



# ESTUDIO ESTRUCTURAL Y APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA:

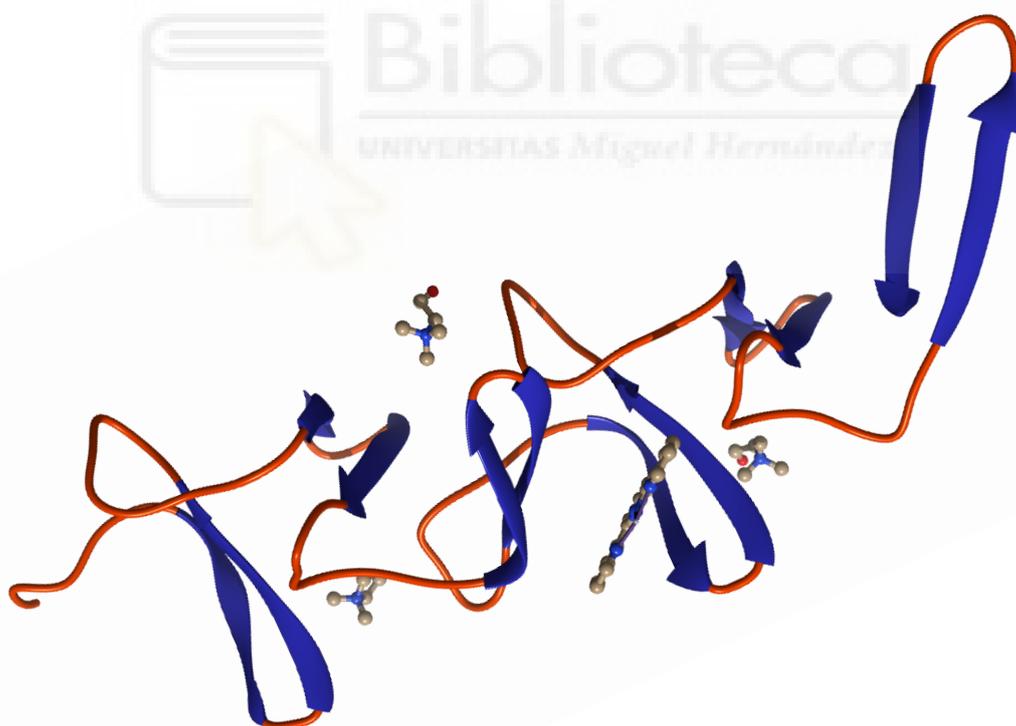
*Antimicrobianos frente a *Streptococcus pneumoniae**

---

**Emma Roig Molina**

**Director:** Jesús Miguel Sanz Morales

**Codirector:** María Beatriz Maestro García-Donas



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE)





Esta tesis se presenta por la modalidad convencional. En el apartado de Anexos se incluye el trabajo previamente publicado, empleado como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y con la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández.

Roig-Molina E, Domenech M, Retamosa MG, Nácher-Vázquez M, Rivas L, Maestro B, García P, García E, Sanz JM. (2019). Widening the antimicrobial spectrum of esters of bicyclic amines: In vitro effect on gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and gram-negative non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863(1): 96-104. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.10.001.

Este trabajo se ha desarrollado en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), dentro del marco de los siguientes proyectos/contratos:

- Proyectos BIO2013-47684-R y BIO2016-79323-R del Ministerio de Economía y Competitividad
- Proyecto RETICS-FEDER RICET RD16/0027/0010 (CIBER de Enfermedades Respiratorias)
- Contratos DECOENZYM, LIPOENZYM y LIPOENZYM II de la UMH con el Instituto Tecnológico AITEX (Alcoy)





Dr. **Jesús Miguel Sanz Morales**, Científico Titular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y Catedrático de Universidad en excedencia, y la Dra. **María Beatriz Maestro García-Donas**, Investigadora contratada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

**CERTIFICAN QUE:**

El trabajo de investigación titulado “**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA: ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Streptococcus pneumoniae***” presentado por **Emma Roig Molina** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Considerando que esta tesis se halla concluida, **AUTORIZAN** su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Fdo.: Dr. Jesús Miguel Sanz Morales

Fdo.: Dra. María Beatriz Maestro García-Donas





Dra. **Asia Fernández Carvajal**, Catedrática y Coordinadora del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

**DA SU CONFORMIDAD** a la lectura de la tesis doctoral titulada **“ESTUDIO ESTRUCTURAL Y APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA: ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Streptococcus pneumoniae*”**, presentada por Emma Roig Molina.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Fdo.: Dra. Asia Fernández Carvajal





*A mis padres*

*A Juan*



Me gustaría dedicar unas palabras a todas las personas que me han ayudado de forma directa e indirecta en la realización de la Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría resaltar que esta Tesis Doctoral ha podido ser finalizada gracias a la ayuda de los directores de la presente, Jesús Sanz y Beatriz Maestro si no hubiera sido por vosotros este reto no podría haberlo superado. Gracias por haber confiado en mis capacidades, por vuestra formación, y sobre todo por la ayuda incondicional que he recibido en todo momento. Sois todo un ejemplo de constancia y esfuerzo, os admiro como investigadores, pero también como personas. Realmente ha sido un placer formar parte del equipo durante todos estos años, solo espero haberos devuelto al menos una parte de todo lo que me habéis enseñado, que no ha sido poco.

A los miembros de este tribunal por aceptar evaluar este trabajo y por sus oportunas contribuciones.

No puedo olvidarme de Manuel Sánchez (Manolo), gracias por haberme ayudado en la parte experimental con “el bicho”, de tu compañía en los congresos, por tu pasión por la ciencia y sobretodo por tu fantástico sentido del humor.

Durante este camino he tenido la suerte de realizar una estancia en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) donde recibí la ayuda de los siguientes investigadores:

- Pedro y Ernesto, gracias por abrirme las puertas del laboratorio.
- A Miri, quedarás en mi recuerdo como “La chica de los Biofilms”, he aprendido mucho de ti.
- A Roberto, gracias por hacerme más llevadera mi estancia en Madrid, eres genial.
- A Montse, gracias por la ayuda que me has brindado tanto dentro como fuera del laboratorio.

Tampoco puedo olvidar a todos los profesores y compañeros que he tenido en el IBMC. En especial a Sara, Oriol, Melissa, María e Iván. Por cierto Sara, tenemos pendiente un viajecito de fin de Tesis. También me gustaría mencionar a las personas que me han facilitado el trabajo técnico, Eva y Maite muchas gracias por vuestra ayuda y por vuestras conversaciones.

Es necesario nombrar a todos aquellos que han colaborado en esta Tesis:

- Dres. Pedro García y Ernesto García del CIB
- Dr. Luis Ignacio Rivas del CIB
- Profesor E.W. Meijer de la Universidad Técnica de Eindhoven, TUE, Holanda
- Prof. Roland Nau de la Universidad de Göttingen, Alemania

Mencionar también a quienes de forma indirecta han permitido que lograra mis objetivos:

- Helena, es necesario que tu nombre quede reflejado en esta Tesis porque hemos compartido momentos en Elche que quedarán en el recuerdo de por vida, y porque eres un ejemplo de tenacidad.
- Mis amigas de toda la vida... tan diferentes, pero siempre juntas.
- También quiero nombra a una persona que me ha ayudado a iniciar una nueva etapa. Belu, siempre estaré agradecida de haberme topado contigo.
- Mi familia, en especial a mis padres. Por haberme enseñado a ser constante, por darme las herramientas para poder formarme y por su incondicional apoyo.
- A mi Juanet, por estar ahí en los momentos buenos y no tan buenos. Por ser la alegría en mis días grises, y por darme la paz que en ocasiones me falta.





## ABREVIATURAS

Además de las aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) y la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), en esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes unidades y abreviaturas:

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>AATGal</b>	2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridesoxi-D-galactosa
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>AMPs</b>	Péptidos antimicrobianos o <i>AntiMicrobial Peptides</i>
<b>ATCC</b>	Colección de Cultivos Tipo Americana
<b>C+Y</b>	Medio CpH8 suplementado con extracto de levadura al 0,08 %
<b>CAMHB</b>	<i>Cation-adjusted Mueller Hinton Broth</i>
<b>CBM</b>	Módulo de unión a colina o <i>choline-binding module</i>
<b>CBP</b>	Proteína de unión a colina o <i>choline-binding protein</i>
<b>CBR</b>	Residuo de unión a colina o <i>choline-binding repeat</i>
<b>CBS</b>	Sitio de unión a colina o <i>choline-binding site</i>
<b>CD</b>	Dicroísmo circular
<b>CDC</b>	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
<b>Cden-EA</b>	Medio C+Y donde la colina es remplazada por la etanolamina
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CLSI</b>	Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico
<b>CLSM</b>	Microscopio (y microscopía) de barrido laser confocal
<b>CM5</b>	Carboximetildextrano
<b>CMC</b>	Concentración crítica micelar
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CpH8</b>	Medio C ajustado a pH 8
<b>CV</b>	Cristal violeta
<b>DEAE</b>	Di-etilaminoetanol
<b>DEAPA</b>	<i>N, N</i> -dietil-1,3-diaminopropano
<b>diSC3-5</b>	3,5-dipropiltiacarbocianina
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco Modifies Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DOC</b>	Desoxicolato sódico
<b>DPC</b>	Dodecilsfosfocolina
<b>DPH</b>	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
<b>EA</b>	Etanolamina
<b>EBA</b>	Éster de amina bicíclica
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos
<b>ENI</b>	Enfermedad neumocócica invasiva
<b>EPS</b>	Sustancias poliméricas extracelulares
<b>Eri</b>	Eritromicina
<b>ermC</b>	Eritromicina ribosoma metilasa

## Abreviaturas

---

<b>FCS</b>	Suero de ternera fecal
<b>FDA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos
<b>FESEM</b>	Microscopio (y microscopía) de barrido de emisión de campo
<b>FM</b>	Módulo funcional o <i>functional module</i>
<b>G</b>	Generación
<b>GalNAc</b>	<i>N</i> -acetil-galactosamina
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetil-glucosamina
<b>gx-cho</b>	Dendrímeros de colina de x generaciones
<b>gx-P4A</b>	Dendrímeros de P4A de x generaciones
<b>HPA</b>	Aglutinina de <i>Helix pomatia</i>
<b>hpf</b>	Horas post-fertilización
<b>hpi</b>	Horas post-infección
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria al 50 %
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1- tiogalactopiranosido
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>LTA</b>	Ácido lipoteicoico
<b>LZ</b>	Cremallera de leucinas
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acetil-murámico
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
<b>Nov</b>	Novobiocina
<b>NPM</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>NTHi</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipificables
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBP</b>	Proteína de unión a penicilina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>P-Cho</b>	Fosforilcolina
<b>PG</b>	Peptidoglicano
<b>PMt</b>	Peso molecular teórico
<b>PPI</b>	Polipropilénimina
<b>PspA</b>	Proteína A de superficie
<b>R</b>	Resistente
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio <i>roswell park memorial institute</i>
<b>S</b>	Svedberg
<b>sBHI</b>	<i>BD Brain Heart Infusion</i> suplementado con hemina y NAD
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmón superficial
<b>TA</b>	Ácido teicoico
<b>TAE</b>	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético, pH 8,0
<b>TEM</b>	Microscopio (y microscopía) electrónica de transmisión

## Abreviaturas

---

<b>U</b>	Unidades de actividad enzimática
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>UNICEF</b>	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
<b>VNC</b>	Vacuna neumocócica conjugada
<b>VNP</b>	Vacuna neumocócica polisacárida
<b>WTA</b>	Ácido teicoico unidos covalentemente a la pared celular
<b><math>\epsilon</math></b>	Coefficiente de extinción teórico

## Aminoácidos

---

<b>A</b>	Alanina
<b>R</b>	Arginina
<b>N</b>	Asparagina
<b>D</b>	Ácido aspártico
<b>C</b>	Cisteína
<b>Q</b>	Glutamina
<b>E</b>	Ácido glutámico
<b>G</b>	Glicina
<b>H</b>	Histidina
<b>I</b>	Isoleucina
<b>L</b>	Leucina
<b>K</b>	Lisina
<b>M</b>	Metionina
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>P</b>	Prolina
<b>S</b>	Serina
<b>T</b>	Treonina
<b>W</b>	Triptófano
<b>Y</b>	Tirosina
<b>V</b>	Valina



## RESUMEN

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es una de las bacterias mundialmente más relevantes causante de varias enfermedades como neumonías, meningitis y otitis media. La vacunación contra neumococo y el tratamiento con antibióticos constituyen dos estrategias de lucha contra este patógeno que resultan incompletas debido a la enorme variedad serotípica de este microorganismo y a los crecientes niveles de resistencia a los antibióticos. Estos problemas inducen a la búsqueda de dianas terapéuticas alternativas frente a las que se desarrollen nuevos antimicrobianos que soslayen las complicaciones derivadas de la resistencia a antimicrobianos. Las proteínas de unión a colina (CBPs) de *S. pneumoniae* comprenden una familia de polipéptidos modulares involucrados en eventos esenciales para la viabilidad y virulencia de este patógeno. Las CBPs reconocen los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos utilizando los llamados módulos de unión a colina (CBMs), constituidos por motivos repetidos de unos 20 residuos (CBRs, repeticiones de unión a colina).

El propósito principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos frente a *S. pneumoniae*, focalizando la investigación en la familia de las CBPs. En concreto la Tesis se puede dividir en tres líneas en base a cada uno de los compuestos estudiados:

### **Ésteres de aminas bicíclicas (EBAs)**

Los EBAs son análogos de colina que se diseñaron inicialmente como inhibidores de las CBPs, sin embargo, estudios anteriores demostraron actuar como inhibidores del crecimiento de *S. pneumoniae* presentando una actividad lítica inesperada. En este trabajo se demuestra que los EBAs actúan como desestabilizadores de la membrana celular. Se ha analizado la actividad inhibidora y desintegradora de los EBAs en biopelículas neumocócicas, el compuesto EBA 31 produjo el mayor efecto sobre las biopelículas de *S. pneumoniae*, así como en biopelículas mixtas de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* no tipificable. Además, los EBAs resultaron ser efectivos frente a la proliferación de promastigotes de *Leishmania donovani*. Estos resultados respaldan el papel de los EBAs como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos de amplio espectro, debido posiblemente a su capacidad desestabilizadora de la membrana celular, siendo efectivos frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como frente a patógenos eucariotas.

## **Módulos de unión a colina (CBMs)**

Se ha estudiado la capacidad de tres CBMs naturales (C-ClytA, C-Cpl1, C-CbpD) y un derivado (LZ-C-LytA) para competir con los CBPs del huésped por el acceso a la colina en la superficie bacteriana, con el objetivo de interferir con la actividad de este último. La interacción de los CBMs con colina libre y mimicos sintéticos de la pared celular se evaluó mediante espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular, así como resonancia de plasmón superficial. Por otro lado, la adición exógena de CBM a cultivos planctónicos neumocócicos causó el encadenamiento celular, la agregación y la sedimentación bacteriana. Este resultado nos llevó a evaluar la capacidad de los CBMs para promover la fagocitosis bacteriana por los macrófagos peritoneales, lo que sugiere que estos polipéptidos podrían constituir la base para candidatos antimicrobianos prometedores basados en la inducción natural del sistema de defensa del huésped.

## **Péptidos derivados de la autolisina de LytA**

Estudios previos del laboratorio habían demostrado que la secuencia de un CBR aislado de la autolisina LytA (P4A) dispone de toda la información necesaria para adquirir una estructura similar a la nativa y siendo capaz de reconocer específicamente la colina, aunque con afinidad residual. Con el propósito de encontrar el mínimo requerimiento estructural necesario para obtener un efecto similar al obtenido en las CBMs se llevó a cabo el estudio de versiones simplificadas, del péptido P4A y construcciones derivadas de éste por duplicación y triplicación de la misma secuencia en tándem (P4B y P4C). Se evaluó la interacción de los péptidos por colina libre, así como se estudió el cambio conformacional de horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  inducido por micelas de detergente. Se comprobó que los péptidos P4B y P4C ejercen un efecto bactericida sobre cultivos *in vitro* de neumococo debido a la salida prematura de la amidasa LytA causada por la perturbación de la membrana celular. Con el propósito de incrementar su eficacia por efectos de multivalencia se procedió al diseño de dendrímeros conteniendo varias copias del péptido P4A (g2-P4A y g3-P4A). Los compuestos g2-P4A y g3-P4A provocaron la destrucción bacteriana a bajas concentraciones (orden nanomolar) mediante un mecanismo independiente de las enzimas líticas del patógeno y de la presencia de colina en la superficie. Finalmente se evaluó la eficacia del dendrímero g3-P4A en modelos animales de pez cebra demostrando ejerce un efecto protector frente a enfermedad neumocócica.

## SUMMARY

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a Gram-positive bacterium responsible for infections with high impact such as pneumonia, meningitis and otitis media. Pneumococcal vaccination and antibiotic treatment are two strategies to combat this pathogen, but they are incomplete due to the wide serotype variety of *S. pneumoniae* and the increasing levels of resistance to traditional antibiotics. These problems foster the search for alternative therapeutic targets for the development of new antimicrobials that avoid complications arising from antimicrobial resistance. Choline binding proteins (CBPs) of *S. pneumoniae* are a family of modular polypeptides that play essential roles for this pathogen. CBPs recognize choline residues present in teichoic acids using the so-called choline binding modules (CBMs), which in turn contain repeated motifs of around 20 residues (CBRs, choline binding repeats).

The main purpose of this Doctoral Thesis is the development of new antimicrobial agents against *S. pneumoniae*, with a focus on the CBP family. This Thesis has been structured in three sections according to the studied compounds:

### **Esters of bicyclic amines (EBAs)**

EBAs are choline analogs that were initially designed as inhibitors of CBPs. However, previous studies had shown to act as growth inhibitors of *S. pneumoniae*, displaying an unexpected lytic activity. In this work, we demonstrate that EBAs are destabilizers of the membrane cell. The inhibitory and disintegrating activity of EBAs in pneumococcal biofilms was tested. The EBA 31 compound produced the highest effect in the biofilms of *S. pneumoniae*, as well as in mixed biofilms formed by *S. pneumoniae* plus non-typeable *Haemophilus influenzae*. In addition, EBAs proved to be effective against the proliferation of promastigotes from *Leishmania donovani*. These results support the role of EBAs as a promising alternative for the development of new broad-spectrum antimicrobial drugs, being effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as against eukaryotic pathogens.

## **Choline binding modules (CBMs)**

We have tested the ability of three natural CBMs (C-LytA, C-CbpD, C-Cpl1) and one engineered derivative (LZ-C-LytA) to compete with host CBPs for the access to choline on the bacterial surface, with the aim of interfering with CBPs activity. The interaction of the CBMs with free choline and synthetic cell-wall mimics was evaluated by fluorescence and circular dichroism spectroscopies, as well as surface plasmon resonance. On the other hand, exogenous addition of CBMs to pneumococcal planktonic cultures caused cell-chaining, bacterial aggregation and sedimentation. This result prompted us to assess the capacity of CBMs to promote bacterial phagocytosis by peritoneal macrophages, suggesting that these polypeptides might constitute a promising basis for antimicrobial candidates based on the natural induction of the host defense system.

## **Peptides derived from LytA autolysin**

Previous laboratory studies had shown that an isolated CBR from the pneumococcal LytA autolysin (P4A) has sufficient information to acquire a native-like structure, being able to recognize choline, although with residual affinity. In order to find the minimum number of repeats necessary to obtain a similar effect than natural CBMs, the analysis of simple constructions resulted from duplication and triplication of the P4A sequence (P4B and P4C peptides) was carried out. Next, we evaluated the interaction of the peptides with free choline, as well as the conformational change from  $\beta$ -hairpin to  $\alpha$ -helix as induced by detergent micelles. Moreover, P4B and P4C peptides showed bactericidal activity in pneumococcal cultures due to the premature release of LytA amidase caused by cell membrane alteration. In order to increase its effectiveness through multivalence effects, dendrimers with several copies of P4A peptide (g2-P4A and g3-P4A) were synthesized and assayed. Here we demonstrate that g2-P4A and g3-P4A compounds are potent antimicrobials at very low concentrations (nanomolar order) by a mechanism independent of host lytic enzymes or the presence choline on the surface. Finally, assays on zebrafish infection models showed that g3-P4A exerts a protective effect against pneumococcal disease *in vivo*.





# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y ASPECTOS HISTÓRICOS.....	1
2. EPIDEMIOLOGÍA .....	3
3. ESTRATEGIAS ACTUALES CONTRA <i>S. pneumoniae</i> .....	4
3.1. Vacunas .....	4
3.2. Antibióticos .....	6
4. LA PARED CELULAR DE <i>S. pneumoniae</i> .....	7
4.1. Importancia de la colina .....	9
4.2. Proteínas de superficie .....	11
4.2.1. Proteínas de unión a colina (CBPs) .....	11
5. CBPs y BIOPELÍCULAS MICROBIANAS DE NEUMOCOCO.....	23
6. NUEVAS ESTRATEGIAS ANTIMICROBIANAS .....	25
6.1. Péptidos antimicrobianos.....	25
6.1.1. Estructura de los AMPs.....	26
6.1.2. Propiedades comunes de los AMPs.....	27
6.1.3. Mecanismo de acción de los AMPs.....	28
6.1.4. Desafíos de los AMPs.....	31
6.2. Enzibióticos.....	33
6.3. Aproximaciones nanotecnológicas: Dendrímeros antimicrobianos.....	34
6.4. Nuevas estrategias específicas frente a neumococo: antimicrobianos basados en las CBPs .....	36
6.4.1. CBPs como enzibióticos .....	36
6.4.2. Análogos de colina.....	37
6.4.3. Dendrímeros funcionalizados con colina y análogos de colina .....	39
II. OBJETIVOS.....	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS .....	47
1.2. Medios, condiciones de cultivo y de conservación.....	48
2. TÉCNICAS DE DNA.....	49
2.1. Extracción de DNA cromosómico .....	49
2.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	49
2.3. Secuenciación .....	50
2.4. Preparación y transformación de células competentes.....	50
3. TÉCNICAS DE TRABAJO CON PROTEÍNAS. ....	50
3.1. Síntesis de péptidos.....	50
3.2. Síntesis de dendrímeros. ....	51
3.3. Expresión y purificación de proteínas.....	53

3.4.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida .....	56
3.5.	Valoración de la concentración de proteína pura.....	56
<b>4.</b>	<b>TÉCNICAS BIOFÍSICAS .....</b>	<b>56</b>
4.1.	Dicroísmo circular (CD).....	56
4.2.	Espectroscopía de fluorescencia .....	58
4.3.	Cálculo de la concentración micelar crítica .....	60
4.4.	Unión de proteínas a superficies .....	60
4.4.1.	Nanopartículas magnéticas (NPMs) revestidas con DEAE. ....	61
4.4.2.	Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) .....	62
4.5.	Ultracentrifugación analítica: velocidad de sedimentación.....	64
<b>5.</b>	<b>MODELADO DE LAS PROTEÍNAS LZ-C-LytA y C-CbpD.....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.....</b>	<b>65</b>
6.1.	Métodos de estudio de células bacterianas crecidas en cultivo planctónico .....	65
6.1.1.	Determinación de la viabilidad celular.....	65
6.1.2.	Ensayo bactericida .....	66
6.1.3.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	66
6.1.4.	Ensayo de permeabilización de la membrana plasmática .....	67
6.1.5.	Ensayo de fagocitosis.....	68
6.1.6.	Actividad leishmanicida .....	69
6.1.7.	Visualización de muestras de neumococo en cultivos planctónicos.....	70
6.2.	Métodos relativos al estudio de células bacterianas crecidas en biopelícula.....	71
6.2.1.	Formación de la biopelícula.....	71
6.2.2.	Ensayos de inhibición y disgregación de biopelículas .....	72
6.2.3.	Visualización de biopelículas por CLSM .....	73
<b>7.</b>	<b>ENSAYOS CON PEZ CEBRA COMO MODELO ANIMAL .....</b>	<b>74</b>
7.1.	Ensayos de toxicidad aguda.....	74
7.2.	Ensayo de eficacia frente a una infección en adultos de pez cebra .....	75
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>ESTUDIO DE ÉSTERES DE AMINAS BICÍCLICAS (EBAs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE A <i>S. pneumoniae</i>. .....</b>	<b>79</b>
1.1.	Desestabilización de la membrana plasmática por efecto de la adición de EBAs. ...	79
1.2.	Efecto de los EBAs sobre biopelículas neumocócicas. ....	84
1.3.	Efecto de EBA 31 en biopelículas mixtas de <i>S. pneumoniae</i> -NTHi .....	89
1.4.	Actividad leishmanicida de los EBAs.....	92
<b>2.</b>	<b>ESTUDIO DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA (CBMs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS NO LÍTICOS FRENTE A <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>94</b>
2.1.	Caracterización estructural de los módulos C-CbpD y C-Cpl1.....	96
2.1.1.	Afinidad por colina libre .....	101
2.1.2.	Afinidad por sustratos insolubles. ....	103

2.2.	Efecto de los CBMs exógenos en cultivos líquidos de <i>S. pneumoniae</i> .....	107
2.3.	Incremento de la eficacia de un CBM frente a <i>S. pneumoniae</i> por presentación multivalente de la proteína. ....	112
2.4.	Efecto de los diferentes CBMs estudiados sobre la fagocitosis de <i>S. pneumoniae</i> por macrófagos peritoneales .....	117
<b>3.</b>	<b>ESTUDIO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA AUTOLISINA LytA COMO POSIBLES ANTIMICROBIANOS líticos FRENTE A <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>119</b>
3.1.	Caracterización estructural de los péptidos derivados de CBR4 de LytA .....	120
3.1.1.	Reconocimiento de colina .....	121
3.1.2.	Estudios de estabilidad térmica .....	122
3.1.3.	Afinidad por colina libre .....	126
3.1.4.	Evaluación de los péptidos derivados de LytA como "interruptores moleculares" .....	130
3.2.	Efecto de los péptidos derivados de CBR4 de LytA en cultivos planctónicos de <i>S. pneumoniae</i> .....	134
3.2.1.	Efecto bactericida de los péptidos derivados de CBR4 de LytA en cultivos de <i>S. pneumoniae</i> .....	136
3.2.2.	Ensayos de permeabilidad en cultivos de <i>S. pneumoniae</i> .....	138
3.3.	Determinantes moleculares de la función antimicrobiana de P4C.....	139
3.3.1.	Caracterización estructural de las variantes peptídicas de P4C.....	142
3.3.2.	Ensayos de permeabilidad de las variantes de P4C en cultivos de <i>S. pneumoniae</i> .....	146
3.3.3.	Efecto de las variantes peptídicas de P4C en cultivos de <i>S. pneumoniae</i> .....	147
3.4.	Mecanismo biológico de la actividad antimicrobiana de P4C.....	148
3.5.	Dendrímeros funcionalizados con el péptido P4A .....	151
3.5.1.	Caracterización estructural de los dendrímeros .....	152
3.6.	Microscopía electrónica de cultivos de <i>S. pneumoniae</i> en presencia del péptido P4C y del dendrímero g3-P4A.....	158
3.7.	Mecanismo biológico de la actividad de g3-P4A.....	161
3.8.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto g3-P4C.....	162
3.9.	Actividad protectora de g3-P4A en un modelo animal: pez cebra.....	163
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>167</b>
<b>1.</b>	<b>ESTUDIO DE ÉSTERES DE AMINAS BICÍCLICAS (EBAs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE A <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>169</b>
<b>2.</b>	<b>ESTUDIO DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA (CBMs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS NO LÍTICOS FRENTE A <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>173</b>
<b>3.</b>	<b>ESTUDIO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA AUTOLISINA LytA COMO POSIBLES ANTIMICROBIANOS LÍTICOS FRENTE A <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>177</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>187</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>193</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>215</b>



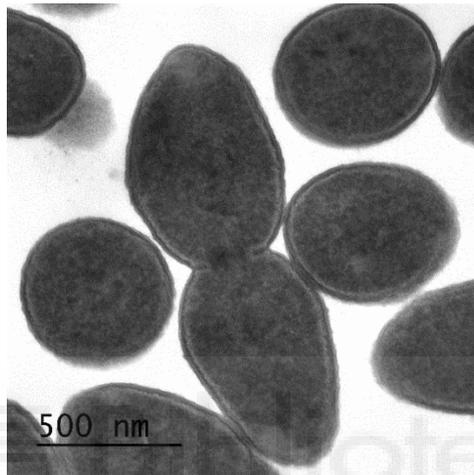


## I. INTRODUCCIÓN



## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y ASPECTOS HISTÓRICOS

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa y catalasa negativa de 0,5–1,25  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 1), que se encuentra frecuentemente formando parte de la microbiota del tracto respiratorio superior humano <sup>1</sup>. Es una bacteria inmóvil que no forma endósporas.



**Figura 1.** Imagen por microscopía electrónica de una sección longitudinal de diplococos de *S. pneumoniae* (cepa R6CIB17). Imagen tomada por la autora de la tesis.

*S. pneumoniae* fue descubierto de forma independiente y casi simultánea en 1881 por los microbiólogos Louis Pasteur en Francia <sup>2</sup> y George Sternberg en Estados Unidos <sup>3</sup>. En 1884, el bacteriólogo danés Christian Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre, no tanto para diferenciar bacterias sino para facilitar la visualización del neumococo en el tejido pulmonar <sup>4</sup>. Este microorganismo ha recibido desde entonces una gran variedad de denominaciones, habiéndose designado como *Micrococcus pneumoniae* <sup>5</sup>, más tarde como *Diplococcus pneumoniae* <sup>6</sup> y, finalmente, *Streptococcus pneumoniae* <sup>7</sup>, siendo esta última denominación aceptada oficialmente en 1980.

*S. pneumoniae* ha desempeñado un papel central en el desarrollo de la biología molecular. El científico británico Frederick Griffith obtuvo en 1928 la primera evidencia de transformación genética bacteriana trabajando con *S. pneumoniae*. Como parte de sus experimentos, Griffith inyectó conjuntamente en ratones una cepa encapsulada (virulenta) inactivada por calor, junto con una cepa no encapsulada (no virulenta).

Comprobó que en los ratones se desencadenaba una infección mortal, y que los microorganismos que se aislaban del animal eran de tipo capsulado <sup>8</sup>. Lo que no supo dilucidar en ese momento es que el responsable de este cambio era el DNA procedente de la cepa encapsulada, y denominó la sustancia responsable de este efecto como “principio transformante”. Años más tarde el principio fue identificado a nivel molecular gracias a las investigaciones de Oswald Avery, Maclyn McCarty y Colin MacLeod, quienes demostraron que el DNA constituye la unidad básica del material genético <sup>9</sup>.

La identificación microbiológica de *S. pneumoniae* se realiza por varias técnicas. Al cultivarse en placas de agar sangre, neumococo origina la lisis de los glóbulos rojos mediante: 1) alfa-hemólisis en condiciones aeróbicas (oxidación de la hemoglobina de la sangre a metahemoglobina por el peróxido de hidrogeno secretado por la bacteria, apareciendo un halo verdoso alrededor de la colonia) <sup>10-12</sup>, y 2) beta-hemólisis en condiciones anaerobias (se produce la lisis total de los glóbulos rojos por desestabilización y rotura de la membrana celular debido a la acción de la neumolisina, apareciendo un halo transparente alrededor de la colonia) <sup>13</sup>. Además, neumococo se solubiliza en sales biliares como el desoxicolato sódico (DOC), agente que dispara la acción incontrolada de la principal autolisina de neumococo, LytA, una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, que hidroliza la pared celular provocando la autólisis del cultivo al final de la fase estacionaria en un proceso dependiente de colina como se describirá más adelante. Esta prueba permite diferenciar *S. pneumoniae* (soluble en sales biliares) de otros estreptococos alfa-hemolíticos (no solubles en sales biliares) <sup>14,15</sup>.

La estructura más externa de neumococo es la cápsula <sup>16</sup>, formada por polisacáridos que se encuentran unidos mediante enlaces covalentes al peptidoglicano (PG) de la pared celular, o a componentes de la membrana plasmática <sup>17-19</sup>. Las diferencias en la inmunquímica de dichos polisacáridos han permitido identificar hasta el momento 98 tipos serológicos distintos <sup>20,21</sup>. Los diferentes serotipos a su vez se clasifican en serogrupos, con un total de 46, numerados del 1 al 48 (los números 26 y 30 no se utilizan) <sup>22</sup>.

## 2. EPIDEMIOLOGÍA

Las enfermedades causadas por *S. pneumoniae* constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial <sup>23,24</sup>. *S. pneumoniae* se encuentra comúnmente de forma asintomática en la nasofaringe de individuos sanos, siendo más frecuente en niños (20-50 %) que en adultos (5-20 %) <sup>1</sup>, proporcionando así un reservorio natural y un mecanismo de transmisión entre personas <sup>1,25</sup>. Neumococo es un patógeno oportunista que afecta especialmente a huéspedes con un sistema inmunológico poco desarrollado, debilitado o deteriorado, por lo que existe una mayor tasa de incidencia de la infección en niños menores de dos años y en ancianos <sup>1</sup>.

Las enfermedades de mayor relevancia que produce la infección neumocócica son la neumonía, meningitis, otitis media y sepsis <sup>1,26</sup>. La neumonía neumocócica es la principal causa de morbilidad y mortalidad por infección respiratoria de la población infantil y anciana a nivel mundial; afecta tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo, aunque la mayor prevalencia se da en el sur de Asia y en África subsahariana, y en 2016 fue responsable de un total de 1.189.937 muertes en el mundo <sup>24</sup>. De hecho, la Organización Mundial de la salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) catalogan la neumonía como “*el asesino olvidado de los niños*” <sup>27,28</sup>. A su vez, *S. pneumoniae* es también el principal agente causal de otitis media <sup>29</sup>, siendo el principal motivo de infección en bebés y en niños menores de 5 años: a los 12 meses de edad, más del 60 % de los niños han tenido al menos un episodio de otitis media aguda <sup>30</sup>.

Por su parte, neumococo es considerado como un patógeno de prioridad media (grupo 3) en la lista de «patógenos prioritarios» resistentes a antibióticos publicada por la OMS <sup>31</sup>. Este listado es una herramienta elaborada para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, con el propósito de combatir el creciente problema mundial de resistencia a los antimicrobianos. Además el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos clasifica *S. pneumoniae* como microorganismo con un nivel de amenaza grave <sup>32</sup>.

En cuanto a la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* causantes de la enfermedad neumocócica, se ha identificado que tras la introducción de la primera vacuna conjugada polivalente (VNC7) el serotipo 19A fue la principal causa de enfermedad neumocócica en América, Europa y el Pacífico occidental con una prevalencia aproximadamente del 20% de los casos estudiados, junto con otros serotipos no incluidos en VNC7<sup>33</sup>. Tras la administración de vacunas de mayor alcance (VNC10 y VNC13) en América del Norte y Europa, aproximadamente la mitad de los casos de enfermedad neumocócica en la niñez se debieron a serotipos no incluidos en las vacunas y la contribución global específica del serotipo 19A fue menor<sup>33</sup>. En concreto en Europa, las principales cepas causantes de la enfermedad fueron 12F, 10A, 24F, 22F y 15C, mientras que en América del Norte fueron 22F, 33F, 15B, 38 y 35B<sup>33</sup>.

### 3. ESTRATEGIAS ACTUALES CONTRA *S. pneumoniae*

#### 3.1. Vacunas

Existen actualmente dos tipos de vacunas antineumocócicas disponibles: la constituida por polisacáridos capsulares (VNP) y las vacunas conjugadas (VNC). La VNP que se comercializa en la actualidad (VNP23, Pneumovax23<sup>®</sup>) contiene polisacáridos capsulares de 23 serotipos diferentes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F). Esta vacuna está indicada para personas de 50 años de edad en adelante, y para mayores de 2 años que presenten un alto riesgo de contraer la enfermedad neumocócica. La respuesta inmune tras la recepción de esta vacuna es de tipo T independiente (no se establece memoria inmune mediada por células T) y por tanto su efecto es de corta duración. Además, en los niños menores de dos años es poco inmunogénica, ya que los antígenos vacunales estimulan las células de la zona marginal esplénica B que no maduran hasta pasada esa edad<sup>34</sup>.

Por su parte, las VNC utilizan polisacáridos capsulares como antígenos a los que se les une covalentemente una proteína transportadora de gran capacidad inmunogénica, comúnmente CRM197, una variante no tóxica de la toxina diftérica<sup>35</sup>. Estas vacunas sí estimulan la respuesta mediada por linfocitos T, posibilitando así una respuesta inmune más efectiva y permanente. Además, es apta para niños menores de

dos años, los cuales constituyen uno de los principales grupos de riesgo <sup>34</sup>. Al contrario que la vacuna VNP23, las vacunas conjugadas no provocan fenómenos de respuesta inmunológica o tolerancia inmune tras dosis repetidas y disminuyen la colonización nasofaríngea de la mayoría de los serogrupos vacunales al proporcionar inmunidad en las mucosas. La vacuna neumocócica conjugada heptavalente (VNC7; Prevenar<sup>®</sup>, Pfizer) fue la primera de este tipo que se comercializó para su uso en población pediátrica, e incluía los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F. La implementación generalizada de VNC7 dio lugar a una disminución de la carga global de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) y de las hospitalizaciones asociadas a neumonía, teniendo efecto no solo en niños vacunados, sino también en niños y adultos no vacunados (inmunidad de grupo) <sup>36-38</sup>. Sin embargo, la colonización por serotipos no incluidos en la VNC7 se incrementó considerablemente con posterioridad, principalmente por el serotipo 19A, que se identificó consistentemente como el más frecuente asociado con los casos de ENI <sup>33,39</sup>. Posteriormente se desarrollaron vacunas de mayor valencia: la 10-valente (VNC10; Synflorix<sup>®</sup>, GSK), que incluye los siete serotipos de VNC7 más los serotipos 1, 5 y 7F, y la 13-valente (VNC13; Prevnar13<sup>®</sup>, Wyeth/Pfizer), conteniendo los mismos serotipos que aparecen en la VNC10 más el 3, 6A y 19A. En los últimos años se ha desarrollado la vacuna 15-valente, que cubre los mismos serotipos que VNC13 más 22F y 33 <sup>40</sup>. VNC15 muestra un perfil de seguridad aceptable y provoca un aumento sustancial de anticuerpos frente a todos los serotipos incluidos en la vacuna <sup>41</sup>, y en la actualidad se encuentra en estudios preclínicos <sup>42</sup>. En España actualmente se dispone de tres vacunas antineumocócicas: VNP23, VNC10 y VNC13 <sup>34</sup>.

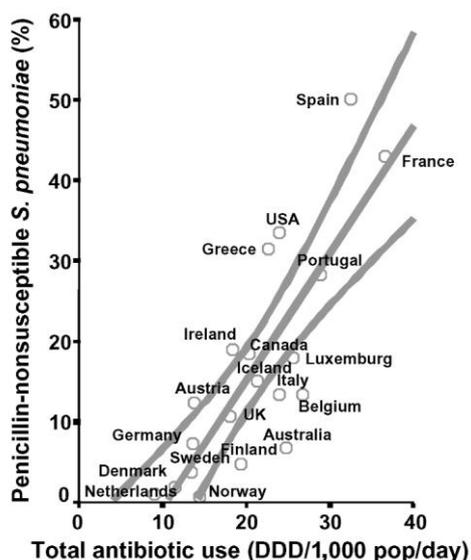
Sin embargo, las estrategias de vacunación actuales no suponen una solución definitiva, ya que los serotipos no incluidos en las vacunas pueden llegar a ser predominantes a medio plazo, haciendo reemerger la enfermedad. De hecho, el aumento de casos de enfermedad neumocócica invasiva producidos por serotipos no incluidos en la vacuna VNC13 está siendo cada vez más frecuente <sup>33,43</sup>.

### **3.2. Antibióticos**

La introducción de la penicilina (antibiótico  $\beta$ -lactámico) en 1940 condujo a una reducción rápida de la mortalidad asociada a la enfermedad neumocócica <sup>44</sup>. El mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos consiste en la unión a las proteínas de unión a penicilina (PBPs), involucradas en el paso final de la formación del PG de la bacteria, dando lugar a la reducción de la síntesis y remodelación del mismo, con la consiguiente pérdida de integridad de la pared celular y la inhibición del crecimiento o la lisis celular.

La excesiva prescripción de antibióticos a partir de la década de los años 60 del pasado siglo contribuyó a la aparición de resistencias; el primer informe de resistencia registrado data de 1969 en Nueva Guinea, aunque la cepa en cuestión seguía siendo susceptible a otros antibióticos <sup>45</sup>. El mecanismo clásico de resistencia en *S. pneumoniae* consiste en la alteración de las PBPs que confiere una afinidad reducida a los  $\beta$ -lactámicos <sup>46,47</sup>. No se prestó suficiente atención al problema de la resistencia a antibióticos hasta 1977, cuando en Sudáfrica apareció una cepa que, además de mostrar un aumento significativo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la penicilina, también presentaba resistencia a otros antibióticos, como los macrólidos <sup>48,49</sup>.

En la actualidad la resistencia a los antibióticos constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, y refleja el uso excesivo de estos medicamentos, así como la falta de desarrollo de nuevos antimicrobianos para abordar el desafío <sup>50</sup>. En el caso concreto de *S. pneumoniae*, su alta capacidad natural de sufrir transformación le aporta importantes ventajas al adquirir fácilmente nuevo material genético, a lo cual se le suma su gran capacidad para colonizar la nasofaringe durante largos periodos de tiempo, proporcionándole el entorno perfecto para llevar a cabo la transformación y recombinación de DNA exógeno. Los aislados de *S. pneumoniae* no susceptibles a la penicilina ascendieron a un total de 35 % en 2004 en los EE. UU., mientras que en Europa los datos varían significativamente entre países, habiendo alcanzado niveles de hasta el 50 % (Figura 2)<sup>51,52</sup>, lo que refleja la consecuencia del alto grado de exposición a antibióticos <sup>53</sup>.



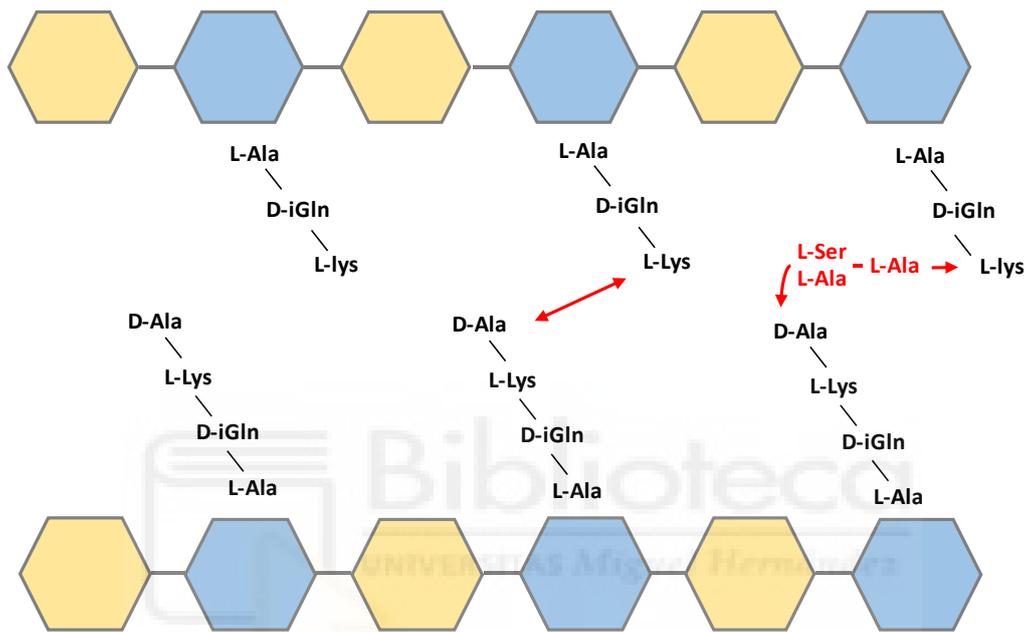
**Figura 2.** Prevalencia de aislados de *S. pneumoniae* no sensibles a penicilina (eje vertical) en 20 países industrializados en relación al uso total de antibióticos en el contexto ambulatorio. Imagen tomada de Albrich y col.(2004) <sup>53</sup>.

A partir de todos estos datos es posible vislumbrar en el futuro próximo un escenario preocupante con respecto al control de la infección neumocócica, en el que el aumento de la resistencia a antibióticos tradicionales constituirá, y constituye ya, una seria amenaza para la salud a nivel mundial. Debido, pues, a las limitaciones que presentan las estrategias actuales para combatir a *S. pneumoniae*, existe un gran interés en la identificación y caracterización de nuevas dianas terapéuticas. Cualquier investigación sobre potenciales blancos debe incluir factores comunes a todos los serotipos, y que sean dianas para una quimioterapia selectiva y efectiva, dificultando en lo posible la aparición de procesos de resistencia. Tales dianas pueden encontrarse en la superficie bacteriana, una fuente tradicional a la vez que excelente para el desarrollo de antibióticos <sup>54</sup>.

#### 4. LA PARED CELULAR DE *S. pneumoniae*

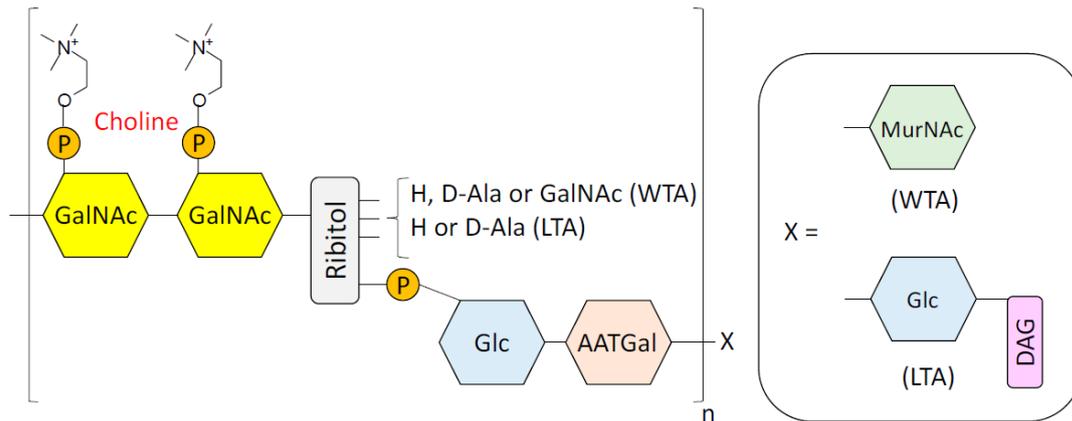
La envoltura bacteriana más externa la constituye la pared celular; ésta se encuentra situada alrededor de la membrana y aporta rigidez a la célula, a la vez que la protege de su posible lisis mecánica u osmótica. El componente básico de la pared celular es el PG (también conocido como mureína) constituido por un heteropolímero de ácido *N*-acetil-murámico (MurNAc) y de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) unidos mediante enlaces glicosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 3). El grupo D-lactilo de cada residuo de

MurNAc se encuentra sustituido por un segmento peptídico cuya composición más habitual en el PG naciente de neumococo es L-Ala-D-γ-Gln-L-Lys-D-Ala. Estos segmentos peptídicos conectan entre sí a través de la unión entre el grupo carboxilo de la D-Ala en posición 4 de la cadena peptídica y el grupo amino de la cadena lateral de la L-Lys en posición 3, bien directamente o bien a través de pequeños puentes peptídicos cuya composición más frecuente es L-Ser-L-Ala o L-Ala-L-Ala (Figura 3) <sup>55-57</sup>.



**Figura 3.** Representación esquemática de la estructura del PG de neumococo formado por cadenas glicánicas de residuos alternantes de GlcNAc (naranja) y MurNAc (azul) y de los segmentos peptídicos. Las uniones interpeptídicas pueden ser directas o mediadas por puentes peptídicos (en rojo).

La pared celular de neumococo presenta múltiples capas de PG y polímeros de ácido teicoico (TA) unidos covalentemente a la pared (WTA), y polímeros de ácido lipoteicoico unidos a la membrana (LTA) <sup>58-62</sup>. Tanto los LTA como los WTA comparten la misma unidad básica de repetición, formada por varios elementos: 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridesoxi-D-galactosa (AATGal), D-glucosa, ribitol-fosfato y dos moléculas de N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Figura 4) <sup>60,63-65</sup>.



**Figura 4.** Modelo estructural de los WTA y LTA de la pared celular de neumococo, de acuerdo con Seo y cols. (2008) <sup>60</sup> y posteriormente refinado por Gisch y cols. (2013) <sup>61</sup>. GalNAc, N-acetilgalactosamina; P, grupo fosfato; Glc, glucosa; AATGal, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridesoxigalactosa; MurNAc, ácido N-acilmurámico; DAG, diacilglicerol. Imagen tomada de Maestro y Sanz (2016) <sup>66</sup> con permiso de los autores.

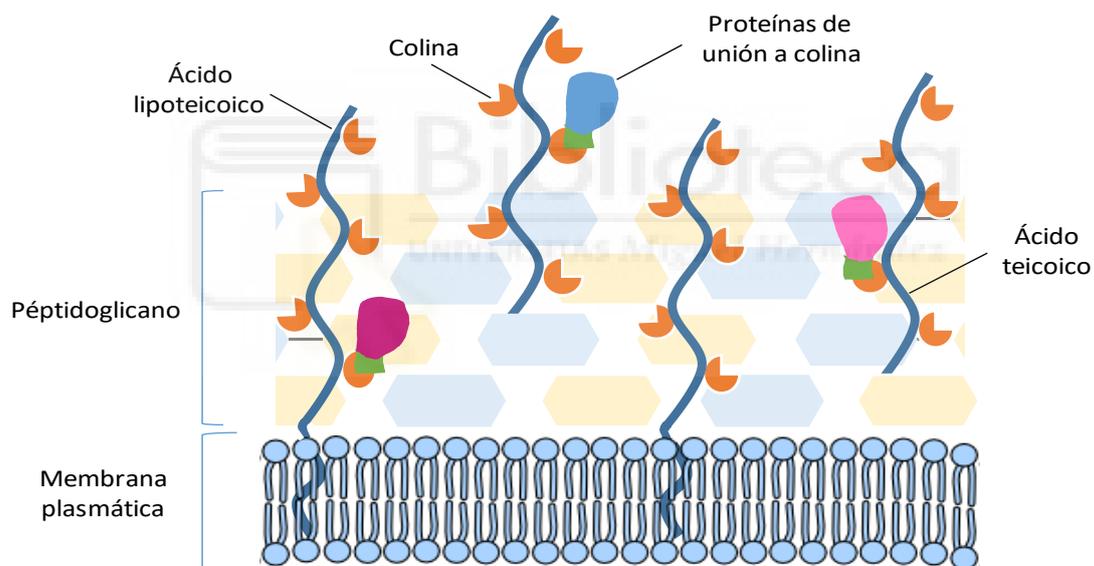
#### 4.1. Importancia de la colina

La colina, en forma de fosforilcolina (*P*-Cho) se encuentra anclada a las moléculas de GalNAc de los TA (Figura 5). El grado de sustitución en los residuos de GalNAc depende de la cepa <sup>63,67,68</sup>. Así, por ejemplo, la cepa R6 posee el 50 % de los TA con una unidad de GalNAc sustituida y el otro 50 % con las dos unidades de GalNAc modificadas con *P*-Cho <sup>60,64</sup>.

Los residuos de *P*-Cho juegan un papel importante en la fisiología celular y en la patogénesis de neumococo <sup>69</sup>. La *P*-Cho interacciona con varios factores del sistema inmune innato del huésped como son la proteína C reactiva (CRP) <sup>70</sup>, la L-ficolina <sup>71</sup> y el receptor depurador CD36 <sup>72</sup>, dando lugar a la activación del complemento y protegiendo frente a la infección. Los residuos de colina también se unen a ciertas proteínas del mieloma murino <sup>73</sup>, así como al receptor activador plaquetario (PAF) acoplado a la proteína G que promueve la adherencia y la invasión neumocócica a la célula huésped <sup>74</sup>. De hecho, aquellas cepas que carecen de residuos de colina no pueden colonizar el tracto respiratorio superior en ratones y son menos virulentas en un modelo de sepsis murina <sup>75</sup>. Finalmente, los residuos de colina constituyen los sitios de unión de las proteínas de unión a colina (CBPs del inglés "*Choline-Binding Proteins*"), incluyendo en

este grupo no solo las proteínas propias de *S. pneumoniae* si no también muchas de las enzimas líticas de sus bacteriófagos <sup>76</sup>.

A pesar de que la colina es un factor de crecimiento imprescindible para neumococo, éste no es capaz de sintetizarla por sí mismo y debe obtenerla a partir del medio de crecimiento <sup>77,78</sup>. La colina puede ser reemplazada en el medio por diferentes análogos como la etanolamina (EA) <sup>79</sup>. Sin embargo, aunque las células cultivadas en estas condiciones son capaces de crecer, muestran numerosas anomalías: no pueden sufrir transformación genética, no realizan la autólisis en la fase estacionaria, son resistentes al bacteriófago Dp-1, y las células hijas no se separan tras la división celular por lo que generan largas cadenas <sup>79</sup>. Todas estas características se observan también en determinadas cepas neumocócicas que son independientes de colina <sup>80-82</sup>.



**Figura 5.** Representación esquemática de la capa de PG. Las CBPs están presentes en la capa de PG, asociadas a restos de colina anclados a los WTA y LTA.

La colina se encuentra en la pared celular de otras especies además de en *S. pneumoniae*, tales como *S. pseudopneumoniae* <sup>83</sup>, *S. mitis* <sup>84-88</sup> y *S. oralis* <sup>89,90</sup>, así como en otras bacterias más alejadas filogenéticamente como *Clostridium beijerinckii* <sup>91</sup>, *Clostridium difficile* <sup>92,93</sup> y *Erysipelothrix rhusiopathiae* <sup>94-97</sup>.

## 4.2. Proteínas de superficie

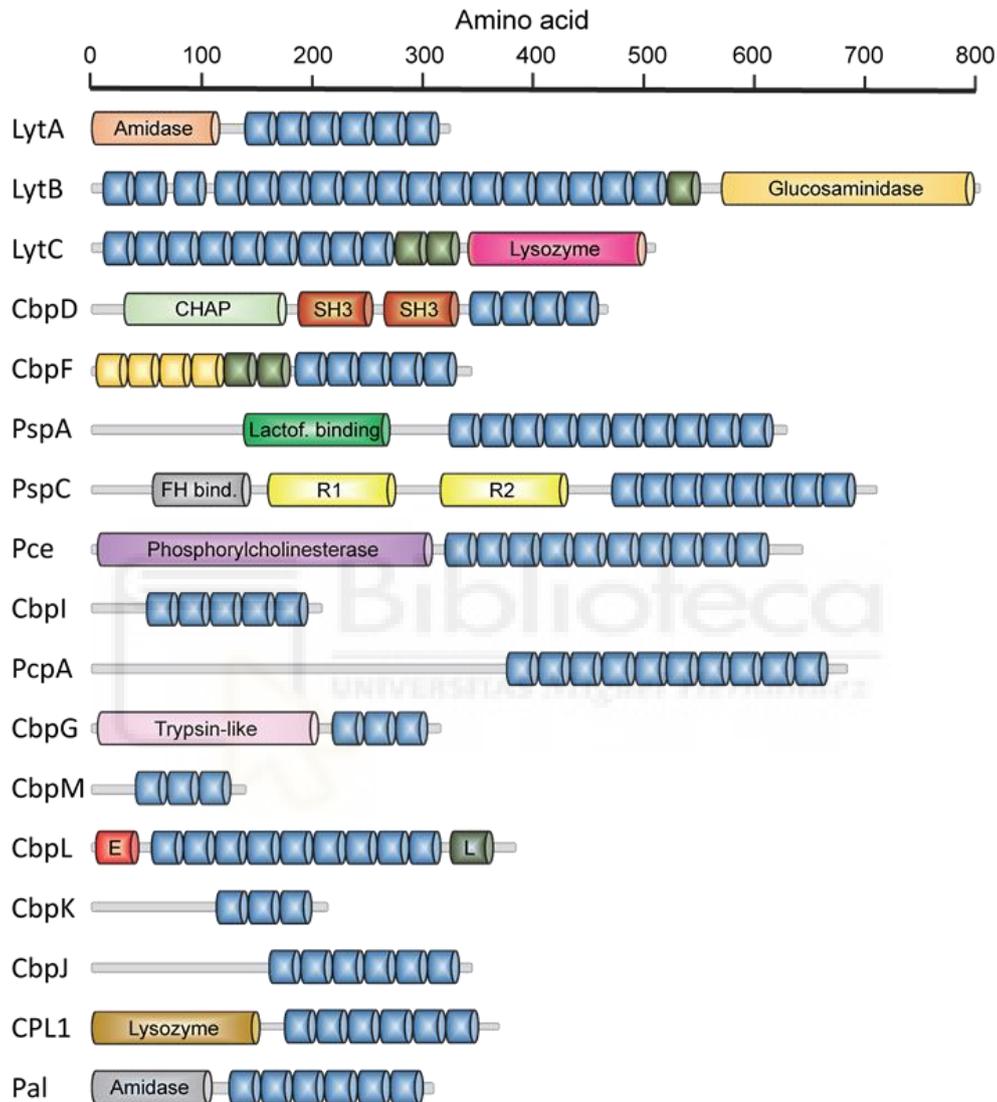
La pared celular de neumococo contiene una gran variedad de proteínas de superficie involucradas en la síntesis y recambio de la pared celular, y en funciones esenciales para la patogénesis de la bacteria. Se pueden diferenciar los siguientes grupos principales: 1) lipoproteínas (alrededor de 50), 2) proteínas con un motivo LPxTG, 3) proteínas de superficie no clásicas y 4) CBPs, sobre las que se centrará esta Tesis<sup>98,99</sup>.

### 4.2.1. Proteínas de unión a colina (CBPs)

Las CBPs constituyen una familia de entre 13-16 miembros, comunes a todos los serotipos, y cuya característica principal es el reconocimiento específico de los residuos de colina de la pared celular, posibilitando su anclaje no covalente a esta estructura macromolecular, desde donde realizarán su función biológica<sup>66,76,87,98-101</sup>. Estas proteínas intervienen en procesos esenciales para la viabilidad y virulencia bacteriana, tales como la adhesión al huésped<sup>102-105</sup>, la separación de las células hijas al final de la división celular,<sup>106-108</sup> la liberación de toxinas (como por ejemplo neumolisina), DNA bacteriano<sup>109,110</sup> o el camuflaje frente al sistema inmune<sup>1,66,111-114</sup>.

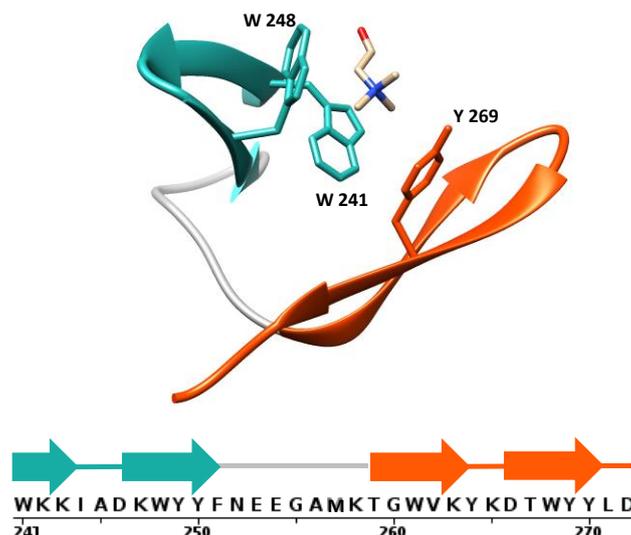
Todas las CBPs están compuestas por al menos dos módulos diferentes: uno, altamente conservado, de unión a colina (CBM, del inglés "*Choline-Binding Module*"), y otro funcional (FM, del inglés "*Functional Module*") responsable de la actividad biológica de cada proteína (Figura 6)<sup>115-118</sup>. En concreto, los CBMs están constituidos por motivos repetidos de unos 20 residuos (CBRs, del inglés "*Choline-Binding Repeats*"), ricos en aminoácidos aromáticos. Las CBRs pertenecen a la amplia familia de polipéptidos que contiene el motivo CW\_binding\_1 (PFAM code PF01473), que se encuentra también en proteínas de unión a glucanos o en glucosiltransferasas de estreptococos orales (donde muestran funciones distintas de la unión a colina), así como en toxinas de *Clostridium difficile*<sup>119,120</sup>. En lo que se refiere específicamente a *S. pneumoniae*, las CBRs típicas presenta el siguiente motivo consenso: TGW-*b*-(K,Q)DNGSWYYLN-x-SG-z-M-x<sub>1-2</sub>, (se especifican las posiciones que representan más del 30 % de conservación), donde *b* es un residuo hidrofóbico, *z* tiene una cadena lateral pequeña y *x* puede ser cualquier residuo<sup>66</sup>. Todas las CBRs presentan una estructura tridimensional típica en conformación de horquilla  $\beta$  de unos 14 aminoácidos (aa), seguida de una secuencia de

enlace de 6-7 aa que la conecta con la siguiente horquilla (Figura 7). En la mayoría de los casos, las CBRs están dispuestas entre sí de manera superhelicoidal formando un solenoide  $\beta,\beta$ -3<sup>66</sup>.

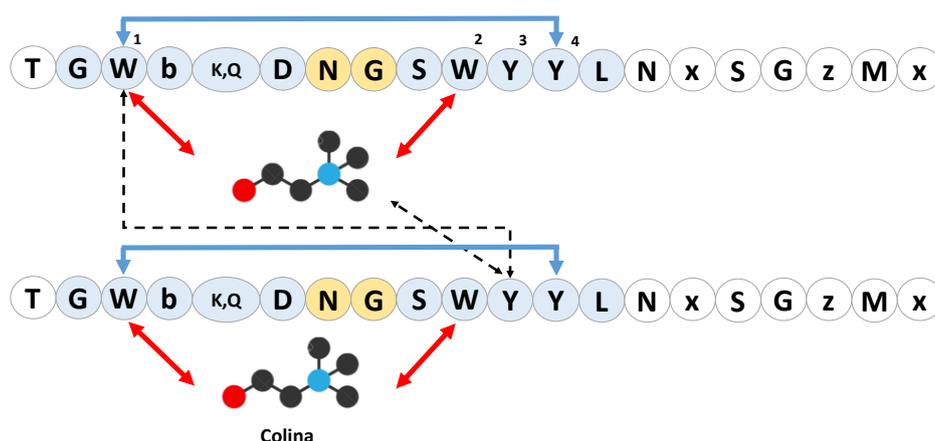


**Figura 6.** Organización modular de las CBPs de neumococo y sus bacteriófagos. Las unidades azules representan las CBRs que configuran los CBMs. En verde se muestran las CBRs no consenso. En amarillo se representan las repeticiones que pertenecen a la familia CW\_binding\_1 PFAM que no unen colina. Se muestra la actividad atribuida a varios módulos funcionales: *CHAP*, módulo amidohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína, histidina; *Lactof. binding*, dominio de unión a lactoferrina; *FH bind*, dominio de unión al factor H; *R1* y *R2*, dominios con función de adhesina; *E*, dominio "Excalibur"; *L*, dominio "Lipoproteína". Imagen tomada de Maestro y Sanz (2016)<sup>66</sup> con permiso de los autores.

Los sitios de unión a colina (CBSs, del inglés “*Choline-Binding Sites*”) se configuran mediante dos horquillas consecutivas que aportan aminoácidos aromáticos mediante los que se establecen interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$ , catión- $\pi$  y de Van der Waals con el ligando (Figura 7). Las interacciones catión- $\pi$  con la colina se establecen entre dos aa aromáticos (usualmente triptófanos) de la primera horquilla y un aa aromático de la segunda horquilla (usualmente tirosina), aunque en ocasiones este último se encuentra interactuando con el primer triptófano de la primera horquilla a través de una interacción  $\pi$ - $\pi$ , donde las nubes electrónicas de ambos residuos se disponen perpendicularmente. Además, se establece una interacción  $\pi$ - $\pi$  perpendicular entre el primer y cuarto aa aromático de la primera horquilla, que ayuda a estabilizar el conjunto, que se completa con la participación de una cadena lateral hidrofóbica de la parte C-terminal de la repetición (Figura 8) <sup>66</sup>. Todas las interacciones que configuran los residuos de una CBR son suficientes para establecer su conformación nativa, ya que se ha demostrado que una CBR aislada, o incluso únicamente su núcleo de horquilla  $\beta$ , es capaz de plegarse de forma autónoma adoptando una estructura similar a la nativa y conservando la capacidad de unión a colina, aunque presentando una afinidad bastante menor comparada con el CBM del que proceden, ya que solo estaría presentando un "semisitio" de unión <sup>121,122</sup>.



**Figura 7.** Representación del sitio típico de unión la colina entre dos CBRs consecutivas. Se muestra la CBR<sub>4</sub><sub>240-259</sub> (azul) y la CBR<sub>5</sub><sub>260-281</sub> (naranja) de la amidasa LytA (código PDB: 4X36), con los residuos aromáticos directamente implicados en la unión a colina.



**Figura 8.** Esquema representativo de un CBS estándar de CBPs de neumococo, configurado por dos CBRs consecutivas. En la secuencia consenso se indican los siguientes elementos: *b* es un residuo hidrofóbico, *z* residuo que presenta una pequeña cadena lateral y *x* puede ser cualquier residuo. En azul se indican los residuos que conforman la horquilla  $\beta$  y en naranja los residuos involucrados en el giro. Las flechas rojas muestran las interacciones catión- $\pi$  con la colina. Las flechas discontinuas reflejan contactos que pueden ser catión- $\pi$  o  $\pi$ - $\pi$ . Las flechas azules indican la estabilización por interacción  $\pi$ - $\pi$  entre las cadenas laterales aromáticas. Los números indican la situación de los residuos aromáticos en la repetición. Imagen realizada a partir de Maestro y Sanz (2016) <sup>66</sup>, con permiso de los autores

Además de estos CBSs, se han identificado otros no canónicos en diversas CBPs que difieren en la longitud de las secuencias y en el número de residuos aromáticos implicados en la unión a colina <sup>101</sup>. Por ejemplo, la amidasa LytA, principal autolisina de la bacteria, presenta un CBS constituido tan solo por dos aa aromáticos de la primera CBR <sup>123</sup>. También existen CBSs con variaciones más complejas que implican la participación de cuatro a seis aa aromáticos; este es el caso de las hidrolasas LytC (*N*-acetilmuramoil-*N*-glucosaminidasa) y LytB (endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase), que disponen de un sitio de unión constituido por seis aa aromáticos procedentes de tres CBRs consecutivas, donde la tercera CBR contiene la secuencia característica Gly-Tyr-Met-Ala (GYMA) responsable del aumento de la afinidad hacia las unidades de TA, al reconocer adicionalmente los residuos de *N*-acetil-galactosamina <sup>101</sup>.

A pesar de que la geometría y disposición de los CBSs se encuentra altamente conservada entre las diferentes CBPs, la afinidad por el ligando entre ellas es muy diversa. Este hecho, junto con estudios de delección escalonada de los CBRs de LytA, que originan proteínas con menor afinidad a colina <sup>124</sup>, condujo a creer que la afinidad por colina está directamente relacionada con el número de CBRs en la proteína <sup>125</sup>. Sin

embargo, a pesar de que se ha descrito que LytC contiene 7 CBSs por monómero y Cpl1, la lisozima del bacteriófago Cp-1 de *S. pneumoniae*, solo 2, la afinidad de ambas por colina libre en solución es similar<sup>126-128</sup>. Asimismo, los dos CBSs de Cpl1 presentan mayor afinidad por colina que los dos sitios de baja afinidad de cada monómero de LytA<sup>123,128-130</sup>. Por lo tanto, de estos resultados se deduce que debe haber otros factores distintos de la mera cantidad de CBRs que determinen la fortaleza de la unión.

En cuanto a las diferentes funciones que ejercen las CBPs, algunas, como LytA, LytB, LytC, CbpD y Pce, están implicadas en la hidrólisis de diferentes enlaces covalentes de la pared celular<sup>66</sup>. La amidasa LytA y la lisozima LytC son las dos únicas autolisinas identificadas en neumococo. LytC posee una temperatura óptima de 30 °C, lo que sugiere que podría desempeñar un importante papel en las vías respiratorias superiores<sup>131</sup>. Por su parte, LytB es una enzima no lítica implicada en la separación de las células hijas al final de la división celular<sup>132</sup> con ayuda de LytA<sup>133</sup>, mientras que Pce es una fosforilcolinesterasa capaz de liberar los residuos de fosforilcolina de la pared celular<sup>134-136</sup>. Otras CBPs, como PspA, PspC, PcpA o CbpG, están implicadas principalmente en la interacción con el hospedador o son responsables de factores de virulencia como la adhesión y la colonización, así como en la evasión del sistema inmune<sup>137-141</sup>. Además de desempeñar papeles fisiológicos clave en la remodelación de la pared celular durante el crecimiento y la división celular, las CBPs están implicadas en otros procesos como la formación de biopelículas<sup>142</sup> o en el denominado “fratricidio”, proceso en el cual las células competentes de neumococo inducen la lisis de aquellas no competentes e incorporan parte de su carga genética por un proceso de transformación natural, en el que además, se liberan factores de virulencia que favorecen la colonización<sup>143</sup>. Por último, la familia de CBPs también incluye varias enzimas líticas cuyos genes están codificados por bacteriófagos, como Cpl1, Cpl7 o Cpl9, y que participan en la liberación de la progenie fágica<sup>66</sup>.

A continuación, nos centraremos en describir de forma más extensa las tres CBPs que se estudian en este trabajo: LytA, CbpD y Cpl-1.

#### **4.2.1.1. Amidasa LytA**

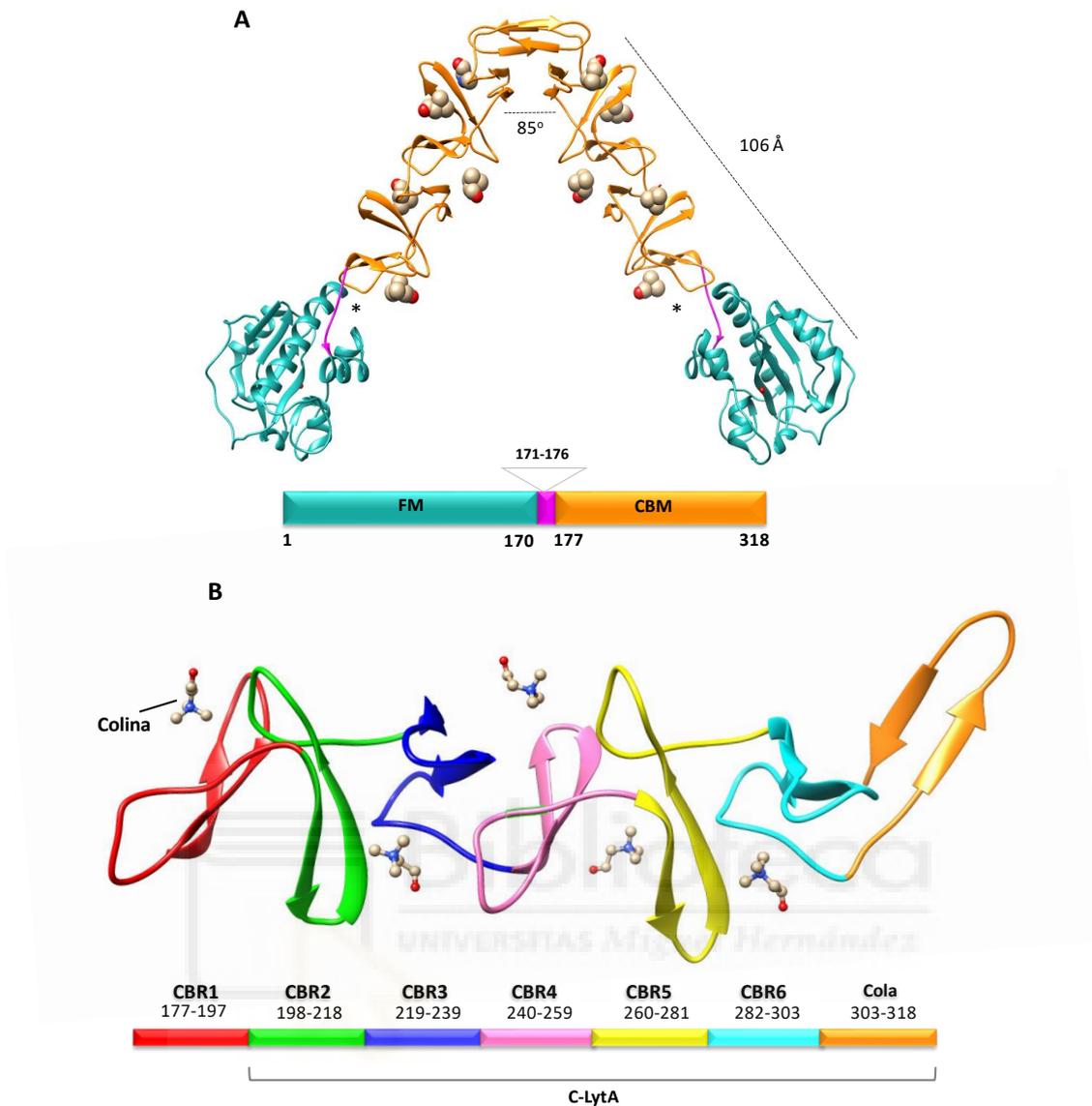
LytA es una *N*-acetilmuramil-L-alanil amidasa altamente conservada entre las estirpes neumocócicas<sup>83,144</sup>, responsable de la hidrólisis de la pared celular al final de la fase estacionaria en cultivos líquidos<sup>145,146</sup>. LytA posee un papel clave en la virulencia de neumococo, ya que la autólisis celular conlleva la liberación de antígenos neumocócicos tales como la neumolisina, así como productos de degradación de la pared celular que dañan las barreras endoteliales y epiteliales del huésped<sup>1,99,109</sup>, permitiendo el acceso de la bacteria al torrente sanguíneo y promoviendo así al desarrollo de una patología invasiva<sup>147</sup>. La liberación de estas partículas dañinas también es capaz de inhibir la producción de las citoquinas TNF, IFN- $\gamma$  e IL-12, responsables de inducir la actividad fagocítica, por lo que los fragmentos de neumococo autolisados aumentan los mecanismos bactericidas al impedir la fagocitosis bacteriana<sup>148</sup>. Asimismo, LytA participa en la evasión del sistema de complemento, independiente de los efectos de la neumolisina<sup>114</sup>, y juega un papel crucial en el fratricidio<sup>149</sup>. Además, la autolisina está implicada en otros procesos como la lisis bacteriana inducida por antibióticos, como la penicilina y la vancomicina, y por el desoxicolato<sup>150-153</sup>. Por último, se sabe que neumococo sobrevive a la acción de péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés "*AntiMicrobial Peptides*") presentes en el epitelio humano gracias al desprendimiento de la cápsula en un proceso dependiente de LytA<sup>154</sup>, promoviendo así la supervivencia bacteriana y teniendo como consecuencia un dramático aumento de la invasión de las células epiteliales<sup>154</sup>. Esta nueva función fisiológica podría explicar el motivo por el cual LytA, potencialmente suicida, es conservada en el genoma de aislados de neumococo virulentos, a pesar de la presión selectiva de los antibióticos<sup>154</sup>.

A pesar de ser una proteína de superficie, LytA se encuentra fundamentalmente en el citoplasma (~ 95 %), y solo una pequeña fracción está asociada a la pared celular (~ 5 %) <sup>146</sup>. Las células están protegidas de la actividad auto-hidrolítica de LytA durante la fase de crecimiento, pero la fracción extracelular crece lentamente hasta el 30 % durante la fase estacionaria, tras lo cual se induce la autólisis<sup>146</sup>. Sin embargo, todavía no se sabe exactamente el mecanismo por el cual LytA se transloca desde el citoplasma, puesto que, al no contener péptido señal, debe recurrir a mecanismos no convencionales. Por otro lado, es sabido que la amidasa se sintetiza en el citoplasma

como forma de baja actividad o "forma-E", que puede "convertirse" *in vitro* a la forma completamente activa o "forma-C" de manera irreversible tras incubación con colina o preparaciones de pared celular a baja temperatura <sup>155</sup>.

La estructura de LytA de *S.pneumoniae* TIGR4 resuelta mediante difracción de rayos-X <sup>123</sup> muestra que la proteína adquiere una forma general alargada y se presenta como dímero en forma de "boomerang" en presencia de colina (Figura 9). El FM se encuentra en la posición N-terminal (aa 1-170), presenta una estructura globular y se conecta a través de 6 residuos (aa 171-176) al CBM, localizado en el extremo C-terminal (aa 177-318) de la proteína y constituido por seis CBRs (CBR1-CBR6) más una "cola" en conformación de horquilla  $\beta$ , responsable de la dimerización (Figura 9). Las CBRs se pliegan tridimensionalmente en una conformación de solenoide  $\beta, \beta$ -3, alargado y superhelicoidal <sup>123,156</sup>. El módulo de unión a colina de LytA (C-LytA) empleado en estudios de la presente tesis está compuesto por 5 CBRs (CBR2-CBR6, Figura 9 B).

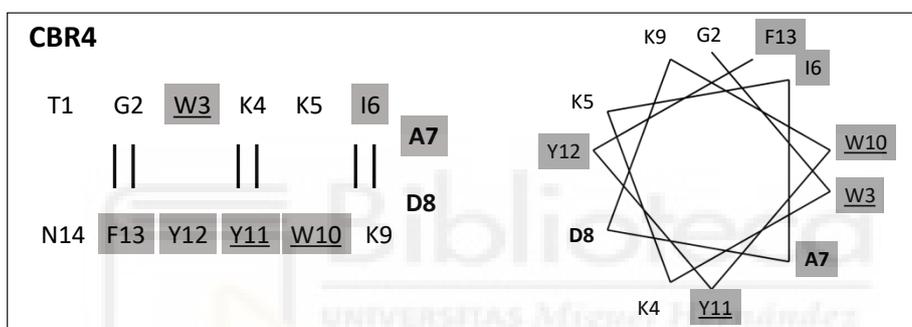
LytA presenta cinco posibles CBSs canónicos más uno no canónico (Figura 9 A y B) <sup>123</sup>. Cada uno de los sitios canónicos está constituido por dos CBRs consecutivas, con una arquitectura similar a la mostrada en la Figura 7 <sup>123,157</sup>. La excepción la constituye el presunto sitio entre CBR1 y CBR2, donde no se ve ocupación por el ligando ni en la estructura de LytA entera <sup>123</sup> ni en el CBM aislado del profago LytA (SPH\_0121) <sup>123,157</sup>. Además, LytA presenta un semisitio adicional configurado únicamente por la CBR1<sub>177-197</sub>, y que probablemente presente por este motivo una afinidad más baja por colina. Por lo tanto, cada monómero de LytA es capaz de unir 5 moléculas de colina (Figura 9). Por su parte, cada una de las horquillas  $\beta$  presentes en las CBRs se comportan como unidades estructurales autónomas.



**Figura 9. A.** Esquema de la estructura tridimensional de la forma dimérica de LytA, en presencia de colina. El FM N-terminal aparece en azul, el conector en purpura y el CBM C-terminal en naranja. Las moléculas de colina se muestran en forma de esferas. Se indica el ángulo interno de 85 °C y la longitud de los brazos 106 Å, resultando de la estructura de tipo “boomerang”. \*Indica el semisitio adicional configurado por la CBR1 (177-197) (código PDB: 4X36). **B.** Esquema de la estructura tridimensional del CBM de LytA. Se representan los 6 CBRs más la cola residual en conformación de horquilla β y las 5 moléculas de colina que se unen a los sitios canónicos, representados en forma de varillas y esferas. Se indica mediante una barra las CBRs que conforman el módulo C-LytA (PDB: 4X36).

En concreto los estudios espectroscópicos de las secuencias correspondientes a las horquillas contenidas en las repeticiones CBR2 y CBR4 aisladas (secuencias 197-210 y 239-252, respectivamente) mostraron que son capaces de mantener su estructura nativa en solución acuosa, aunque presentando una afinidad residual por el ligando <sup>121,122,158</sup>. Además, se ha comprobado que, en concreto, tanto la horquilla de CBR4 como

el módulo C-LytA completo sufren un cambio conformacional reversible de horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  anfipática en presencia de micelas de detergente y vesículas lipídicas (Figura 10) entrando en la clasificación de "péptido camaleónico" o "interruptor molecular" <sup>122,158,159</sup>. Las denominadas secuencias "camaleónicas" son aquellas que no presentan una tendencia intrínseca de formar una estructura secundaria particular, y por lo tanto pueden adaptarse dependiendo del entorno cambiando su conformación <sup>160-162</sup>. En la literatura se pueden encontrar varios casos de transiciones donde se produce un cambio conformacional a estructuras en hélice  $\alpha$  inducidas por metanol y alcoholes fluorados <sup>163</sup>, o por micelas en el caso de péptidos antimicrobianos <sup>164</sup>. Sin embargo, todas ellas parten de una estructura desordenada, por lo que P4A parece ser el primer péptido descrito que presenta una transición entre dos estructuras altamente ordenadas.



**Figura 10.** Representación esquemática de la horquilla  $\beta$  y la rueda  $\alpha$ -helicoidal perteneciente a la secuencia CBR4. Los enlaces de hidrógeno que interviene en la horquilla están indicados por líneas verticales, los residuos implicados en el reconocimiento de la colina están subrayados, los residuos de giro se muestran en negrita, los residuos hidrofóbicos están sombreados en gris. Imagen realizada a partir de Zamora-Carreras y *col.* (2018) <sup>158</sup> con permiso de los autores.

La unión de colina contribuye a la dimerización de la proteína a través de la horquilla C-terminal, resultando una estructura geométrica de tipo "boomerang" con un ángulo interno entre las dos moléculas de  $85^\circ$  y dos brazos de  $106 \text{ \AA}$  de longitud (Figura 9.A) <sup>123</sup>. La estructura completa de LytA <sup>123</sup> es similar a las estructuras del FM y CBM obtenidas previamente por separado <sup>156,157,165,166</sup>. Sin embargo, comparando con el módulo C-LytA aislado, se observa una diferencia en cuanto al ángulo interno de la estructura tipo "boomerang", lo que sugiere que existe una cierta flexibilidad entre los dos brazos del dímero <sup>123,156,157,165,166</sup>. La interacción de LytA con colina sigue un mecanismo complejo y muestra dos tipos de sitios de unión con distinta afinidad <sup>129,130,167</sup>. La dimerización es esencial para una actividad eficiente de la proteína <sup>168</sup> y, además, confiere estabilidad frente a la desnaturalización química y térmica <sup>125,129,130,167</sup>.

Por su parte, el FM de LytA adopta una conformación mixta  $\alpha/\beta$ , con la parte central formada por 5 láminas  $\beta$  rodeadas por 5 hélices  $\alpha$  y dos hélices  $3_{10}$ , formando así el centro catalítico, que contiene un átomo de  $Zn^{2+}$  situado en la parte inferior <sup>123,157</sup>. Para llevar a cabo su función, la proteína LytA requiere de largos fragmentos de PG, denominados di(GM5P), compuestos por dos residuos alternados de GlcNAc y MurNAc unidos a los péptidos del tallo (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala) <sup>157</sup>. La formación del complejo LytA-PG implica hasta 21 residuos de la amidasa, la mayoría estableciendo interacciones con la cadena de glicano. Cabe destacar que, mientras que el sustrato di(GM5P) adopta una conformación diferente tras unirse a la amidasa, la estructura de LytA no se altera tras la formación del complejo <sup>169</sup>.

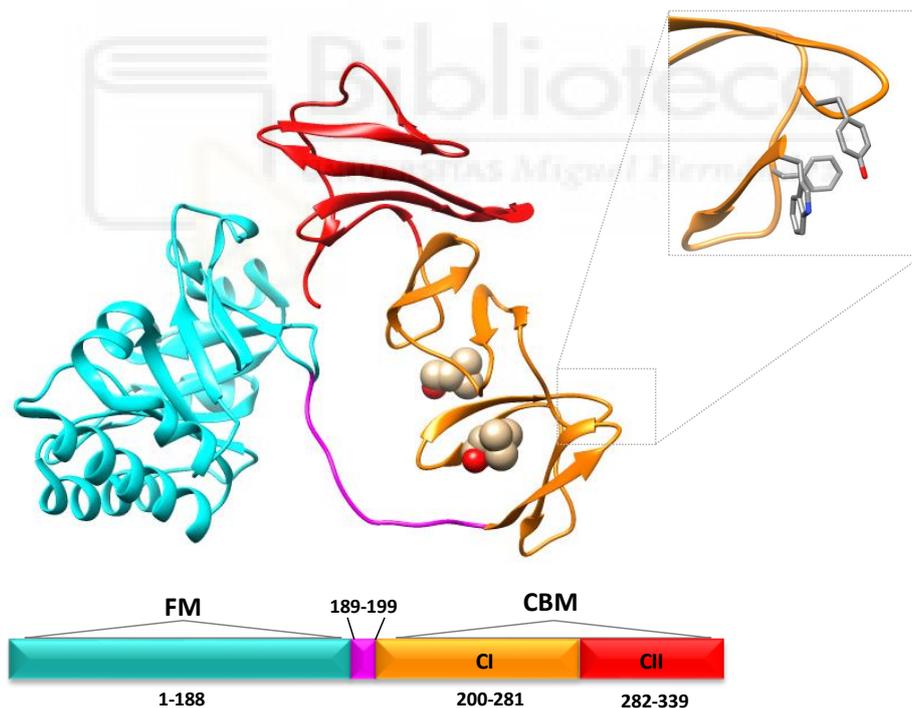
### 4.2.1.2. Lisozima Cpl1

Gran parte de los bacteriófagos de neumococo son atemperados, es decir se encuentran como profagos, con el DNA integrado en el cromosoma de la célula hospedadora siguiendo la ruta lisogénica <sup>170</sup>. Los únicos fagos neumocócicos reportados hasta la fecha como líticos son los pertenecientes a las familias Dp-1 y Cp.

Las endolisinas son enzimas altamente evolucionadas que hidrolizan enlaces específicos en el PG, desestructurando la pared celular y permitiendo así la liberación de las partículas de la progenie del fago <sup>171</sup>. Los fagos líticos neumocócicos presentan dos clases de endolisinas: a) amidasas, presentes en los fagos temperados y en el fago lítico Dp-1, y b) lisozimas, pertenecientes a los fagos de la familia Cp y que incluyen las enzimas Cpl-1, Cpl-7 y Cpl-9 correspondientes a los fagos Cp-1, Cp-7 y Cp-9 respectivamente. Todas las endolisinas neumocócicas carecen de péptido señal, y la translocación a través de la membrana se lleva a cabo mediante un sistema de holinas <sup>76</sup>.

En esta memoria nos centraremos en el estudio del CBM de Cpl-1, la endolisina del bacteriófago Cp-1 de *S. pneumoniae*. La estructura de Cpl-1 ha sido resuelta tanto en estado libre como unida a colina o a análogos del PG de la pared celular (Figura 11) <sup>127,172</sup>. El módulo catalítico y el de unión a colina se encuentran unidos mediante un conector (residuos 189-199) que presenta una estructura bien definida y que permite identificar inequívocamente el comienzo del CBM. Este módulo presenta seis CBRs (p1-

p6), cada una de ellas formada por una horquilla  $\beta$  de 5-6 aminoácidos más un bucle de unos 7 aminoácidos, y finalizando con una cola C-terminal de 16 aa. Las primeras cuatro repeticiones (p1-p4, subdominio CI, residuos 200-281) se pliegan en disposición súper-helicoidal, mientras que las dos últimas repeticiones (p5-p6) junto con la cola C-terminal (subdominio CII, residuos 282-339) se pliegan en forma de lámina  $\beta$  antiparalela de seis cadenas, estableciéndose una fuerte interacción con el FM <sup>172</sup>. Las primeras cuatro repeticiones proporcionan dos CBSs canónicos (p1-p2 y p2-p3) <sup>127</sup>. La adición de colina provoca la dimerización de la lisozima a través de la primera CBR <sup>173</sup>, postulándose la formación de un CBS adicional no canónico, ubicado en la horquilla de dimerización y conformado por tres residuos aromáticos (Trp-210, Phe-218 y Tyr-238). Se cree que este posible CBS no canónico, si bien no se observa ocupado en la estructura cristalográfica publicada, podría contribuir a estabilizar la dimerización, aumentando al mismo tiempo el número de sitios funcionales <sup>173</sup>.



**Figura 11.** Esquema de la estructura de la endolisina Cpl-1. Los dominios se encuentran coloreados de forma diferenciada. N-terminal catalítico, en azul; conector, en púrpura; dominio CI, en naranja; dominio CII, en rojo. Las moléculas de colina se encuentran representadas en forma de esferas. Recuadro: detalle de la región de dimerización que muestra la cadena lateral de los residuos aromáticos (Trp-210, Phe-218 y Tyr-238) que forman un CBS adicional no canónico (PDB: 1OBA).

A pesar de presentar más del 50 % de identidad de secuencia, los CBMs de Cpl-1 (C-Cpl1) y LytA (C-LytA)<sup>127</sup> presentan importantes diferencias estructurales entre ambos dominios. C-Cpl1 muestra dos subdominios estructurales bien diferenciados: CI, con un plegamiento superhelicoidal y CII, que comprende una nueva región plegada en lámina  $\beta$  estableciendo interacciones inter-modulares entre el FM y el CBM, mientras que C-LytA no presenta subdominios y no interactúa con el módulo funcional. Además, C-Cpl1 presenta únicamente dos sitios de unión a colina por monómero, localizados en la interfaz de las tres primeras repeticiones (p1-p2 y p2-p3), en lugar de 5 sitios completos y 1 semisitio como en el caso de C-LytA<sup>123</sup>. Por último, la dimerización de Cpl-1 se establece través de la región N-terminal de su CBM, mientras que la de LytA ocurre a través de la horquilla C-terminal<sup>123,173</sup>.

### 4.2.1.3. Amidasa/endopeptidasa CbpD

CbpD es una mureín-hidrolasa<sup>174</sup> que se sintetiza exclusivamente cuando la bacteria entra en estado de competencia, siendo clave en el mecanismo de fratricidio<sup>175,176</sup>.

Esta proteína consta de un FM en el extremo N-terminal que contiene un dominio CHAP, seguido de dos dominios SH3b y un CBM en el extremo C-terminal que comprende cuatro CBRs (Figura 6). El dominio CHAP está presente en la familia de amidohidrolasas y peptidasas dependientes de histidina y cisteína, y, aunque su actividad en *S. pneumoniae* es desconocida, ha demostrado actividad *N*-acetilmuramoil-L-Ala amidasa o endopeptidasa en otros sistemas<sup>177,178</sup>. Por su parte, el CBM establece las interacciones con los TA de la pared celular, dirigiendo la unión de CbpD a la zona de división bacteriana, mientras que los módulos SH3b reconocen específicamente el PG<sup>174</sup>. Este doble reconocimiento del PG y los TA parece ser clave para que la proteína produzca la lisis efectiva de las células diana<sup>174</sup>.

A pesar de que la principal enzima desencadenante del fratricidio en cultivos líquidos es CbpD, para causar una lisis sustancial se requiere la participación de LytA y LytC<sup>176</sup>. En primer lugar, CbpD se une a los polos y a la zona de división de las células diana y digiere los péptidos que conforman el PG<sup>174</sup>. Este daño generado en la pared

celular tiene como consecuencia la activación de las enzimas LytA y LytC, resultando así un mayor grado de lisis que el logrado únicamente por CbpD <sup>126,174</sup>. Las células de neumococo competentes se protegen de la acción lítica de CbpD produciendo ComM, una proteína integral de membrana que neutraliza la acción de CbpD por un mecanismo hasta ahora desconocido <sup>174,179</sup>.

### 5. CBPs y BIOPELÍCULAS MICROBIANAS DE NEUMOCOCO

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos estados: planctónico (de libre flotación) y sésil (formando biopelículas). Las biopelículas son poblaciones estructuradas de microorganismos adheridas a una superficie o interfase, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular <sup>180-182</sup>. Pueden estar formadas por una o varias especies bacterianas y, en cualquier caso, presentan modificaciones con respecto a las mismas especies bacterianas en cultivos planctónicos, tanto a su patrón de expresión génica como a su crecimiento <sup>183</sup>. En concreto se sabe que *S. pneumoniae* se encuentra asociado a *H. influenzae* en la nasofaringe humana formando biopelículas mixtas <sup>184</sup>. La forma natural de crecimiento para la mayoría de los microorganismos es de hecho en forma de biopelícula <sup>185</sup>: se cree que en más del 60 % de las infecciones bacterianas humanas está implicado el crecimiento de una biopelícula, llegando hasta el 80 % en el caso de las infecciones crónicas <sup>186</sup>. En particular, en neumococo se ha demostrado la presencia de biopelículas en las glándulas adenoides, en la mucosa epitelial en niños con infecciones recurrentes de otitis media y en la mucosa de pacientes con rinosinusitis crónica <sup>181</sup>.

La formación de la biopelícula implica, en primer lugar, la adhesión bacteriana a la superficie. Una vez que la adhesión pasa a ser irreversible, se inicia la proliferación alrededor del sitio de unión que da lugar a la formación de grupos multicelulares, llamados "microcolonias". A continuación, las bacterias secretan sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que constituirán la matriz de la biopelícula, permitiendo adoptar unas estructuras tridimensionales denominadas "macrocolonias" <sup>183</sup>. Tras la formación y maduración de la biopelícula, algunas bacterias se liberan y permanecen en estado planctónico; se trata de poblaciones genéticamente heterogéneas que pueden presentar, o bien el fenotipo de la biopelícula local, o bien uno más virulento y con

propiedades invasivas<sup>183,187,188</sup>. Se debe tener en cuenta diversos factores ambientales para la formación de la biopelícula, tales como el medio de cultivo, ya que se ha demostrado que en medios ricos en nutrientes se obtiene una menor formación de biopelículas, lo cual sugiere que la formación de estas estructuras representa para las bacterias una estrategia de supervivencia en condiciones de déficit nutricional<sup>181</sup>.

La matriz extracelular de la biopelícula está compuesta por las EPS (exopolisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas), que resultan clave para determinar la integridad estructural y la cohesión, además de determinar la arquitectura tridimensional. En concreto, los exopolisacáridos proporcionan estabilidad mecánica, mientras que el DNA extracelular posibilita la transferencia horizontal de genes y asegura la estabilidad estructural de la biopelícula, siendo importante tanto para el mantenimiento como para la formación de la misma<sup>142,189,190</sup>. En cuanto al papel que desempeñan las proteínas, y más en concreto las CBPs en el caso de neumococo, se ha estudiado mediante el aislamiento de cepas mutantes deficientes en estas proteínas. Mientras que en ausencia de las mureín-hidrolasas LytA, LytB y LytC, la proteína A de superficie (PspA) y las adhesinas PcpA y CbpA se disminuye la capacidad de crecer en forma de biopelícula, para los mutantes deficientes en la fosfocolinesterasa Pce o la amidasa CbpD no se observó tal reducción<sup>142,191,192</sup>. Además, se ha demostrado que las CBPs poseen la inesperada capacidad de unirse fuertemente al DNA extracelular a través de interacciones electrostáticas, por lo que podrían ser importantes en las primeras etapas de la formación de la biopelícula<sup>193</sup>. Por último, se ha demostrado que la presencia de altas concentraciones de colina o EA en el medio influye negativamente en la formación de la biopelícula<sup>142</sup>.

Estas agrupaciones bacterianas adoptan sobre la superficie a la que se anclan estructuras que se asemejan a panales de abejas, presentando pequeños huecos y canales que separan las microcolonias. Proporcionan estabilidad mecánica y constituyen un importante factor de virulencia, al entorpecer la labor de las defensas del hospedador<sup>142</sup>. De hecho, la importancia de las biopelículas en microbiología médica radica en su capacidad para eludir al sistema inmune del hospedador<sup>194</sup>. Las bacterias que crecen en forma de biopelículas presentan asimismo una menor susceptibilidad a los antibióticos<sup>195</sup>. Además, en el caso concreto de *S. pneumoniae* la formación de biopelículas

constituye un medio eficaz para evadir tanto la vía clásica como la vía alternativa del complemento dependiente de PspC del sistema inmune del huésped <sup>196</sup>.

## 6. NUEVAS ESTRATEGIAS ANTIMICROBIANAS

La creciente aparición de bacterias resistentes a los antibióticos es una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial. Se estima que las infecciones por bacterias resistentes causan al año alrededor de 25.000 muertes en Europa <sup>197</sup> y algunas estimaciones apuntan a que, a medio plazo, podríamos entrar en una era pos-antibiótica donde la mortalidad achacable a enfermedades infecciosas superara incluso a las muertes por cáncer <sup>198</sup>.

Debido a la falta de opciones terapéuticas para tratar ciertas enfermedades infecciosas, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), la Agencia Japonesa de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos (PMDA) y la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), han establecido un programa de desarrollo único con el objetivo de cambiar sus directrices para alentar el desarrollo y la aprobación de nuevos compuestos antimicrobianos <sup>197,199</sup>. En la última reunión tripartita celebrada en junio de 2018 se trataron aspectos relevantes para optimizar el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos destinados al sector pediátrico <sup>200</sup>.

Entre las terapias antimicrobianas no tradicionales que actualmente se están estudiando se incluyen los AMPs <sup>201</sup> y la fagoterapia, que consiste en el uso de viriones enteros, así como sus enzimas líticas, llamadas endolisinas o enzibióticos, capaces de romper enlaces específicos del PG de la pared bacteriana <sup>171,202-208</sup>.

### 6.1. Péptidos antimicrobianos

Los AMPs, también llamados péptidos de defensa del huésped, son moléculas de origen natural que tienen propiedades antibióticas, participan en la defensa inmune innata y están presentes en prácticamente todas las formas de vida <sup>209,210</sup>.

En bacterias los AMPs benefician a la propia especie al eliminar competidores por los nutrientes y el nicho ambiental <sup>211,210</sup>. En eucariotas, desempeñan una función defensiva de acción directa frente a patógenos, y algunos además actúan

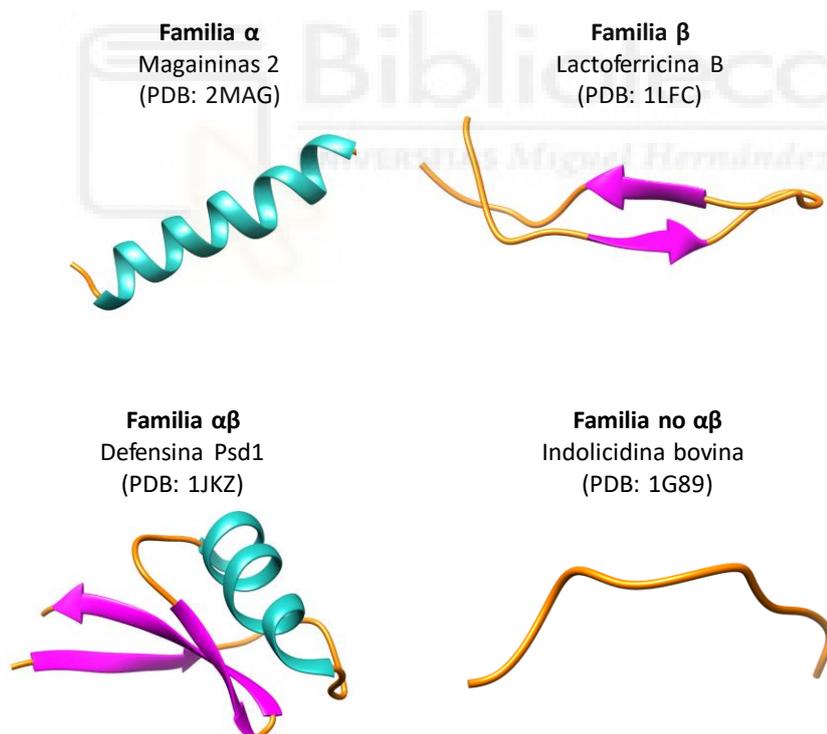
indirectamente modulando los sistemas de defensa del huésped y controlando la inflamación <sup>210,212-217</sup>. También previenen la formación de biopelículas <sup>210</sup> y presentan propiedades antivirales <sup>218</sup> e incluso anticancerígenas <sup>219</sup>.

### **6.1.1. Estructura de los AMPs**

En función de la estructura tridimensional del péptido (cuando es conocida), los AMPs se clasifican en cuatro familias (Figura 12) <sup>220</sup>:

- Familia  $\alpha$ : AMPs con estructura de hélices  $\alpha$ .
- Familia  $\beta$ : AMPs con estructura de lámina  $\beta$ .
- Familia  $\alpha\beta$ : aquellos que presentan estructura de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$ .
- Familia no  $\alpha\beta$ : aquellos que no presentan estructura de hélice  $\alpha$  ni lámina  $\beta$ .

Sin embargo, según la base de datos de péptidos antimicrobianos APD3 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), solo una pequeña población de ellos (20 %) presenta una estructura tridimensional conocida.



**Figura 12.** Ejemplos de las clases de AMPs por estructura. El nombre y el código PDB están indicados para cada estructura. Los elementos de estructura secundaria se encuentran indicados en color cian para las hélices  $\alpha$ , en púrpura para las láminas  $\beta$  y en naranja para los bucles.

### 6.1.2. Propiedades comunes de los AMPs

Aunque los AMPs son un grupo diverso de moléculas en términos de secuencia y estructura, hay varias propiedades que son comunes a casi todos ellos <sup>209,210</sup>:

- **Carga:** existe una fuerte correlación entre la carga neta positiva y su actividad antimicrobiana; esta posibilita la unión a los componentes de la superficie celular cargados negativamente como los fosfolípidos, los lipopolisacáridos de las bacterias Gram-negativas o los TA de las Gram-positivas <sup>221-223</sup>. Sin embargo, se ha observado que una elevada carga positiva en los péptidos puede conducir a una pérdida de la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a la alta interacción entre el péptido y los fosfolípidos que imposibilitaría la entrada en el interior de la membrana <sup>222</sup>. Por otro lado, la existencia de AMPs con carga negativa indica que el mecanismo de unión puede incluir variaciones; por ejemplo, algunos contienen dominios de unión a receptores que les permite interactuar de forma específica con componentes de la membrana celular <sup>224</sup>.
- **Hidrofobicidad:** es una característica clave para que tenga lugar la permeabilización de la membrana. La mayoría de los AMPs presenta una hidrofobicidad en torno al 50 %, aunque niveles muy altos de hidrofobicidad pueden conducir a la pérdida de especificidad antimicrobiana y a provocar toxicidad en células de mamíferos <sup>209,210,225-227</sup>.
- **Anfipaticidad:** casi todos los AMP forman algún tipo de estructura anfipática al interactuar con la membrana diana. Esta propiedad deriva de la disposición relativa de aa hidrofílicos e hidrofóbicos en regiones opuestas de la conformación peptídica. Aunque la anfipaticidad se puede detectar en multitud de conformaciones peptídicas, la más eficiente es la estructura en hélice  $\alpha$  <sup>209,210,228</sup>.

Por otro lado, existe más variación respecto a otros aspectos:

- **Tamaño:** los AMPs descritos hasta ahora pueden ser desde secuencias cortas (6 aa) hasta de más de 59 residuos. También se han descrito AMPs que forman dímeros y trímeros <sup>209,210</sup>.

- **Conformación:** los AMPs pueden presentar una conformación específica o bien relativamente desestructurada o extendida. Entre los péptidos estructurados la más común es la conformación en hélice  $\alpha$  o en lámina  $\beta$ . Además, al unirse a la membrana los péptidos pueden experimentar cambios conformacionales significativos: mientras que los péptidos antimicrobianos estructurados en lámina  $\beta$  suelen mantener su conformación en ambos entornos, aquellos con estructura en hélice  $\alpha$  están habitualmente desordenados en un entorno acuoso y se vuelven helicoidales tras la interacción con la membrana <sup>209</sup>.

### 6.1.3. Mecanismo de acción de los AMPs

Los AMPs pueden producir la muerte celular de manera directa o mediante modulación del sistema inmune <sup>210,229-231</sup>.

#### 6.1.3.1. Efecto inmunomodulador

Algunos AMPs se ven implicados en procesos de quimiotaxis atrayendo células del sistema inmune. Los AMPs reclutan y activan células del sistema inmune, lo que conlleva finalmente a la eliminación de las células microbianas y/o al control de la inflamación <sup>210,212,216,232</sup>. Estos péptidos también estimulan la angiogénesis, proceso fundamental para la vascularización del nuevo tejido, además de controlar la expresión de quimiocinas y especies reactivas de oxígeno/nitrógeno. <sup>210</sup>. En concreto, los AMPs humanos, como las defensinas LL-37 y  $\beta$ , tienen la capacidad de atraer células inmunes como los mastocitos, los leucocitos y las células dendríticas <sup>233,234</sup>.

#### 6.1.3.2. Muerte directa

El mecanismo de acción de los AMPs por eliminación directa se puede dividir en función de si el objetivo molecular es o no la ruptura o desestabilización de la membrana celular.

##### a) Mecanismos no disruptivos de membrana

Los mecanismos no disruptivos de membrana, se pueden dividir a su vez en dos categorías, en función de que su diana sea la pared celular bacteriana o los componentes intracelulares. En el primer caso, los AMPs pueden actuar de manera directa sobre

proteínas específicas involucradas en la síntesis de la pared celular, o bien de manera indirecta, sobre moléculas precursoras que se requieren para la síntesis de la misma <sup>210</sup>. Por su parte, los péptidos cuya diana es intracelular, estos interactúan primero con la membrana y luego se acumulan en el interior de la célula, bloqueando en última instancia procesos vitales, como la síntesis de proteínas o de ácidos nucleicos, o alterando la actividad de una enzima <sup>210,235-237</sup>. Curiosamente, existen algunos AMPs intracelulares que solo son efectivos en ciertas etapas del crecimiento, lo que sugiere que interactúan con ciertas vías metabólicas específicas <sup>236</sup>.

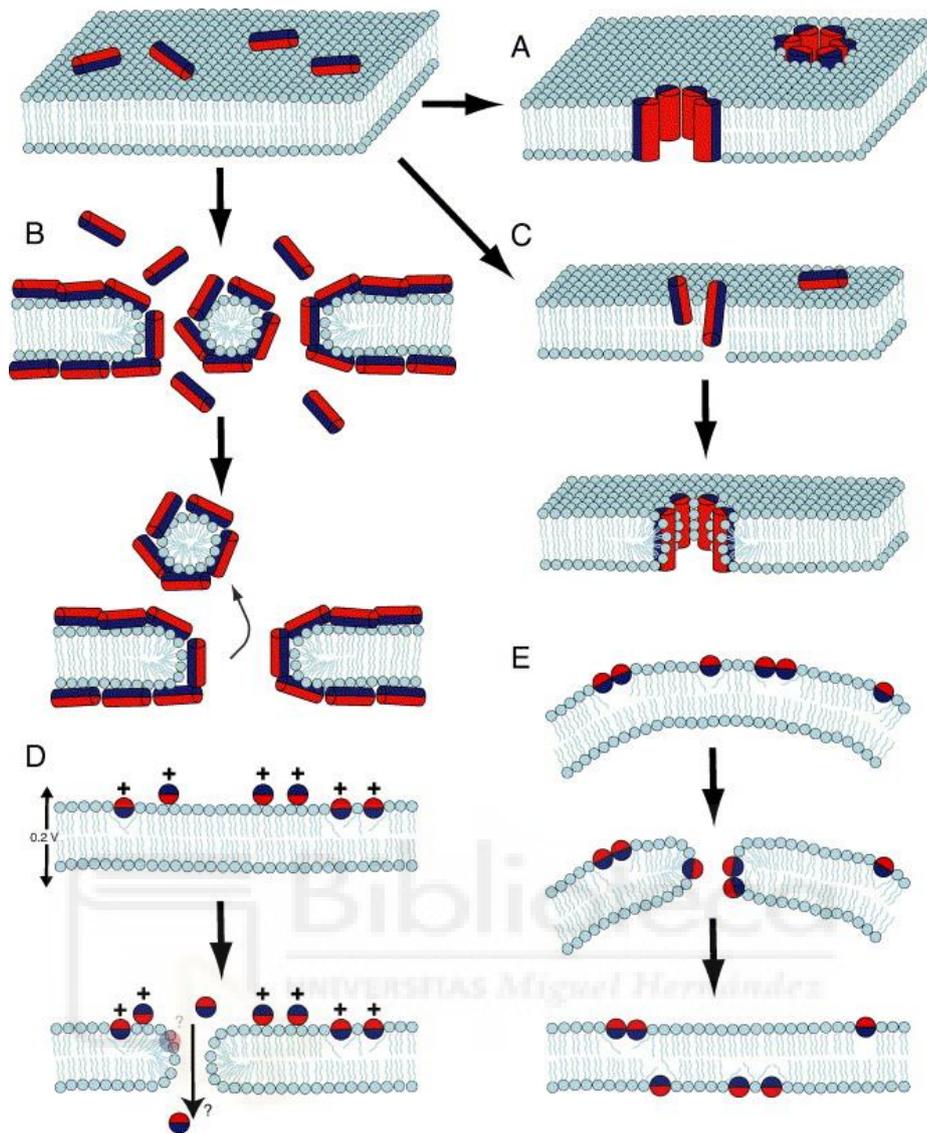
### b) Mecanismos disruptivos de membrana

Los AMPs que actúan mediante este tipo de mecanismo pueden presentar dos tipos de interacción con la superficie celular: los que son de origen bacteriano principalmente interactúan con un receptor de la membrana, mientras que la mayoría de los AMPs de vertebrados e invertebrados interactúan con la superficie celular de manera directa, a través de fuerzas electrostáticas <sup>210</sup>. En este caso, por tanto, las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la membrana marcan el espectro de acción del péptido: la membrana plasmática de las células animales posee en su parte externa fosfolípidos de carácter neutro, mientras que la membrana bacteriana está compuesta esencialmente por lípidos cargados negativamente. Por lo tanto, los AMPs catiónicos presentan interacciones electrostáticas fuertes con los fosfolípidos de la membrana bacteriana sin afectar de manera significativa a las células eucariotas <sup>238,210</sup>. Además de la carga de la membrana existen otras propiedades, como la curvatura que presenta, que juegan un papel decisivo en la interacción inicial <sup>210,239</sup>.

Tras interactuar con la membrana los péptidos se acumulan en la superficie y se autoensamblan mediante los siguientes mecanismos (Figura 13) <sup>209,229-231 210</sup>:

- **Modelo de barril-bastón** (Figura 13.A). Los péptidos orientados en paralelo se insertan perpendicularmente en la bicapa lipídica y promueven las interacciones péptido-péptido, generando estructuras similares a los canales de iones. El carácter anfipático es esencial en la formación de poros, ya que las regiones hidrófobas interactúan con los lípidos de la membrana y los residuos hidrófilos forman el lumen de los poros.

- **Modelo de alfombra** (Figura 13.B). Los péptidos se alinean paralelamente a la superficie de la membrana hasta alcanzar una concentración umbral a partir de la cual se forma una “alfombra” peptídica que conduce a la formación de interacciones desfavorables. En consecuencia, la integridad de la membrana se pierde, produciendo un efecto similar al detergente, que eventualmente desintegra la membrana formando micelas.
- **Modelo de poros toroidales** (Figura 13.C). Los péptidos se insertan perpendicularmente en la membrana, interaccionando con el grupo polar de los fosfolípidos, formándose poros de carácter dinámico y transitorio. Ambos modelos de formación de poros (poro toroidal y barril) conducen a la despolarización de la membrana y finalmente a la muerte celular.
- **Modelo de electroporación molecular** (Figura 13.D). Los péptidos catiónicos se asocian con la membrana bacteriana y generan una diferencia de potencial. Los poros se generan cuando el campo eléctrico alcanza 0,2 V.
- **Modelo de balsa de hundimiento** (Figura 13.E). La unión de los péptidos anfipáticos provocaría un desequilibrio de masa y, en consecuencia, un aumento en la curvatura de la membrana local. A medida que las moléculas de péptido se autoasocian, se hunden en la membrana, creando poros transitorios que dan como resultado que los péptidos se encuentren en ambas partes.



**Figura 13.** Principales modelos de actividad peptídica antimicrobiana. **A.** Modelo de barril-bastón; **B.** Modelo de alfombra; **C.** Modelo de poros toroidales; **D.** Modelo de electroporación molecular; **E.** Modelo de balsa de hundimiento. La parte roja del péptido representa la superficie hidrofílica y la azul la hidrofóbica. Imagen tomada de Chan, D y col. (2006) <sup>229</sup>.

#### 6.1.4. Desafíos de los AMPs

Los AMPs son candidatos prometedores para combatir a los microorganismos resistentes a múltiples fármacos, debido a su rápida acción y amplio espectro de actividad. En los últimos años, la investigación en este campo se ha incrementado de forma progresiva <sup>240</sup>, de tal forma que la base de datos APD3 (<http://aps.unmc.edu/AP/>) recoge actualmente más de 2.900 ejemplos incluidos en los distintos reinos de la vida

<sup>241</sup>.

Sin embargo, solo unos pocos AMPs han sido aprobados por la FDA a día de hoy. Entre ellos se encuentra la polimixina, activa frente a bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*) y que se administra por vía tópica, oftalmológica, intramuscular o intravenosa, y la vancomicina, para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) administrada por vía oral o intravenosa <sup>211,242-244</sup>. Esta situación es debida a los desafíos técnicos, comerciales y regulatorios frente a los que se enfrenta la terapia basada en AMPs.

En este sentido, varios estudios muestran que existe una pobre correlación entre la actividad antimicrobiana de los AMPs *in vitro* y su eficacia *in vivo*, posiblemente debido a que su función es altamente sensible a las condiciones del ambiente en que se encuentren. Por ejemplo, se ha comprobado que algunos AMPs, como la defensina  $\beta$  humana <sup>245</sup> y el péptido LL-37 derivado de la catelicidina humana <sup>246</sup>, parecen inactivos o mínimamente activos al evaluar la CMI en presencia de concentraciones salinas fisiológicas o en suero <sup>240</sup>. Esto podría deberse a que no se emulen suficientemente bien *in vitro* las condiciones del entorno de los mamíferos, o bien a que el péptido no lleve a cabo una destrucción bacteriana directa, sino que siga un mecanismo mediado por un efecto inmunomodulador <sup>214,247</sup>.

Por otro lado, la terapia peptídica en general presenta limitaciones en cuanto a la vía de administración. La mayoría de los AMPs en fases clínicas se limitan a aplicaciones tópicas debido a la susceptibilidad de los péptidos a la degradación por enzimas proteolíticas del tracto digestivo y de la circulación sanguínea, así como del rápido aclaramiento renal y hepático <sup>210,240,248</sup>. La estabilidad de los péptidos frente a la digestión proteolítica se puede mejorar a través de diferentes estrategias de modificación química <sup>210,240</sup>: *i*) incorporación de D-aminoácidos que revierten la estereoquímica del péptido, por lo que se evita la degradación por las enzimas, que son estereoespecíficas; *ii*) ciclación peptídica a través de la unión de los extremos, estabilizando así la estructura; *iii*) acetilación del extremo N-terminal, que bloquea la actividad de las aminopeptidasas, y *iv*) empleo de compuestos péptidomiméticos que conservan la disposición espacial de las cadenas laterales por tanto mantienen su

función, pero presentan modificaciones en el esqueleto de la molécula, evitando así la proteólisis.

En general, se considera que las terapias peptídicas tienen ventajas desde la perspectiva de seguridad en comparación con los fármacos de pequeño tamaño, ya que sus productos de degradación son aminoácidos naturales y a que, debido a su corta vida media, no tienden a acumularse en los tejidos <sup>240</sup>. Además, los péptidos terapéuticos, incluso los sintéticos, son generalmente menos inmunogénicos que las proteínas y los anticuerpos recombinantes <sup>249</sup>. Actualmente, un buen número de AMPs se encuentra en las últimas fases de desarrollo clínico <sup>201,240</sup>.

### 6.2. Enzibióticos

Las enzimas líticas de la pared celular representan una novedosa terapia contra las enfermedades infecciosas, y reciben el nombre de “enzibióticos” cuando se emplean para tal fin <sup>206,207,250</sup>. Estas lisinas pueden ser codificadas por bacteriófagos (endolisinas) o por las propias bacterias (autolisinas), y pueden presentar actividad amidasa (rompen los enlaces amida entre las cadenas de glicano y las cadenas peptídicas), glicosidasa (hidrolizan enlaces de la cadena de glicanos), o endopeptidasa (rompen enlaces peptídicos específicos del peptidoglicano) <sup>207</sup>.

Los enzibióticos se encuentran actualmente entre las diez mejores alternativas a los antibióticos convencionales <sup>251</sup>, debido a las siguientes características, que les confieren grandes ventajas:

- Alta actividad, se ha comprobado que ocasionan la muerte bacteriana en un tiempo menor que los antibióticos convencionales <sup>203,205</sup>.
- Alta especificidad, particularmente frente a bacterias Gram-positivas, aunque se han identificado endolisinas con actividad lítica de amplio espectro <sup>206</sup>.
- Baja incidencia de resistencia: debido a la naturaleza de la diana (la estructura de la pared celular) que resulta esencial para la viabilidad bacteriana, y que se encuentra muy conservada, esta no puede modificarse fácilmente sin comprometer la aptitud de la bacteria (reducción de la tasa de crecimiento, mayor susceptibilidad a elevadas temperaturas, disminución de la virulencia,

etc.)<sup>252</sup>. A pesar de esto, se han documentado mutantes de *S. aureus* resistentes a la lisostafina, una endolisina que se dirige al puente de pentaglicina débilmente conservado en el peptidoglicano de esta bacteria<sup>253</sup>.

- Capacidad de actuar de manera sinérgica con otras lisinas<sup>254,255</sup> o antibióticos<sup>256-259</sup>, en combinaciones altamente letales frente a cepas resistentes<sup>260-263</sup>.
- Efectividad en una amplia variedad de modelos animales de infección bacteriana que incluyen neumonía, sepsis y otitis. Asimismo presentan actividad inhibitoria de la formación de biopelículas y ejercen un efecto de descolonización de las membranas mucosas<sup>171,203-206,250</sup>.

Actualmente se encuentra en el mercado la primera serie de productos antibacterianos basados en el empleo de una endolisina como principio activo (Staphefekt™, Microeos Human Health BV, <http://www.micreos.com/>), destinado al tratamiento tópico de la infección por *S. aureus*, incluso resistente a la meticilina<sup>264</sup>.

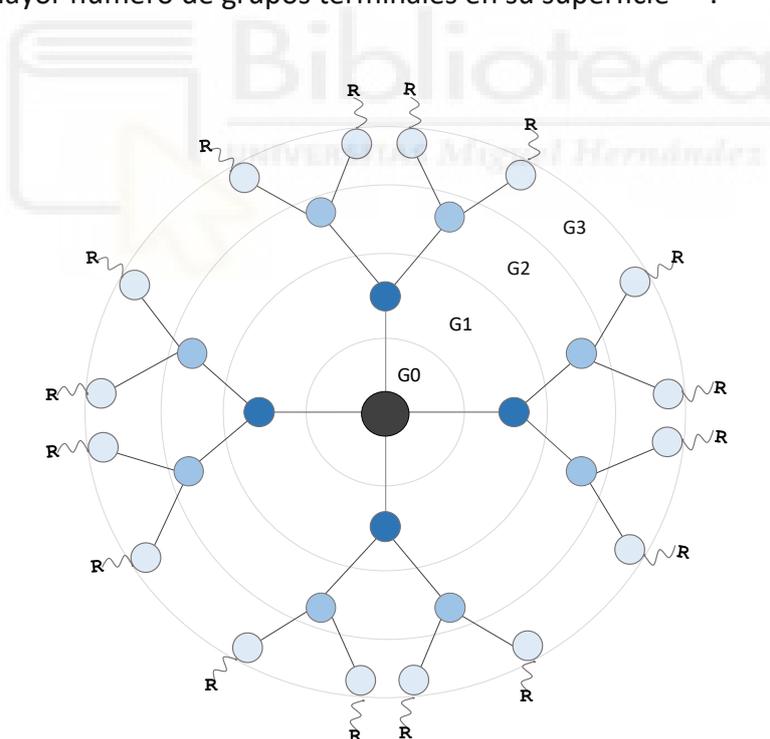
La eficacia de las endolisinas puede mejorarse mediante su modificación por ingeniería de proteínas, ya sea mediante la construcción de lisinas quiméricas mediante el intercambio de módulos<sup>250,262,265</sup>, cambio en el estado oligomérico<sup>266</sup> o modificación de la carga neta<sup>267,268</sup>. En el caso de organismos Gram-negativos, la presencia de una membrana externa protectora reduce significativamente la eficacia de las lisinas, si bien el empleo de un péptido desestabilizador de membranas fusionado a la endolisina (quimera denominada "artilisina")<sup>269,270</sup>, o bien la coadministración con agentes desestabilizantes de membrana, pueden facilitar la translocación de la enzima<sup>207</sup>.

### 6.3. Aproximaciones nanotecnológicas: Dendrímeros antimicrobianos

La nanotecnología es un campo multidisciplinar que fusiona la ciencia y la ingeniería para la creación de materiales o sistemas a escala nanométrica<sup>271</sup>. En las últimas décadas, la investigación en campos relacionados con la nanotecnología se ha incrementado notablemente<sup>272</sup>. Las nanopartículas poseen, por definición, un rango de tamaño de entre 10 a 1000 nm, aunque para aplicaciones biomédicas el tamaño preferido es generalmente inferior a 200 nm<sup>273</sup>.

La nanomedicina combina la nanotecnología con las ciencias farmacéuticas y biomédicas, con el objetivo de desarrollar fármacos y agentes de diagnóstico más eficaces y con mejor perfil toxicológico y de seguridad <sup>274</sup>. Entre los múltiples sistemas nanomédicos descritos hasta la fecha, los dendrímeros constituyen unos de los más atractivos en cuanto a su uso potencial como antimicrobianos.

Los dendrímeros son moléculas poliméricas tridimensionales con múltiples puntos de ramificación <sup>275</sup>. En su estructura se pueden diferenciar tres dominios (Figura 14): *i*) la superficie exterior, que presenta un número considerable de grupos terminales, *ii*) las ramas internas, denominadas dendrones, y *iii*) el núcleo central, desde donde parten los dendrones. La cavidad interior resulta a menudo adecuada para la encapsulación de fármacos, mientras que la superficie presenta múltiples grupos que pueden ser funcionalizados. Cada capa de ramificación se denomina generación (G), por lo que los dendrímeros de generaciones superiores son más grandes, más ramificados y exponen un mayor número de grupos terminales en su superficie <sup>276</sup>.



**Figura 14.** Esquema representativo de un dendrímero. Se pueden diferenciar tres dominios: el núcleo central (negro), los dendrones (ramificaciones internas) y la superficie exterior con los grupos terminales (R). Cada capa de ramificación se denomina generación (G). En la figura se pueden observar hasta 3 generaciones.

Su estructura bien definida y su estabilidad química los convierten en candidatos atractivos como soporte de biomoléculas para su administración *in vivo*, minimizando la eliminación prematura por parte del hígado o el bazo <sup>277</sup>. Además, la capacidad de funcionalización de la superficie posibilita la unión de múltiples copias de un ligando, lo cual conlleva un aumento de la afinidad por su blanco en varios órdenes de magnitud, por efectos de multivalencia: la unión de un primer ligando a la diana favorece la unión del segundo, ya que ambos pertenecen a la misma partícula; la afinidad se incrementa exponencialmente con el número de grupos terminales conjugados <sup>278</sup>.

Los dendrímeros representan una alternativa muy atractiva para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos <sup>276</sup>. Se ha observado que la disposición multivalente de AMPs en estas partículas tiene como resultado un incremento en su actividad antimicrobiana, al aumentar su capacidad disruptiva de membranas <sup>279-282</sup>. No obstante, a pesar del importante potencial que presentan, existen muy pocos estudios sobre el efecto multivalente en el contexto de la administración de AMPs <sup>282,283</sup>.

#### **6.4. Nuevas estrategias específicas frente a neumococo: antimicrobianos basados en las CBPs**

En el caso concreto que nos ocupa en esta Tesis Doctoral, las CBPs de *S. pneumoniae* constituyen un blanco y una herramienta atractivos para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Estas proteínas, como hemos visto en apartados anteriores, presentan diferentes funciones esenciales para la viabilidad y virulencia de la bacteria <sup>148,284-288</sup>, son comunes a todos los serotipos <sup>66</sup>, y juegan un papel esencial en la formación de biopelículas <sup>142</sup>. Además, poseen una estructura y un comportamiento muy similar entre sí en cuanto al reconocimiento de colina, por lo que una única molécula podría inhibir simultáneamente a todos los miembros de dicha familia, dificultando la aparición de resistencias.

##### **6.4.1. CBPs como enzibióticos**

El empleo de enzimas líticas de pared como terapia (enzibióticos) frente a infecciones neumocócicas ha sido y es en la actualidad ampliamente estudiado <sup>207</sup>. La unión a su diana (la pared celular bacteriana) se establece comúnmente por el

reconocimiento de la colina a través del CBM, lo que explica su alta especificidad por microorganismos que contienen colina en su envoltura. Debido a que la colina es esencial para la viabilidad de neumococo, el desarrollo de resistencia parece muy improbable <sup>207</sup>. La excepción corresponde a la lisozima Cpl-7, cuya unión es independiente de colina y muestra asimismo un espectro de acción más amplio <sup>117,289,290</sup>.

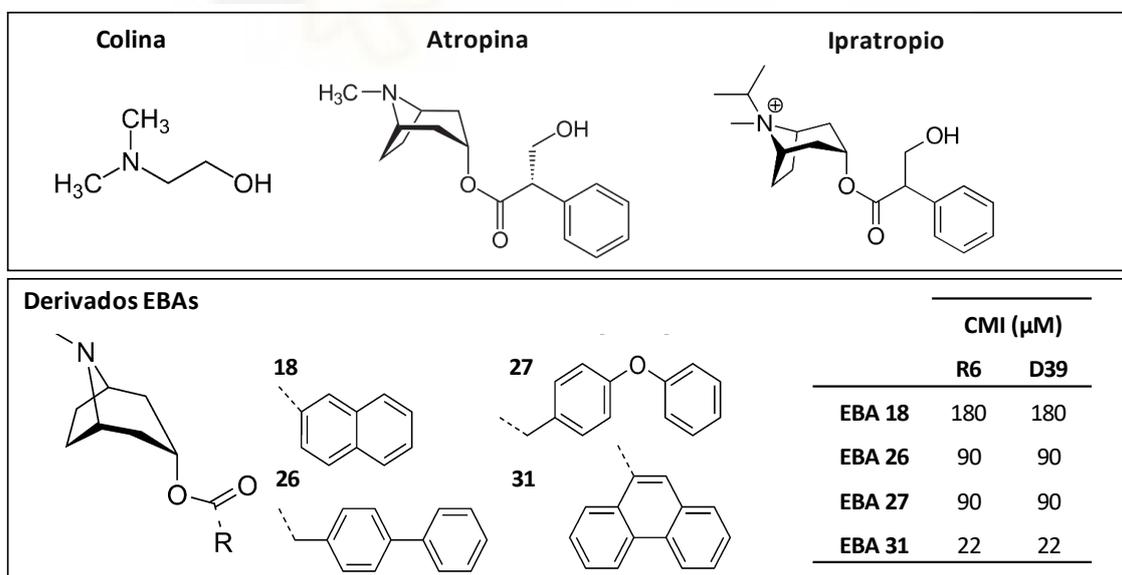
Se han probado con éxito enzimas líticas codificados por fagos (Pal, Cpl1, Cpl7) y por el propio huésped (LytA), tanto en ensayos *in vitro* como frente a una amplia variedad de modelos animales de infección bacteriana (neumonía, sepsis, otitis), así como en la formación de biopelículas y en la descolonización de las membranas mucosas <sup>207,267,291-295</sup>. Además se han descrito efectos sinérgicos entre diferentes endolisinas, como Cpl1-Pal <sup>254,257</sup>, y entre endolisinas y antibióticos, siendo incluso activos frente a cepas neumocócicas multirresistentes <sup>257,258,260 263</sup>. En la actualidad los enzibióticos más efectivos frente *S. pneumoniae* son las proteínas quiméricas PL3 (FM de Pal fusionado al CBM de LytA) <sup>296</sup>, y Cpl711 (FM de Cpl7 fusionado con Cpl1) <sup>261 297</sup>. PL3 a bajas dosis presenta una alta actividad bactericida específica frente a cepas que disponen en su superficie residuos de colina <sup>296</sup>.

### 6.4.2. Análogos de colina

Desde hace tiempo se sabe que una concentración alta de colina en el medio de cultivo (150 mM) inhibe la acción de las CBPs por competición con el ligando, induciendo la formación de largas cadenas <sup>298</sup>. Sin embargo, la alta concentración necesaria y los posibles efectos secundarios derivados de su administración en estas condiciones impiden el uso de colina como agente terapéutico, si bien abre la vía de la investigación de compuestos alternativos, funcionales a una concentración inferior.

El requisito mínimo necesario para el reconocimiento del ligando por parte de las CBPs es el de una amina terciaria con dos sustituyentes etilo o una amina cuaternaria con tres sustituyentes metilo <sup>299</sup>, lo que ha fomentado la búsqueda de análogos de colina con diferentes fines biotecnológicos <sup>156,299-302</sup>. De entre los análogos de colina así seleccionados cabe destacar los ésteres de aminas bicíclicas (EBAs), con la atropina e ipratropio como cabezas de serie de amina terciaria y cuaternaria respectivamente <sup>300</sup> (Figura 15). Estos compuestos, aunque se mostraron como eficaces inhibidores de las

CBPs, muestran un comportamiento inesperado ya que, a diferencia de la colina, no provocan la encadenación celular, y producen cambios morfológicos en la superficie de la bacteria disminuyendo su viabilidad en más de un 90 %<sup>300</sup>. Aunque estos compuestos podrían considerarse como potenciales antimicrobianos, sus efectos secundarios anticolinérgicos debido a las dosis requeridas, aún en el rango milimolar, constituye un serio inconveniente. El estudio del complejo entre la proteína CbpF y los ligandos atropina e ipratropio mediante cristalografía de rayos-X mostró la importancia de la fracción aromática de los EBAs, que está implicada en interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los residuos aromáticos de la CBP<sup>301</sup>. Esta información permitió el diseño racional de EBAs que mostrasen una interacción mejorada con la proteína, prestando especial atención a la diversidad en el número de anillos aromáticos y a su disposición espacial<sup>302</sup>. Los EBAs más relevantes de dicha quimioteca (Figura 15) fueron capaces de inhibir *in vitro* la actividad de LytA con una eficiencia 100 veces más alta que la colina<sup>302</sup>, y de detener el crecimiento *in vitro* de las cepas R6 (no encapsulada) y D39 (encapsulada), con CMI del orden de  $\mu$ M, concentraciones comparables a los que presentan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas comerciales actualmente en uso<sup>303</sup>.



**Figura 15.** Estructura de la molécula de colina y de los análogos de colina, ésteres de aminas bicíclicas (EBAs). Se muestra la fórmula molecular de los derivados de los EBAs y la CMI que presenta cada uno frente a las cepas de *S. pneumoniae* R6 y D39. Figura tomada de De Gracia Retamosa y col. (2015)<sup>302</sup>, mostrada con permiso de los autores.

#### 6.4.3. Dendrímeros funcionalizados con colina y análogos de colina

Como se ha apuntado más arriba, el uso de partículas dendriméricas constituye un procedimiento nanotecnológico muy eficaz para incrementar exponencialmente la actividad de un determinado ligando gracias a efectos de multivalencia. Este concepto se aplicó a la construcción de dendrímeros de colina y de atropina, compuestos que, aislados, ejercen su actividad antimicrobiana a concentración del orden de milimolar. La primera aproximación consistió en la construcción de dendrímeros de polipropilénimina (PPI) de varias generaciones funcionalizados con colina <sup>304</sup>.

Los estudios mostraron que los dendrímeros de colina de varias generaciones ( $g_x$ -cho) ejercen el mismo efecto que la colina a dosis hasta 5.000 veces inferiores (concentraciones efectivas equivalentes: 50 mM colina; 100  $\mu$ M  $g_2$ -cho; 10  $\mu$ M  $g_3$ -cho y  $g_5$ -cho) <sup>305</sup>, generándose largas cadenas que son más fácilmente fagocitadas por las células de la microglía <sup>306</sup>. Por su parte, los dendrímeros funcionalizados con 8 moléculas de atropina ( $g_2$ -dendropina) mejoran notablemente la eficacia inhibidora de la actividad de LytA *in vitro*, con una concentración inhibitoria al 50 % ( $IC_{50}$ ) en el rango nanomolar, es decir, se requiere una concentración de  $g_2$ -dendropina aproximadamente 45.000 veces inferior a la de atropina <sup>300,302</sup>. La diferencia entre ambos dendrímeros reside en que, mientras que los dendrímeros de colina inducen la formación de largas cadenas sin afectar la viabilidad celular, la  $g_2$ -dendropina a 1  $\mu$ M inhibe por completo el crecimiento de la cepa no capsulada R6 y a 10  $\mu$ M el de la cepa capsulada AR33118 (serotipo 3), altamente patógena y resistente a la levofloxacina <sup>302</sup>.





## II. OBJETIVOS

---



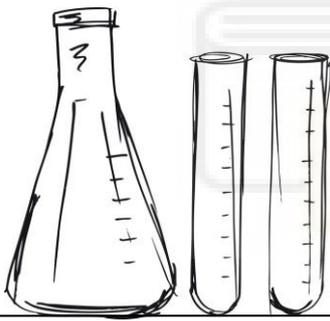
Las enfermedades infecciosas resultan cada vez más difíciles de atajar, debido a la diseminación global de la resistencia antimicrobiana. Es por ello de gran importancia el desarrollo de nuevas estrategias, que soslayen las complicaciones de las resistencias. *S. pneumoniae* es uno de los patógenos humanos más relevante a nivel mundial, causante de enfermedades con elevado impacto social, y que forma parte de la lista de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos publicada por la OMS.

El propósito principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos frente a *S. pneumoniae*, focalizando la investigación en la familia de las CBPs, por un lado, como un blanco de antimicrobianos apenas considerado hasta ahora pero muy atractivo debido a que participan en funciones esenciales para la viabilidad, colonización del huésped y virulencia, mientras que por otra parte pueden constituir por sí mismas fuentes de nuevos compuestos antineumocócicos.

Los objetivos concretos que nos planteamos investigar en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- Determinación del mecanismo de acción de los EBAs sobre *S. pneumoniae* que les distingue del resto de análogos de colina.
- Determinación del efecto de los EBAs sobre biopelículas simples de *S. pneumoniae* o mixtas con la bacteria Gram negativa *H. influenzae*.
- Caracterización de la estructura y la afinidad por el sustrato de los CBMs: C-Cpl1, C-LytA y C-CbpD. Ensayo como bloqueantes de las CBPs y como compuestos antineumocócicos no líticos.
- Caracterización de la estructura de péptidos sintéticos derivados de un CBR de LytA. Ensayo como bloqueantes de las CBPS y/o perturbadores de la membrana de *S. pneumoniae*.
- Estudio de la potenciación del efecto antimicrobiano de los CBMs y de los péptidos derivados de LytA de mayor interés mediante su disposición multivalente en oligómeros o dendrímeros.





Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---



**1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS**

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon las siguientes estirpes bacterianas y los plásmidos detallados en las tablas 1 y 2.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo/Fenotipo</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> con DE3</i>	307
RB791	W3110 <i>lacI<sup>q</sup></i>	308
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>		
R6	Cepa no capsulada derivada de D39	309
M11	Derivada de R6, <i>lytA</i> <sup>+</sup>	142
M22	Derivada de M11 (Nov <sup>r</sup> )	89
M31	Derivada de M11, $\Delta$ <i>lytA</i>	133
M31C	Derivada de M31, $\Delta$ <i>lytA lytC::ermC</i> ; Eri <sup>r</sup>	131
M32	$\Delta$ <i>lytA32</i>	310
R6B	R6, <i>ytB::ermC</i> ; Eri <sup>r</sup>	142
R6C	R6, <i>lytC::ermC</i> ; Eri <sup>r</sup>	142
R6CIB17	Cepa no floculante derivada de R6	Esta Tesis
P046	R6 derivative, <i>lytA::kan lytC::ermC</i> ; Kan <sup>r</sup> Eri <sup>r</sup>	142
P181	Transformante de M11 con DNA de 5086 (serotipo 19A), cepa S19A+	311
P233	Transformante de R6 con DNA de M22 (Nov <sup>r</sup> )	312
D39	Cepa encapsulada (NCTC 07466, serotype 2)	313
P093	Cepa derivada D39 ( <i>lytC</i> )	314
P095	Cepa derivada D39 ( <i>lytA</i> )	114
P096	Cepa derivada D39 ( <i>lytB</i> )	314
P139	Cepa derivada D39 ( <i>lytA, lytC</i> )	315
P170	Cepa derivada D39 ( <i>lytA, lytB, lytC</i> )	315
48	Serotipo 23F	J. Yuste, ISCIII
5086	Aislado clínico serotipo 19A, ST81	311
3498	Aislado clínico serotipo 8	J. Yuste, ISCIII
ATCC 49619	Cepa tipo serotipo 19F	Colección de Cultivos Tipo Americana
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>		
54997	Aislado clínico de un niño con otitis media aguada	316
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>		
CECT 110		Colección Española de Cultivos Tipo
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>		
CECT 5190		Colección Española de Cultivos Tipo

**Tabla 1.** Estirpes bacterianas empleadas  
*ermC*, eritromicina ribosoma metilasa. Nov, Novobiocina. Kan, Kanamicina. Eri, eritromicina.

Plásmido	Características	Referencia
pETccbpD	Plásmido derivado de pET21d(+), Amp <sup>r</sup> Sobreexpresa la proteína C-CbpD	Esta Tesis
pET-lzclytA	Plásmido derivado de pET21d(+), Amp <sup>r</sup> Sobreexpresa LZ-C-LytA	Esta Tesis
pCE17	Plásmido derivado de pIN-III(Ipp <sup>P</sup> -5)-A3, Amp <sup>r</sup> Sobreexpresa la proteína C-LytA	116
pCM1	Plásmido derivado de pIN-III(Ipp <sup>P</sup> -5)-A3, Amp <sup>r</sup> Sobreexpresa C-Cpl1	116

**Tabla 2.** Plásmidos empleados. Amp, ampicilina

## 1.2. Medios, condiciones de cultivo y de conservación

Las cepas se conservaron congeladas a - 80 °C en los diferentes medios de cultivo empleados a los que se añadió glicerol al 10-15 % (v/v) (concentración final). Los cultivos en medio líquido de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB): triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup> <sup>317</sup>, suplementado en los casos necesarios con ampicilina (0,1 mg mL<sup>-1</sup>), en agitación orbital (200 rpm, Innova 4000) a 37 °C. Su crecimiento se valoró por turbidimetría a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) utilizando el espectrofotómetro “Evolution 201” (Thermo Scientific). Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en placas Petri convencionales conteniendo medio LB suplementado con 1,5 % (p/v) de agar bacteriológico (Oxoid).

Para el cultivo en medio líquido de las cepas de *S. pneumoniae* se utilizó rutinariamente el medio C ajustado a pH 8,0 (CpH8) <sup>318</sup>, suplementado con extracto de levadura al 0,08 % (C+Y) (Oxoid), o el medio Cden-EA donde la colina es remplazada por la EA <sup>155</sup>. El crecimiento de los cultivos se llevó a cabo a 37 °C sin agitación, y se siguió por turbidimetría a 550 nm (D.O.<sub>550</sub>). Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas de agar de soja tripticaseína (Conda-Pronadisa) suplementado con 5 % de sangre desfibrinada de oveja (Thermo Fisher). Para obtener el cultivo de *S. pneumoniae* en fase exponencial sin riesgo de autólisis se realizó el inóculo correspondiente de *S. pneumoniae* (50 µL del cultivo procedente del glicerol a 0,4 D.O.<sub>550</sub> en 4 mL de medio C+Y) el día anterior y se dejó en el baño programable PolyScience, modelo AP15R-30-A12E, a 15 °C, programado para calentar a 37 °C a las 6:00 am, 3 horas antes del inicio de la jornada siguiente.

En cuanto al cultivo de *H. influenzae*, se empleó el medio infusión corazón (BD Bacto™ Brain Heart Infusion Referencia 237500) suplementado con hemina y dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) ( $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada suplemento) (sBHI), a  $37^\circ\text{C}$  en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5 %. Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas de agar chocolate (Conda-Pronadisa).

## **2. TÉCNICAS DE DNA**

### **2.1. Extracción de DNA cromosómico**

El DNA cromosómico de *S. pneumoniae* R6CIB17 se purificó utilizando el procedimiento descrito previamente <sup>319</sup> con pequeñas modificaciones. Para ello, las células de un cultivo crecido a D.O.<sub>550</sub> de 0,6 (10 mL) se sedimentaron por centrifugación a  $7.800 \times g$ , durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado obtenido se resuspendió en 0,4 mL de tampón de Morrison (30 mM ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), 0,4 % Sarkosyl, 0,1 % Triton X-100, 50 mM Tris pH 8,0) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  hasta la lisis total del cultivo (aproximadamente 10 min). El cultivo lisado se trató con RNasa ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y a continuación con proteinasa K ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se purificó en dos pasos con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando en cada paso a  $7.800 \times g$  durante 10 min para separar la fase acuosa de la orgánica e interfase (proteínas y contaminantes), y a continuación con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), para eliminar restos de fenol. La precipitación del DNA se llevó a cabo en presencia de etanol absoluto frío (1 mL), manteniéndolo 30 min a  $-20^\circ\text{C}$ . A continuación, se centrifugó durante 10 min a  $7.800 \times g$  y, tras eliminar el sobrenadante, el precipitado conteniendo el DNA se lavó con etanol al 70 % (1 mL) y se centrifugó de nuevo 10 min a  $7.800 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado final se dejó secar al aire para eliminar completamente el etanol de la muestra y finalmente el DNA se resuspendió en 0,2 mL de agua ultra pura (Millipore,  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) pH 8,0.

### **2.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La extracción del DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa) al 0,6 % (p/v) en tampón TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético, pH 8,0, SERVA), y utilizando el sistema Wide Mini-Sub® Cell GT de Bio-Rad. Las muestras

se cargaron con tampón de carga (10x: 0,1 % (p/v) xilencianol, 0,1 % (p/v) azul de bromofenol, 10 % (v/v) glicerol, 10 mM EDTA, pH 8,0). Como solución de tinción se utilizó Redsafe™ (Intron Biotechnology) y el campo eléctrico aplicado fue 75 V durante 60 min. El DNA se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **2.3. Secuenciación**

La secuenciación de DNA se llevó a cabo por la empresa Macrogen (Seul, Corea del Sur) utilizando un secuenciador automático modelo HiSeq2500 (Illumina). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *kit* Truseq nano DNA de Illumina, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador ProFlex PCR System Applied Biosystems (Thermo Fisher).

### **2.4. Preparación y transformación de células competentes**

La preparación de células competentes de *E. coli* y su transformación con DNA plasmídico se llevó a cabo por el método tradicional del  $\text{CaCl}_2$ <sup>317</sup>.

## **3. TÉCNICAS DE TRABAJO CON PROTEÍNAS**

### **3.1. Síntesis de péptidos**

Los péptidos indicados en la Tabla 3 fueron sintetizados por Caslo Aps (Lingbym, Denmark). En todos los casos, se siguieron los protocolos de síntesis en fase sólida de Fmoc (fluorenil-9 metiloxycarbonilo) y se purificaron mediante HPLC de fase inversa usando columnas C18 hasta alcanzar un 95 % o más de pureza. Los péptidos se prepararon en una solución de partida stock conteniendo 2 mg mL<sup>-1</sup> de cada compuesto disuelto en agua ultra pura ya que la presencia de sales induce a precipitación (Millipore, 18.2 MΩ cm).

<b>Péptidos sintetizados</b>	<b><math>\epsilon</math> (<math>M^{-1}cm^{-1}</math>)</b>	<b>PMT</b>
<b>P4A</b> (LytA <sub>239-252</sub> ) TGWKKIADKWYYFN	13.980	1820,1
<b>P4B</b> TGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWKKIADKWYYFN	27.960	4267,92
<b>P4C</b> TGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWKKIADKWYYFNEEGAMKT GWKKIADKWYYFN	41.940	6715,74
<b>P4C_NOME</b> TGWKKSADKWYYSNEEGAMKTGWKKSADKWYYSNEEGAMKT GWKKSADKWYYSN	41.940	6457,19
<b>P4C_NOCH</b> TGIKKIADKIIYFNEEGAMKTGIKKIADKIIYFNEEGAMKTGIKKIAD KIIYFN	4.470	6127,36

**Tabla 3.** Péptidos sintetizados. En azul se indica la secuencia repetida y en rojo las mutaciones introducidas respecto a la secuencia de P4A.  $\epsilon$ : coeficiente de extinción teórico  
PMT: peso molecular teórico

### 3.2. Síntesis de dendrímeros

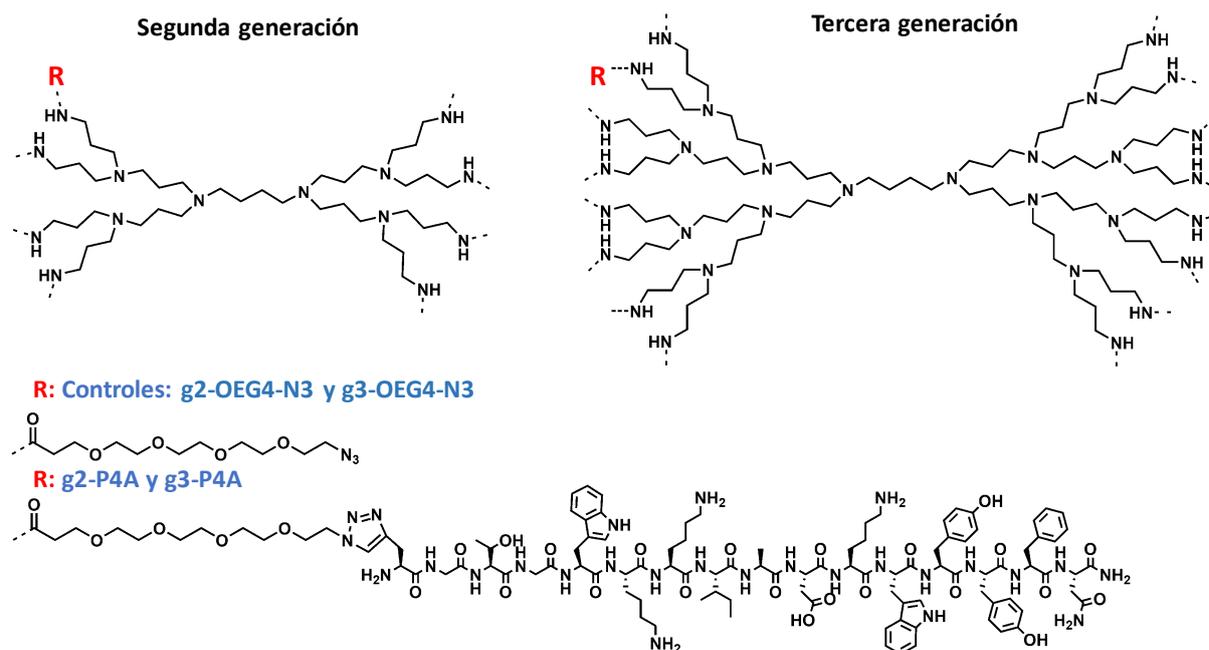
Los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A se sintetizaron en las instalaciones del laboratorio del Profesor E.W. Meijer (Universidad Técnica de Eindhoven - TUE, Holanda). La síntesis se llevó a cabo en dos etapas.

En la primera (activación) se generaron los dendrímeros g2-OEG4-N3 y g3-OEG4-N3 (controles) (Figura 16). Para ello se partió de los dendrímeros base aminados g2-NH<sub>2</sub> y g3-NH<sub>2</sub> con núcleo de PPI (Figura 16), a los que se hizo reaccionar con azido-dPEG4-NHS éster en cloroformo/trietilamina. Tras 21 h de reacción a temperatura ambiente, se añadieron unas gotas de agua y se procedió a evaporar el disolvente. El residuo se disolvió en metanol y se purificó en una columna IRA95 equilibrada en metanol. El eluido se concentró y dializó frente a agua conteniendo trietilamina al 0,2 % y posteriormente frente a agua pura, procediéndose finalmente a su liofilización. Estos dendrímeros se utilizaron como controles negativos (no funcionalizados con péptidos) en los experimentos.

Caracterización de los productos finales: MALDI-TOF: g2-OEG4-N3:  $Mw_{calc} = 2959,62$  g/mol,  $m/z_{obs} = 2960,14$  [M+H]<sup>+</sup>; g3-OEG4-N3:  $Mw_{calc} = 6059,47$  g/mol,  $m/z_{obs} = 6059,3$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RNM: g2-OEG4-N3 (400 MHz, D<sub>2</sub>O);  $\delta$  3,71 (t, 16H),  $\delta$  3,60 (m, 96H),  $\delta$  3,43 (t, 16H),  $\delta$  3,14 (t, 16H),  $\delta$  2,66, 2,55, 2,45, 1,65, 1,49 (núcleo dendrímérico); g3-OEG4-N3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>); 3,74 (t, 32H), 3,62 (m, 192H), 3,39 (t, 32H), 3,24 (t, 32H), 2,47, 2,41, 2,14, 1,60, 1,55, 1,39 (núcleo dendrímérico).

En la segunda etapa de síntesis, se llevó a cabo el acoplamiento del péptido P4A para generar los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A, tal y como sigue de manera resumida: se prepararon por separado soluciones de partida del péptido P4A en agua y de los dendrímeros activados en dimetilformamida/diclorometano. Por otro lado, se añadió aminoguanidina a una solución de sulfato de cobre, y posteriormente Bim(py)<sub>2</sub> y, tras un minuto de reacción, ascorbato sódico. A esta mezcla de reacción se le añadieron el péptido y el dendrímero activado, y se dejó agitando durante dos días a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a purificar el producto usando filtros de centrifuga Amicon con tamaños de tamiz de 10 kDa (g2-P4A) o 30 kDa (g3-P4A), lavando el filtro exhaustivamente con agua. Finalmente, el residuo se recuperó y liofilizó.

Caracterización: MALDI-TOF: g2-P4A:  $Mw_{calc} = 18729,36$ ,  $m/z_{obs} = 18773,2$  (~8 copias de péptido), 16775,5 (~7 copias), y 14720,6 (~6 copias). g3-P4A:  $Mw_{calc} = 37598,94$ ,  $m/z_{obs} = 37796,8$  (~16 copias de péptido), 35787,3 (~15 copias), 33820,1 (~14 copias), 31688,8 (~13 copias) y 29421,9 (~12 copias). En todos los casos la especie predominante era la que contenía mayor número de copias, de manera que a lo largo del trabajo se considera, para simplificar los cálculos, que los dendrímeros contienen 8 y 16 copias de péptido respectivamente (Figura 16).



**Figura 16.** Estructura molecular de los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A, y sus respectivos controles (g2-OEG4-N3 y g3-OEG4-N3).

### 3.3. Expresión y purificación de proteínas

La construcción de los plásmidos conteniendo los genes que codifican para las proteínas C-CbpD (pET-ccbpd) y LZ-C-LytA (pET-lzclytA) se llevó a cabo por la empresa GenScript (Nueva Jersey, EE. UU.). La secuencia de nucleótidos que codifica para el módulo de unión a colina de CbpD (C-CbpD) de la cepa R6 (aminoácidos del 353 a 448) se insertó entre los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI* del plásmido pET21d(+) (Novagen), respetando la fase de lectura, dando lugar al plásmido pET-ccbpd. Por otro lado, una región que incluía la secuencia codificante de la cremallera de leucinas de *Pseudomonas putida* KT2440 (aminoácidos de 106 a 142) se fusionó aguas arriba del gen *c-lytA* de la cepa R6 (aminoácidos 187 a 318 de LytA),<sup>116</sup> y ambas se clonaron en el vector pET21d(+) entre los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, respetando la fase de lectura, dando lugar al plásmido pET-lzclytA. En ambos plásmidos, se introdujeron tres codones de terminación justo antes de la secuencia *XhoI* (Figura 17 y Figura 18).

```

C^C ATG GGA TGG AAA AAA ATC AAC GGC TCC TGG TAT CAC TTC AAA AGC
  M  G  W  K  K  I  N  G  S  W  Y  H  F  K  S
AAC GGT AGC AAA AGC ACG GGC TGG CTG AAA GAC GGC TCA TCC TGG TAC
  N  G  S  K  S  T  G  W  L  K  D  G  S  S  W  Y
TAT CTG AAA CTG AGC GGC GAA ATG CAG ACC GGT TGG CTG AAA GAA AAC
  Y  L  K  L  S  G  E  M  Q  T  G  W  L  K  E  N
GGC TCT TGG TAT TAC CTG GGC AGC TCT GGT GCG ATG AAA ACG GGC TGG
  G  S  W  Y  Y  L  G  S  S  G  A  M  K  T  G  W
TAT CAA GTC AGC GGT GAA TGG TAT TAC TCG TAC AGT TCC GGT GCG CTG
  Y  Q  V  S  G  E  W  Y  Y  S  Y  S  S  G  A  L
GCC ATT AAC ACC ACG GTG GAT GGC TAC CGT GTT AAT TCC GAC GGT GAA
  A  I  N  T  T  V  D  G  Y  R  V  N  S  D  G  E
CGC GTT TAA TGA TGA C^TC GAG
  R  V  -  -  -  (Stop XhoI)
    
```

**Figura 17.** Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (negro) resultante tras la clonación para la obtención del plásmido pET-ccbpD, que codifica para la proteína C-CbpD. Se muestran sombreados en gris los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, y en azul los tres codones de terminación, justo antes de la secuencia *XhoI*.

```

C^C ATG GGC CTG GGC GTT CCG AGC CGC AAT GAA ATC AAA GCG CTG
  M  G  L  G  V  P  S  R  N  E  I  K  A  L
CAC CAA CAA GTG GAT AGC CTG ACC AAA CAA ATC GAG AAG CTG ACC
  H  Q  Q  V  D  S  L  T  K  Q  I  E  K  L  T
GGT GCG AGC GTG ACC CCG ATC AGC AGC CGT AAG GGT GGC ATT GTT
  G  A  S  V  T  P  I  S  S  R  K  G  G  I  y
CAC AGC GAC GGT AGC TAC CCG AAG GAT AAA TTC GAG AAA ATC AAC
  H  S  D  G  S  Y  P  K  D  K  F  E  K  I  N
GGT ACC TGG TAC TAT TTT GAT AGC AGC GGC TAC ATG CTG GCG GAC
  G  T  W  Y  Y  F  D  S  S  G  Y  M  L  A  D
CGT TGG CGT AAG CAC ACC GAT GGC AAC TGG TAT TGG TTC GAC AAC
  R  W  R  K  H  T  D  G  N  W  Y  W  F  D  N
AGC GGT GAA ATG GCG ACC GGC TGG AAA AAA ATC GCG GAC AAG TGG
  S  G  E  M  A  T  G  W  K  K  I  A  D  K  W
TAC TAT TTT AAC GAG GAA GGT GCG ATG AAA ACC GGC TGG GTG AAG
  Y  Y  F  N  E  E  G  A  M  K  T  G  W  V  K
TAT AAA GAC ACC TGG TAC TAT CTG GAT GCG AAA GAG GGT GCG ATG
  Y  K  D  T  W  Y  Y  L  D  A  K  E  G  A  M
GTT AGC AAC GCG TTC ATT CAG AGC GCG GAT GGT ACC GGC TGG TAC
  V  S  N  A  F  I  Q  S  A  D  G  T  G  W  Y
TAT CTG AAA CCG GAC GGC ACC CTG GCG GAT CGC CCG GAA TTT ACC
  Y  L  K  P  D  G  T  L  A  D  R  P  E  F  T
GTG GAA CCG GAT GGT CTG ATT ACC GTG AAG TGA TAA TAA C^TC GAG
  V  E  P  D  G  L  I  T  V  K  -  -  -  (stop XhoI)
    
```

**Figura 18.** Secuencia nucleotídica (gris) resultante tras la clonación para la obtención del plásmido pET-lzclytA, que codifica para la proteína LZ-C-LytA. En rojo, el segmento que corresponde a la secuencia de la cremallera de leucinas de *P. putida* KT2440; en negro la secuencia de C-LytA y en verde la región separadora de ambos dominios. Se muestran sombreados en gris los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, y en azul los tres codones de terminación, justo antes de la secuencia *XhoI*.

La sobreexpresión de los genes que codifican para los CBMs se llevó a cabo en cepas de *E. coli*: *c-cbpD* y *lz-c-LytA* en BL21 (DE3), mientras que *c-lytA* (a partir del plásmido pCE17) y *c-cp1* (a partir de pCM1) se expresaron en la cepa RB791<sup>116</sup>. La purificación de proteínas se realizó por cromatografía de afinidad y elución con colina, tal y como se ha descrito previamente<sup>116,299</sup>. Para ello se preparó un preinóculo en medio LB en presencia de ampicilina 0,1 mg mL<sup>-1</sup> dejándose crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inoculó 1 L de LB con 10 mL del preinóculo anterior y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0,6. La expresión de los genes *c-lytA* y *c-cp1* se indujo en este momento por la adición de 0,5 mM de isopropyl-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), dejando crecer el cultivo durante 14 h a 37 °C (200 rpm). En el caso de los genes *c-cbpD* y *lz-c-LytA* su expresión se indujo por la adición de 0,5 mM de IPTG durante 3 h a 30 °C, ya que comprobamos que en estas condiciones obteníamos una cantidad superior de proteína en relación a la fracción proteica total. Las células se recogieron mediante centrifugación a 5.000 × *g* (Avanti® J-26XP, Beckman Coulter) durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en 50 mL de tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0, y se lisaron por sonicación (Branson 250) mediante 10 ciclos de 15 s a 4 °C. El extracto resultante se centrifugó a 10.000 × *g* durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se cargó en una columna cromatográfica (30 x 1,5 cm, Bio-Rad) que contenía 10 mL de lecho empaquetado de di-etilaminoetanol (DEAE)-celulosa (forma fibrosa, Sigma-Aldrich) previamente equilibrada en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0. A continuación la columna se lavó exhaustivamente con tampón 20 mM fosfato sódico, 1,5 M NaCl, pH 7,0, seguido de un segundo lavado con tampón 20 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, pH 7,0 hasta que no se detectó presencia de proteína en la fracción de lavado. Finalmente, la proteína de interés se eluyó de la columna con tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 conteniendo cloruro de colina 2 % (p/v).

Las proteínas purificadas se dializaron a 4 °C frente a tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 para eliminar la colina utilizada en la elución, y se almacenaron a - 20 °C hasta su utilización. En el caso de LZ-C-LytA, se observó que la proteína precipitaba casi por completo al retirar la colina por diálisis, por lo que se llevó a cabo una diálisis gradual en presencia de concentraciones decrecientes de colina (de 75 a 10 mM) y a una concentración máxima de proteína de 6-8 μM.

### **3.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

La pureza de las preparaciones proteicas fue comprobada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)<sup>320</sup>, utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. El gel concentrador fue preparado a una concentración final de acrilamida (BioRad) del 4 % (p/v) y el separador a una concentración de 15 % (p/v). Los geles fueron teñidos con EZBlue™ (Sigma-Aldrich).

### **3.5. Valoración de la concentración de proteína pura**

La concentración de las proteínas puras se valoró por espectroscopia de absorción a 280 nm (Evolution 201, Thermo Scientific), utilizando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{280}$ ) teórico calculado a partir de la secuencia primaria (Programa *ProtParam* del servidor EXPASY, <http://web.expasy.org/protparam>). Los coeficientes de absorción molar a 280 nm así calculados para C-LytA, C-CbpD, C-Cpl1 y LZ-C-LytA son: 62.540, 58.900, 81.076 y 67.380 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> respectivamente.

## **4. TÉCNICAS BIOFÍSICAS**

### **4.1. Dicroísmo circular (CD)**

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-815 (Tokio, Japón), equipado con un sistema Peltier PTC-423S, empleando cubetas con paso óptico de 0,1 cm para la región del UV lejano (250-195 nm) y de 1 cm para el UV cercano (320-250 nm). En el caso de los dendrímeros se empleó siempre la cubeta de paso óptico de 1 cm. Todas las mediciones se llevaron a cabo en 20 mM de fosfato sódico, pH 7,0 y a 20 °C. Dado que los péptidos y los dendrímeros tienden a precipitar en este tampón, una vez preparada la muestra se centrifugó durante 3 min a 9.000 × *g* y se comprobó la concentración final previa al experimento. Los espectros de longitud de onda para estas muestras se adquirieron a una velocidad de 50 nm min<sup>-1</sup>, con un tiempo de respuesta de 2 s y promediando cuatro espectros. Los datos de CD se procesaron en primer lugar restando el espectro de la línea base obtenido con tampón y en ausencia de muestra, y posteriormente fueron suavizados con el método proporcionado por el software Jasco Spectra Analysis.

Los resultados finales obtenidos se expresan en elipticidad molar de residuos ( $[\theta]$ ), en unidades de  $\text{grad cm}^2 (\text{dmol de residuos})^{-1}$  (Ecuación 1).

$$[\theta]_{\lambda} = \theta_{\lambda} / ([M] \cdot n \cdot d \cdot 10) \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde  $[\theta]_{\lambda}$  es la elipticidad molar por residuo,  $\theta_{\lambda}$  es la elipticidad a una longitud de onda determinada,  $[M]$  la concentración molar de proteína o péptido,  $n$  el número de aminoácidos menos uno, y  $d$  el paso óptico en centímetros.

Los barridos de temperatura se llevaron a cabo a una velocidad de  $60 \text{ }^{\circ}\text{C h}^{-1}$  con un tiempo de respuesta de 2 s. Tras alcanzar la temperatura final, la muestra se enfrió a  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y, tras 1 h de equilibrio, se registró de nuevo el espectro de longitud de onda para comprobar la reversibilidad del proceso de desnaturalización. Las concentraciones peptídicas empleadas fueron 30, 20 y  $10 \text{ }\mu\text{M}$  para P4A, P4B y P4C respectivamente con objeto de mantener la misma concentración en equivalentes de CBR4, habiéndose descartado en todo caso efectos inespecíficos en los espectros de cada péptido en este rango de concentraciones. La muestra se estratificó con aceite mineral para evitar la evaporación durante el proceso. Los barridos térmicos se ajustaron a la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ecuación 2).

$$\Delta G^{\circ}(T) = \Delta H_m \left(1 - T/T_m\right) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde  $\Delta G^{\circ}(T)$  es la energía libre de la transición a una temperatura  $T$ ,  $\Delta H_m$  es la entalpía de van't Hoff,  $T_m$  es el punto medio de desnaturalización (en Kelvin) y  $\Delta C_p$  es la diferencia en la capacidad calorífica entre los estados nativos y desnaturalizados. Utilizamos un valor estimado de  $\Delta C_p$  de  $12 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \times (\text{número de aminoácidos})^{321}$ , resultando  $2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para la proteína C-Cpl1 (165 aminoácidos) y  $1,2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para C-CbpD (97 aminoácidos). Para los péptidos se asumió un valor de  $\Delta C_p = 0$ .

Para determinar el número de CBSs de las proteínas C-Cpl1 y C-CbpD, se realizaron barridos térmicos a concentraciones saturantes de colina. El número de CBS se obtuvo a partir de la gráfica de van't Hoff, empleando la ecuación de van't Hoff (Ecuación 3).

$$\ln([C]) = -\left(\frac{\Delta H_m}{nR}\right) * 1/T_m + \Delta S/nR \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde [C] es la concentración de colina,  $T_m$  es el punto medio de desnaturalización (en Kelvin),  $\Delta H_m/nR$  es la pendiente de la línea de ajuste,  $\Delta H_m$  es la entalpía media de van't Hoff,  $R$  es la constante de gas y  $n$  el número de CBSs.

Los ensayos de titulación con dodecilsfosfolina (DPC, Avanti Lipids Inc.) se llevaron a cabo registrando el espectro de longitud de onda de la muestra a concentraciones crecientes de DPC y a una concentración fija de compuesto (1  $\mu$ M g2-P4A; 0,2  $\mu$ M g3-P4A; 30  $\mu$ M P4A; 20  $\mu$ M P4B; 10  $\mu$ M P4C y sus mutantes) en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0.

La elipticidad a 222 nm ( $\theta_{222}$ ) está relacionada con el contenido en hélice  $\alpha$  ( $f_H$ ) que se puede calcular a partir de la (Ecuación 4). La conversión de  $\theta_{222}$  a ( $f_H$ ) requiere del conocimiento de la línea base de elipticidad del random coil ( $\theta_C$ ) y de la hélice  $\alpha$  completa ( $\theta_H$ ).

$$f_H = (\theta_{222} - \theta_C)/(\theta_H - \theta_C) \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Los valores de  $\theta_C$  y  $\theta_H$  depende de la temperatura y se calculan emplenado las siguientes ecuaciones:

$$\theta_C = 2220 - 53 T$$

$$\theta_H = (-44000 + 250T)(1 - 3/N_r)$$

Donde  $T$  es la tempetarura en  $^{\circ}$ C y  $N_r$  es el número de residuos.

#### **4.2. Espectroscopía de fluorescencia**

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorímetro PTI-Quanta Maser QM-62003SE (Birmingham, NJ, EE.UU) excitando la muestra a 280 nm y registrando la emisión entre 300 y 400 nm. La velocidad de barrido fue de 60 nm min<sup>-1</sup>, y la apertura de las rendijas de los monocromadores de excitación y emisión fue de 0,75-1 mm. Se empleó una cubeta de 5 x 5 mm para la medición de los CBMs (1  $\mu$ M) y para los péptidos (7,5  $\mu$ M P4A; 5  $\mu$ M P4B; 2,5  $\mu$ M P4C y sus mutantes). Por

su parte, para los dendrímeros (0,5  $\mu\text{M}$  g2-P4A; 0,2  $\mu\text{M}$  g3-P4A) se empleó una cubeta de 10 x 10 mm. Todas las muestras se estudiaron en presencia de tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 a 20 °C.

En los experimentos de titulación en presencia de diferentes concentraciones de colina, a partir de los espectros de fluorescencia obtenidos se calculó el promedio de la intensidad de emisión ( $|\langle \lambda \rangle|$ ) (Ecuación 5).

$$|\langle \lambda \rangle| = \sum_1^n (\lambda_i I_i) / \sum_1^n I_i \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde  $|\langle \lambda \rangle|$  es el promedio de la longitud de onda de emisión,  $I_i$  es la intensidad de fluorescencia medida a cada longitud de onda  $\lambda_i$  y  $n$  es el número de puntos recogidos.

A partir de la representación del promedio de intensidad frente a la concentración de ligando se calculó la constante de afinidad por la colina libre. En concreto, la afinidad del módulo C-CbpD, los péptidos y los dendrímeros estudiados se estimó considerando un solo tipo de sitio de unión, y de acuerdo al análisis de Langmuir (Ecuación 6).

$$|\langle \lambda \rangle| = \frac{|\langle \lambda \rangle|_{\max} [L]}{K_d + [L]} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde  $|\langle \lambda \rangle|$  es el cambio en el promedio de la longitud de onda en cada punto,  $(|\langle \lambda \rangle|)_{\max}$  es el cambio máximo extrapolado a la saturación con el ligando ( $L$ ), y  $K_d$  es la constante de disociación.

En el caso de la proteína C-Cpl1 el análisis de la afinidad contempla tanto la dimerización de la proteína inducida por la unión del ligando como la existencia de 5 sitios de unión independientes por dímero. En este caso, el cálculo de la afinidad se realizó utilizando una versión ampliada de la ecuación publicada por Monterroso y cols. (2008)<sup>128</sup>, la cual contemplaba únicamente la existencia de 4 sitios (Ecuación 7):

$$|\langle \lambda \rangle| = \{[M]^2 r (A + B) - p[D]_0\} / [C] \quad \text{(Ecuación 7)}$$

donde:

$$[M] = \frac{\{-1 + \{1 + 8[C]r(1 + K_b[L])^5\}^{1/2}\}}{4r(1 + K_b[L])^5}$$

$$A = p(1 + K_b[L])^5$$

$$B = 5h(K_b[L] + 4K_b^2[L]^2 + 6K_b^3[L]^3 + 4K_b^4[L]^4 + K_b^5[L]^5)$$

siendo:

$[M]$  = concentración proteica de forma monomérica libre,  $[D]_0$  = concentración de forma dimérica en ausencia de ligando,  $[C]$  = concentración total de proteína (en unidades monoméricas),  $r$  = constante de dimerización de la proteína en ausencia de ligando,  $p$  = cambio en  $|\langle\lambda\rangle|$  sufrido por la dimerización de la proteína libre en ausencia de ligando,  $K_b$  = constante de unión del ligando (inverso de la constante de disociación) y  $h$  = cambio en  $|\langle\lambda\rangle|$  inducido por la unión del ligando al dímero (por mol de sitios en cada monómero). La constante de disociación ( $K_d$ ) se calculó como  $1/K_b$ .

#### **4.3. Cálculo de la concentración micelar crítica**

La concentración micelar crítica (CMC) del DPC en tampón 20 mM fosfato sódico a pH 7,0 y 20 °C se determinó por fluorescencia, de acuerdo con el procedimiento de Chattopadhyay y London (1984)<sup>322</sup>, usando 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) como sonda de fluorescencia. Se empleó una cubeta de 10 x 10 mm, y la apertura de las rendijas de excitación y emisión se ajustó a 1 nm. La longitud de onda de excitación fue de 360 nm y la emisión se registró entre 380 y 500 nm. Se midió el incremento de fluorescencia de la sonda DPH tras la adición de cantidades crecientes de DPC, observándose dos tramos lineales de distinta pendiente. Dichos tramos se ajustaron por separado a la ecuación de una línea recta. La resolución del sistema de las dos ecuaciones lineales rinde el punto de intersección de ambos brazos de la titulación, obteniéndose así la CMC.

#### **4.4. Unión de proteínas a superficies**

Se emuló el sustrato nativo utilizando dos aproximaciones distintas: 1) mediante el uso de nanopartículas magnéticas (200 nm) recubiertas con DEAE y 2) mediante "chips" derivatizados con el análogo de colina *N, N*-dietil-1,3-diaminopropano (DEAPA).

#### **4.4.1. Nanopartículas magnéticas (NPMs) revestidas con DEAE**

Para los experimentos de unión de los CBMs a las nanopartículas magnéticas se utilizó una suspensión de nanopartículas de 200 nm funcionalizadas con DEAE-dextrano (NPMs-DEAE, Chemicell, Berlín, Alemania). Las partículas se utilizaron como emuladores de la pared bacteriana de neumococo en base a los siguientes cálculos:

- Cálculo de densidad de moléculas de DEAE:

Conociendo que cada molécula de DEAE presenta un átomo de nitrógeno, se calculó cuántos grupos funcionales se disponen en cada NPM. Se dispone de  $2,2 \times 10^{14}$  NPM  $g^{-1}$ , y el análisis elemental de las NPs, realizado por la empresa Nanoimmunotech es de 0,04 % de nitrógeno en peso, es decir,  $1,7 \times 10^{19}$  moléculas de DEAE  $gramo^{-1}$ . A partir del cociente entre  $1,7 \times 10^{19}$  moléculas de DEAE  $gramo^{-1}$  y  $2,2 \times 10^{14}$  NPM  $gramo^{-1}$  se obtiene que se disponen 78200 moléculas de DEAE  $partícula^{-1}$ . Finalmente, dividiendo por el área de las NPM ( $125.664 \text{ nm}^2$ ) obtenemos el valor de densidad 0,6 DEAE/ $nm^2$ .

- Cálculo de densidad de moléculas de colina en la pared celular:

Sabiendo que  $10^8$  células de neumococo pesan 91  $\mu g$  (Pedro García, comunicación personal), que la pared celular representa un 20 % del peso seco total de la célula en bacterias Gram-positivas <sup>323</sup>, y que la colina supone el 4,8 % del peso seco de las paredes <sup>324</sup>, se deduce que disponemos de  $51 \times 10^6$  moléculas de colina por célula. Por otro lado, conociendo que la célula de neumococo es un esferoide prolato de dimensiones  $1320 \times 920 \text{ nm}$  <sup>325</sup>, se calcula el área de la célula ( $3,5 \times 10^6 \text{ nm}^2$ ). Finalmente, al realizar el cociente obtenemos el valor de densidad 14 colina/ $nm^2$ .

Las NPMs se utilizaron a una concentración final de  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  en un volumen final de 300  $\mu L$  en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0. previamente lavadas y equilibradas en el citado tampón, se incubaron frente a distintas concentraciones de proteína (C-LytA, C-CbpD o C-Cpl1) durante 30 min a temperatura ambiente en una rueda giratoria a velocidad suave. De esta manera, parte de la proteína queda adsorbida por unión no covalente de afinidad a las nanopartículas. Transcurrido el tiempo, el complejo proteína-NPMs se retiró mediante la ayuda de un imán (MagnetoPURE, Chemicell), y el

sobrenadante recogido se centrifugó durante 3 min a  $9.000 \times g$  para eliminar cualquier resto de NPMs. La cantidad de proteína retenida se calculó mediante la diferencia entre la proteína añadida inicialmente y la proteína no retenida, cuantificada espectrofotométricamente en el sobrenadante tras la incubación. La afinidad de la proteína por las NPMs se analizó mediante la ecuación de Langmuir considerando un solo tipo de sitio de unión para los tres CBMs estudiados (Ecuación 8).

$$q = \frac{q_{max} \cdot C}{K_d + C} \text{ (Ecuación 8)}$$

Donde  $q$  es la cantidad de proteína retenida a las NPMs,  $q_{max}$  es la capacidad máxima de adsorción,  $C$  es la concentración de proteína inicial y  $K_d$  es la constante de disociación.

#### **4.4.2. Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)**

Los experimentos se realizaron en un equipo Biacore X-100 (GE) a 25 °C. Los soportes de carboximetildextrano (CM5) empleados se funcionalizaron con el análogo de colina DEAPA a través de la amina primaria. Para ello, la activación de los grupos carboximetilados del soporte se llevó a cabo mediante inyección durante 7 min de una mezcla 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) a concentración de 0,4 M y 0,1 M respectivamente, y a un flujo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . Una vez activados los grupos, el ligando DEAPA se inyectó durante 100 s a un flujo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ , empleando concentraciones de entre 1-100  $\mu\text{M}$ , hasta alcanzar una densidad de 250 RUs. Por último, los grupos reactivos de la superficie del chip que no reaccionaron con el análogo de colina, y que podrían dar problemas al inyectar la proteína, se bloquearon por inyección de 1 M etanolamina pH 8,5 durante 7 min.

Para el estudio de la afinidad de los CBMs por el ligando se aplicaron concentraciones crecientes de cada proteína sobre los chips funcionalizados y en presencia de tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0, conteniendo Tween al 0,005 %. La velocidad de flujo ( $V_f$ ), el tiempo de asociación ( $t_{as}$ ) y disociación ( $t_{dis}$ ) para cada una de las proteínas estudiadas y la regeneración se indican en la Tabla 4.

	<b>C-LytA</b>	<b>C-Cpl1</b>	<b>LZ-C-LytA</b>
<b><math>V_f</math> (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	20	20	30
<b><math>t_{as}</math> (s)</b>	250	350	180
<b><math>t_{dis}</math> (s)</b>	250	350	150
<b>Regeneración con SDS</b>	Sin regeneración	0,5 %; 60 s (Tres veces)	0,5 %; 30 s

**Tabla 4.** Condiciones empleadas para cada CBM en el ensayo Biacore. ( $V_f$ ), velocidad de flujo; ( $t_{as}$ ), tiempo de asociación; ( $t_{dis}$ ) tiempo de disociación.

A partir de los sensogramas de SPR obtenidos, se determinó la afinidad de cada proteína al representar la respuesta (RU) frente a la concentración de proteína. Para ello la curva se ajustó a un modelo de unión de un sitio único en el caso de C-Cpl1 y LZ-C-LytA, y de dos sitios de unión para C-LytA. A diferencia de lo obtenido mediante el procedimiento por NPMs, mediante la técnica SPR la proteína C-LytA se ajustó correctamente al modelo de dos sitios de unión. Esta diferencia posiblemente se debe a que la técnica de SPR es mucho más sensible, por lo que teniendo en cuenta que los sitios de alta afinidad son minoría mediante la técnica de NPMs no pudo detectarse. De acuerdo a las siguientes ecuaciones se obtuvo la constante de disociación (Ecuación 9 y 10).

Modelo para un tipo de sitio de unión:

$$R_{eq} = \frac{R_{max}[P]}{K_d + [P]} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Modelo para dos tipos de sitios de unión:

$$R_{eq} = \frac{R_{max1}[P]}{K_{d1} + [P]} + \frac{R_{max2}[P]}{K_{d2} + [P]} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Donde,  $R_{eq}$  es la respuesta en el equilibrio (medida experimental máxima para cada punto a diferentes concentraciones),  $[P]$  es la concentración de proteína en el equilibrio,  $R_{max}$  es la respuesta máxima de unión a la superficie para un tipo de sitio (calculada por el ajuste), mientras que  $R_{max1}$  y  $2$  serían para dos tipos de sitios,  $K_d$ , es la constante de disociación macroscópica para un tipo de sitios, y  $K_{d1}$  y  $K_{d2}$  son las constantes de disociación para el modelo de dos tipos de sitios.

#### **4.5. Ultracentrifugación analítica: velocidad de sedimentación**

Los ensayos de velocidad de sedimentación para las muestras de C-CbpD, C-Cpl1 y LZ-C-LytA (0,85 – 5,5  $\mu$ M) se llevaron a cabo en tampón 20 mM fosfato sódico pH 7,0, en ausencia o en presencia de 10 mM colina.

En cada caso la muestra se cargó (320  $\mu$ L) en una celda de ultracentrifugación analítica de Epon-carbón de doble sector y 12 mm de paso óptico. Los experimentos se llevaron a cabo a 48.000 rpm y 20 °C en una ultracentrífuga analítica XL-I (Beckman-Coulter Inc.) equipada con sistemas de detección de absorbancia UV-VIS e interferencia de Raleigh, utilizando un rotor An-50Ti. Los perfiles de sedimentación para los módulos C-CbpD y C-Cpl1 se registraron por absorbancia a 230 nm cada 5 min, mientras que para la proteína LZ-C-LytA se midió a 280 nm. La distribución de los coeficientes de sedimentación  $c(s)$  se calculó mediante el ajuste global de los datos experimentales por mínimos cuadrados utilizando soluciones numéricas de la ecuación de Lamm (que describe el transporte de macromoléculas bajo un campo centrífugo) implementadas en el *software* SEDFIT<sup>326</sup>. Dado que el valor del coeficiente de sedimentación depende de los parámetros físicos y químicos de la solución (agua, 20 °C y dilución infinita), estos valores se corrigieron a las condiciones estándar ( $s_{20, w}$ ) usando el programa Sednterp<sup>327</sup>.

#### **5. MODELADO DE LAS PROTEÍNAS LZ-C-LytA y C-CbpD**

Las coordenadas tridimensionales del modelo de la proteína LZ-C-LytA se obtuvieron como sigue: las correspondientes a la secuencia conteniendo el motivo de cremallera de leucinas (LZ) de la fasina PhaF de *P. putida* KT2440 (MGLGVPSRNEIKALHQVDSLTKQIEKLTGASVTPISSRK) se tomaron del modelo tridimensional previamente realizado<sup>328</sup>, mientras que las de C-LytA (forma monomérica o dimerica a través de la horquilla C-terminal) se tomaron de la estructura elucidada por difracción de rayos-X (código PDB: 1HCX)<sup>156</sup>. Ambas se enlazaron en una única secuencia "LZ-C-LytA" utilizando el programa SwissPDB Viewer 4.1<sup>329</sup>. Según se enlazará a uno de los monómeros de C-LytA o al dímero completo de la estructura cristalográfica (que interacciona por la horquilla C-terminal), se obtuvo respectivamente la forma monomérica de LZ-C-LytA y dimerica (dímero Ct-Ct) de la proteína de fusión. Por otro

lado, el fichero PDB con las coordenadas del monómero LZ-C-LytA, creado como se indica más arriba, se sometió a las utilidades M-ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/m-zdock/>;<sup>330</sup>) para la generación del resto de posibilidades de oligomerización (dímeros, trímeros y tetrameros). En los casos en los que el servidor fue incapaz de generar el modelo buscado, se sometió a M-ZDOCK únicamente la secuencia MGLGVPSRNEIKALHQVDSLTKQIEKLTGASVTPISSRK, conteniendo el motivo LZ, generándose los oligómeros correspondientes. A continuación, dichos modelos sirvieron de plantilla para el alineamiento de monómeros y dímeros Ct-Ct, según correspondiera, usando para ello la modalidad "Iterative Fit" de SwissPDB Viewer. Una vez que los alineamientos se habían realizado, se eliminaron las secuencias LZ utilizadas para crear la plantilla, quedando únicamente los oligómeros buscados. Las propiedades hidrodinámicas teóricas para cada uno de los modelos se estimaron con el programa HydroPro 10<sup>331</sup>, empleando como parámetros una densidad de disolvente de 1 g mL<sup>-1</sup>, una viscosidad de 0,01 poise y la temperatura de 20 °C. El volumen específico empleado fue de 0,722 mL g<sup>-1</sup>, tomando como base el valor descrito para la propia C-LytA<sup>167</sup>.

La estructura tridimensional del módulo C-CbpD se modeló mediante la utilidad Phyre2<sup>332</sup>, usando como plantilla más aproximada la de la estructura de la fosfocolinesterasa (Pce) de neumococo (código PDB: 2BIB).

## **6. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS**

### **6.1. Métodos de estudio de células bacterianas crecidas en cultivo planctónico**

#### **6.1.1. Determinación de la viabilidad celular**

La viabilidad celular se cuantificó mediante diluciones seriadas del cultivo en el medio de cultivo correspondiente (6 diluciones 1:10 por duplicado en cada ensayo), y sembrando 10 µL de cada dilución en placas de agar de soja tripticaseina suplementadas con 5 % de sangre de oveja desfibrinada (Thermo Fisher). Tras incubar las placas durante 16 h a 37 °C, se procedió a contar el número de colonias. Solo se consideraron las diluciones donde se podían contar de 30 a 300 colonias. En los ensayos donde el efecto bactericida fue alto, observando un número de UFC menor de 30, se sembraron 100 µL

de la suspensión directa (no diluida). En paralelo se llevó a cabo un control con cultivo sin tratar.

### **6.1.2. Ensayo bactericida**

Un cultivo de *S. pneumoniae* R6CIB17 se creció en medio C+Y o Cden-EA hasta alcanzar una D.O.<sub>550</sub> de 0,3. Tras enfriar el cultivo en hielo durante 10 min, las células se centrifugaron a  $3.800 \times g$  durante 10 min a 4 °C, y el precipitado resultante conteniendo las células se lavó dos veces con una solución de 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0. Tras ajustar el cultivo a una D.O.<sub>550</sub> de 0,6 empleando el mismo tampón, se transfirió a una placa multipocillo (150 µL por pocillo) y se procedió al tratamiento con los péptidos derivados de LytA (10 y 30 µM) y los dendrímeros (0,5 y 1 µM). El volumen de compuesto añadido en todos los casos fue inferior al 10 % del volumen final, de esta forma se evita la dilución del cultivo. Las muestras se incubaron a 37 °C y sin agitación durante 1, 2 o 3 horas, dependiendo del compuesto, y transcurrido ese tiempo se determinó la viabilidad celular tal y como se ha detallado en el apartado anterior. Como control, se ejecutó el mismo experimento con tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, en ausencia de compuesto a probar.

Esta técnica, denominada “resting cells”, permite probar el efecto del agente antibacteriano frente a una suspensión celular en estado de reposo, evitando que interfieran en la medida el crecimiento de la bacteria o su estado metabólico<sup>267</sup>.

### **6.1.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Los ensayos de CMI se llevaron a cabo en la empresa Ikan Biotech (Pamplona, España) siguiendo las indicaciones descritas en la Norma Internacional ISO 20776. Las bacterias se crecieron en medio Mueller-Hinton (CAMHB), en el caso de *S. pneumoniae* suplementado con 5 % de sangre. La CMI se determinó utilizando los criterios del Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico (CLSI) mediante el sistema de microdilución y empleando las cepas de neumococo D39, 3498 y ATCC 49619, así como *P. aeruginosa* CECT 110 y *S. aureus* CECT 5190. En primer lugar, se distribuyeron 100 µL por pocillo del medio CAMBH, seguidamente se inoculó con 5 µL de la cepa seleccionada ajustando la concentración final de células a  $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, y 25 µL de sonda INT que permite

observar los pocillos donde hay crecimiento bacteriano (color rojizo) y donde no hay crecimiento (color amarillo). Se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 18-20 h para favorecer el crecimiento del microorganismo, en el caso de *S. pneumoniae* se incubó con un 5% de CO<sub>2</sub>. La CMI se calculó como la concentración más baja del agente a la cual se inhibe el crecimiento de forma visible. En paralelo se realizaron controles de crecimiento para cada cepa ensayada, y un control positivo y negativo para comprobar el correcto funcionamiento de la sonda INT.

#### **6.1.4. Ensayo de permeabilización de la membrana plasmática**

La evaluación del efecto sobre la permeabilización de la membrana celular de *S. pneumoniae* R6 por los compuestos seleccionados se llevó a cabo utilizando como sonda Sytox Green (Invitrogen). Un aumento en la permeabilidad de la membrana conlleva un incremento en la emisión de fluorescencia, causado por la unión del colorante a los ácidos nucleicos.

Un cultivo de *S. pneumoniae* R6 crecido en medio C+Y hasta una D.O.<sub>550</sub> de 0,6 se centrifugó a  $3.800 \times g$  durante 10 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0 conteniendo 1 μM de la sonda Sytox Green, y se dispensaron en una placa de 96 pocillos de fondo negro (100 μL por pocillo). Seguidamente, la placa se introdujo en un lector BMG POLARstar Galaxy (Offenburg, Alemania), y una vez que se obtuvo una lectura estable en un pocillo extra conteniendo únicamente 0,1 % Triton X-100 (TX-100), se agregó en los pocillos correspondientes el compuesto a testar a una concentración final de 10 μM para péptidos, 0,5 μM dendrímeros y la concentración equivalente a la CMI para los EBAs. La emisión de fluorescencia se siguió en tiempo real (504 nm/524 nm, longitud de onda de excitación/emisión). En paralelo, se llevó a cabo un control negativo, conteniendo células y tampón únicamente y uno positivo, conteniendo células más 0,1 % TX-100 desde el inicio del ensayo (control de máxima permeabilidad). Los resultados se expresan en porcentaje de fluorescencia respecto al control de células completamente permeabilizadas, obtenido mediante la adición de TX-100 al 0,1 % al finalizar el experimento en cada pocillo.

La permeabilidad de la membrana de los EBAs también se analizó usando 3,5-dipropiltiacarbocianina (diSC3-5) como sonda (Thermo Fisher). La intensidad de la fluorescencia en este caso varía en respuesta a los cambios en el potencial de transmembrana. El experimento se llevó a cabo de manera análoga al anterior, excepto que las células bacterianas se resuspendieron en un tampón fosfato salino (PBS, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) conteniendo 0,6  $\mu$ M diSC3-5. Se dispensaron en placas de múltiples pocillos (90  $\mu$ L por pocillo) a los que se agregaron 10  $\mu$ L del compuesto correspondiente. La fluorescencia se midió después de una incubación de 1 h utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 622 y 670 nm, respectivamente. Se añadió DOC a una concentración final de 0,1 % para registrar los valores máximos de fluorescencia.

### **6.1.5. Ensayo de fagocitosis**

El ensayo fue realizado por el grupo del Prof. Roland Nau de la Universidad de Göttingen, Alemania.

#### Preparación de los macrófagos peritoneales murinos

Los ratones C57/Bl6N (7 ratones para los experimentos con C-Cpl1 y 5 para los de LzClytA, de 10-14 semanas de edad) se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizó por duplicado un lavado peritoneal con una solución de 5 mL de tampón PBS 0,01 M frío, y utilizando para ello una aguja de calibre 21. La suspensión celular se recogió en un tubo y se centrifugó a 500  $\times g$  durante 8 min a 4 °C, realizando un lavado de las células con PBS. El sedimento se disolvió finalmente en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco Modifies Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS, del inglés *Fetal Calf Serum*, GIBCO Life technologies) inactivado por calor, más 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de penicilina y 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de estreptomina. Las células se contaron en un hemocitómetro Neubauer, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 15  $\times 10^4$  células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmosfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Pasadas 48 h desde la siembra, el medio se cambió a condiciones libres de antibióticos en medio DMEM suplementado con 10 % de FCS.

### Incubación de *S. pneumoniae* R6 con CBMs

En primer lugar, la cepa R6 de *S. pneumoniae* se cultivó en caldo de soja tríptica (Sigm-Aldrich) sin agitación a 37 °C y en presencia de 5 % CO<sub>2</sub> durante 22 h, determinando el crecimiento bacteriano mediante ensayos de viabilidad celular. A continuación, una muestra de 1 mL de cultivo se trató con C-Cpl1 o LZ-C-LytA a una concentración final de 1 μM (30 μL de C-Cpl1 de la solución de partida a 600 μg mL<sup>-1</sup> o 55,5 μL de LZ-C-LytA de la solución de partida a 360 μg mL<sup>-1</sup>) bien en la fase de rezago, en cuyo caso se incubaron durante 16 h a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>, o bien en la fase exponencial tardía durante 2 h en las mismas condiciones de cultivo.

### Ensayo de fagocitosis

Finalmente, una muestra de 200 μL del cultivo de *S. pneumoniae* R6 tratado con una de las proteínas se centrifugó a 1.000 × *g* durante 5 min a temperatura ambiente (25 °C). El sedimento se resuspendió en el mismo volumen de medio DMEM suplementado con 10 % de FCS, y posteriormente se añadió a los cultivos de macrófagos en una relación de aproximadamente 100 bacterias por fagocito (1,5 × 10<sup>6</sup> UFC/pocillo). La incubación de bacterias y macrófagos se prolongó durante 1 h a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, y con objeto de eliminar las bacterias extracelulares, las células se lavaron dos veces con NaCl al 0,9 % y se incubaron durante 1 h a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> con DMEM suplementado con 10 % FCS y 100 mg mL<sup>-1</sup> de antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich). A continuación, los macrófagos se lavaron dos veces con NaCl al 0,9 % y se lisaron con 100 μL de agua destilada. Las bacterias intracelulares se cuantificaron mediante la realización de ensayos de viabilidad en placas de agar de soja tripticaseína (Conda-Pronadisa) suplementado con 5 % de sangre desfibrinada de oveja (Thermo Fisher).

#### **6.1.6. Actividad leishmanicida**

*Leishmania donovani* se cultivó a 28 °C en el medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) suplementado con 10% de SFBIC (suero fetal bobino inactivado por calor) (Thermo Fisher). Los parásitos se recolectaron en la fase exponencial tardía de

crecimiento, se lavaron y se resuspendieron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en el medio RPMI sin rojo fenol (Thermo Fisher) en presencia del compuesto a tratar (EBAs 18, 26, 27 y 31) durante 72 h a 26 °C.

La proliferación de los parásitos se midió por reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que se añadió a una concentración final de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  y se incubó durante 1 h. Al reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de la familia formazanos, de color violeta e insoluble en agua. Seguidamente el formazán obtenido se solubilizó en SDS (2 % [p/v], concentración final) y se determinó la absorbancia midiendo a 595 nm (D.O.<sub>590</sub>) en un lector de placas tras esperar 2 horas (Microplate-reader Model 680, Bio-Ra). El valor registrado fue la IC<sub>50</sub>. Las muestras se analizaron por triplicado y los experimentos se repitieron al menos dos veces.

#### **6.1.7. Visualización de muestras de neumococo en cultivos planctónicos**

##### **6.1.7.1. Microscopía de barrido laser confocal (CLSM)**

Las células se tiñeron con el *kit* de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probes). Para ello a 1 mL del cultivo se le adicionaron 3  $\mu\text{L}$  de una solución conteniendo SYTO9:yoduro de propidio en proporción 1:1, y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad. La observación de las células se llevó a cabo con un CLSM Leica TCS-SP2-AOBS-UV, utilizando un aumento de 63 X y 100 X. La longitud de onda de excitación/emisión para SYTO9 y para yoduro de propidio fue 488/500-550 nm y 543/600-670 nm, respectivamente.

##### **6.1.7.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido de emisión de campo (FESEM)**

El protocolo de preparación de las muestras es similar para ambas técnicas de microscopía. Se tomó 1 mL de cultivo (D.O.<sub>550</sub> 0,3-0,6) se centrifugó a  $3.800 \times g$  durante 10 min a 4 °C, y la muestra de células recolectadas se lavó dos veces con 2 mL PBS. A continuación, las células se resuspendieron en 0,5 mL de 2 % glutaraldehído (v/v) (grado I, Sigma-Aldrich) en 0,1 M cacodilato sódico (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron durante 1 h a 4 °C para su fijación. Tras realizar dos lavados post-fijación con 2 mL de tampón 0,1 M

cacodilato sódico, la muestra se resuspendió en 0,5 mL de 1 % tetróxido de osmio (v/v) (Sigma-Aldrich) y se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras este tiempo, las células se lavaron dos veces con 2 mL de tampón 0,1 M cacodilato sódico y se deshidrataron mediante series graduales de 10 min cada una de 30 %, 60 %, dos rondas de 90 %, y dos rondas de 100 % de acetona (0,5 mL).

Las muestras para ser visualizadas en el TEM se centrifugaron a  $3.800 \times g$  durante 10 min a 4 °C y se incluyeron en un volumen final de 150  $\mu$ L de resina comercial Epoxy (Embedding Medium kit, Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. A partir de la muestra incluida en la resina se prepararon secciones de 60 nm empleando el microtomo Leica ultracut UCT, y dichas secciones se incluyeron en rejillas de cobre (G200). Una vez incorporada la muestra en las rejillas se tiñeron con acetato de uranilo 2 % (p/v) y citrato de plomo 0,4 % (p/v) durante 15 y 5 min respectivamente. Finalmente, las muestras se visualizaron en un TEM de 120 kV, marca JEOL modelo JEM-1400 Plus equipado con una cámara de adquisición de imágenes modelo GATAN marca ORIUS.

En el caso de la preparación de las muestras para FESEM, las células se concentraron en la segunda ronda de acetona 90 % al resuspenderlas en un volumen final de 150  $\mu$ L. Para su visualización se dejó secar una gota de la muestra sobre el portaobjetos perteneciente al microscopio. Debido a la rugosidad de la superficie, para observar la muestra adecuadamente fue necesario cubrir el soporte previamente con un cubreobjetos de 6 mm de diámetro. Las muestras se visualizaron en un FESEM marca ZEISS modelo Merlin VP Compact, equipado con un sistema de microanálisis por EDX marca BRUKER modelo Quantax 400.

## **6.2. Métodos relativos al estudio de células bacterianas crecidas en biopelícula**

### **6.2.1. Formación de la biopelícula**

Para la formación de una biopelícula se utilizaron placas de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano (Costar 3595; Corning) y se utilizó el protocolo descrito en estudios anteriores<sup>142</sup>. Las células de *S. pneumoniae* (cepas R6 y P181) se crecieron en medio C+Y a 37 °C hasta una D.O.<sub>550</sub> de 0,6. A continuación, se llevó a cabo una dilución

1/10 del cultivo R6, y una dilución 1/100 del cultivo P181 en el mismo medio. Seguidamente, se inocularon 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular por pocillo y se incubaron durante 5 h a 34 °C en el caso de los cultivos de R6, y 6 h a 37 °C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % para el cultivo de P181. Tras este periodo, el crecimiento bacteriano se valoró por turbidimetría a  $\text{D.O.}_{595}$  en un lector de placas (Microplate Absorbance Reader 2020; Anthos Labtec Instruments GmbH). A continuación, y con el propósito de determinar la formación de la biopelícula, las células se tiñeron durante 15 min a temperatura ambiente con una solución de 50  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (CV) al 1 % (sin retirar los 200  $\mu\text{L}$  de cultivo). Transcurrido el tiempo, se eliminó el cultivo planctónico y la biopelícula se lavó 3 veces con 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Finalmente, se resuspendieron las células teñidas en 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 96 % y se midió la  $\text{D.O.}_{595}$ .

Para la formación de biopelículas mixtas, las cepas empleadas fueron *H. influenzae* 54997 no tipificable y *S. pneumoniae* P233. El cultivo de *H. influenzae* 54997 se creció en el medio sBHI hasta alcanzar una  $\text{D.O.}_{550}$  de 0,5. El sedimento obtenido tras centrifugar el cultivo se resuspendió en medio C + Y suplementado con hemina y NAD (15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  cada uno) (dilución 1/100). Por su parte, el cultivo de *S. pneumoniae* P233 se creció en medio CpH8 a 37 °C hasta alcanzar una  $\text{D.O.}_{550}$  de 0,5 y, de igual forma, el sedimento obtenido tras centrifugar el cultivo se resuspendió en medio C + Y (dilución 1/100). Las suspensiones de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* se mezclaron en proporción 1:1, y se dispensaron en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  en las placas de 96 de poliestireno (Costar 3595 Corning). La formación de la biopelícula se desarrolló durante 6 h a 37 °C en una atmósfera al 5 % de  $\text{CO}_2$ , tras lo cual se procesó según el método de tinción descrito anteriormente.

### **6.2.2. Ensayos de inhibición y disgregación de biopelículas**

En los ensayos de inhibición de la formación de la biopelícula, el análogo de colina correspondiente y disuelto en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0, se añadió junto con el inóculo bacteriano desde el inicio del crecimiento en los pocillos. En todos los casos el volumen empleado de compuesto no superó el 10 % del volumen final del inóculo (200  $\mu\text{L}$ ) evitando así la dilución. Transcurrido el tiempo de crecimiento, la biopelícula se tiñó con CV como se describe en el apartado anterior, y en ocasiones también se determinó la viabilidad celular de la biopelícula formada, según el protocolo detallado a continuación.

Los ensayos de disgregación de biopelículas generadas por *S. pneumoniae* R6 se realizaron en placas de 96 pocillos de poliestireno (Costar 3595 Corning) si bien, en el caso de las biopelículas de la cepa P181 y las biopelículas mixtas, no se observó un efecto disgregador claro en este soporte, por lo que en estos casos se emplearon placas con fondo de vidrio (placa WillCo, WillCo Wells B.V., Holanda). Estas placas tienen un tamaño de pocillo mayor, por lo que se inocularon 2 mL de cultivo. Una vez generada la biopelícula, el cultivo planctónico se retiró con ayuda de una pipeta sin tocar la base (para evitar la rotura de la biopelícula). A continuación, se añadió un volumen de 100 o 1000  $\mu\text{L}$  (en función de la placa utilizada, tal y como se ha explicado) del análogo de colina que se desea probar su efecto disgregante, disuelto en 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 a la concentración requerida, y se incubó durante 1 h a 37 °C bajo 5 % de  $\text{CO}_2$ . Para analizar la disgregación, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad de las células que conforman la biopelícula siguiendo el protocolo detallada a continuación.

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad de las células formadoras de la biopelícula se realizó el siguiente protocolo. Una vez finalizado el ensayo, el sobrenadante se retiró y se añadieron 100 o 1000  $\mu\text{L}$  de tampón PSB (en función de la placa empleada). Seguidamente con ayuda de la punta de la pipeta se raspó la biopelícula, con el propósito de disgregar las células, y se determinó la viabilidad de esa suspensión celular mediante el método detallado en el apartado “Materiales y Métodos 6.1.1. Viabilidad celular”. Para la determinación del número de UFC, se emplearon placas de agar sangre en el caso de biopelículas simples de las cepas R6 y P181 de *S. pneumoniae*, mientras que en el caso de biopelículas mixtas se utilizaron placas de agar sangre con 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de novobiocina para la cepa P233 de *S. pneumoniae* y placas de agar chocolate con 0,16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina para *H. influenzae*; en todos los casos las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas.

### **6.2.3. Visualización de biopelículas por CLSM**

La visualización de las biopelículas se llevó a cabo mediante microscopia laser confocal. Para ello, se realizó un experimento en paralelo en placas con fondo de vidrio (placa WillCo, WillCo Wells B.V., Holanda) siguiendo el mismo protocolo de crecimiento de biopelículas detallado en el apartado “Materiales y Métodos 6.2.1. Formación de la

*biopelícula*”: 2 mL de cultivo bacteriano por cada pocillo se dejaron crecer junto con el análogo a colina correspondiente durante el tiempo requerido y a la temperatura correspondiente en cada ensayo, según fuera un ensayo de inhibición o disgregación. A continuación, se eliminó la solución y la biopelícula se enjuagó con agua estéril para eliminar las bacterias no adheridas. Finalmente, la biopelícula se trató con el fluorocromo correspondiente: Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Invitrogen) conjugado con la lectina aglutinina de *Helix pomatia* (HPA), que es capaz de unirse fuertemente a la superficie de las células de *S. pneumoniae*<sup>312</sup>, SYTO59 (Molecular Probes Invitrogen) que tiñe todas las células o el *kit BacLight LIVE/DEAD*. Los fluorocromos (1 µL de SYTO59; 7,5 µL de HPA-Alexa 488; 1 µL *BacLight*) disueltos en 0,3 mL de tampón 10 mM Tris-HCl, pH 8,8 se añadieron directamente sobre la biopelícula. Todos los procesos de tinción requirieron un tiempo de incubación de 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras ese tiempo, la solución de tinción se retiró con ayuda de la pipeta, la biopelícula se lavó con 0,5 mL de tampón PBS, y finalmente se añadieron 0,3 mL del mismo tampón. La observación de la muestra teñida se realizó con un aumento de 63 X en un CLSM Leica TCS-SP2-AOBS-UV equipado con un láser de iones de argón. La longitud de onda de excitación/emisión para SYTO9 y para yoduro de propidio fue 488/500-550 nm y 543/600-670 nm, respectivamente. Finalmente, las imágenes fueron analizadas con el software LCS de Leica.

## **7. ENSAYOS CON PEZ CEBRA COMO MODELO ANIMAL**

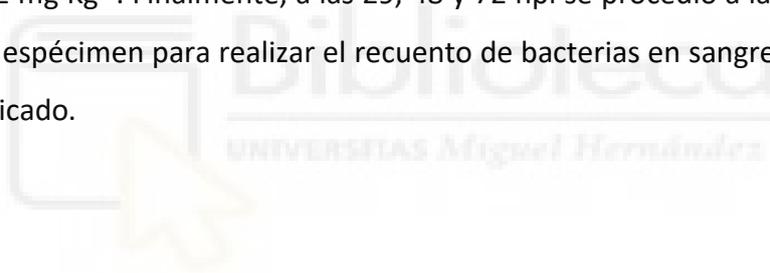
### **7.1. Ensayos de toxicidad aguda**

Los ensayos de toxicidad aguda en embriones de pez cebra se llevaron a cabo en la empresa Ikan Biotech (Pamplona, España). El test se inició inmediatamente después de la fecundación de los huevos y se continuó hasta las 72 h post-fertilización (hpf). Los embriones de pez cebra se pusieron en contacto de forma individual (en placas de 96) con el dendrímero g3-P4A a concentraciones de 0,05, 0,1 y 0,2 µg por pocillo. Se emplearon un total de 20 embriones por cada condición testada. Finalmente, transcurridas 24, 48 y 72 hpf, se evaluaron los efectos de toxicidad aguda descritos por cuatro puntos apicales: (1) embriones coagulados, (2) retraso en el desarrollo de somitas, (3) desprendimiento de

la cola, y (4) falta de latido de corazón. Los embriones que presentan alguna de estas características se contabilizan como muertos. Cada estudio se realizó por triplicado.

## **7.2. Ensayo de eficacia frente a una infección en adultos de pez cebra**

Se empleó una población de 30 peces adultos, que se dividieron de forma aleatoria en seis grupos (n = 5 por grupo). Tras anestesiar a los peces por inmersión en una solución de 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de triclaína (MS-222 Sigma-Aldrich) durante 10 min, se inyectaron intraperitonealmente (empleando una jeringa Hamilton de 10 µL) con aguja del calibre 31G x 13 mm (BD Microlance), 10 µL de una solución conteniendo: i) 10<sup>6</sup> UFC de la cepa 3469 de *S. pneumoniae* (4 grupos); ii) 10<sup>6</sup> UFC de la cepa altamente patógena 23F de *S. pneumoniae* (1 grupo, control positivo); iii) solución salina 0,9 % estéril (1 grupo, control negativo). A las 29 h post-infección (hpi), tres de los cuatro grupos infectados con la cepa 3469 se trataron con el dendrímero funcionalizado con P4A (g3-P4A) a concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2 mg Kg<sup>-1</sup>. Finalmente, a las 29, 48 y 72 hpi se procedió a la extracción de sangre de cada espécimen para realizar el recuento de bacterias en sangre. El estudio se realizó por triplicado.







## IV. RESULTADOS



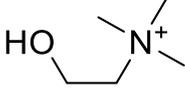
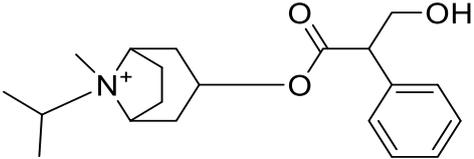
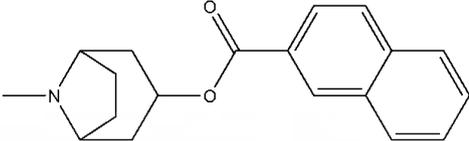
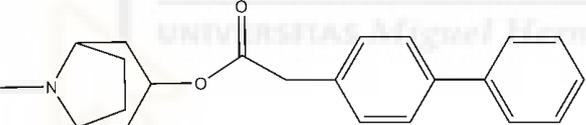
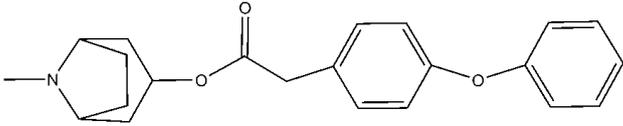
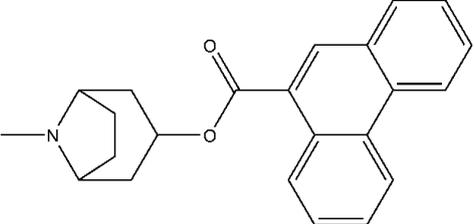
## **1. ESTUDIO DE ÉSTERES DE AMINAS BICÍCLICAS (EBAs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE A *S. pneumoniae***

### **1.1. Desestabilización de la membrana plasmática por efecto de la adición de EBAs**

Como se ha descrito más arriba, los EBAs no se comportan como meros análogos de colina, sino que presentan una actividad bactericida no esperada en principio, con una CMI del orden de mM<sup>300</sup> o  $\mu\text{M}$ <sup>302</sup> (Tabla 5).

Con objeto de determinar si las CBPs con actividad hidrolasa de pared celular están involucradas en este proceso, el compuesto EBA 31 (el EBA más eficiente probado hasta ahora) se añadió a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  a cultivos de *S. pneumoniae* R6 o D39 deficientes en al menos una de las siguientes peptidoglicánhidrolasas del huésped: LytA, LytB y LytC. Como puede observarse en la Tabla 6 el crecimiento celular disminuyó en menor medida en aquellos mutantes deficientes del gen *lytA*, lo que sugiere una participación importante de esta autolisina. Además, la presencia simultánea de cloruro de colina (150 mM) en los cultivos de R6 y D39 condujo a una reducción sustancial de la lisis bacteriana inducida por el EBA 31 junto con una recuperación significativa de la viabilidad (Tabla 7), compatible con la inhibición parcial de la actividad LytA<sup>298</sup>.

Para verificar si los EBAs podrían inducir la liberación de la proteína LytA citoplasmática, al promover su translocación a través de la membrana, se analizó la permeabilidad celular en un cultivo de neumococo tratado con el EBA correspondiente, y utilizando la entrada del fluorocromo vital Sytox Green como sonda. Como se puede ver en la Figura 19.A, todos los EBAs probados (Tabla 5), empleados a concentración equivalente a la CMI sobre cultivos planctónicos<sup>302</sup> desestabilizaron la membrana de *S. pneumoniae* a niveles cercanos a los causados por el detergente Triton X-100, utilizado como control positivo, siendo EBA 31 el compuesto que presentó la cinética más rápida y a la menor concentración.

Compuesto	Estructura química	CMI <sup>a</sup>	log P <sup>b</sup>
Colina		-	-4,24
Ipratropio		12 mM	-1,4
18		180 μM	4,1
26		90 μM	4,6
27		90 μM	4,7
31		22 μM	4,9

**Tabla 5.** Estructura y características de los EBAs empleados. <sup>a</sup> CMI<sub>50</sub> previamente publicadas <sup>300,302</sup>. <sup>b</sup> Logaritmo de la estimación del coeficiente de partición en octanol:agua, calculada utilizando los servicios web de Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) (Molinspiration Cheminformatics, Nova Ulica, Slovak Republic).

Cepa	Características	Descenso en D.O. <sub>550</sub> (%)
R6	Cepa no encapsulada derivada de D39 (Hex <sup>+</sup> , <i>lytA</i> <sup>+</sup> )	89
M31	Derivada de M11 (Hex <sup>-</sup> ; $\Delta$ <i>lytA</i> )	25
R6B	Derivada de R6 (Hex <sup>+</sup> ; <i>lytB</i> )	78
R6C	Derivada de R6 (Hex <sup>+</sup> ; <i>lytC</i> )	82
P046	Derivada de R6 ( <i>lytA lytC</i> )	2
D39	Cepa encapsulada (serotipo 2) ( <i>lytA</i> <sup>+</sup> )	82
P095	Derivada D39 ( <i>lytA</i> )	20
P096	Derivada D39 ( <i>lytB</i> )	65
P093	Derivada D39 ( <i>lytC</i> )	85
P139	Derivada D39 ( <i>lytA lytC</i> )	14
P170	Derivada D39 ( <i>lytA lytB lytC</i> )	28

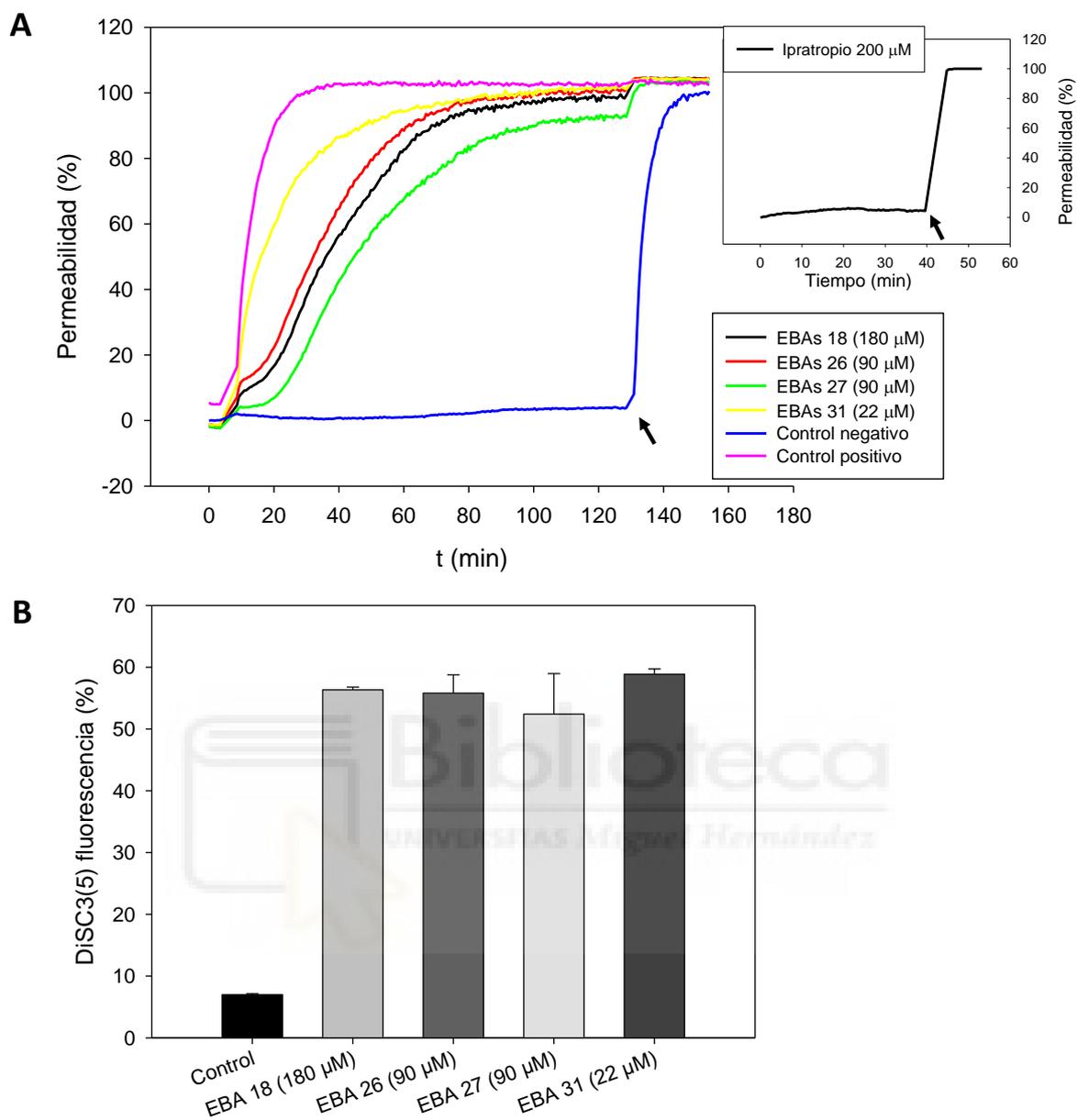
**Tabla 6.** Efecto del EBA31 (concentración final 100  $\mu$ M) sobre el crecimiento de cada una de las cepas mutantes de *S. pneumoniae* indicadas. El compuesto se añadió al comienzo de la fase exponencial. Se muestra la disminución de la D.O.<sub>550</sub> en porcentaje, en comparación con un control no tratado de la misma cepa después de 4 h de incubación a 37 °C. Ensayos realizados por triplicado.

	Descenso en D.O. <sub>550</sub> con respecto al control (%)		Viabilidad celular con respecto al control (%)	
	R6	D39	R6	D39
EBA 31	89	82	< 0,001	< 0,001
EBA 31 y Colina	27	37	2,4	0,1

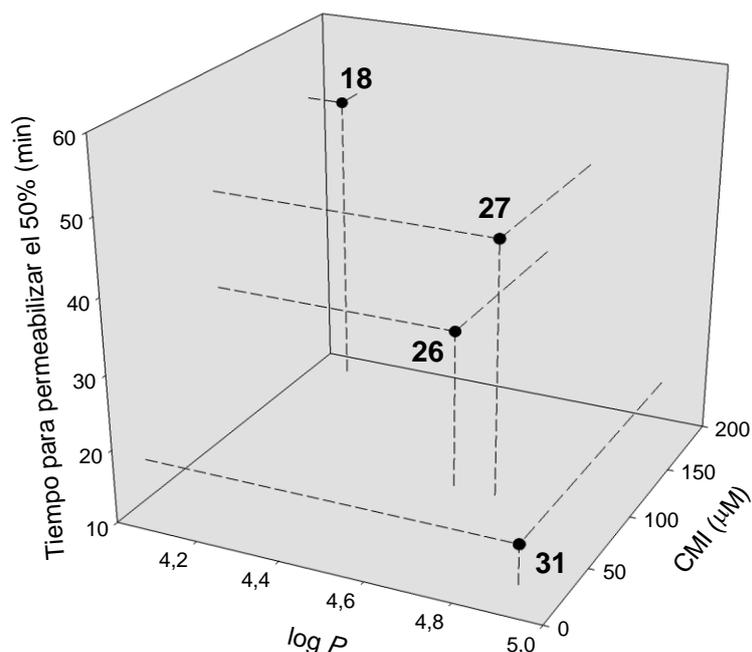
**Tabla 7.** Efecto del cloruro de colina sobre la actividad antimicrobiana de EBA 31. A los cultivos en crecimiento exponencial se le administró el compuesto EBA 31 a una concentración final de 100  $\mu$ M. La mitad del cultivo tratado también recibió cloruro de colina (a una concentración final de 150 mM). Las bacterias se incubaron durante 4 h a 37 °C. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes.

Para confirmar el efecto desestabilizante de los EBAs sobre la membrana, se llevó a cabo un experimento de permeabilidad utilizando el compuesto fluorescente diSC3-5, una sonda cuya intensidad varía en respuesta a los cambios en el potencial de membrana <sup>333</sup>. La Figura 19.B muestra que la adición de los EBAs causa un cambio significativo en la fluorescencia de la sonda, lo que indica un alto grado de despolarización de la membrana (alrededor del 50 %) con respecto a la adición de DOC 0,1 %. Estos resultados indican que los EBAs, además de ser capaces de unirse a las CBPs e inhibir su actividad, muestran una actividad adicional de desestabilización de la membrana; este hecho podría entonces inducir la liberación masiva de LytA, la cual sería la responsable final de la autólisis.

Las características químicas de los EBAs son clave para explicar este efecto, ya que estas moléculas contienen un resto polar (amina terciaria bicíclica) esterificado a una estructura altamente hidrofóbica, policíclica y aromática (Tabla 5), propensa a la inserción en membranas biológicas. De hecho, la Figura 20 muestra la correlación entre las características fisicoquímicas de los EBAs probados y su efecto antimicrobiano sobre neumococo: cuanto mayor es la hidrofobicidad del resto aromático (reflejado por el parámetro  $\log P$ , Tabla 5), menor es la CMI mostrada y más rápida es la inducción de la permeabilidad de la membrana, siendo el EBA 31 el más apolar y el que presenta un mayor efecto antimicrobiano. Esta correlación observada entre la apolaridad del compuesto y el rendimiento antibacteriano también explicaría por qué los EBAs de amonio cuaternario (como los derivados de ipratropio), que tienen carga positiva permanente, son mucho menos eficientes que las aminas terciarias <sup>302</sup> que presentan menor polaridad. De hecho, y como se puede observar en el recuadro adjunto a la Figura 19.A, la adición de ipratropio (con un  $\log P$  estimado de -1,4) a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  apenas induce cambios en la permeabilidad de la membrana, incluso después de una incubación de 40 min.



**Figura 19. A.** Evaluación de la permeabilidad de *S. pneumoniae* R6 tratado con los diferentes EBAs. Un cultivo de R6 se incubó con cada uno de los EBAs en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0. Control positivo: células tratadas con 0,1 % Triton X-100; control negativo: células tratadas con tampón. Cada EBA se analizó a la concentración equivalente a su CMI correspondiente en cultivo planctónico (Tabla 5). En el recuadro de arriba a la derecha se muestra el experimento de incubación de las células en presencia de 200  $\mu$ M de bromuro de ipratropio, en el mismo tampón fosfato. Las flechas indican el momento de la adición de 0,1 % de Triton X-100 a todas las muestras. **B.** Evaluación de la despolarización de la membrana seguida mediante ensayos de fluorescencia usando la sonda diSC3-5. Control: se añadió DOC a una concentración final de 0,1 % para registrar los valores máximos de fluorescencia.

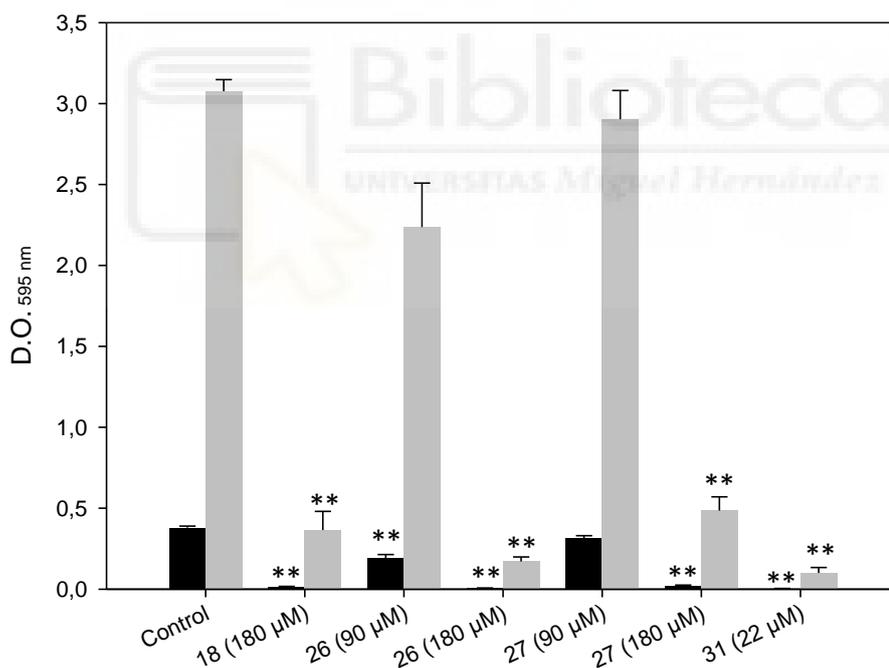


**Figura 20.** Correlación entre las características bioquímicas y microbiológicas de los EBAs. Gráfico tridimensional que representa el parámetro  $\log P$ , CMI en cultivos neumocócicos planctónicos<sup>302</sup> y tiempo necesario para alcanzar el 50 % de la permeabilidad total de la membrana (véase la Figura 19).

## 1.2. Efecto de los EBAs sobre biopelículas neumocócicas

Las biopelículas constituyen una forma de vida microbiana que representa un desafío médico global debido a su inherente resistencia a antibióticos, y que exige el uso de dosis altas de antibiótico durante un período prolongado<sup>334,335</sup>. Por otro lado, se ha descrito previamente que la adición de colina sobre cultivos neumocócicos inhibe en cierta medida la formación de biopelículas, bloqueando y/o liberando las CBPs de la pared celular, pero sin afectar a la viabilidad de las células residuales<sup>142</sup>. Sin embargo, la existencia de un segundo mecanismo de desestabilización de la membrana por los EBAs, que parece ser biológicamente más relevante que la actividad puramente inhibidora de las CBPs, nos llevó a evaluar su capacidad antimicrobiana tanto en biopelículas neumocócicas simples como en biopelículas mixtas, formadas por *S. pneumoniae* no encapsulado y *H. influenzae* no tipificable (NTHi), ya que estos dos patógenos son comensales nasofaríngeos asociados a muchas infecciones comunes del tracto respiratorio, y que frecuentemente forman juntos una biopelícula autoproducida<sup>312</sup>. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo en colaboración con los Drs. Mirian Domenech y Ernesto García en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

En primer lugar, se estudió la capacidad de cada uno de los compuestos de inhibir la formación de la biopelícula de la cepa de *S. pneumoniae* R6. Para ello, se incubaron las células en presencia de cada uno de los EBAs de manera independiente, a una concentración equivalente a la CMI o al doble de la CMI durante 5 h a 37 °C, y seguidamente se cuantificó la formación de la biopelícula resultante mediante la técnica de CV descrita en el apartado “Materiales y Métodos 6.2.1. Formación de la biopelícula”. En la Figura 21 se muestra el crecimiento total del cultivo (células adheridas y planctónicas, bandas negras) y el crecimiento de las células en forma de biopelícula (bandas grises) tras llevar a cabo el tratamiento. Los compuestos EBA 18 y 31 redujeron significativamente la formación de la biopelícula a una concentración equivalente a la CMI de cada compuesto, mientras que en el caso de los EBAs 26 y 27 fue necesaria una concentración del doble de la CMI. De forma similar a los cultivos planctónicos, el compuesto EBA 31 resultó ser el más eficaz a la menor concentración.

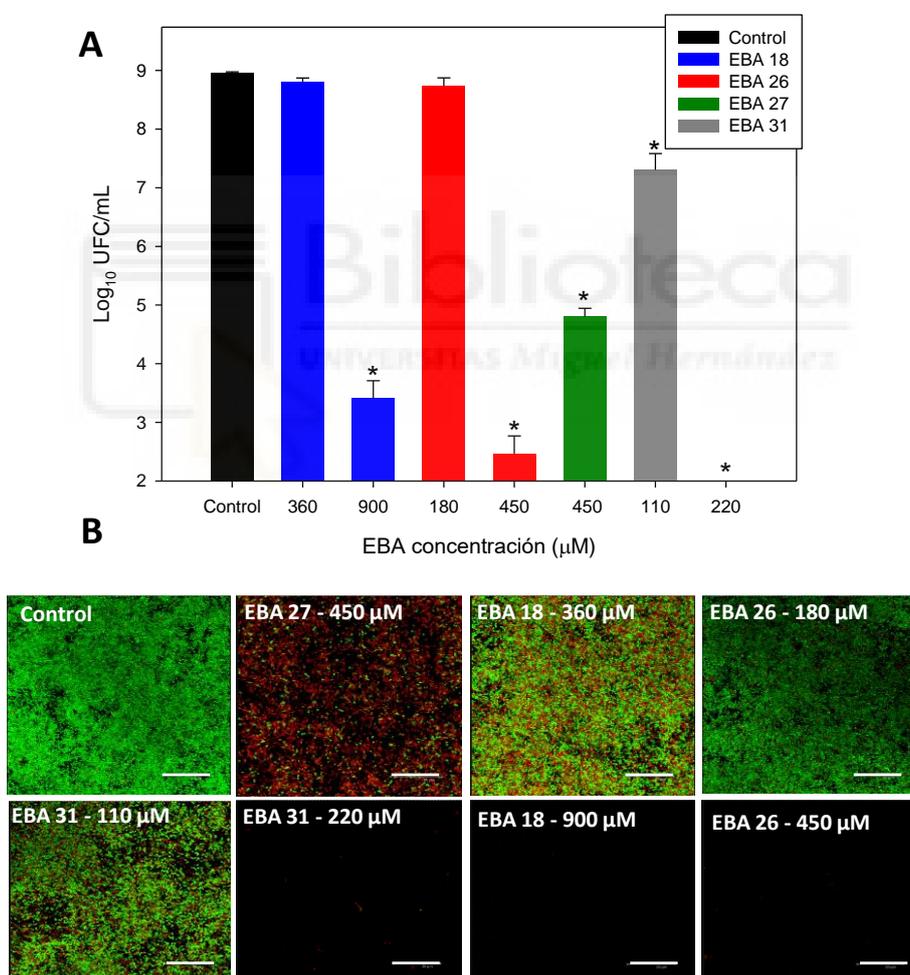


**Figura 21.** Estudio de la inhibición de la formación de una biopelícula de *S. pneumoniae* R6 por acción de los EBAs. Cada compuesto se añadió al cultivo desde el inicio, y se incubó durante 5 h a 34 °C. Las barras negras indican el crecimiento bacteriano total (medido como la D.O.<sub>595</sub> del total de células, adheridas y planctónicas), mientras que las grises muestran el crecimiento bacteriano en forma de biopelícula (medido como D.O.<sub>595</sub> de las células adheridas, teñidas con CV). Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes, cada uno a su vez realizado por triplicado. Los asteriscos muestran los datos estadísticamente significativos (\*, P <0,05; \*\*, P <0,001) en comparación con el control.

Seguidamente, se evaluó la capacidad de los EBAs de disgregar una biopelícula previamente formada. Para ello, a una biopelícula ya crecida se añadió de manera independiente cada uno de los EBAs a las concentraciones indicadas en la Figura 22 durante 1 h a 37 °C. La capacidad de disgregación se analizó mediante el recuento de las UFC mL<sup>-1</sup> de las células remanentes no disgregadas, y de manera paralela a través de la visualización de la biopelícula por CLSM. En todos los casos se observó una disminución de las UFCs respecto al control, siendo de nuevo el EBA 31 el compuesto más eficaz, seguido de los EBAs 26, 27 y 18 (Figura 22.A). La concentración necesaria para ello fue, en todo caso, superior a las de la CMI para cultivos planctónicos, si bien es sabido que la necesidad de incrementar la concentración de antimicrobianos frente a biopelículas es habitual<sup>336,337</sup>. Por otro lado, la tinción de la biopelícula remanente (conteniendo las células no disgregadas) mediante el sistema *BacLight*, y su posterior visualización empleando CLSM, confirmó, en aquellos casos en los que se observa la presencia de células, que estas presentan la membrana comprometida (Figura 22.B), en consonancia con el efecto de permeabilización observado *in vitro* para estos compuestos (Figura 19). Estos datos indican que los EBAs actúan negativamente frente a biopelículas neumocócicas, ya sea disgregándolas o impidiendo su formación.

A continuación, y una vez seleccionado el compuesto EBA 31 como el más eficiente, se evaluó el efecto de este sobre la formación y la disgregación de una biopelícula de una cepa de *S. pneumoniae* encapsulada. Para este experimento se utilizó la estirpe de *S. pneumoniae* P181, un transformante de R6 isogénico que expresa el polisacárido capsular 19A (Tabla 1). Se eligió este serotipo porque, a pesar de estar incluido en las vacunas actuales, sigue apareciendo de manera frecuente en aislados clínicos<sup>33</sup> y además, se caracteriza por ser un buen formador de biopelículas *in vitro*<sup>311</sup>. En primer lugar, el ensayo de inhibición de la formación de la biopelícula se llevó a cabo mediante la incubación de un cultivo de *S. pneumoniae* P181 junto con el compuesto EBA 31 durante 6 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. En la Figura 23.A se puede observar que el compuesto EBA 31 es capaz de inhibir significativamente la formación de la biopelícula a una concentración de 15 µM, inferior a la CMI del compuesto en la cepa P181 en cultivo planctónico (32 µM), determinada previamente en nuestro laboratorio. En segundo lugar, se llevó a cabo un ensayo de disgregación sobre una biopelícula ya

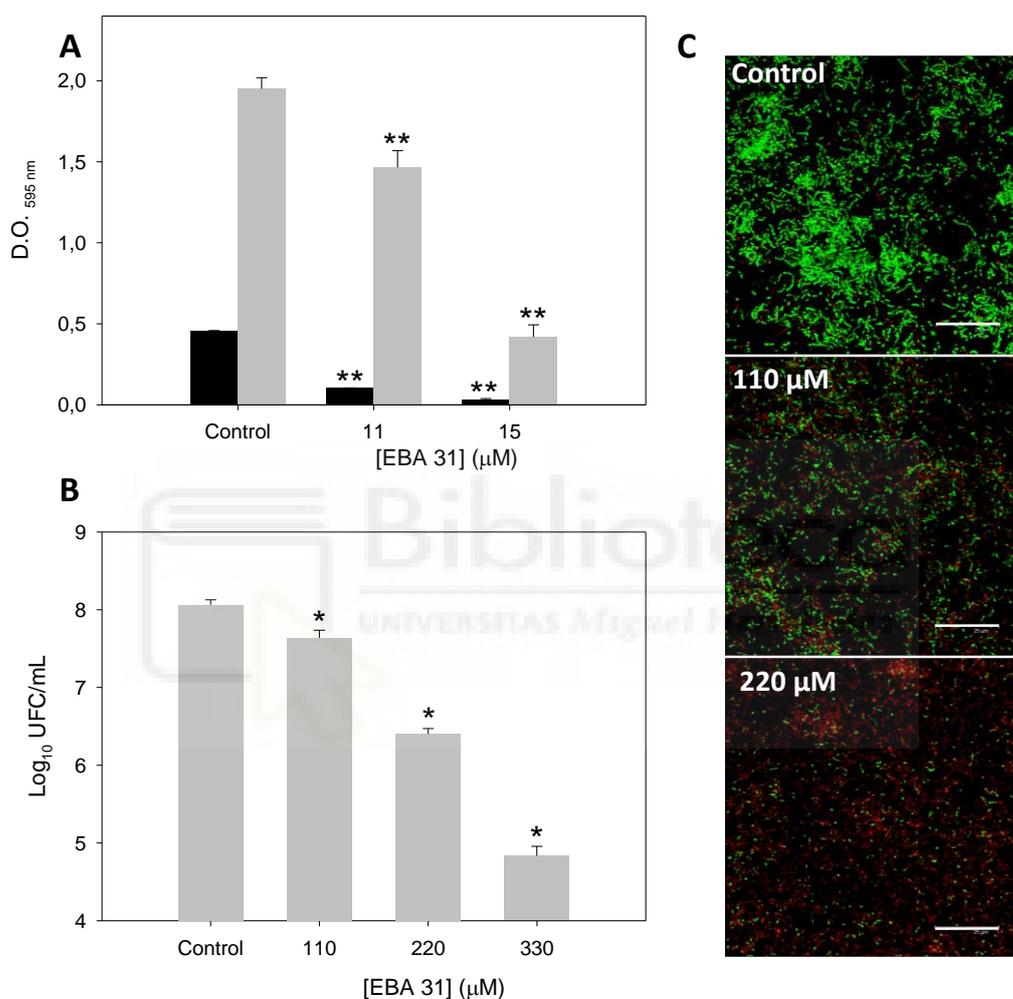
crecida, la cual se incubó en presencia de EBA 31 durante 1 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Como se observa en la Figura 23.B, el compuesto EBA 31 es capaz de disgregar las células de la biopelícula (menor cantidad de UFCs), aunque con una eficacia menor en comparación con la cepa R6 (no capsulada): a una concentración de 220 μM la viabilidad celular se reduce en 1,5 unidades logarítmicas en el caso de P181 (Figura 23.B), mientras que en R6 la misma concentración causa una caída de 7 unidades logarítmicas (Figura 22.A), lo que indica que la cápsula representa un impedimento para la acción de estos compuestos. En cualquier caso, el efecto sobre la estructura de la biopelícula es similar en ambas cepas, con signos de daños en la membrana según se detecta por CLSM (Figura 23.C).



**Figura 22.** Evaluación de la disgregación de una biopelícula de *S. pneumoniae* R6 mediada por cada EBA. En cada caso, la biopelícula previamente crecida se incubó en presencia del compuesto en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 6,9 durante 1 h a 37 °C. El control negativo fue una biopelícula incubada en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 6,9 durante 1 h a 37 °C. **A.** Determinación de las células no disgregadas tras el tratamiento, medidas como Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>.

## Resultados

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes, cada uno a su vez realizado por triplicado. Se muestran las barras que representan la desviación estándar. Los asteriscos muestran los datos estadísticamente significativos (\*,  $P < 0,05$ ) en comparación con el control. **B.** Imágenes tomadas de CLSM de una muestra de *S. pneumoniae* R6 crecida en biopelícula y tratada posteriormente con cada uno de los EBAs a las concentraciones indicadas durante 1 h a 37 °C. La biopelícula se tiñó en cada caso con el sistema *BacLight*. Las células teñidas de rojo indican que tienen su membrana celular comprometida. Barra de escala, 25  $\mu\text{m}$ .

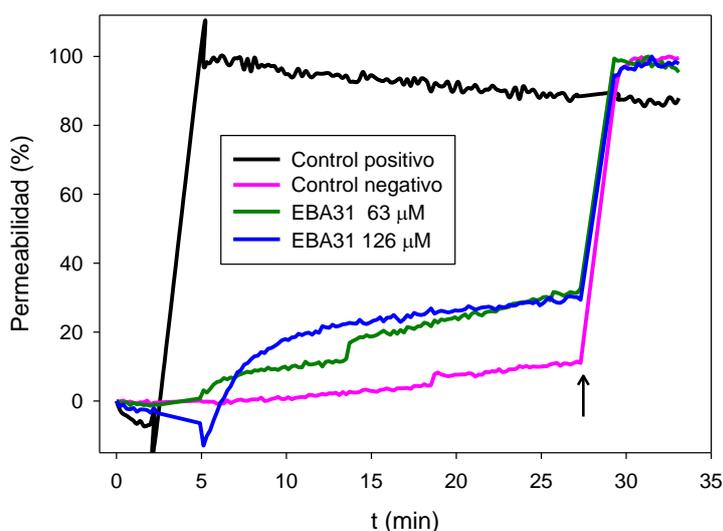


**Figura 23.** Efecto del compuesto EBA 31 sobre la formación y disgregación de una biopelícula de *S. pneumoniae* P181. **A.** Estudio de inhibición de la formación de biopelículas. Las barras negras indican el crecimiento bacteriano total (medido como D.O.<sub>595</sub> del total de células, adheridas y planctónicas), mientras que las barras grises muestran el crecimiento bacteriano en forma de biopelícula (medido como D.O.<sub>595</sub> de las células adheridas, teñidas con cristal violeta). **B.** Estudio de disgregación de biopelículas. Determinación de las células no disgregadas tras el tratamiento, medidas como Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes, cada uno a su vez realizado por triplicado. Se muestran las barras que representan la desviación estándar. Los asteriscos muestran los datos estadísticamente significativos (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,001$ ) en comparación con el control. **C.** Imágenes tomadas de CLSM de una muestra de *S. pneumoniae* P181 crecido en biopelícula y tratado posteriormente con EBA 31 a la concentración indicada, durante 1 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La biopelícula se tiñó en cada caso con el sistema *BacLight*. Barra de escala, 25  $\mu\text{m}$ .

### 1.3. Efecto de EBA 31 en biopelículas mixtas de *S. pneumoniae*-NTHi

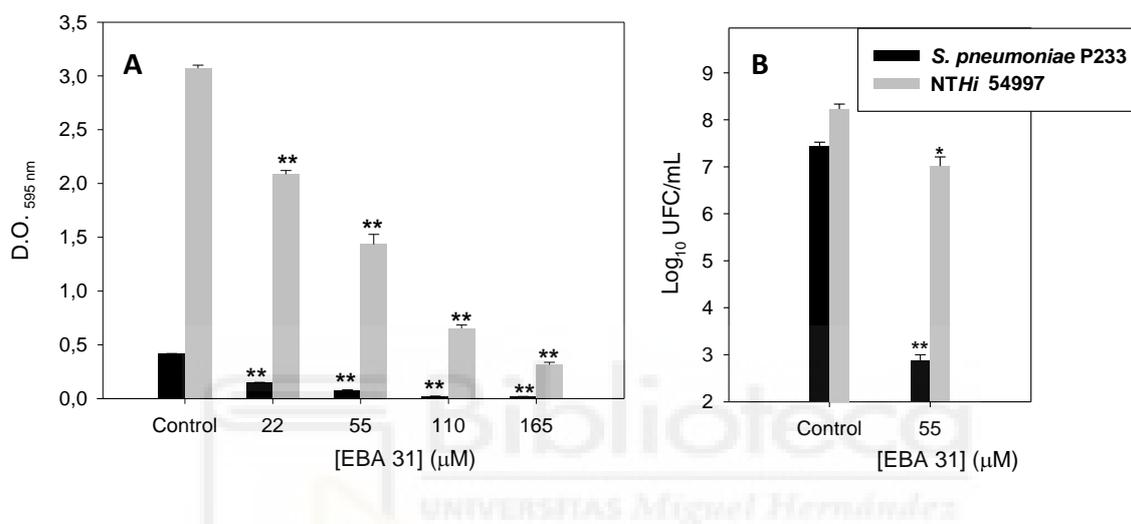
Una vez demostrada la efectividad de los EBAs para prevenir o eliminar la formación de una biopelícula de cepas neumocócicas (capsuladas y no capsuladas), deseábamos explorar si esta actividad antimicrobiana podría expandirse a organismos Gram-negativos tales como *H. influenzae* NTHi, un patógeno oportunista que coloniza la nasofaringe de cerca del 80 % de los humanos<sup>338</sup> y en ocasiones formando biopelículas mixtas con *S. pneumoniae*. Ambos patógenos son los principales agentes bacterianos causantes de otitis media a nivel mundial. En concreto *H. influenzae* predomina en pacientes con otitis media crónica con derrame, otitis media aguda recurrente, y está asociada a la otitis media aguda resistente a tratamientos antibióticos<sup>339</sup>.

El efecto del compuesto EBA 31 se examinó sobre una biopelícula mixta formada por la cepa P233 de *S. pneumoniae* y la cepa 54997 de *H. influenzae* (*S. pneumoniae* P233-NTHi 54997); se seleccionaron estas cepas ya que son las empleadas en el protocolo previamente establecido para el cultivo de biopelículas mixtas<sup>312</sup>. La efectividad sobre ambas bacterias se había demostrado previamente en nuestro laboratorio al obtener la CMI del EBA 31 sobre un cultivo planctónico de las cepas P233 y NTHi 54997 (16 y 63  $\mu\text{M}$  respectivamente). Además, el compuesto EBA 31 indujo un aumento en la permeabilidad de la membrana interna de NTHi similar al provocado en *S. pneumoniae* R6 (Figura 19), aunque con un efecto menos marcado (Figura 24).



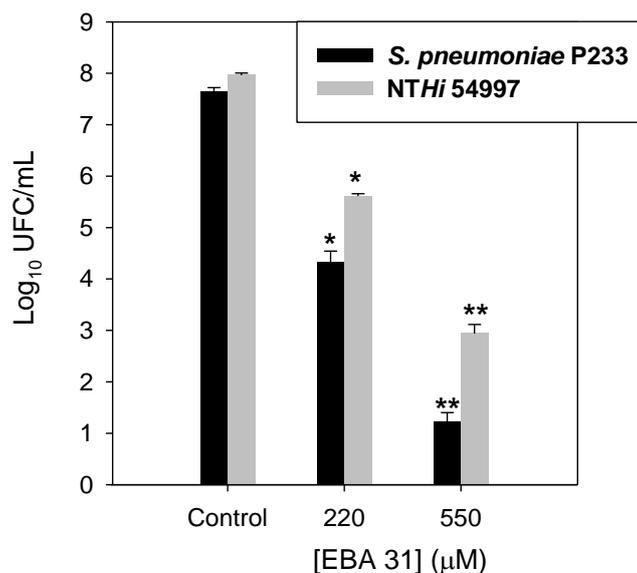
**Figura 24.** Evaluación de la permeabilidad de las células de NTHi 54997 tratado con EBA 31. Un cultivo de NTHi 54997 se incubó en presencia de EBA 31 en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0 a las concentraciones de 63  $\mu\text{M}$  (CMI) y 126  $\mu\text{M}$  (2x CMI). Control positivo: células tratadas con 0,1 % Triton X-100; control negativo: células tratadas con tampón. La flecha indica la adición de Triton X-100 al 0,1 % a todas las muestras.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en apartados anteriores, se incubó un cultivo mixto 1:1 en presencia del compuesto EBA 31 durante 6 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, y se observó una reducción significativa en la formación de la biopelícula mixta a concentración alrededor de la MIC (Figura 25.A). Sin embargo, el estudio de viabilidad de las células remanentes mostró que a 55 μM de EBA 31 se inhibe completamente el crecimiento de *S. pneumoniae* P233 en la biopelícula, mientras que en el caso de *NTHi* 54997 queda remanente algo menos de un 10 % de las células en la misma (Figura 25.B).



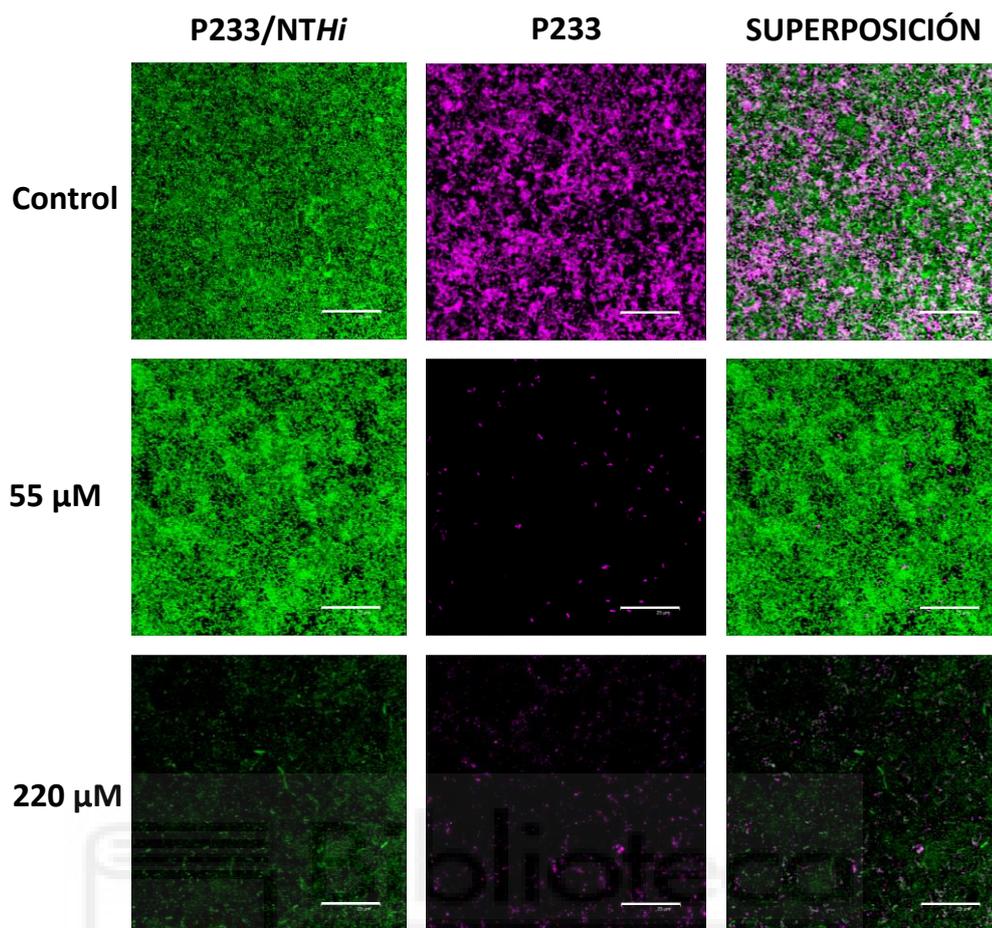
**Figura 25.** Estudio de la inhibición de la formación de una biopelícula de mixta *S. pneumoniae*-*NTHi* por acción de los EBA 31. El compuesto se añadió al cultivo mixto 1:1 desde el inicio, y se incubó durante 6 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. **A.** Las barras negras indican el crecimiento bacteriano total (medido como la D.O.<sub>595 nm</sub> del total de células, adheridas y planctónicas), mientras que las grises muestran el crecimiento bacteriano en forma de biopelícula (medido como D.O.<sub>595 nm</sub> de las células adheridas, teñidas con cristal violeta). **B.** Viabilidad celular de la biopelícula mixta en presencia de EBA 31 (55 μM). Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes, cada uno a su vez realizado por triplicado. Las barras de error representan el error estándar. Los asteriscos muestran los datos estadísticamente significativos (\*, P < 0,05; \*\*, P < 0,001) en comparación con el control.

Por otro lado, la incubación de una biopelícula mixta preformada de *S. pneumoniae* P233 y *NTHi* 54997 junto con EBA 31 a 220 μM durante 1 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> causó la reducción en la viabilidad celular de la biopelícula de 2 y 3 unidades logarítmicas para *NTHi* 54997 y *S. pneumoniae* P233 respectivamente, aumentando hasta 5 y 6,5 unidades en presencia de 550 μM de compuesto, erradicando prácticamente la población bacteriana (Figura 26). Este resultado confirma el efecto bactericida del compuesto EBA 31 sobre bacterias Gram-positivas y negativas inhibiendo la formación de biopelículas, y muestra un efecto disgregante de las mismas.



**Figura 26.** Evaluación de la disagregación de una biopelícula mixta formada por *S. pneumoniae*-NTHi 54997. La biopelícula previamente crecida se incubó en presencia del compuesto en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 6,9 durante 1 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. El control negativo fue una biopelícula incubada en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 6,9 durante 1 h a 37 °C. Se muestran las células no disagregadas tras el tratamiento, medidas como Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes, cada uno a su vez realizado por triplicado. Se muestran las barras que representan la desviación estándar. Los asteriscos muestran los datos estadísticamente significativos (\*, P < 0,05; \*\*, P < 0,001) en comparación con el control.

La Figura 27 muestra la distribución de las poblaciones que forman la biopelícula mixta P233-NTHi 54997, utilizando SYTO 59, que tiñe ambas especies (verde) junto con la aglutinina HPA de *Helix pomatia* (morado), que reconoce específicamente los residuos de GlcNAc de los ácidos teicoico y lipoteicoico de la pared celular de *S. pneumoniae*<sup>312, 340</sup>. En el ensayo de inhibición de la formación de biopelícula (Figura 27, segunda fila), se observa que el empleo de EBA 31 a 55 μM causó la inhibición selectiva de *S. pneumoniae*, como puede observarse por la ausencia de coloración morada en la superposición, mientras que en el ensayo de disagregación (Figura 27, tercera fila) se observa que el compuesto ejerce a 220 μM un claro efecto bactericida en ambas especies, ya que se observa una disminución en la coloración verde y morada.



**Figura 27.** Imágenes tomadas de CLSM de una muestra de la biopelícula mixta *S. pneumoniae*-NTHi. La biopelícula formada por las cepas NTHi 54997 y *S. pneumoniae* P233, tratada o sin tratar, se tiñó con una combinación de lectina SYTO 59 (verde) y HPA conjugada con Alexa Fluor 488 (morado). Primera fila: control no tratado. Segunda fila: biopelícula tratada con EBA 31 (55  $\mu\text{M}$ ); el compuesto se añadió al cultivo desde el comienzo de la formación de la biopelícula y se incubó durante 6 h a 37 °C en 5 % de  $\text{CO}_2$ . Tercera fila: biopelícula tratada con EBA 31 (220  $\mu\text{M}$ ); el compuesto se añadió tras la formación de la biopelícula y se incubó durante 1 h a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ .

#### 1.4. Actividad leishmanicida de los EBAs

Las especies de *Leishmania* son parásitos protozoarios causantes de una amplia gama de enfermedades humanas y animales conocidas colectivamente como leishmaniosis. La OMS considera la leishmaniosis como una de las causas más importantes de muerte por enfermedad infecciosa a nivel mundial; se calcula que cada año se producen entre 700.000 y 1 millón de casos nuevos, y entre 20.000 y 30.000 muertes, la gran mayoría en Brasil, África Oriental y sudeste de Asia <sup>341</sup>. Los lípidos de membrana, como la fosfatidilcolina, constituyen una posible diana para el desarrollo de compuestos contra la leishmaniosis, ya que tienen un importante papel biológico <sup>342</sup>. De

hecho, la miltefosina (hexadecilfosfocolina) es un medicamento en uso para el tratamiento de esta parasitosis, y produce entre otros la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina <sup>343</sup>. Por lo tanto, resultaba interesante estudiar el efecto de nuestros análogos de colina sobre *Leishmania*, ya que podrían interferir en la biosíntesis de este lípido (por su similitud estructural con la colina) y/o provocar un efecto desestabilizador de membrana como se ha comprobado en *S. pneumoniae*.

En el marco de una colaboración con el grupo del Dr. Luis Ignacio Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), recientemente iniciada, evaluamos el efecto de los EBAs frente a promastigotes (forma flagelada e infectiva) de *L. donovani*. Para ello se incubaron diferentes concentraciones de los EBAs frente a un cultivo de *L. donovani* en medio RPMI sin rojo fenol (Thermo Fisher) durante 72 h a 26 °C, obteniendo una IC<sub>50</sub> en torno a 3 μM para todos los compuestos probados (Tabla 8).

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
EBAs 18	4,0 ± 0,3
EBAs 26	2,5 ± 0,4
EBAs 27	3,0 ± 0,7
EBAs 31	3,3 ± 1,3

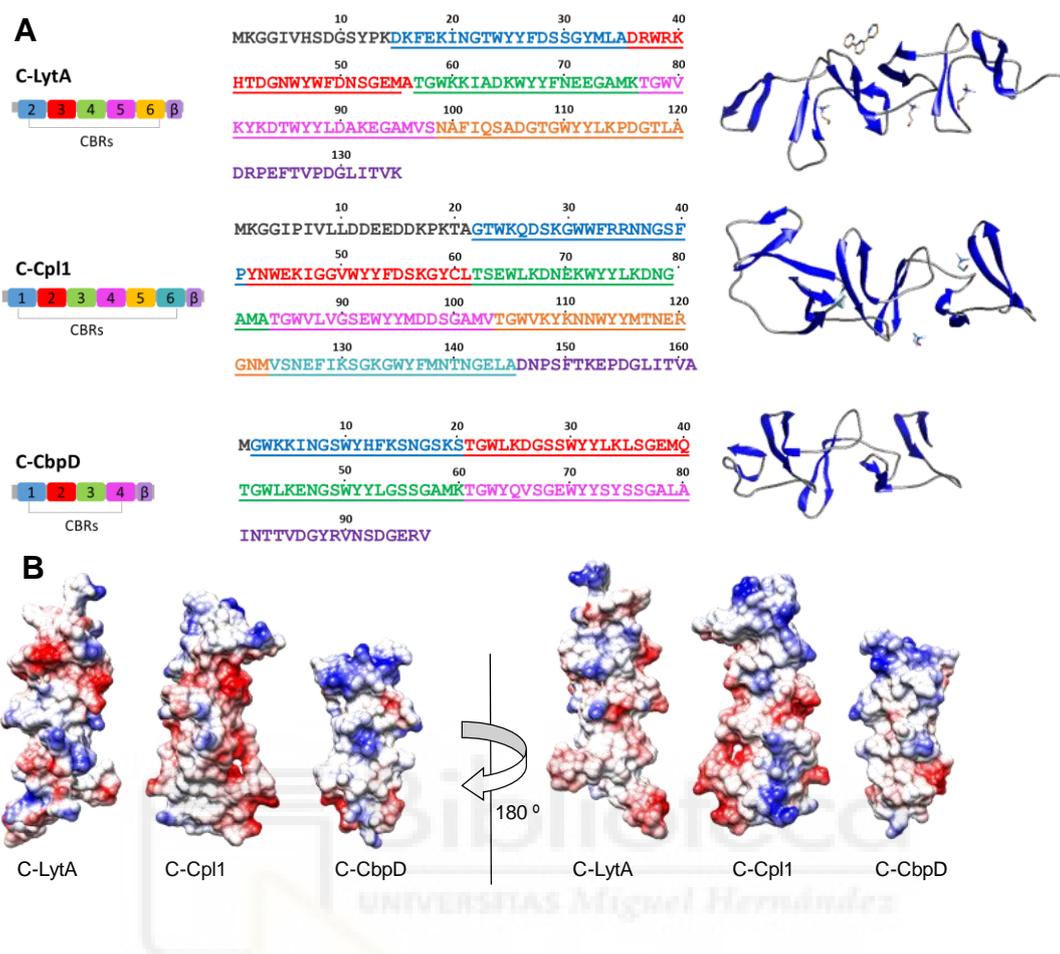
**Tabla 8.** Actividad leishmanicida de los EBAs. Se muestra la IC<sub>50</sub> obtenida tras incubar diferentes concentraciones de los EBAs 18, 26, 27 y 31 frente a promastigotes de *L. donovani* (2 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>) en medio RPMI durante 72 h a 26 °C.

Como resumen de este apartado de esta Tesis, cabe decir que los resultados apuntan a los EBAs como una prometedora alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos de amplio espectro, debido posiblemente a su capacidad desestabilizadora de la membrana celular, siendo efectivo frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como frente a patógenos eucariotas.

## 2. ESTUDIO DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA (CBMs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS NO LÍTICOS FRENTE A *S. pneumoniae*

El hecho de que todas las CBPs deban unirse a la colina presente en la pared celular a través de sus respectivos CBMs para ejercer su acción, lleva a la hipótesis de que la adición exógena de un CBM provocaría la inhibición de la unión CBP-bacteria por competición por los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared. Tal hipótesis está sustentada por experimentos previos de inhibición enzimática *in vitro* de la amidasa LytA y la lisozima Cpl1 tras la adición de los CBMs aislados de ambas enzimas <sup>116</sup>. Asimismo, sería de prever que aquellos CBMs con mayor afinidad por la colina resultasen ser mejores inhibidores de las CBPs. En este sentido, y a pesar de la alta conservación de los CBSs, la afinidad por esta molécula entre las diferentes CBPs es muy diversa <sup>123,126-128,130</sup>. Algunos estudios sugieren que el número de CBRs o CBSs no está directamente relacionado con la afinidad del ligando. Por ejemplo, a pesar de que LytC contiene 7 CBSs por monómero, su afinidad por colina ( $K_d = 2,7$  mM) es similar a la descrita para Cpl1 ( $K_d = 3,6$  mM), que contiene 2 sitios por monómero <sup>127</sup>, y LytA ( $K_d = 4,5$  mM) que posee 4 sitios por monómero <sup>126-130</sup>.

Con el fin de llevar a cabo un estudio sistemático sobre la afinidad por colina libre de los diferentes CBMs, analizamos los módulos C-CbpD, C-LytA y C-Cpl1, correspondientes a las proteínas CbpD (aminoácidos 353-448), LytA (aminoácidos 187-318) y Cpl1 (aminoácidos 183-339) y que contienen 4, 5 y 6 CBRs respectivamente (Figura 28). En cuanto al número de sitios de unión a colina, C-LytA posee 4 por monómero (dos de alta y dos de baja afinidad) <sup>129,130,167</sup> y C-Cpl1 dispone de 2 sitios de unión por monómero según la estructura cristalina de la proteína parental Cpl1 <sup>127</sup>, si bien se ha descrito la posibilidad de un sitio adicional que se ubicaría en la interfase de dimerización de la proteína <sup>173</sup>. Actualmente no se conoce el número de CBSs que presenta C-CbpD al no estar resuelta su estructura tridimensional ni conocerse su estado de agregación.



**Figura 28. A.** Secuencias de aminoácidos de los módulos C-LytA, C-CbpD y C-Cpl1. Se indica el número de las CBRs y la horquilla  $\beta$  terminal empleando un código de colores. En la parte derecha se representa la estructura secundaria de los CBMs mostrando la colina o los análogos de colina en los sitios de unión. **B.** Representación tridimensional de la superficie de los CBM. Código de colores: el rojo indica polaridad negativa, el azul indica polaridad positiva, el blanco indica polaridad cero. C-LytA y C-Cpl1 están representados por sus estructuras cristalográficas (códigos PDB 1HCX y 1OBA, respectivamente), mientras que C-CbpD está representado por un modelo de homología. Las figuras se representaron con UCSF Chimera 1.10<sup>344</sup>.

En primer lugar, se procedió a la sobreexpresión de los genes que codifican para los CBMs, se llevó a cabo en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y RB791 empleando los plásmidos indicados en Tabla 2. La purificación de las proteínas se realizó por cromatografía de afinidad y elución con colina “Materiales y Métodos 3.3. *Expresión y purificación de proteínas*”. Aunque tras todos los procesos de purificación se llevó a cabo la electroforesis de las fracciones eluidas, los gels incluidos en la memoria corresponden a las proteínas C-CbpD y LZ-C-LytA, expresadas por primera vez en esta Tesis (Figura 29).

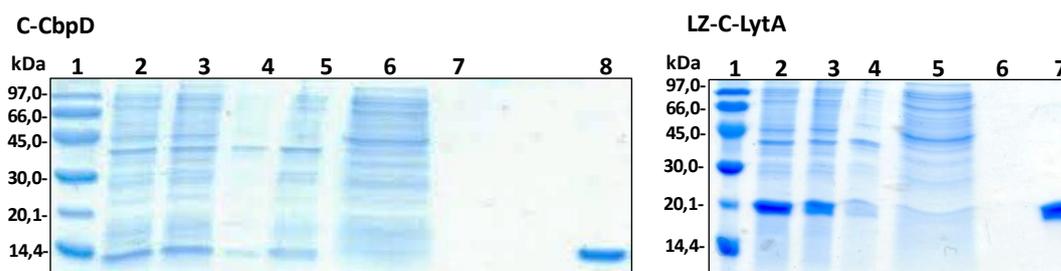


Figura 29. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión y purificación de C-CbpD y LZ-C-LytA.

**C-CbpD**

1. Marcador de peso molecular
2. Sonicado de *E. coli* BL21 (pETccbpD)
3. Fracción soluble *E. coli* BL21 (pETccbpD)
4. Fracción Insoluble *E. coli* BL21 (pETccbpD)
5. Fracción no retenida
6. Fracción obtenida tras 1<sup>er</sup> lavado
7. Fracción obtenida tras 2<sup>o</sup> lavado
8. Fracción pura de C-CbpD

**LZ-C-LytA**

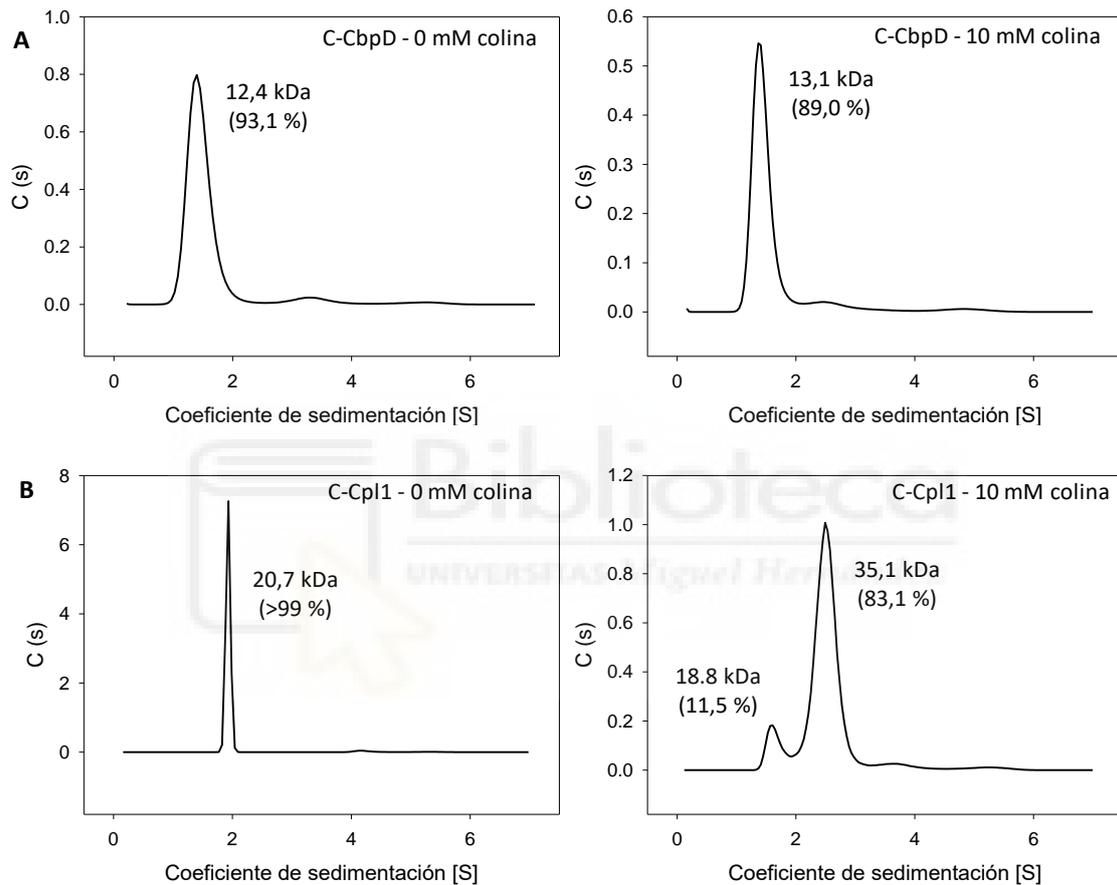
1. Marcador de peso molecular
2. Sonicado de *E. coli* BL21 (pET-lzcltA)
3. Fracción soluble *E. coli* BL21 (pET-lzcltA)
4. Fracción no retenida
5. Fracción obtenida tras 1<sup>er</sup> lavado
6. Fracción obtenida tras 2<sup>o</sup> lavado
7. Fracción pura de LZ-C-LytA

**2.1. Caracterización estructural de los módulos C-CbpD y C-Cpl1**

Antes de proceder a determinar la afinidad por colina de los CBM, es necesario confirmar el estado de oligomerización de los módulos estudiados en ausencia y en presencia de concentraciones saturantes de colina. Mientras que el módulo C-LytA ha sido ampliamente estudiado a este respecto y se sabe que la unión de colina contribuye a la dimerización de la proteína a través de la horquilla C-terminal por encima de colina a 10 mM,<sup>123</sup> del módulo C-Cpl1 únicamente se conocía su estado dimérico en presencia de concentraciones de colina relativamente altas (40 mM)<sup>128,173</sup> pero no se tenía información de su estado a menores concentraciones de ligando como las que se mostrarán a continuación dentro de este apartado. En cuanto al estado de agregación de C-CbpD, éste se desconocía por completo. Para determinar el estado oligomérico de C-Cpl1 y C-CbpD se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación a concentración final en torno a 1  $\mu$ M, en ausencia y en presencia de 10 mM colina, concentración a la cual los sitios de unión se encontrarían saturados como se puede observar en los experimentos de titulación (ver resultados más abajo, Figura 33). Los resultados se muestran en la Figura 30 y en la Tabla 9. En ausencia de ligando la especie mayoritaria de C-Cpl1 es el monómero (20,7 kDa; >99 %) con un coeficiente de sedimentación de 1,96 S y un coeficiente de fricción ( $f/f_0$ ) de 1,33. En presencia de colina 10 mM, C-Cpl1 se encuentra fundamentalmente en forma dimérica (35,1 kDa; 83,1 %;

## Resultados

2,55 S) con un coeficiente de fricción ( $f/f_0$ ) de 1,6, mientras que se detectó un porcentaje minoritario en estado monomérico (18,8 kDa; 11,5 %; 1,66 S). Por otro lado, los perfiles de C-CbpD en ausencia de colina mostraron que se encuentra mayoritariamente en forma monomérica (14,2 kDa; 93,1 %; 1,44 S) con un coeficiente de fricción ( $f/f_0$ ) de 1,27, mientras que se mantiene en estado monomérico en presencia de colina (13,1 kDa; 89,0 %), a diferencia de C-LytA y C-Cpl1 (Figura 30).



**Figura 30.** Perfiles de velocidad de sedimentación obtenido mediante ultracentrifugación analítica de **A.** C-CbpD y **B.** C-Cpl1, en ausencia y presencia de 10 mM colina.

	Estado oligomérico		Nº CBRs <sup>a</sup>	Nº CBSs <sup>a</sup>	K <sub>d</sub> (µM)		
	No colina	10 mM colina			Colina	NPMs-DEAE	CHIPS SPR DEAPA
<b>C-Cpl1</b>	Monómero	Dímero	12 (6+6) <sup>115</sup>	5 (2+2+1)	670 ± 50	16 ± 4	9 ± 1
<b>C-CbpD</b>	Monómero	Monómero	4 <sup>284</sup>	3	300 ± 10	23 ± 6	N.D. <sup>b</sup>
<b>C-LytA</b>	Monómero	Dímero	10 (5+5) <sup>116</sup>	8 (4+4) <sup>156</sup>	100 y 5300 <sup>c 130</sup>	54 ± 9	0,19 ± 0,01 (25 % señal) 14 ± 7 (75 % señal) <sup>c</sup>
<b>LZ-C-LytA</b>	N.D.	Trímero /dímero	15/10 ([5]+5+5)	12/8 ([4]+4+4) <sup>d</sup>	N.D. <sup>b</sup>	N.D. <sup>b</sup>	1,8 ± 0,3

**Tabla 9.** Características estructurales, y constantes de afinidad por colina libre y por sustratos insolubles de los módulos C-LytA, C-Cpl1 y C-CbpD.

<sup>a</sup> Número de CBRs o CBSs de las especies unidas a colina en su estado oligomérico correspondiente. Los paréntesis hacen referencia a cada uno de los monómeros.

<sup>b</sup> N.D.: No determinado

<sup>c</sup> Sitios con alta y baja afinidad, respectivamente

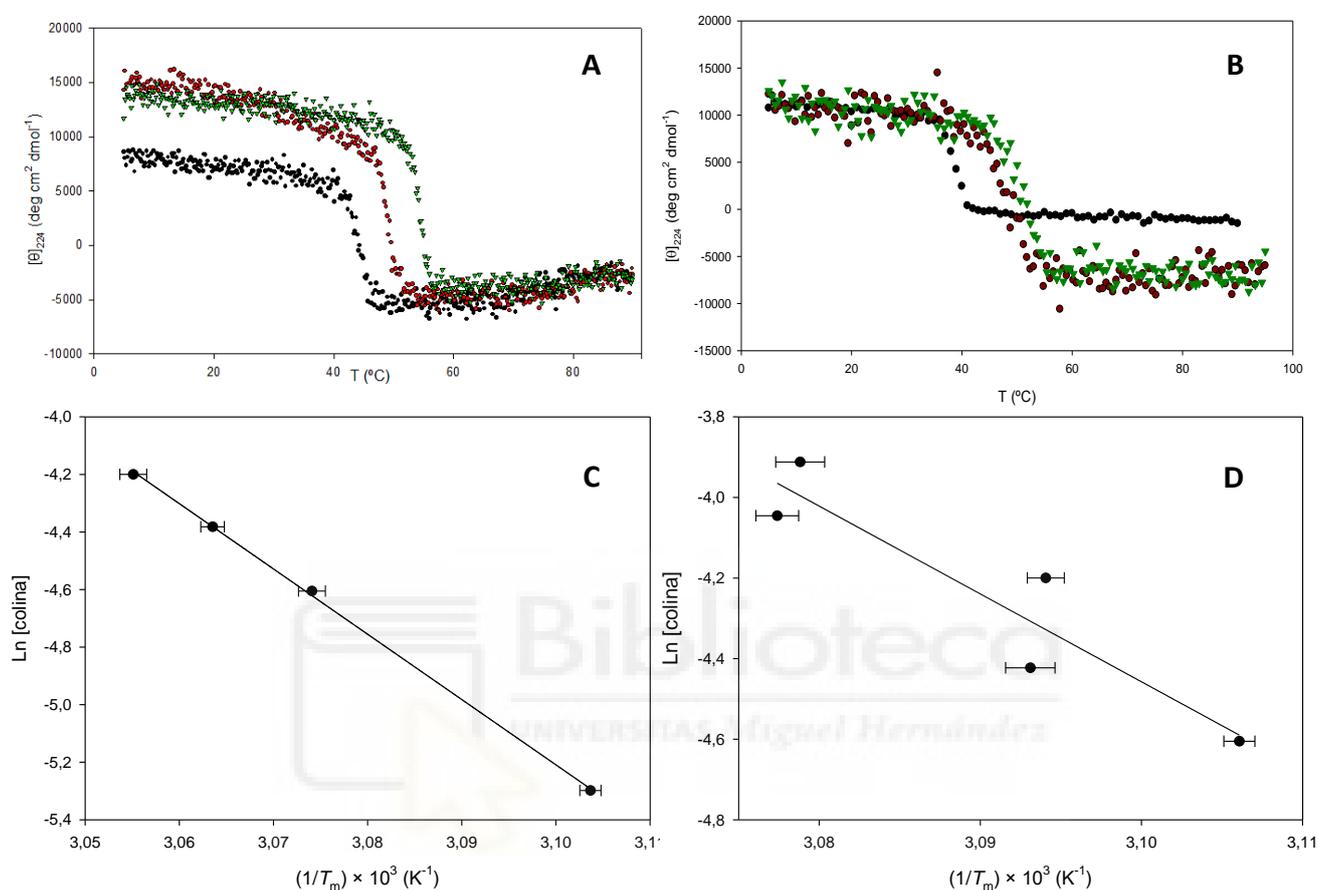
<sup>d</sup> Estimación teórica

El siguiente paso fue tratar de determinar el número de moléculas de colina unidas a cada CBM. Actualmente, el único módulo cuya estructura ha sido resuelta por cristalografía de forma aislada es C-LytA, que dispone de 4 moléculas unidas<sup>156</sup>. En cuanto a la estructura de Cpl1 solo ha sido dilucidada en su forma completa, revelando dos moléculas de ligando. Sin embargo, dicha estructura fue resuelta tras introducir los cristales de la proteína libre en una solución con colina, de modo que el proceso de dimerización concomitante a la unión podría estar dificultado o no haber ocurrido en tales circunstancias. Es necesario recordar en este punto que Buey y cols. (2007)<sup>173</sup> sugirieron la posible existencia de un sitio adicional en la interfase de dimerización y que estaría constituido por los residuos W210, F218 y Y238 de cada monómero. Además, es necesario tener en cuenta que la capacidad de unión de C-Cpl1 desprovisto del módulo catalítico podría variar con respecto a la proteína completa, dada las fuertes interacciones que hay entre módulos.

El número de moléculas de colina unidas al dímero de C-Cpl1 se determinó por análisis de van't Hoff <sup>345,346</sup> mediante experimentos de desnaturalización térmica siguiendo la señal de CD en la región del UV lejano a diferentes concentraciones de colina a 60 °C h<sup>-1</sup>. Mediante el ajuste de las curvas a la ecuación de Gibbs-Helmholz (Ecuación 2) se obtuvo la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ), observándose que el ligando confiere estabilidad a la proteína al inducir un aumento de la  $T_m$  (Figura 31). A pesar de que la desnaturalización térmica no resultó ser completamente reversible tras enfriar la muestra a 5 °C, las transiciones térmicas de C-Cpl1 pudieron ajustarse a ecuaciones de termodinámica en equilibrio puesto que mediante experimentos de desnaturalización en los que se empleó una velocidad de barrido inferior (30 °C h<sup>-1</sup>) se obtuvo un valor similar de la  $T_m$  (datos no mostrados). Este resultado indica que el evento que hace que el proceso de desnaturalización sea irreversible es más lento que la desnaturalización en sí misma, y debe producirse a temperaturas superiores, teniendo lugar una vez desplegada la proteína en equilibrio, por lo que podemos decir que la desnaturalización está bajo control termodinámico. Finalmente, el número de sitios de unión a colina se dedujo mediante el análisis de van't Hoff (Ecuación 3), empleando la pendiente  $-23000 \pm 4000$  K, obtenida al representar la variación del inverso de la  $T_m$  en función de la concentración de colina (Figura 31). El resultado obtenido muestra la existencia de 5,0 sitios de unión a colina en el módulo C-Cpl1 (Francisco García, comunicación personal). Teniendo en cuenta que a las concentraciones de colina ensayadas la unidad cooperativa de C-Cpl1 es un dímero, los datos confirman la presencia de un sitio de unión adicional que podría ubicarse en la interfase de dimerización entre ambas moléculas, tal y como se había postulado anteriormente <sup>173</sup>.

A continuación, se realizó de forma análoga el análisis de van't Hoff para el módulo C-CbpD. Esta proteína tras realizar un barrido de temperatura desde 5 a 90 °C a 60 °C h<sup>-1</sup> mostró, al igual que C-Cpl1, una desnaturalización irreversible en la que las transiciones térmicas son también independientes de la velocidad del barrido, por lo que el proceso irreversible tiene lugar después de la desnaturalización, permitiendo así el análisis de van't Hoff. El número de sitios obtenido a partir de dicho análisis y empleando la pendiente  $-22000 \pm 5000$  K, fue de 3,1 (Figura 31). Teniendo en cuenta

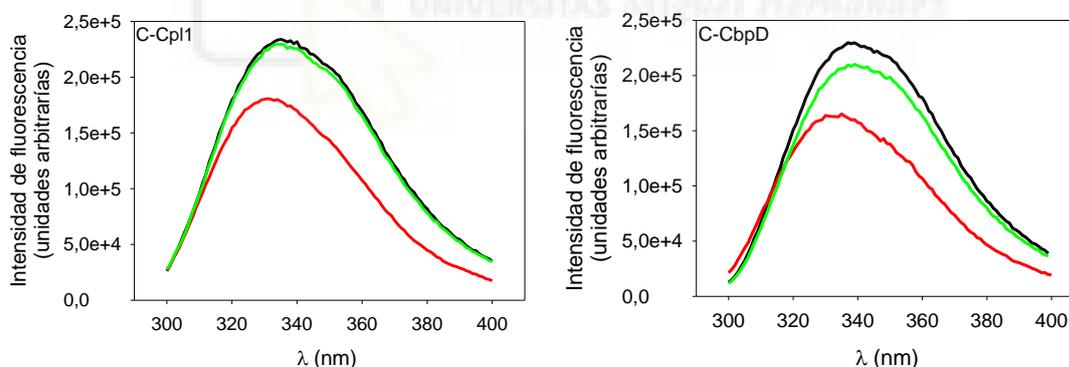
que C-CbpD se mantiene en estado monomérico, los resultados sugieren que la proteína presenta 3 sitios de unión a colina, en consonancia con la presencia de tres CBSs canónicos predichos.



**Figura 31.** Estimación del número de sitios de unión a colina en C-Cpl1 y C-CbpD. **A.** Estabilidad térmica de C-Cpl1 monitorizada por CD en el UV lejano en ausencia (círculos negros) y presencia de colina 10 mM (círculos rojos) y colina 15 mM (triángulos verdes). **B.** Estabilidad térmica de C-CbpD monitorizada por CD en el UV lejano en ausencia (círculos negros) y presencia de colina 12 mM (círculos rojos) y colina 20 mM (triángulos verdes). **C.** Representación de van't Hoff para C-Cpl1; la pendiente de la recta es  $-23000 \pm 4000$  K y la entalpía media es  $230 \pm 20$  kcal mol<sup>-1</sup>, obteniéndose  $n = 5,0$  sitios por unidad de desnaturalización (dímero). **D.** Representación de van't Hoff para C-CbpD; la pendiente de la recta es  $-22000 \pm 5000$  K y la entalpía media es  $135 \pm 40$  kcal mol<sup>-1</sup>, obteniéndose  $n = 3,1$  sitios por unidad de desnaturalización (monómero). La pendiente de la recta obtenida se corresponde con el término  $(\Delta H/nR)$  de la Ecuación 3, donde  $\Delta H$  es la media de las entalpías,  $R$  es la constante de los gases ideales y  $n$  es el número de sitios de unión por ligando. Los datos que se muestran en los paneles C y D son el promedio de al menos 2 barridos.

### 2.1.1. Afinidad por colina libre

Los datos de afinidad por colina de C-LytA han sido calculados previamente<sup>130</sup> (Tabla 9), revelando la existencia de sitios de alta y baja afinidad. Por su parte, y con el fin de obtener los datos de afinidad de las proteínas C-CbpD y C-Cpl1, se llevaron a cabo titulaciones en el equilibrio mediante fluorescencia, registrando los espectros a concentraciones crecientes de ligando. A medida que la concentración de colina aumenta, se observó un descenso en la señal de fluorescencia, acompañado de un desplazamiento hacia una longitud de onda menor (Figura 32), indicando que la interacción con el ligando implica que los triptófanos se encuentren en un ambiente más apolar, posiblemente debido a un mayor empaquetamiento de las horquillas. Por su parte, la adición de 20 mM de NaCl no indujo cambios significativos en el espectro de C-Cpl1 y solo muy someros en caso de C-CbpD, sin afectar en cualquier caso a la longitud de onda del máximo de intensidad, por lo que se deduce que el efecto observado con colina no se debe a interacciones puramente electrostáticas, sino que es más específico (Figura 32).



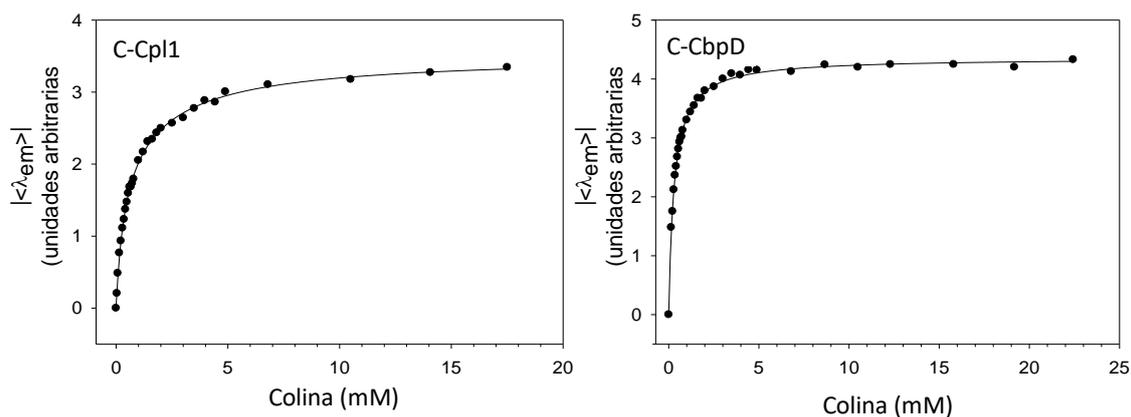
**Figura 32.** Espectro de fluorescencia de C-Cpl1 y C-CbpD en ausencia (negro) y en presencia de 20 mM de colina (rojo) y 20 mM de NaCl (verde), excitando a 280 nm.

Para soslayar los problemas derivados de la pérdida de intensidad de fluorescencia debida a efectos salinos inespecíficos en el caso de C-CbpD, decidimos seguir la variación del promedio de intensidad de fluorescencia ( $|\langle \lambda_{em} \rangle|$ ) frente a la concentración de colina. La representación muestra en ambos casos una curva hiperbólica para las dos proteínas (Figura 33), cuyo ajuste permite calcular la constante de disociación ( $K_d$ ) asumiendo que todos los sitios de unión tienen una afinidad similar, tal y como se describió previamente para Cpl1<sup>128</sup>. En el caso de la proteína C-Cpl1, la

Ecuación 7 empleada contempla la existencia de 5 sitios independientes junto con la dimerización de la proteína y la presencia despreciable de dímeros en ausencia de colina. Por su parte, para el caso del módulo C-CbpD la constante de disociación se calculó ajustando la curva a la Ecuación 6, considerando la unión de tres moléculas de colina equivalentes por monómero.

Los resultados de los ajustes se muestran en la Tabla 9. Las constantes calculadas ( $K_d = 0,67$  mM para C-Cpl1 y  $0,3$  mM for C-CbpD) son intermedias entre los datos de los sitios de alta y de baja afinidad de C-LytA ( $0,1$  y  $5,3$  mM respectivamente)<sup>130</sup>, e indican que C-CbpD presenta una mayor afinidad por el ligando que C-Cpl1. Cabe señalar que la  $K_d$  de C-Cpl1 ( $0,67$  mM) es menor que la mostrada para la proteína parental completa Cpl1 determinada mediante experimentos de CD ( $3,6$  mM) y calorimetría isotérmica ( $1,9$  mM)<sup>128</sup>. Estas discrepancias pueden provenir de la consideración previa (basada en la estructura cristalina) de la existencia de 4, en vez de 5, sitios de unión como hemos probado en esta Tesis, y también de la fuerte interacción existente en Cpl1 entre los módulos catalítico y de unión a colina<sup>127</sup> que tal vez podría impedir de algún modo la unión del ligando y, consecuentemente, la dimerización de la proteína. De hecho, estudios previos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) llevados a cabo con Cpl1 y C-Cpl1 mostraron que, en presencia de  $10$  mM de colina, las diferencias entre la entalpía de desnaturalización de van't Hoff y la calorimétrica dan cuenta de que el módulo C-Cpl1 estaría en conformación dimérica en estas condiciones (corroborado por nuestros experimentos de ultracentrifugación analítica, Figura 31) cuando la proteína parental tan solo ha adquirido esta conformación en aproximadamente un  $30\%$  de su población en iguales condiciones<sup>347</sup>.

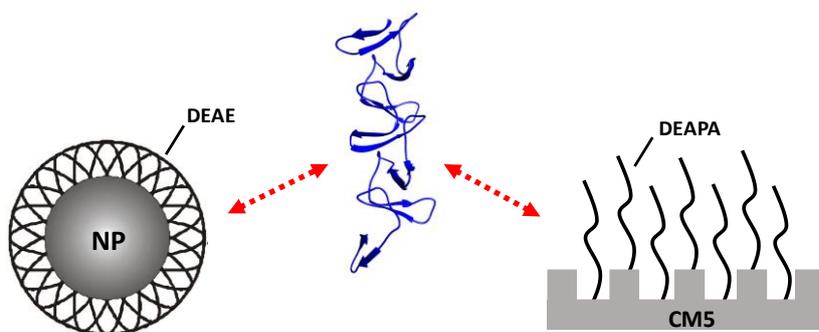
En cualquier caso, las constantes de disociación estimadas son altas (en el rango de milimolar), lo que indica que la afinidad de los CBMs por colina libre es muy baja en términos generales.



**Figura 33.** Variación del promedio de intensidad de fluorescencia ( $|\langle \lambda_{em} \rangle|$ ) de C-Cpl1 y C-CbpD en presencia de concentraciones crecientes de colina. La línea corresponde al ajuste de la Ecuación 7 para C-Cpl1 y de la Ecuación 6 para C-CbpD. Se muestra un ensayo representativo en cada caso.

### 2.1.2. Afinidad por sustratos insolubles

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados y de la utilidad de los mismos para caracterizar molecularmente la interacción proteína-ligando, la cuantificación de la afinidad por colina libre por parte de CBPs y CBMs no debe desviarnos de la situación biológica real, en la cual la colina se encuentra formando parte de un sustrato insoluble y multidentado como es la pared celular<sup>57</sup>. Por ello, nos propusimos evaluar la afinidad de la unión de los CBMs en condiciones similares a las que se encuentran en la naturaleza. Para evitar diferencias experimentales derivadas de la heterogeneidad y variabilidad de las preparaciones de paredes celulares de neumococo<sup>348,349</sup>, se emuló el sustrato nativo utilizando dos aproximaciones distintas con sustratos más definidos: 1) mediante el uso de NPMs (200 nm) recubiertas con DEAE y 2) mediante "chips" derivatizados con el análogo de colina DEAPA empleados en la técnica SPR (Figura 34).

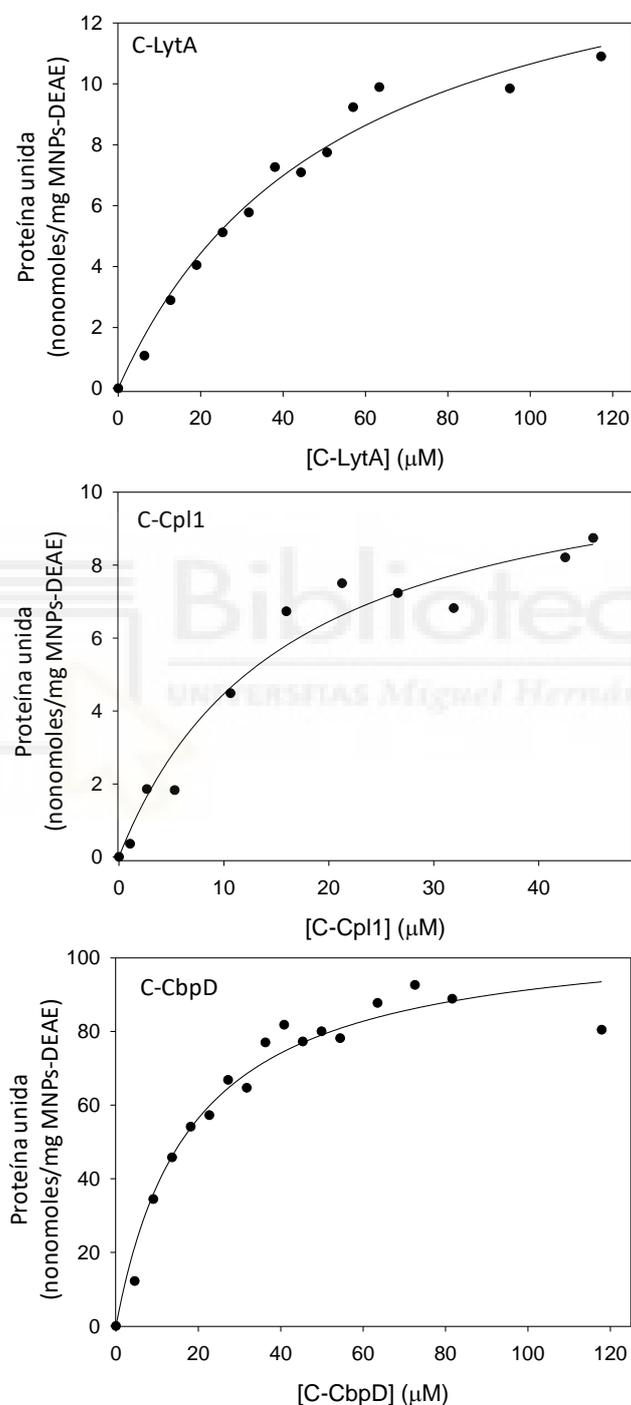


**Figura 34.** Representación esquemática de los sustratos insolubles empleados como simuladores de la pared celular de neumococo. NPMs funcionalizadas con dextrano conteniendo DEAE (izquierda) y "chips" de CM5 derivatizados con DEAPA (derecha).

Con respecto al primero de los sustratos, las estimaciones mostradas en el apartado “Materiales y Métodos 4.4.1. NPMs revestidas con DEAE” indican una densidad de grupos razonablemente similar entre la pared celular y las NPMs-DEAE (14 vs 0,6 grupos funcionales por  $\text{nm}^2$ , respectivamente). Por otro lado, en nuestro laboratorio, se había demostrado anteriormente la capacidad de NPMs-DEAE de 200 nm de diámetro para unir selectivamente CBPs tales como CbpF<sup>301</sup>, por lo que en primer lugar estudiamos la unión de los CBMs a estas partículas. Para ello, se incubó una solución de NPMs-DEAE a una concentración final de  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  en presencia de concentraciones crecientes de C-LytA, C-CbpD o C-Cpl1 en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0. La cantidad de proteína retenida a las NPMs-DEAE se calculó como la diferencia entre la proteína añadida inicialmente y la proteína no retenida cuantificada espectrofotométricamente. Al representar la cantidad de proteína unida frente a la concentración inicial de proteína añadida inicialmente se obtuvo en los tres casos un perfil hiperbólico, en la que la saturación observada al final de la curva indica la especificidad de unión de las proteínas por el soporte (Figura 35). Mediante el ajuste de la curva a la ecuación de Langmuir (Ecuación 8) se obtuvieron los valores de  $K_d$  para estos soportes, que se muestran en la Tabla 9. En todos los casos los datos se ajustaron correctamente a un modelo de un solo tipo de sitios de unión con la misma afinidad. Además, la  $K_d$  obtenida resultó del mismo orden de magnitud para C-Cpl1 y C-CbpD (16 y  $23 \mu\text{M}$  respectivamente, Tabla 9), indicando que presentan una afinidad similar por el sustrato, independientemente del número de CBSs. En el caso de la proteína C-LytA, y contrariamente a lo observado en los estudios de afinidad por colina libre<sup>130</sup>, la curva de saturación no pudo ajustarse a dos tipos de sitios, estimándose en cambio una única constante de disociación global ( $54 \text{ mM}$ , Tabla 9), y resultando una menor afinidad por los sustratos insolubles que para C-Cpl1 y C-CbpD a pesar de que estos presentan un menor número de sitios de unión a colina.

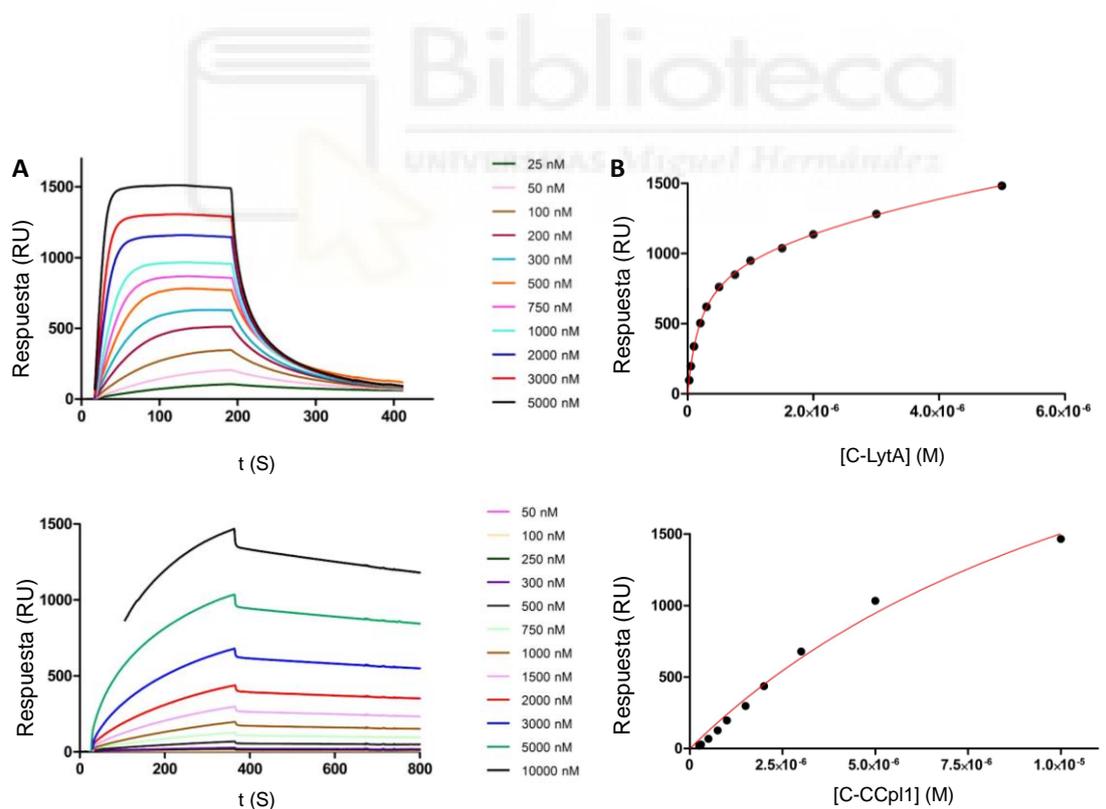
Por otro lado, se observó que la capacidad de unión máxima de C-CbpD a la superficie estudiada es aproximadamente cinco veces mayor que para C-LytA y C-Cpl1 (Figura 35). Esta mayor capacidad de unión probablemente sea debido a que C-CbpD presenta un menor tamaño. Cada monómero de C-LytA se ubicaría dentro de un paralelepípedo virtual de  $0,5 \times 0,3 \times 7 \text{ nm}$ <sup>156</sup>, de manera que su forma más extendida

ocuparía 3,5 nm<sup>2</sup>, mientras que el monómero de C-CbpD, según el modelo realizado “Materiales y Métodos 5. Modelado de las proteínas LZ-C-LytA y C-CbpD”, poseería unas dimensiones de 5 x 0,3 x 2,6 nm y ocuparía una superficie más compacta de tan solo 1,3 nm<sup>2</sup>, posibilitándose la unión de más moléculas.



**Figura 35.** Isothermas de unión de Langmuir de los CBMs a NPMs-DEAE. Las gráficas se ajustaron a un modelo de unión simple para las tres proteínas estudiadas (Ecuación 8). Los datos corresponden a un experimento representativo.

El análisis de la afinidad y la cinética de unión a un sustrato polimérico emulador de la pared celular se determinó adicionalmente mediante SPR utilizando soportes recubiertos con DEAPA. En cuanto a la proteína C-CbpD, los ensayos de SPR no pudieron realizarse ya que la proteína no presentó un comportamiento homogéneo, probablemente por agregación de la proteína en la superficie (datos no mostrados). Los sensogramas de C-Cpl1 y C-LytA se representan en la Figura 36.A, y mostraron cinéticas de asociación y disociación mucho más rápidas en el caso de C-LytA. La curva de unión de C-Cpl1 se ajustó a un modelo de afinidad de un solo tipo de sitios de unión (Ecuación 9), obteniéndose una  $K_d$  de  $9 \mu\text{M}$ , mientras que la unión de C-LytA se ajustó mejor a un modelo de afinidad de dos tipos de sitios (Ecuación 10), donde aproximadamente el 75 % de las moléculas presenta sitios de baja afinidad ( $K_d = 14 \mu\text{M}$ ), y el 25 % se corresponde con los sitios de alta afinidad ( $K_d = 0,19 \mu\text{M}$ ) (Figura 36.B, Tabla 9). Al igual que se observó con colina libre, los sitios de unión de C-Cpl1 presentan un comportamiento intermedio entre los sitios de alta y de baja afinidad de C-LytA (Tabla 9).



**Figura 36. A.** Sensogramas SPR con los “chips” de carboximetildextrano funcionalizados con DEAPA a concentración creciente de C-LytA (panel superior), C-Cpl1 (panel inferior) en tampón 20 mM fosfato sódico, 0,1 % Tween pH 7,0 a 25 °C. **B.** Curvas de unión de C-LytA (panel superior), C-Cpl1 (panel inferior). Los datos se ajustaron a un modelo de un único tipo de sitios para C-Cpl1 y de dos sitios de unión para C-LytA (Ecuaciones 9 y 10).

En resumen, las constantes de disociación obtenidas de los dos experimentos que emplean un sustrato sólido polidentado representan afinidades de unión de 20 a 500 veces más altas que las del ligando libre (Tabla 9), poniendo de manifiesto los efectos de multivalencia en este sistema.

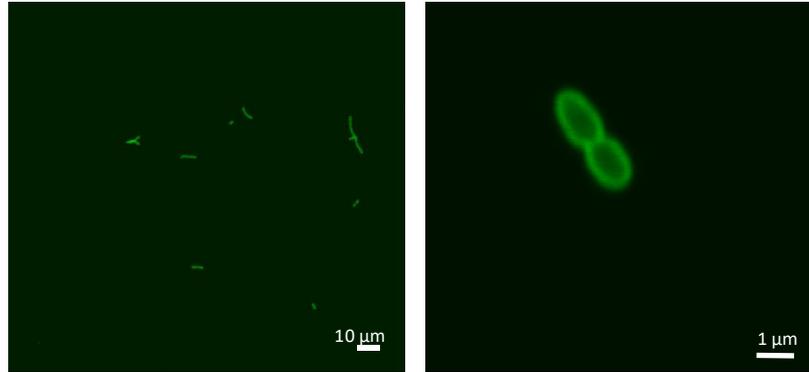
### 2.2. Efecto de los CBMs exógenos en cultivos líquidos de *S. pneumoniae*

Sobre la base de la elevada afinidad que presentan los CBMs por los sustratos insolubles con múltiples copias de análogos de colina, nos propusimos a continuación analizar el efecto de la adición de los diferentes CBMs a cultivos planctónicos de *S. pneumoniae*. Los CBMs podrían dar lugar a la inhibición competitiva de diferentes CBPs, de modo que cabría esperar fenómenos tales como la inhibición de la autólisis o de la separación de las células hijas, que tendrían como consecuencia la formación de largas cadenas celulares, tal y como ocurre tras la adición de un exceso de colina al medio <sup>298</sup>. En apoyo de esta hipótesis, debe recordarse que se había descrito previamente que los módulos C-Cpl1 o C-LytA inhiben la actividad de las hidrolasas Cpl1 y LytA parentales en experimentos de hidrólisis de la pared celular *in vitro* <sup>116</sup>. Con objeto de facilitar la detección del efecto de los CBMs, y dado que la estirpe R6 tiende espontáneamente a flocular, empleamos la cepa R6CIB17 (Tabla 1), un derivado de R6 con fenotipo no floculante aislado espontáneamente en nuestro laboratorio. El genoma de la cepa R6CIB17 fue secuenciado (GenBank accession number: CP038808), y se localizaron una serie de mutaciones, entre las cuales se destaca la existencia de dos cambios en el gen *pspC* (una inserción de 4 bases y un cambio C-T) que dan lugar a la expresión de esta CBP de manera truncada, lo que podría ser la causa del fenotipo no floculante.

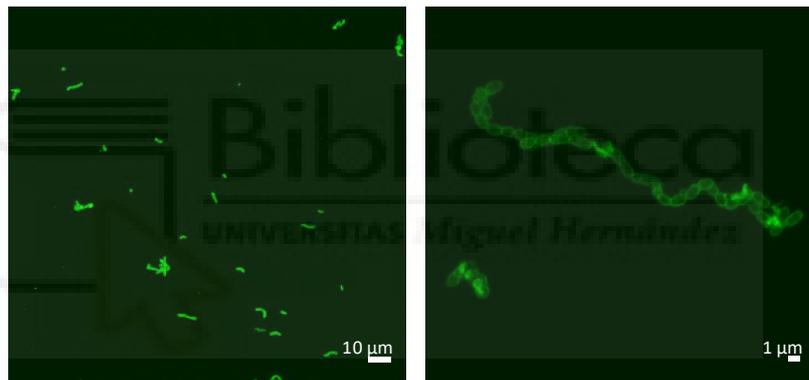
En primer lugar, se agregó a un cultivo bacteriano la proteína híbrida GFP-C-LytA, una quimera donde la proteína verde fluorescente (GFP) se fusiona con el módulo C-LytA <sup>350</sup>. La proteína se añadió en la fase exponencial temprana ( $D.O_{550} \approx 0.1$ ) y las muestras tomadas en diferentes momentos se observaron por microscopía de fluorescencia confocal. Como se muestra en la Figura 37, tan solo 5 minutos después de la adición, la proteína GFP-C-LytA se distribuyó uniformemente por la superficie bacteriana. A medida que avanzaba el cultivo aparecieron cadenas largas y, al comienzo de la fase estacionaria, se detectaron aglomeraciones celulares. En esta etapa, la mayor

parte de la fluorescencia se detectó en el septo bacteriano (Figura 37), descrito como el destino de la autolisina LytA expresada intracelularmente <sup>107</sup>, confirmando la preferencia del módulo C-LytA por la región ecuatorial en la célula.

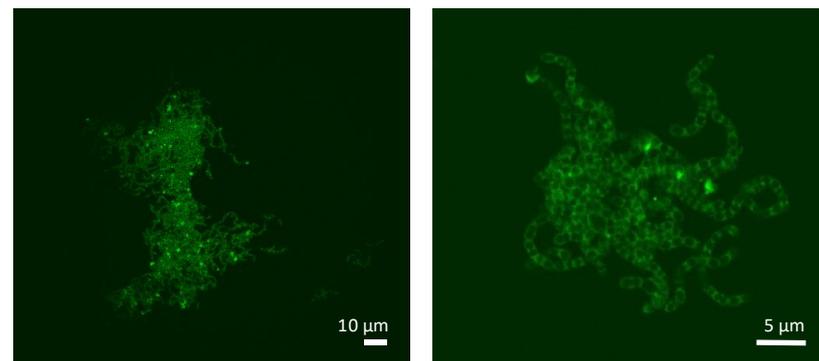
Fase exponencial temprana (5 min)



Fase exponencial media (80 min)



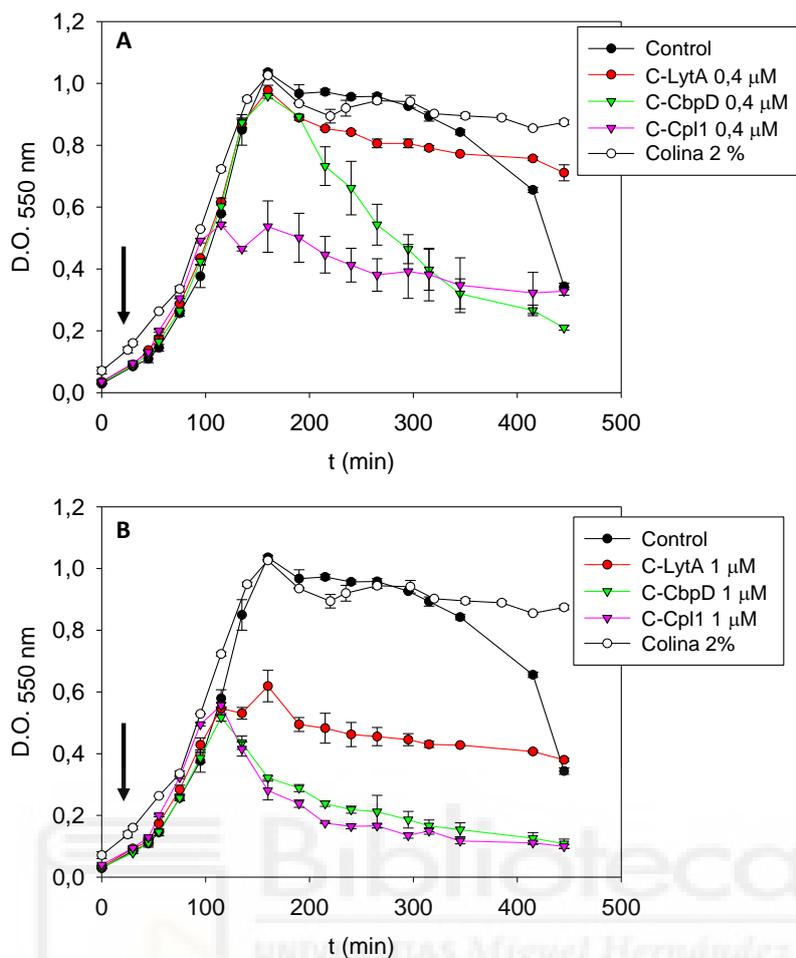
Fase estacionaria temprana (180 min)



**Figura 37.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de *S. pneumoniae* R6CIB17 cultivadas en presencia de GFP-C-LytA (1 µM). Se indica el tiempo tras la adición de proteínas a una D.O.<sub>550</sub> de 0.1.

Una vez comprobado que, al menos el módulo C-LytA se adsorbía a la pared bacteriana, se ensayó la adición de los CBMs al inicio de la fase exponencial (D.O.<sub>550</sub> de 0,1), tomándose medidas de la D.O.<sub>550</sub> en tiempos regulares, pero sin voltear el tubo. En ningún caso se observó efecto en la curva de crecimiento al incubar con cualquiera de las proteínas a 0,04  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados). Sin embargo, tras la adición de C-Cpl1 a 0,4  $\mu\text{M}$ , a los pocos minutos se observaron agregados fácilmente visibles, y el cultivo alcanzó una D.O.<sub>550</sub> máxima de 0,6, por debajo del control (D.O.<sub>550</sub> aprox. 1,0), momento tras el cual comenzó a disminuir debido a que las células se depositaban en el fondo del tubo (Figura 38.A). En el caso del módulo C-CbpD el efecto final que se observó a 0,4  $\mu\text{M}$  fue similar, aunque la agregación aparece más tarde, alcanzando el cultivo la fase estacionaria y la D.O.<sub>550</sub> máxima de 1,0, momento en que se observó una caída de la D.O. mucho más brusca. Por su parte, el efecto producido por C-LytA a esta concentración fue mínimo (Figura 38.A). La actividad floculante fue mucho más pronunciada cuando la concentración de CBMs se incrementó hasta 1  $\mu\text{M}$ , alcanzando en todos los casos una D.O.<sub>550</sub> máxima de 0,6, momento a partir del cual se observó una caída de la D.O. similar para las muestras tratadas con C-Cpl1 y C-CbpD, mientras que el empleo de C-LytA condujo a un descenso en la misma más lento (Figura 38.B).

Estos resultados apuntan a C-Cpl1 como el CBM con mayor actividad observada sobre células neumocócicas y a C-LytA como el menos efectivo, en consonancia con los datos de afinidad *in vitro* sobre sustratos emuladores de la pared (Tabla 9). Como control, la adición de colina al cultivo, si bien indujo la formación de cadenas, no condujo a la agregación celular (Figura 38 y Figura 39.B), lo que sugiere mecanismos de acción adicionales ejercidos por los polipéptidos CBM en comparación con el aminoalcohol.

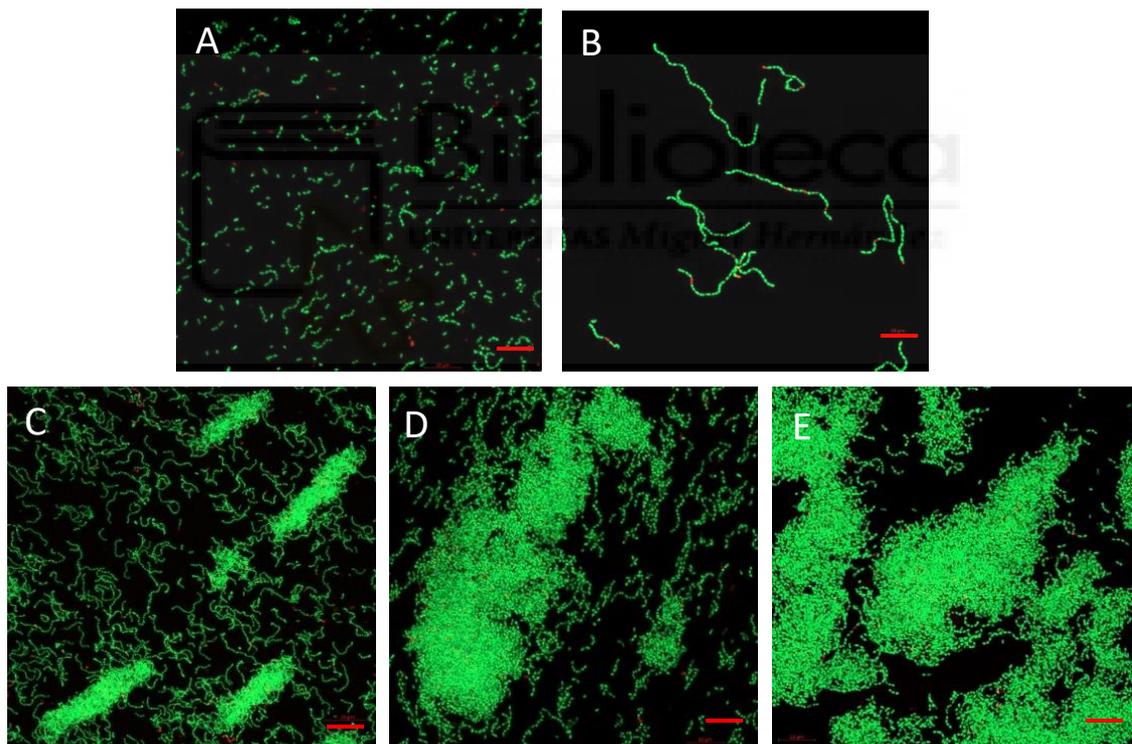


**Figura 38.** Crecimiento de la cepa *S. pneumoniae* R6CIB17 en medio C+Y en presencia de C-LytA, C-CbpD, C-Cpl1. Las concentraciones ensayadas fueron 0,4 y 1  $\mu\text{M}$  en el panel **A** y **B** respectivamente. La flecha indica el tiempo al cual se adicionaron las proteínas.

Se recogió una muestra de los cultivos conteniendo las proteínas a 1  $\mu\text{M}$ . Una alícuota se empleó para llevar a cabo el recuento de células viables, mientras que otra se tiñó con el sistema LIVE/DEAD *BacLight*, que permite diferenciar las células con la membrana intacta (verdes) de aquellas que la presentan comprometida (rojas), y se visualizaron por CLSM. En los tres casos se detectaron agrupaciones de células teñidas de verde ya en fase exponencial, encontrando un mayor efecto de agregación en presencia de C-Cpl1 (datos no mostrados). En fase estacionaria este fenómeno se incrementó, observándose grandes acumulaciones celulares, que finalmente dieron lugar a la formación de un sedimento. Los resultados obtenidos con los CBMs contrastan con el control realizado en presencia de colina al 2 %, donde se generan largas cadenas de varias decenas de células (Figura 39.B) como consecuencia de la inhibición de las CBMs<sup>298</sup>, pero no se forman agrupaciones celulares, ni conlleva la formación de flóculos.

Por último, en consonancia con los resultados de la tinción *BacLight* el recuento de células viables confirmó que la incubación del cultivo con los CBMs no induce la muerte celular (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que la agregación bacteriana podría deberse a la formación de cadenas celulares como consecuencia de la inhibición de las CBPs del huésped, junto con la existencia de interacciones entre CBMs unidos a diferentes células. En este caso, los CBMs actuarían como enlazadores no covalentes que conducen finalmente a la agregación bacteriana, constituyendo aquellos con mayor afinidad por sustratos macromoleculares conteniendo DEAE (C-Cpl1 y C-CbpD, Tabla 9) los mejores enlazadores, y por tanto los que conducen a una mayor agregación celular.



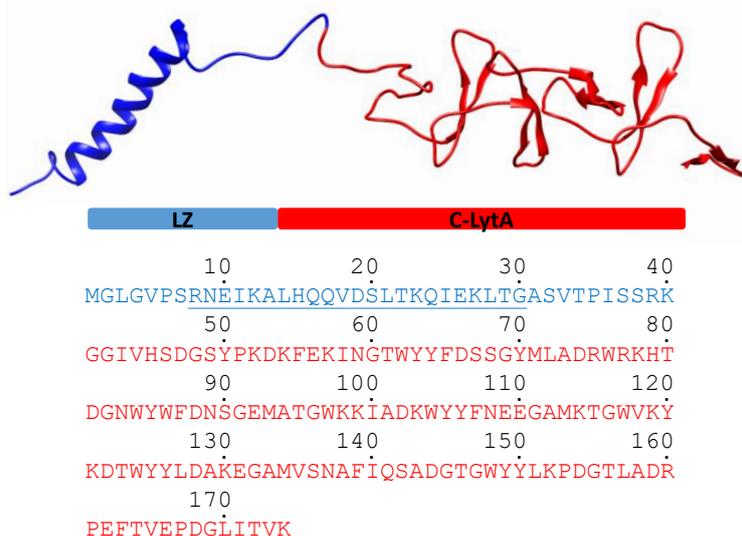
**Figura 39.** Imágenes de CLSM de muestras de *S. pneumoniae* R6CIB17. **A.** Sin tratar. **B.** En presencia de 2 % colina. **C, D, E.** Cultivos tratados con 1 μM de C-LytA, C-CbpD, C-Cpl1 respectivamente (muestras tomadas de sedimento). Las muestras se recolectaron en la fase estacionaria del crecimiento y se tiñeron con el sistema LIVE/DEAD *BacLight*. Barra: 10 μm.

### **2.3. Incremento de la eficacia de un CBM frente a *S. pneumoniae* por presentación multivalente de la proteína**

Los resultados mostrados en la Tabla 9 reflejan claramente los efectos de multivalencia resultantes al analizar la interacción entre dos moléculas polidentadas, esto es, un CBM con múltiples sitios de unión a colina y un sustrato macromolecular con múltiples copias del ligando, reflejándose en un aumento sustancial de la afinidad con respecto al ligando libre. Además, como hemos visto en el apartado anterior, la gradación de afinidades sobre sustratos artificiales se traslada a los ensayos con cultivos celulares. Aunque no parece haber una relación directa entre el número de sitios de unión a colina y la afinidad por el sustrato (Tabla 9), decidimos estudiar el efecto al aumentar el número de sitios de unión a ligando por molécula, pero en una disposición ramificada. De esta manera multiplicaríamos el número de sitios de unión a colina contenidos en una única molécula y en una disposición no lineal, inspirándonos en una arquitectura dendrímica que, en nuestro laboratorio, han mostrado previamente intensos efectos de multivalencia y de efectividad como agentes antineumocócicos<sup>302,305</sup>. Para ello, y con objeto de estudiar al máximo la capacidad de este sistema para mejorar las propiedades de un CBM, seleccionamos C-LytA, por ser el CBM que en nuestro estudio presenta menor afinidad por los sustratos emuladores de la pared y menor efectividad sobre los cultivos de neumococo.

Para la disposición del CBM de manera multivalente, utilizamos un motivo de oligomerización de proteínas, en concreto la cremallera de leucinas (LZ) de la proteína PhaF de *P. putida* KT2440<sup>328</sup>. La secuencia LZ interviene en la tetramerización de la proteína PhaF<sup>328</sup>, aunque ciertos programas como LOGICOIL (Vincent TL, Green PJ, Woolfson DN. 2013. LOGICOIL—multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state. *Bioinformatics* 29:69-76; <http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/LOGICOIL/>) predicen también su propensión a formar trímeros<sup>351</sup>. Con el fin de evitar posibles impedimentos estéricos en la región de oligomerización de la proteína quimérica, se introdujo una secuencia separadora perteneciente a la misma PhaF (Figura 40). El gen híbrido, *lzclytA*, se clonó en el vector de expresión pET21d(+), y tras la expresión de la correspondiente proteína de fusión, LZ-C-LytA (Figura 40), en *E. coli*, se purificó por cromatografía de

afinidad en DEAE-celulosa (Figura 29), tal y como se indica en “Materiales y métodos 3.3. Expresión y purificación de proteínas”.

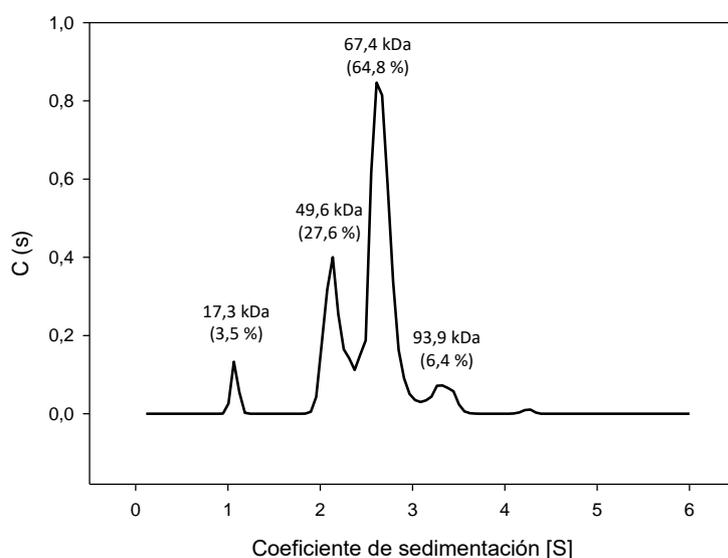


**Figura 40.** Modelo estructural y secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión LZ-C-LytA. En azul se representa la parte de la secuencia correspondiente a la proteína PhaF de *P. putida* KT2440, y en rojo la del módulo C-LytA. Los residuos que conforman la cremallera de leucinas de PhaF se encuentran subrayados.

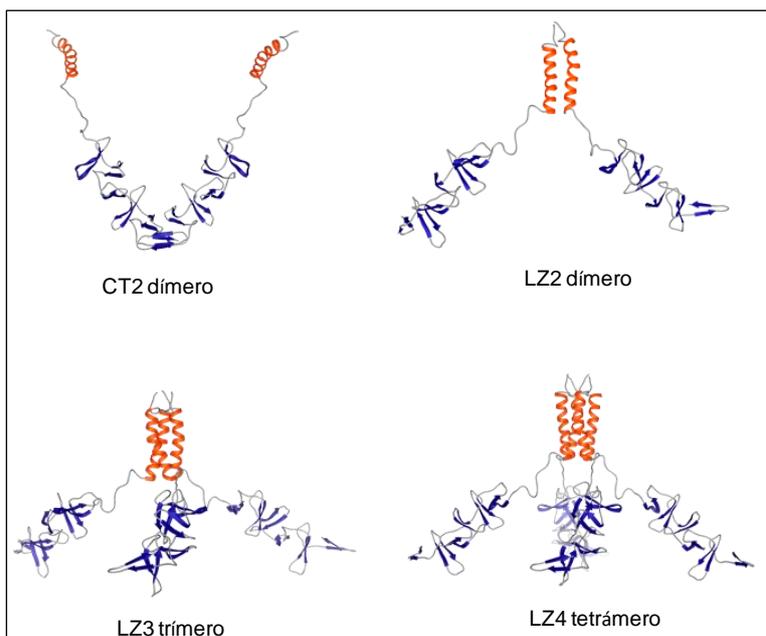
Para confirmar el estado de oligomerización de la proteína LZ-C-LytA se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación a una concentración de 5  $\mu$ M y en presencia de 10 mM colina. El experimento no pudo realizarse en ausencia de colina debido a problemas de agregación de la muestra en las condiciones de la ultracentrífuga. Los resultados (Figura 41 y Tabla 10) mostraron que en presencia de colina la proteína se presenta como una mezcla de especies: una mayoritaria de 2,69 S (64 %), una adicional de 2,20 S (27 %) y dos especies minoritarias de 1,09 S (3 %) y 3,36 S (6 %). La presencia de colina complica el análisis para determinar la naturaleza de los complejos LZ-C-LytA, ya que, en estas condiciones, la proteína podría oligomerizar por dos mecanismos distintos: a través de la horquilla C-terminal, como está publicado para C-LytA<sup>123</sup>, y/o haciendo uso de la cremallera de leucinas a través de la secuencia LZ. En un intento de asignar cada pico de sedimentación a los distintos tipos posibles de complejos oligoméricos de LZ-C-LytA, se obtuvieron modelos tridimensionales de los mismos, basados en la estructura tridimensional resuelta de C-LytA<sup>123</sup> y la estructura modelada de la región de cremallera de leucinas de PhaF<sup>328</sup>. Seguidamente se generó un modelo monomérico de partida uniendo la secuencia LZ<sup>328</sup> a C-LytA. A partir del monómero modelado, se generaron *in silico* distintas estructuras utilizando técnicas de acoplamiento proteína-proteína, mediante el servidor ZDOCK para las interacciones LZ-

LZ (variante LZ2), y mediante modelado por homología utilizando el programa Swiss-PDB para los oligómeros derivados de interacciones C-LytA-C-LytA (variante CT2) “Materiales y métodos 5. Modelado de las proteínas LZ-C-LytA y C-CbpD”. Cabe destacar que, entre la variedad de posibles oligómeros de orden superior (trímeros y tetrámeros) decidimos descartar aquellos modelos que contienen interacciones mixtas LZ-LZ y C-LytA-C-LytA. La razón es que esos modelos conducirían a motivos de oligomerización no apareados que deberían conducir a una mayor polimerización, en contraste con los resultados de ultracentrifugación analítica (Tabla 10). Como consecuencia, solo se consideraron los trímeros y tetrámeros formados exclusivamente por la interacción de LZ (LZ3 y LZ4, Figura 42).

A continuación, se estimaron las propiedades hidrodinámicas de las estructuras obtenidas utilizando el programa HydroPro<sup>331</sup>. La Tabla 10 muestra la comparación entre los datos experimentales y predichos de los valores del coeficiente de sedimentación. La especie mayoritaria es compatible con un trímero de la proteína (2,69 S), mientras que la especie de 2,20 S correspondería al dímero, y las minoritarias podrían corresponder al monómero y tetrámero. Las predicciones teóricas hidrodinámicas de los modelos *in silico* (Tabla 10) son, dentro de los límites de este enfoque, razonablemente compatibles con los resultados experimentales de sedimentación, lo que nos lleva a predecir la presencia predominante de las especies diméricas y triméricas a través del motivo LZ representadas en la Figura 42.



**Figura 41.** Experimento de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica de LZ-C-LytA en presencia de 10 mM colina.



**Figura 42.** Modelos de los posibles estados oligoméricos de la proteína LZ-C-LytA. Especies CT, dimerización a través de la horquilla C-terminal de C-LytA; Especie LZ, oligomerización a través de la secuencia de cremallera de leucina.

Coefficiente de sedimentación experimental (S)	Porcentaje de población (%)	Estado oligomérico del modelo	Mecanismo de oligomerización <sup>a</sup>	Coefficiente de sedimentación estimado (S) <sup>b</sup>
1,09	3	Monómero (19899 Da)	-	1,60
2,20	27	Dímero (39781 Da)	CT2	2,31
			LZ2	2,27
2,69	64	Trímero (59662 Da)	LZ3	2,81
3,36	6	Tetrámero (79543 Da)	LZ4	3,53

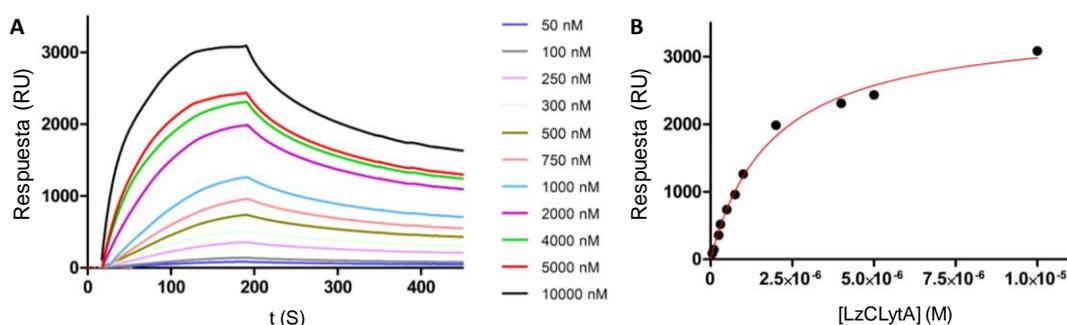
**Tabla 10.** Coeficientes de sedimentación experimentales y estimados de diferentes modelos oligoméricos de la proteína LZ-C-LytA.

<sup>a</sup> Especies CT: dimerización a través de la horquilla C-terminal de C-LytA; Especie LZ, oligomerización a través de la secuencia de cremallera de leucina. (Ver Figura 42)

<sup>b</sup> Estimado utilizando el programa HydroPro (ver Materiales y métodos)

A continuación, determinamos la afinidad de LZ-C-LytA por sustratos insolubles multivalentes. La unión a NPM-DEAE no se pudo determinarse debido a problemas de agregación de la proteína a las concentraciones requeridas. En cambio, sí se pudo evaluar la afinidad empleando la técnica de SPR debido a que se emplearon concentraciones menores, obteniendo el sensograma que se muestra en la Figura 43.A. La curva de afinidad (Figura 43.B) se ajusta adecuadamente a un único tipo de sitios de unión ( $K_d$ : 1,8  $\mu$ M), a diferencia de lo observado previamente con C-LytA, cuya curva se ajusta a dos tipos de sitios (Figura 36, Tabla 9). Aunque la afinidad de la proteína LZ-C-LytA por el sustrato multivalente es inferior a la de los sitios de unión de alta afinidad de

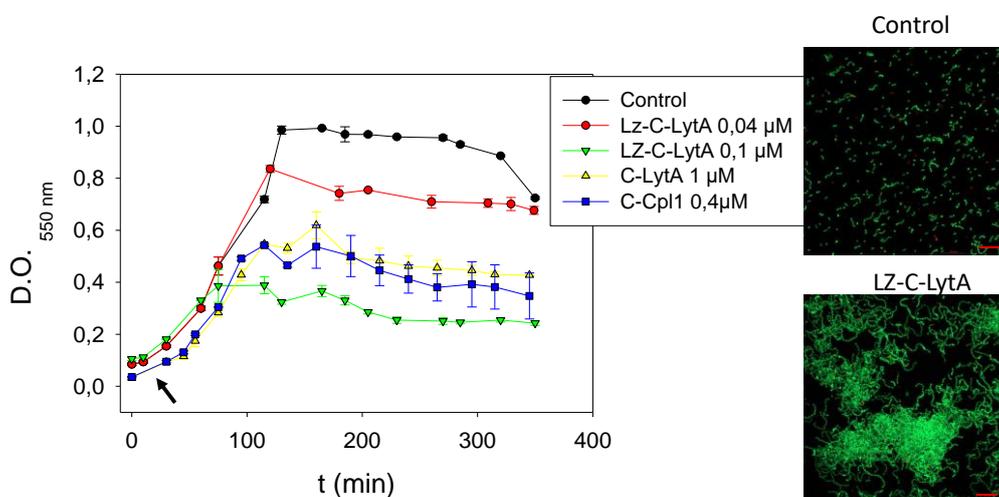
C-LytA, se debe tener en cuenta que solo una minoría de la población (25 %) presenta tales sitios. En comparación con los sitios mayoritarios de C-LytA (75 % de las moléculas), la introducción del motivo LZ induce un incremento en la afinidad de casi 8 veces, resultando también en una mayor afinidad al compararlo con el módulo C-Cpl1 (5 veces). Por lo tanto, estos experimentos indican que la oligomerización de la proteína inducida por la secuencia LZ conduce a un incremento significativo de la afinidad de los CBMs por su sustrato.



**Figura 43. A.** Sensograma SPR con un “chip” de carboximetildextrano funcionalizado con DEAPA a concentraciones crecientes de LZ-C-LytA en tampón 20 mM fosfato sódico, 0,1 % Tween, pH 7,0 a 25 °C. **B.** Curva de unión de LZ-C-LytA. Los datos se ajustaron a un modelo de un tipo de sitios de unión (Ecuación 9).

La proteína LZ-C-LytA representa el CBM con mayor afinidad *in vitro* por sustratos emuladores de la pared, por lo que a continuación nos propusimos estudiar su efecto sobre cultivos líquidos de neumococo. Como se puede ver en la Figura 44.A, a bajas concentraciones de la proteína LZ-C-LytA (40 nM), donde no se observa efecto con los 3 CBMs naturales, se aprecia aquí en cambio un ligero pero medible descenso de la D.O.<sub>550</sub>, de manera semejante a lo encontrado para la proteína C-LytA a 400 nM (Figura 38), acompañado de aglomerados celulares que se podían percibir a simple vista, y que terminaban sedimentando. Asimismo, a una concentración de 0,1  $\mu$ M de LZ-C-LytA se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos con 1  $\mu$ M de C-LytA y 400 nM C-Cpl1 (Figura 38), y en consonancia con el aumento de unas 8 veces en la afinidad de LZ-C-LytA por sustratos polidentados comparada con el CBM parental (Tabla 9). Además, en las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las muestras tomadas del sedimento del cultivo en la fase estacionaria del crecimiento en presencia de LZ-C-LytA a 0,1  $\mu$ M se observó la formación de cadenas y de amplias agrupaciones celulares teñidas de verde (Figura 44.B). En ambos casos (0,04 y 0,1  $\mu$ M) el número de células

viables determinado por micro-siembra de diluciones seriadas permaneció sin cambios (datos no mostrados). Estos datos indican que la disposición multivalente de C-LytA potencia exponencialmente el efecto de aglomeración de células neumocócicas.

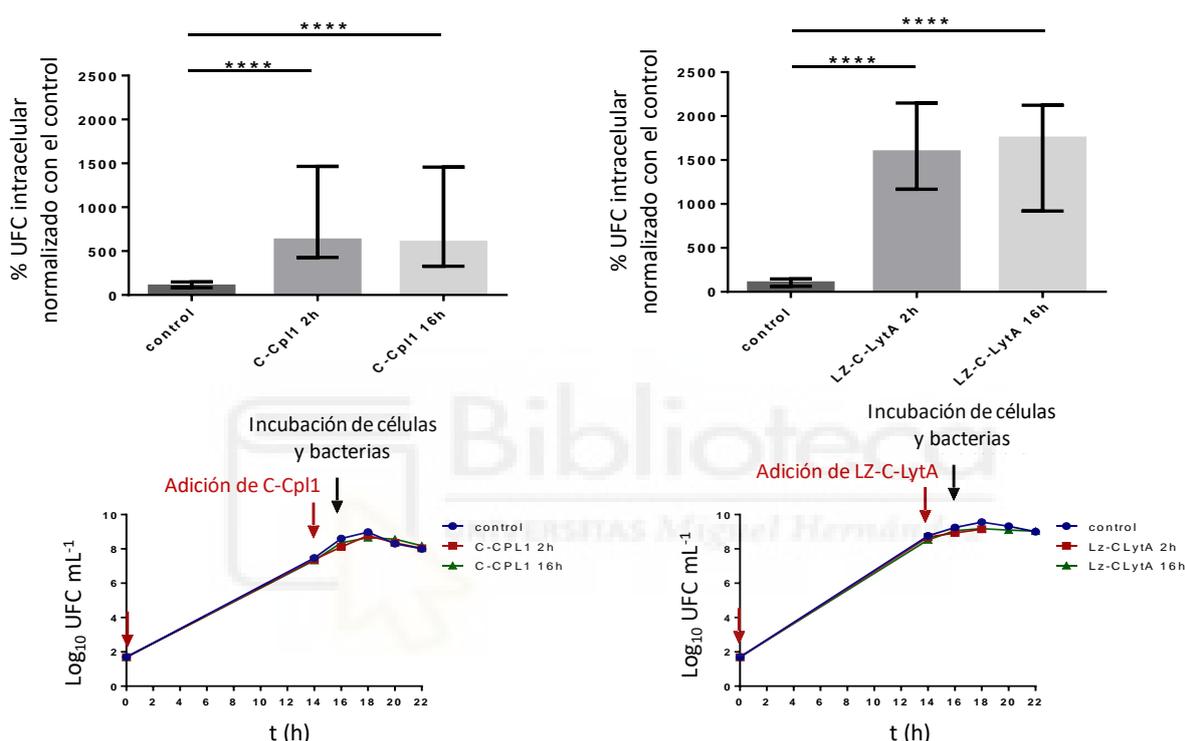


**Figura 44. A.** Curva de crecimiento de la cepa *S. pneumoniae* R6CIB17 en medio C+Y y en presencia de la proteína LZ-C-LytA a las concentraciones indicadas. **B.** Imágenes de CLSM de muestras de *S. pneumoniae* R6CIB17, sin tratar y en presencia de LZ-C-LytA a 0,1  $\mu\text{M}$ . Las muestras se recolectaron a los 300 min de la adición del correspondiente CBM, y se tiñeron con el sistema LIVE/DEAD *BacLight*. Barra: 10 $\mu\text{m}$ .

#### 2.4. Efecto de los diferentes CBMs estudiados sobre la fagocitosis de *S. pneumoniae* por macrófagos peritoneales

Estudios previos realizados en el laboratorio, y en colaboración con el grupo del Prof. Roland Nau de la Universidad de Göttingen (Alemania) demostraron que el tratamiento de cultivos de *S. pneumoniae* con un dendrímero de colina tiene como resultado la inhibición de la actividad de las CBPs y la formación de largas cadenas<sup>305</sup> que son fácilmente reconocidas por macrófagos de células glia<sup>306</sup>. A diferencia de la adición de colina, en nuestro estudio la incubación con CBMs no induce tanto a la formación de largas cadenas como a la formación de aglomerados celulares que podrían ser más fácilmente reconocidos por los macrófagos. Por esta razón, comprobamos *in vitro* la respuesta mediada por macrófagos peritoneales de ratón sobre un cultivo de *S. pneumoniae* R6 tratado con los CBMs más efectivos de nuestro estudio, C-Cpl1 y LZ-C-LytA. El porcentaje de UFC intracelulares se determinó después de tratar el cultivo durante 2 o 16 h con C-Cpl1 o LZ-C-LytA a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Con objeto de corregir las posibles variaciones en un mismo experimento, el número de UFC se presenta como porcentaje en relación al número obtenido en el control sin tratar. Como

puede observarse en la Figura 45, la incubación del cultivo en presencia de los módulos influye significativamente en la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales, mostrando el mismo nivel de fagocitosis (UFC intracelulares) transcurridas las 2 y 16 h de tratamiento. Es importante señalar que el número de UFC intracelular obtenido al tratar el cultivo con LZ-C-LytA es dos veces el obtenido con C-Cpl1 (Figura 45), en consonancia con su mayor afinidad por sustratos sólidos (Tabla 9) y su mayor poder de agregación de células en cultivos planctónicos (Figura 44).



**Figura 45.** Fagocitosis de *S. pneumoniae* R6 por macrófagos peritoneales de ratón. El pretratamiento de neumococos con CBM aumenta su fagocitosis por los macrófagos. Comparación de UFC después de 2 y 16 h de pretratamiento de un cultivo de neumococo R6 con C-Cpl1 1  $\mu$ M (izquierda; células de 7 animales; 20-21 valores/grupo) o 1  $\mu$ M LZ-C-LytA (derecha; células de 5 animales; 19-20 valores/grupo). El número de bacterias fagocitadas tras el pretratamiento con CBM se expresó en % del número de bacterias no tratadas fagocitadas en el mismo intervalo de tiempo. Los datos se expresan como medianas (percentil 25/percentil 75). La prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn se utilizó para comparar datos (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

En conjunto, los resultados muestran que la adición exógena de CBMs induce la aglutinación celular, un efecto que es proporcional a su afinidad por colina o un análogo de la misma en un soporte multidentado emulador de la pared celular. Además, estos agregados bacterianos favorecen la fagocitosis mediada por los macrófagos del huésped. Por tanto, los CBMs se presentan como una novedosa estrategia de tratamiento para las infecciones neumocócicas.

### 3. ESTUDIO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA AUTOLISINA LytA COMO POSIBLES ANTIMICROBIANOS líticos FRENTE A *S. pneumoniae*

Una vez comprobada la capacidad de agregación de los CBMs sobre las células de neumococo en cultivo líquido, nos planteamos estudiar versiones simplificadas de los mismos con el propósito de encontrar el mínimo requerimiento estructural necesario para obtener un efecto similar. La razón de investigar esta alternativa se basa en las distintas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que puede presentar un péptido pequeño frente a una proteína. Los péptidos disponen de una mayor capacidad de penetrar en membranas, son menos inmunogénicos y además generalmente presentan una alta actividad y estabilidad. Un beneficio adicional del uso de péptidos es que no se acumulan en órganos específicos, lo que puede ayudar a minimizar sus efectos secundarios<sup>352</sup>. Estudios previos del laboratorio habían demostrado que la secuencia de un CBR aislado de la autolisina LytA dispone de toda la información necesaria para adquirir en solución acuosa una estructura similar a la nativa, en conformación de horquilla  $\beta$ , siendo, además, capaz de reconocer específicamente la colina, aunque con afinidad residual comparado con el CBM completo<sup>121,122</sup>.

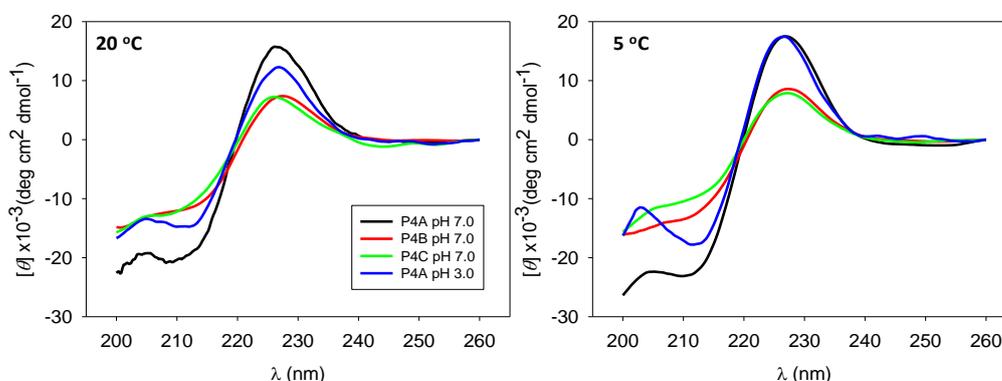
De entre las secuencias estudiadas, LytA<sub>239-252</sub> (de ahora en adelante péptido P4A, Tabla 11), correspondiente a la repetición CBR4 (aminoácidos 239-258), presenta una horquilla  $\beta$  de tipo 2:2 con un giro de tipo I', una configuración particularmente estable<sup>123</sup> que contribuye a la adquisición en solución de su conformación nativa prácticamente en un 100 %<sup>122</sup>. Por todo ello, en el presente trabajo nos centramos en el estudio del péptido P4A, y construcciones derivadas de éste por duplicación y triplicación de la misma secuencia en tándem (péptidos P4B y P4C) (Tabla 11). La razón de estudiar repeticiones de secuencias idénticas fue doble: aprovechar la particular estabilidad de la horquilla P4A para generar péptidos de estructura probablemente más robusta que las correspondientes secuencias naturales, y tratar de encontrar de manera inequívoca y simple una relación entre los efectos encontrados y el número de repeticiones. Para separar las horquillas se introdujo la secuencia correspondiente al bucle de la repetición CBR4.

<b>P4A</b> - Horquilla $\beta$ de CBR4	TGWKKIADKWYFFN
<b>P4B</b> - Duplicación de P4A	TGWKKIADKWYFFN <b>EEGAMKT</b> GWKKIADKWYFFN
<b>P4C</b> - Triplicación de P4A	TGWKKIADKWYFFN <b>EEGAMKT</b> GWKKIADKWYFFN <b>EEGAMKT</b> GWKKIADKWYFFN

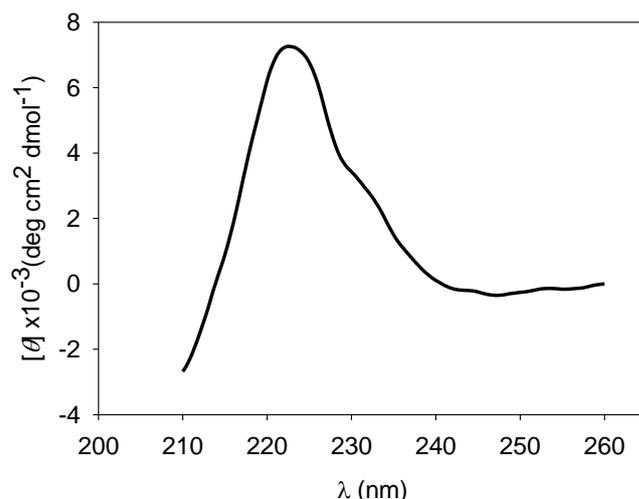
**Tabla 11.** Secuencia de aminoácidos del péptido P4A y sus derivados. Se indica el nombre común por el que nos referiremos a ellos en este trabajo. En azul se muestra la secuencia correspondiente a la horquilla  $\beta$  de CBR4 (LytA<sub>239–252</sub>) y en rojo el bucle (LytA<sub>253–258</sub>) que conecta las horquillas CBR4 y CBR5.

### 3.1. Caracterización estructural de los péptidos derivados de CBR4 de LytA

En primer lugar, llevamos a cabo una caracterización estructural del péptido P4A y sus derivados mediante CD en la región del UV lejano, a pH fisiológico (7,0), y se comparó con el espectro del mismo péptido previamente caracterizado en el laboratorio a pH 3,0<sup>122</sup>. La única diferencia apreciable encontrada fue que el péptido P4A a pH 7,0 presenta una cierta mayor estructuración a 20 °C con respecto a pH ácido (Figura 46). El espectro de P4A y sus derivados muestran similitudes con el del módulo completo C-LytA, con un máximo centrado a 227 nm que provendría de la contribución de residuos aromáticos en un entorno rígido (Figura 47)<sup>116,129,130</sup>. Por su parte, la presencia de las secuencias del bucle conector entre horquillas de la proteína C-LytA y los péptidos P4B y P4C provoca que la contribución relativa de los triptófanos a 227 nm sea inferior en estos dos casos comparado con P4A (que no posee aminoácidos en ordenación aperiódica), lo cual se detecta también en una menor contribución en los picos negativos en torno a 200 y 215 nm. En todo caso, los resultados sugieren que los péptidos P4A, P4B y P4C presentan una estructura ordenada a pH 7,0, similar a la del péptido P4A a pH 3,0 (Figura 46)<sup>122</sup>.



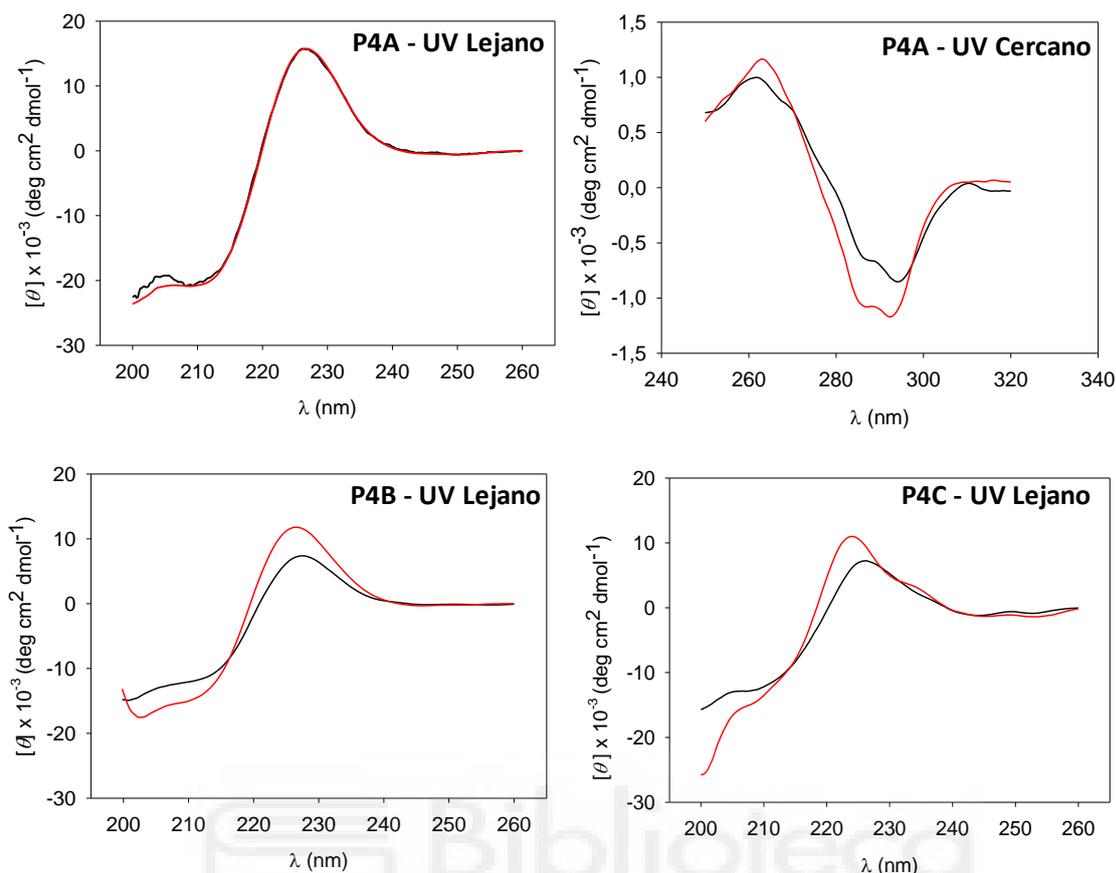
**Figura 46.** Espectro de CD en la región del UV lejano de los péptidos P4A (negro), P4B (rojo) y P4C (verde) en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0, y del péptido P4A en tampón 20 mM glicina a pH 3,0 (azul) registrados a 20 °C (izquierda) y a 5 °C (derecha).



**Figura 47.** Espectro de CD en la región del UV lejano de C-LytA en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 a 20 °C.

### 3.1.1. Reconocimiento de colina

La capacidad de los diferentes péptidos para unir colina se analizó en primer lugar siguiendo la variación en el espectro de CD en el UV lejano en presencia de 500 mM de colina, observándose un incremento en la intensidad del pico máximo en el caso de los péptidos P4B y P4C (Figura 48) y un desplazamiento a una longitud de onda inferior, siendo más acusado en el caso de P4C. Por otro lado, y al igual que se había descrito previamente a pH 3,0<sup>122</sup>, la unión de colina en el péptido P4A no afecta al espectro de CD en el UV lejano, mientras que sí resulta modificado el espectro en el UV cercano (Figura 48), observándose un aumento de las bandas centradas a 293 nm (cadenas laterales de los triptófanos) y 286 nm (tirosinas y triptófanos) como ya se describió anteriormente<sup>116,122</sup>. La ausencia de cambio en el espectro de P4A en el UV lejano (Figura 48) podría deberse al hecho de que P4A adquiere en solución y en ausencia de colina una estructura de lámina  $\beta$  próxima al 100 %<sup>122</sup>, por lo que la totalidad de la población dispone los aromáticos en un entorno rígido que apenas se ve modificado por la unión de colina, mientras que la presencia de secuencias conectoras flexibles en los péptidos P4B y P4C facilitarían un cambio conformacional (que lleve a un mayor plegamiento) más evidente inducido por el ligando.



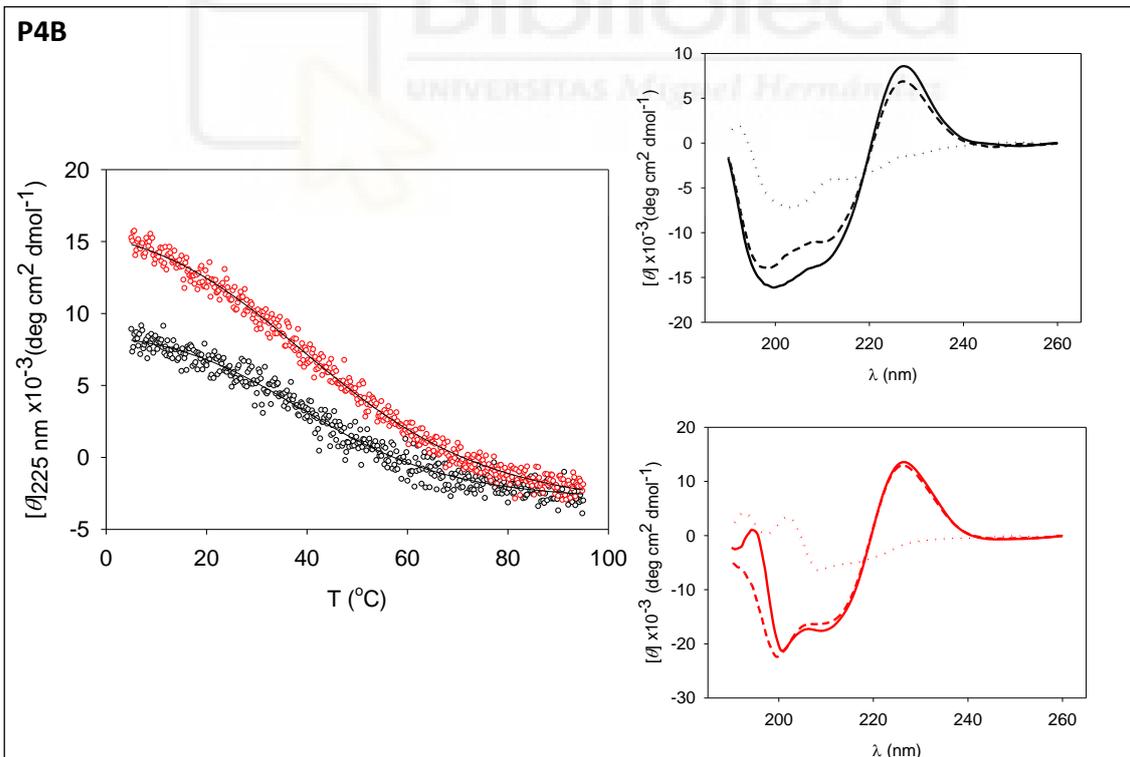
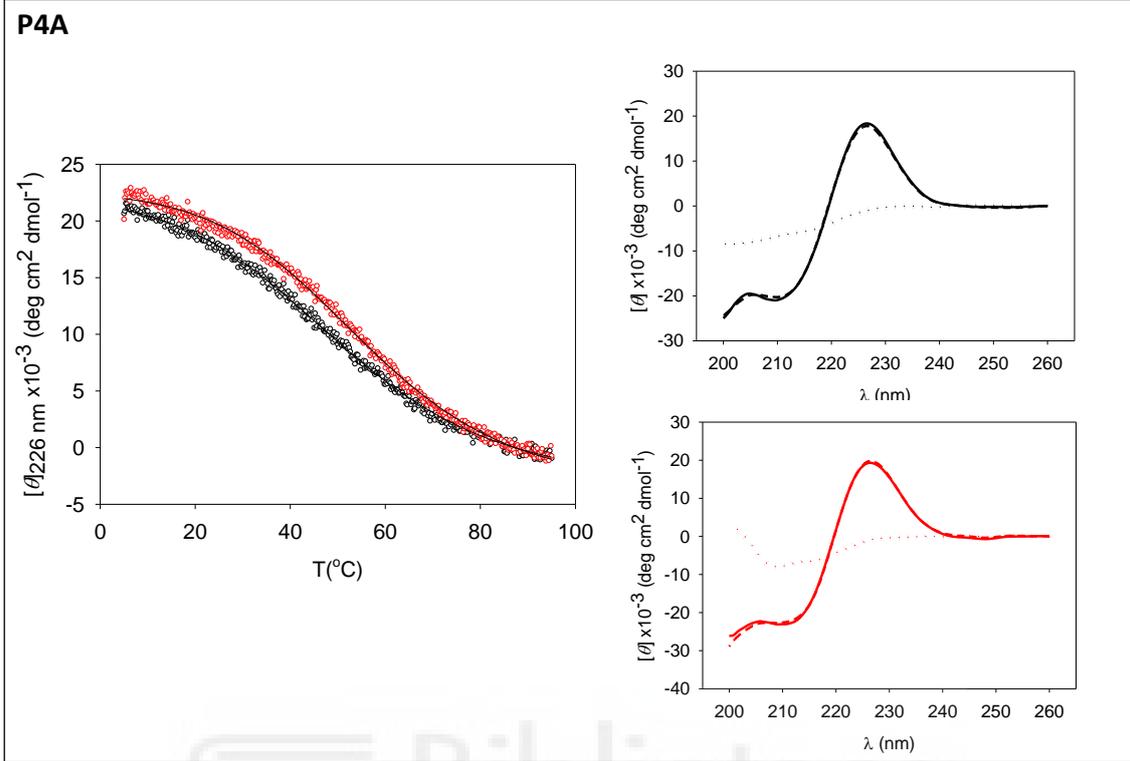
**Figura 48.** Espectro de CD en el UV cercano y lejano de P4A, y en el UV lejano de P4B y P4C, en ausencia (negro) y en presencia de colina 500 mM (rojo) a 20 °C en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0.

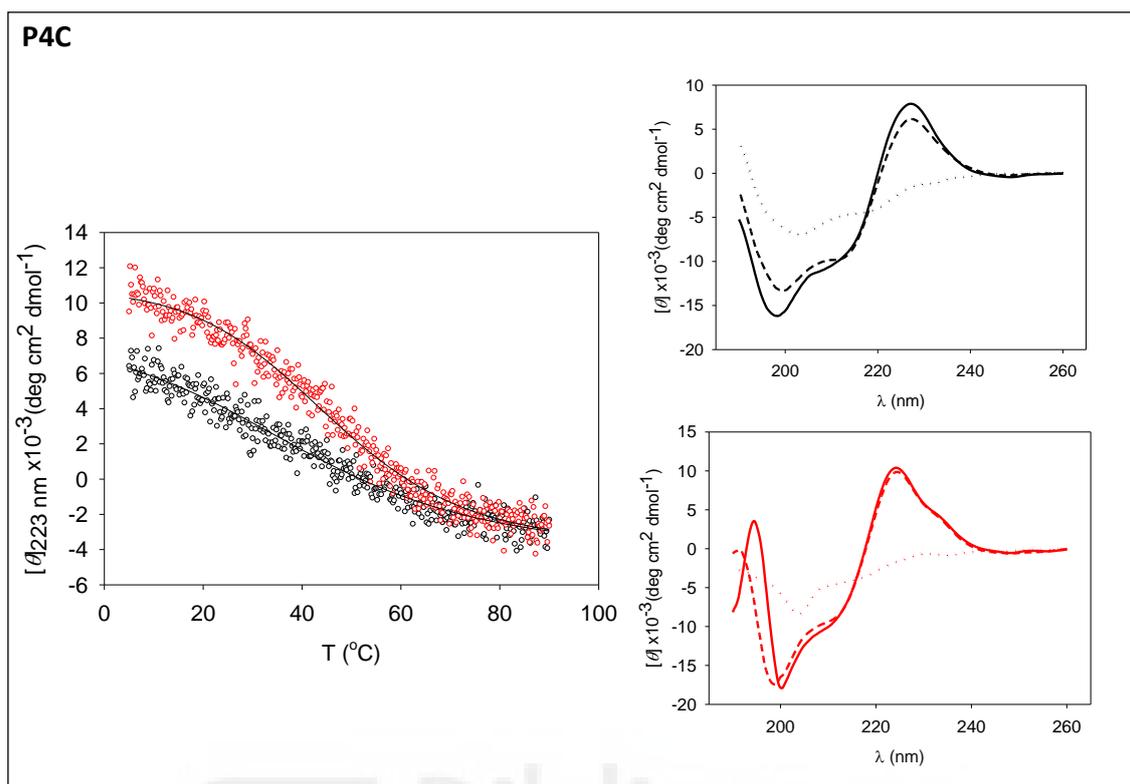
### 3.1.2. Estudios de estabilidad térmica

El estudio de la estabilidad térmica de los diferentes péptidos en ausencia y en presencia de colina a 500 mM se realizó siguiendo por CD el cambio en la elipticidad molar en el UV lejano en función de la temperatura (Figura 49). En todos los casos se produce una pérdida de señal de CD en la región de contribución de los residuos aromáticos a medida que aumenta la temperatura, indicativo de una pérdida de estructura apreciable, y rindiendo a 95 °C un espectro con un mínimo centrado a 200 nm aproximadamente, correspondiente a una estructura mayoritariamente desordenada<sup>345</sup>. Esta última característica no se observa con claridad en los espectros de las muestras con colina ya que la combinación de temperatura y fuerza iónica genera demasiado ruido en esta región del espectro<sup>345,353,354</sup>. Tras finalizar cada barrido de temperatura (entre 5 y 95 °C), y con objeto de comprobar si la transición era reversible, las muestras se enfriaron hasta la temperatura original y se registró de nuevo el espectro

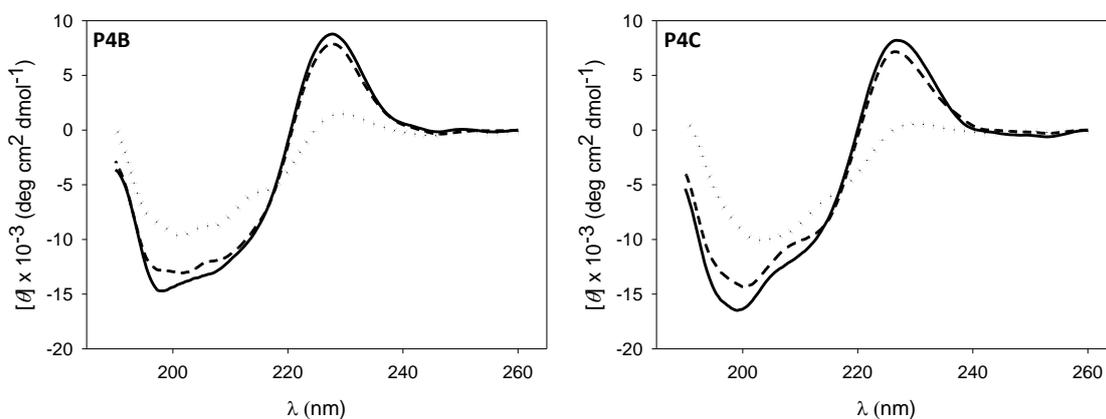
de longitud de onda tras 1 h de espera (Figura 49). En el caso de los péptidos P4B y P4C se observó que en ausencia de colina la transición no era reversible al 100 %. Sin embargo, cuando el calentamiento se detuvo a 60 °C, con la transición completada en su mayor parte, los espectros revirtieron al valor inicial en mayor medida (Figura 50). Por este motivo, y al igual que se ha descrito más arriba con los CBMs, se consideró que los procesos causantes de la irreversibilidad presentan una cinética relativamente lenta, y teniendo lugar después de la transición de desnaturalización, por lo que se procedió a aplicar la termodinámica de procesos reversibles al análisis estructural del desplegamiento térmico, y en consecuencia a ajustar las curvas de desnaturalización con la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ecuación 2). Las curvas de desnaturalización muestran escasa cooperatividad (Figura 51), lo que sugiere la falta de núcleos hidrofóbicos de apreciable tamaño, por lo que, como aproximación, se asumió como nula la contribución de  $\Delta C_p$ , tal y como se había descrito para el péptido P4A a pH 3,0<sup>122</sup> y para otros péptidos en conformación de horquilla  $\beta$ <sup>355-357</sup>. Los parámetros termodinámicos obtenidos de esta manera se muestran en la Tabla 12.

La interacción con la colina induce un modesto incremento en la estabilidad de los péptidos, que se traduce en un aumento de la  $T_m$  que es más evidente en el caso de P4A y P4C (Tabla 12). Además, la Figura 49 muestra que la elipticidad de cada péptido en presencia y ausencia de colina solo converge a temperatura superior a 75 °C, a partir de la cual las transiciones se solapan, indicando que los péptidos mantienen su unión al ligando incluso a temperaturas tan altas. En todo caso, tanto en ausencia como en presencia de colina la estabilidad termodinámica de los péptidos a temperatura ambiente es solo marginal, observándose incluso un cierto descenso al incrementarse el número de repeticiones, que proviene sobre todo de una apreciable reducción de la  $T_m$  de hasta 10 °C en el caso de P4C (Tabla 12); de hecho, el péptido P4A es el que presenta un espectro más cooperativo en ausencia de colina, tal y como se observa también en la comparativa de la Figura 51. Finalmente, los bajos valores de la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_m$ ) tanto en presencia como en ausencia de colina para los tres péptidos hace que los valores finales de la energía libre de estabilización sean muy similares en los dos casos (Tabla 12), lo que sugiere que la unión del ligando está poco favorecida.

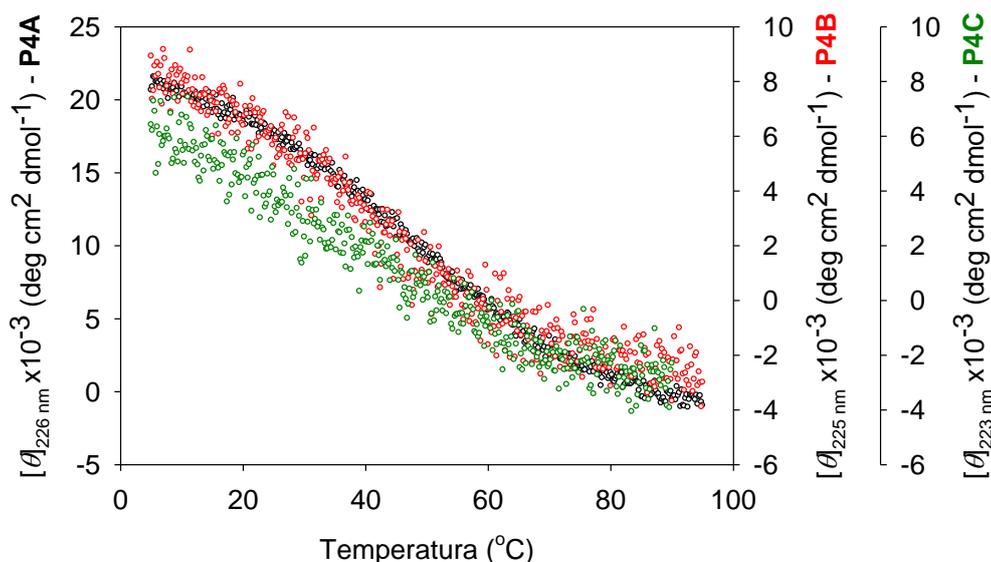




**Figura 49.** Caracterización espectroscópica de los péptidos en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 monitorizado por CD. A la izquierda se muestra el barrido de temperatura en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de colina 500 mM; la línea continua es la derivada del ajuste a la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ecuación 2). A la derecha se muestran los espectros por CD en el UV lejano de cada péptido en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de colina 500 mM a 5 °C (línea continua), 90 °C (línea punteada), y la muestra enfriada tras el barrido de temperatura a 5 °C (línea discontinua).



**Figura 50.** Espectros de CD en el UV lejano de los péptidos P4B (izquierda) y P4C (derecha) en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 sin colina. En cada panel se representa la muestra a 5 °C (línea continua), calentada a 60 °C (líneas punteadas), y enfriadas a 5 °C tras el barrido de temperatura hasta 60 °C (línea discontinua).



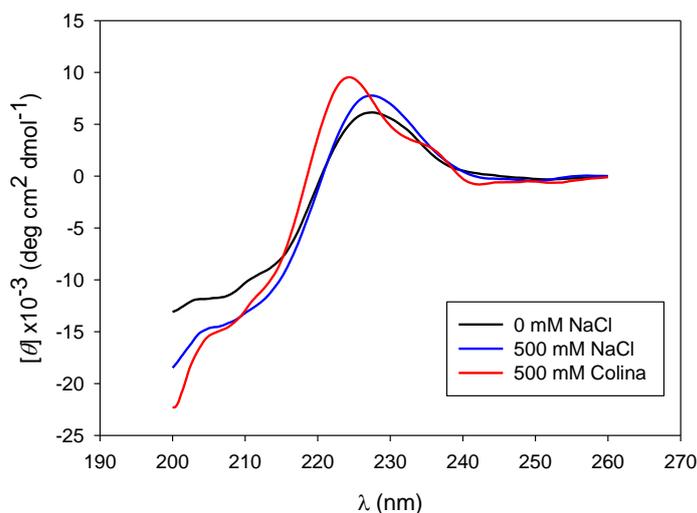
**Figura 51.** Comparación del desplegamiento térmico monitorizado por CD de los péptidos P4A (negro), P4B (rojo) y P4C (verde) en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 en ausencia de colina.

[Colina] (mM)	P4A		P4B		P4C	
	0	500	0	500	0	500
$\Delta H_m$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	51 ± 1	56 ± 1	57 ± 3	48 ± 1	41 ± 2	60 ± 3
$T_m$ (K)	322,4 ± 0,2	327,8 ± 0,2	314,2 ± 0,6	315,8 ± 0,4	311,8 ± 1,1	318,5 ± 0,5
$\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	4,0 ± 0,1	5,1 ± 0,8	3,0 ± 0,2	2,7 ± 1,1	1,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3
$K_d$ (mM)	197 ± 9		280 ± 10		118 ± 3	

**Tabla 12.** Parámetros termodinámicos y constantes de afinidad calculadas para P4A, P4B y P4C en tampón fosfato 20 mM pH 7,0.

### 3.1.3. Afinidad por colina libre

Con objeto de evaluar la afinidad de los péptidos por colina a 20 °C, nos propusimos realizar en primer lugar una titulación de la señal de CD tras la adición del ligando. Sin embargo, como se muestra en la Figura 52, la adición de 500 mM de NaCl como control del efecto de la fuerza iónica desveló que, en estas condiciones, el espectro de P4C sufre un cierto incremento de intensidad a 227 nm, aunque en menor grado y sin experimentar un desplazamiento de longitud de onda como ocurre en presencia de colina a la misma concentración. Es decir, el cambio en el espectro de CD producido por la colina podría ser el resultado de una componente específica y otra inespecífica por puro incremento de la fuerza iónica.



**Figura 52.** Espectro de CD en el UV lejano de P4C (negro), en presencia de 500 mM NaCl (azul), colina 500 mM (rojo) a 20 °C en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0.

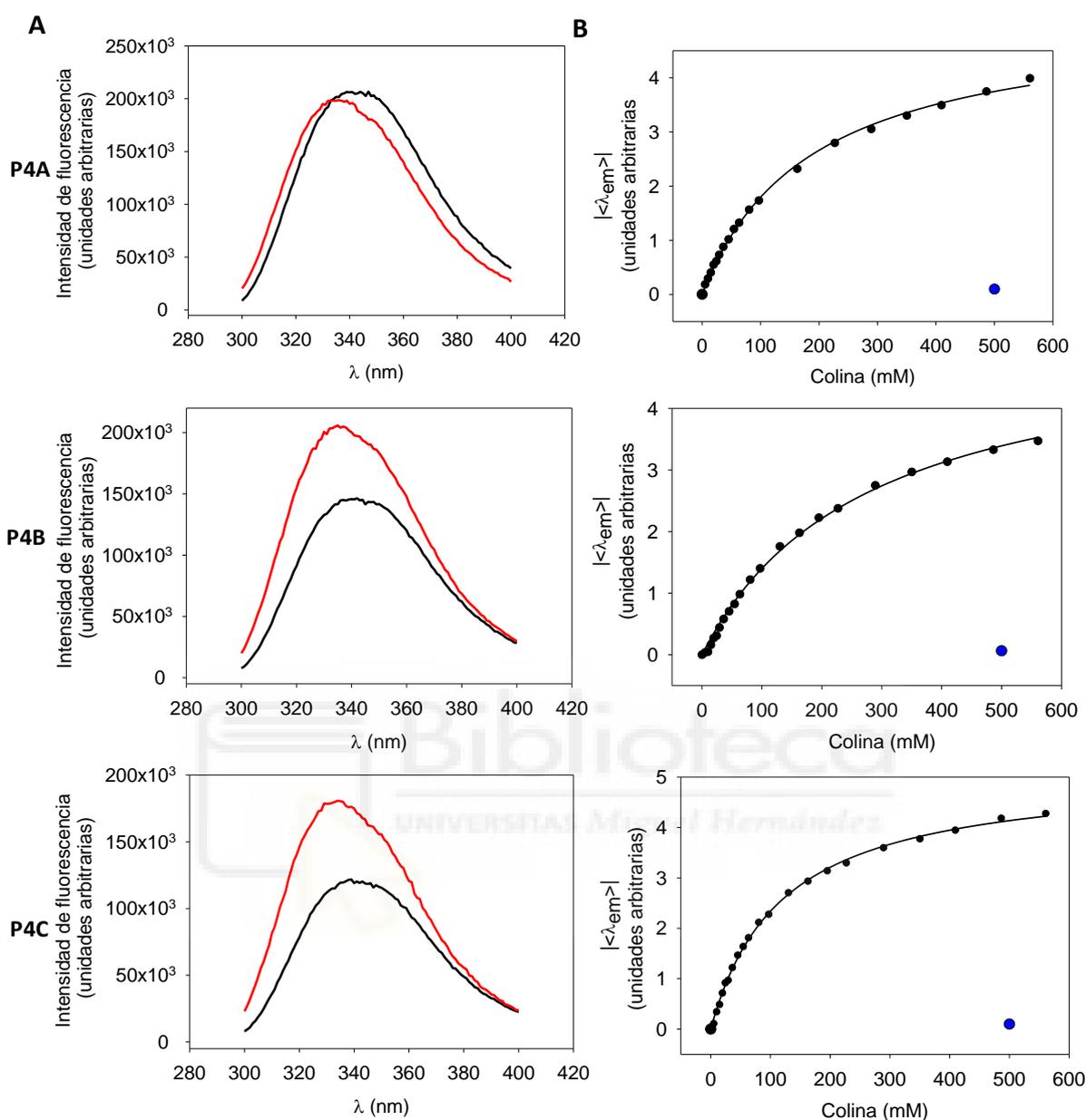
Para minimizar estos inconvenientes, decidimos estudiar alternativamente la unión del ligando mediante espectroscopia de fluorescencia intrínseca de la proteína. Los espectros de P4A, P4B y P4C se registraron tras excitar la muestra a 280 nm, en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 a concentraciones crecientes de colina (Figura 53.A). Los espectros de emisión muestran un máximo centrado a 340 nm, correspondiente a residuos de triptófano situados en un entorno expuesto al disolvente <sup>358</sup>. En los tres casos la adición de colina provoca un desplazamiento de los espectros de emisión hacia el azul, sugiriendo la aparición de un entorno más apolar alrededor de los residuos aromáticos, como era de esperar por el modo típico de unión a colina por medio de CBRs <sup>66</sup>. Mientras que, en consonancia con los resultados de CD en el UV lejano (Figura 48), los cambios conformacionales de P4A son de pequeña magnitud, en el caso de P4B y P4C el desplazamiento espectral se ve acompañado de un fuerte incremento en la intensidad de fluorescencia, indicando una mayor protección de las cadenas laterales aromáticas del apagamiento ("quenching") de las moléculas de disolvente.

La Figura 53.B muestra la titulación con colina siguiendo la variación en valor absoluto de la longitud de onda promedio de emisión de fluorescencia ( $|\langle \lambda_{em} \rangle|$ ), indicando saturación a altas concentraciones de ligando (Ecuación 5). Es necesario señalar que la adición de NaCl provoca una pequeña variación de la intensidad de fluorescencia en el caso de P4B y P4C (Figura 54), pero no afecta al valor de  $\langle \lambda_{em} \rangle$  (Figura

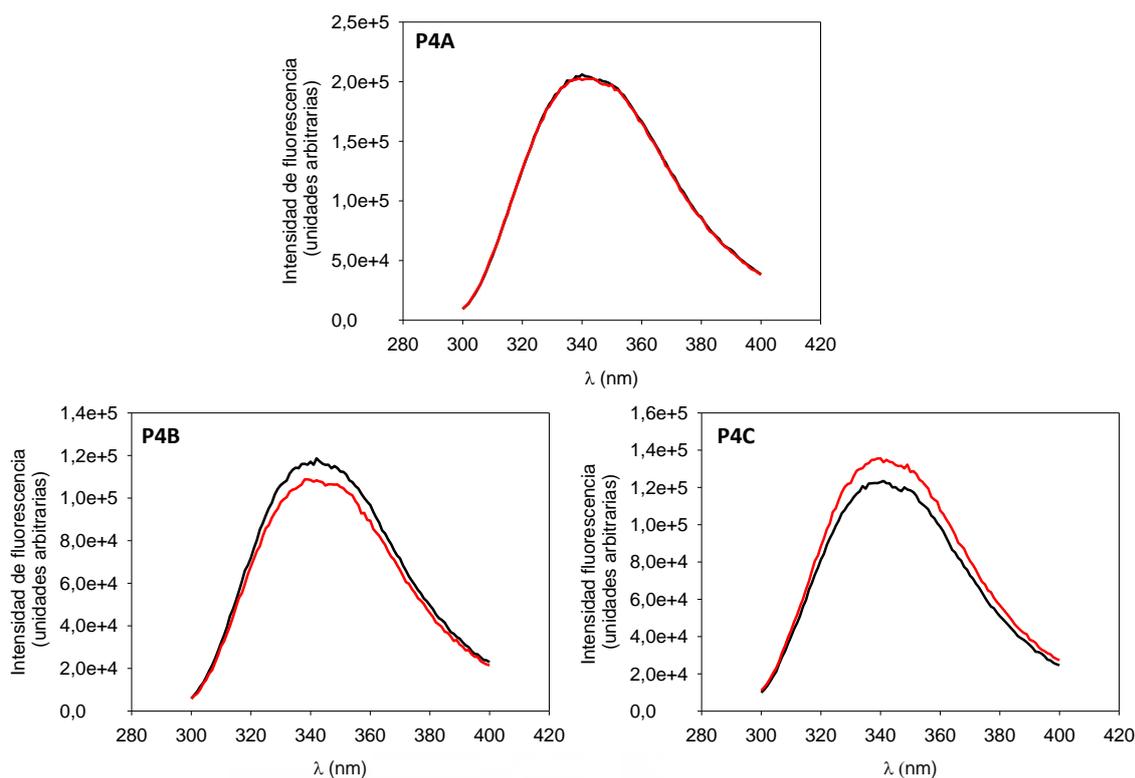
53.B) lo que indica que el seguimiento de este parámetro es específico para la unión del colina.

Los resultados de las titulaciones se ajustaron a una función hiperbólica simple suponiendo un único tipo de sitios de unión “Materiales y Métodos 4.2 *Espectroscopía de fluorescencia*” (Figura 53.B). Otros intentos de ajuste a modelos más complejos que contemplaran dos o más tipos distintos de sitios no rindieron resultados satisfactorios (datos no mostrados). Las constantes de disociación calculadas ( $K_d$ , Tabla 12) indican que el péptido P4B muestra una afinidad algo inferior a P4A, mientras que la unión se encuentra más favorecida en el caso de P4C. En todo caso se trata de afinidades marginales, del orden de centenas de milimolar, lo que explica el discreto efecto ejercido por la colina sobre la estabilidad térmica de los péptidos, y en todo caso indica que la mera repetición de CBRs idénticas no asegura una interacción horquilla-horquilla de tipo nativo para la configuración de un sitio canónico de unión a colina, cuya constante de afinidad es dos órdenes de magnitud inferior (Tabla 9).

A continuación, y tal y como se había realizado anteriormente con los CBMs (Resultados 2.1.2. *Afinidad por sustratos insolubles*), pretendimos evaluar la unión de los péptidos P4A, P4B y P4C a superficies multidentadas emuladoras de la pared celular (NPM-DEAE y "chips" de SPR), donde podrían mostrar una afinidad aumentada. Sin embargo, en ninguno de los dos casos pudieron obtenerse resultados reproducibles, ya que se produjeron fenómenos de adsorción inespecífica y/o precipitación (datos no mostrados). Se procedió a la obtención de los péptidos P4D y P4E, cuya secuencia corresponde a la cuadruplicación y quintuplicación de P4A en tándem. Debido al mayor número de residuos que componen su secuencia esta vez no se pudo llevar a cabo la síntesis peptídica, por lo que se procedió a la sobreexpresión de los genes, a partir del plásmido pET21d(+) en cepas de *E. coli* BL21 (DE3), y a su purificación por cromatografía de afinidad y elución con colina<sup>116,299</sup>. Aunque se observó que los péptidos P4D y P4E ya eran capaces de unirse a la resina de DEAE-celulosa, y obtenerse en cantidades suficientes de manera pura, los problemas de insolubilidad peptídica en ausencia de colina hicieron imposible el progreso del estudio en este sentido.



**Figura 53. A.** Espectros de fluorescencia de P4A, P4B y P4C en tampón 20 mM fosfato sódico pH 7,0, en ausencia (negro) y en presencia de 500 mM colina (rojo) **B.** Representación del valor absoluto de la variación de la longitud de onda promedio de emisión ( $|\langle \lambda_{em} \rangle|$ ) en función de colina añadida a los péptidos: P4A, P4B, y P4C. Las gráficas se ajustaron a una hipérbola, asumiendo un modelo de unión simple (Ecuación 6). El punto azul que se muestra corresponde al  $|\langle \lambda_{em} \rangle|$  en presencia de 500 mM de NaCl. Los datos corresponden a un experimento representativo.



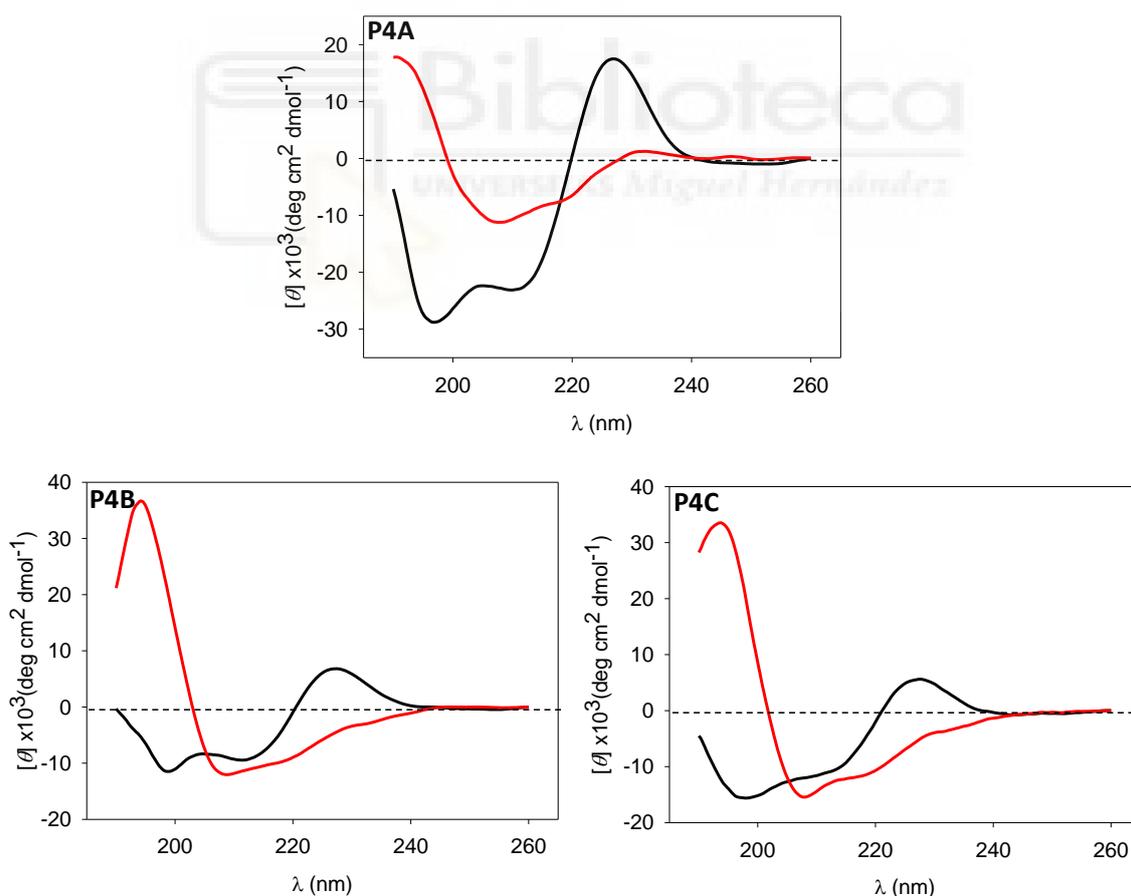
**Figura 54.** Espectros de fluorescencia de P4A, P4B y P4C en tampón fosfato 20 mM pH 7,0, en ausencia (negro) y en presencia de 500 mM NaCl (rojo).

### 3.1.4. Evaluación de los péptidos derivados de LytA como "interruptores moleculares"

La carencia de una estructura compacta (baja cooperatividad, Figura 51), su estabilidad marginal (Tabla 12), y su afinidad residual frente a colina libre (Tabla 12, Figura 53) nos llevó a pensar que los péptidos P4A, P4B y P4C no se comportan como CBMs minimizados y que, por lo tanto, sería improbable que presentaran un efecto de agregación celular frente a cultivos planctónicos de neumococo (Figura 39). Sin embargo, decidimos evaluar una vía alternativa que pudiera desvelar un efecto antimicrobiano diferente a los CBMs. Dicha vía se basa en estudios previos del laboratorio que habían demostrado que el péptido P4A sufre, a pH ácido, un cambio conformacional reversible desde su estructura nativa en horquilla  $\beta$  hacia una hélice  $\alpha$  anfipática en presencia de micelas de detergente y de vesículas lipídicas, entrando en la clasificación de "péptido camaleónico" o "interruptor molecular" <sup>122,158</sup>. La transición  $\beta \rightarrow \alpha$  puede observarse también con el CBM completo C-LytA, aunque en este caso es necesario desestabilizar adicionalmente la proteína por temperatura o pH,

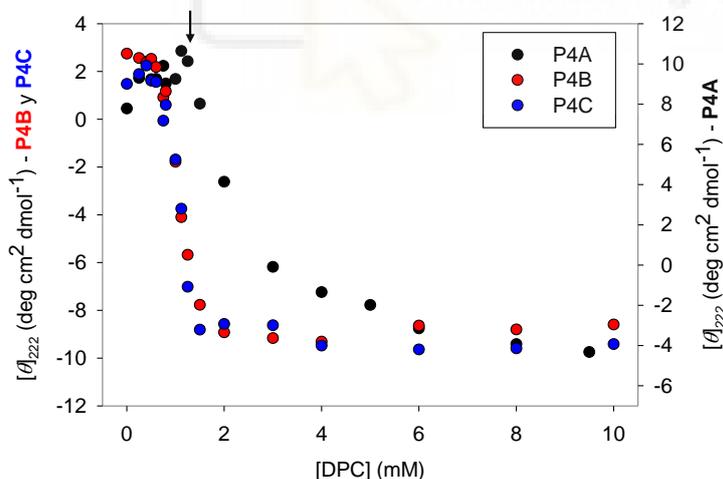
presumiblemente debido a su estructura más compacta <sup>122</sup>. Por este motivo nos propusimos constatar si los péptidos P4B y P4C presentan, igualmente, un comportamiento camaleónico inducido por micelas, pero que pudiera estar favorecido con respecto a los CBMs completos gracias precisamente a su flexibilidad estructural citada, y que por este motivo pudieran actuar como péptidos antimicrobianos, teniendo como blanco la membrana celular <sup>209,224,240</sup>.

Con este propósito registramos en primer lugar los espectros de CD de cada péptido en el UV lejano en presencia del detergente DPC a 10 mM. En todos los casos se muestra un cambio notable en el espectro de CD, con la reducción drástica del máximo de 227 nm, proveniente del entorno asimétrico de los triptófanos en la horquilla  $\beta$ , y la aparición de un mínimo a 209 nm, un hombro a 222 nm y un máximo a 195 nm (Figura 55), todos estos rasgos característicos de una estructura en hélice  $\alpha$  <sup>359</sup>.



**Figura 55.** Espectros de CD en el UV lejano de P4A, P4B y P4C en ausencia (líneas negras) y presencia (líneas rojas) de DPC 10 mM. Todos los espectros se adquirieron a 20 °C en tampón 20 mM fosfato sódico a pH 7,0. Los datos corresponden a un experimento representativo.

A partir de estos espectros se realizó una estimación del contenido en hélice  $\alpha$  del total de cada péptido en presencia de las micelas de DPC (Figura 55, Ecuación 4), utilizando el procedimiento indicado en el apartado “Materiales y Métodos 4.1. Dicroísmo circular”. Los porcentajes calculados para P4A, P4B y P4C fueron del 18, 24, y 28 % respectivamente. Sin embargo, es necesario señalar que, en el caso de P4A, el contenido en hélice  $\alpha$  encontrado por RMN (67 %) era muy superior al estimado en base a los datos de CD <sup>122</sup>. Esto se debe probablemente a una subestimación en el cálculo utilizando la técnica de CD debido a la cancelación parcial de la elipticidad negativa del espectro de hélice  $\alpha$  por los intensos valores positivos de la banda de 227 nm proveniente de la población remanente de horquilla  $\beta$  nativa (Figura 55). Una vez comprobado que las secuencias conectoras no influyen negativamente en el comportamiento camaleónico de las secuencias correspondientes a las horquillas, se realizó a continuación una titulación de los tres péptidos con concentraciones crecientes de DPC. Como se puede ver en la Figura 56, la transición de horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  es en todos los casos cooperativa, y se encuentra altamente favorecida en el caso de P4B y P4C (Tabla 13).

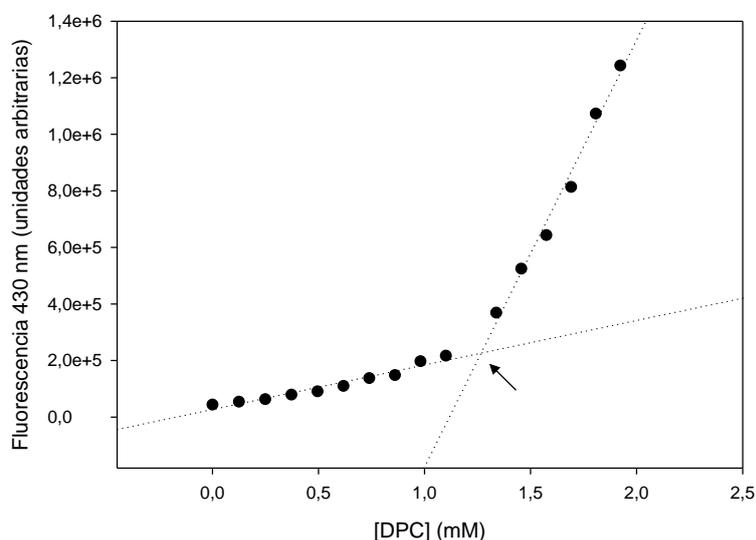


**Figura 56.** Evolución de la elipticidad molar de los péptidos P4A, P4B, P4C en presencia de concentraciones crecientes de DPC. La flecha negra indica el momento en que se alcanza la CMC de DPC (1,2 mM).

Péptido	Concentración de DPC (mM) <sup>a</sup>
P4A	4,13
P4B	1,42
P4C	1,43

**Tabla 13.** Concentración de DPC (mM) a la cual la transición  $\beta \rightarrow \alpha$  está completa en un 90 %.  
<sup>a</sup> Los datos se calculan a partir del ajuste a una ecuación sigmoideal estándar sin significado físico.

Con el propósito de comprobar si la transición estructural está inducida por la formación de micelas de DPC en el disolvente, como se había descrito para P4A a pH 3,0<sup>122</sup>, se determinó en primer lugar la CMC del detergente en tampón 20 mM fosfato sódico pH 7,0, obteniéndose un valor de 1,2 mM (Figura 57). Por tanto, tal y como se muestra en la Figura 56, el umbral de la transición estructural en el caso de P4A coincide con la CMC, confirmando que la conversión estructural está inducida por las micelas del detergente para este péptido también a pH neutro. En cambio, las transiciones de P4B y P4C, además de conducir a un mayor contenido en hélice  $\alpha$  (ver más arriba), son mucho más cooperativas y tienen lugar a concentraciones de DPC claramente por debajo de la CMC, lo que implica una interacción favorecida con el detergente con respecto a P4A. Este resultado podría explicarse por la acumulación preferente de detergente sobre los péptidos P4B y P4C y la formación concomitante de semi-micelas en su superficie<sup>360,361</sup>, al igual que se ha descrito para explicar la interacción del módulo completo C-LytA con SDS submicelar<sup>362</sup>. Al contrario que P4A, estos péptidos ya tendrían un tamaño suficiente para albergarlas. Para comprobar la formación de dichas semi-micelas se llevó a cabo el ensayo descrito con anterioridad<sup>360</sup>, según el cual la inserción de pireno en ambientes hidrofóbicos como las micelas o semi-micelas de detergente se detecta por el incremento del cociente de las bandas de fluorescencia I3/I1 del pireno. Sin embargo, en nuestro caso no se pudieron obtener resultados concluyentes, ya que en presencia de los péptidos se observó un drástico apagamiento de la fluorescencia del pireno, posiblemente como consecuencia de algún tipo de interacción inespecífica con el péptido (datos no mostrados).

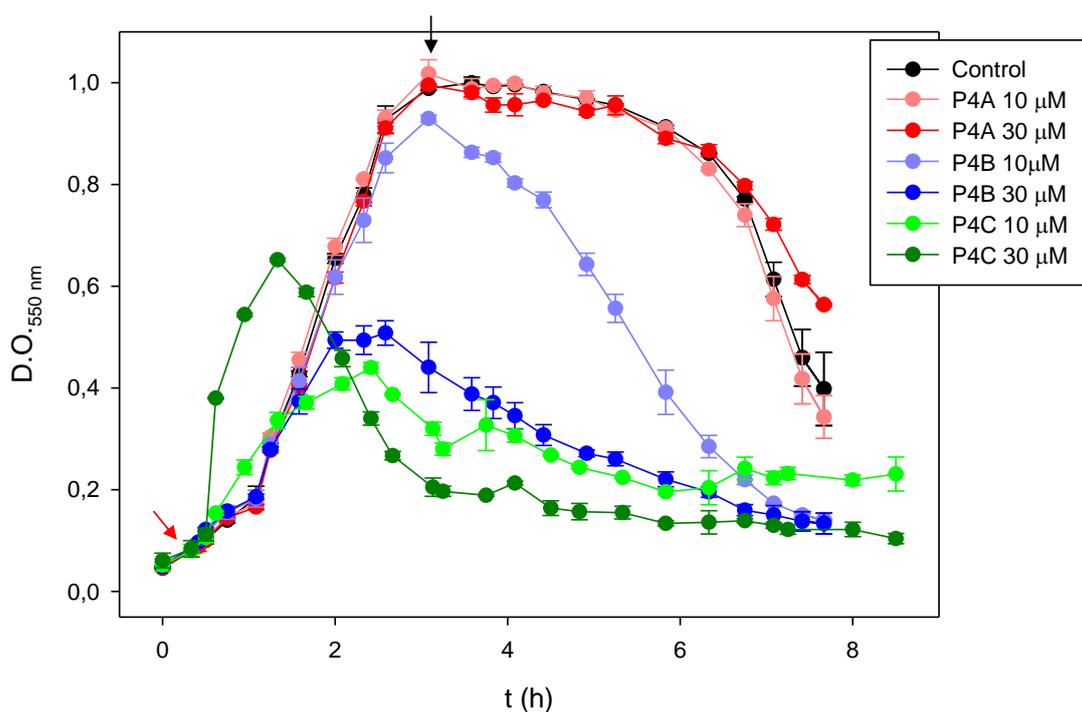


**Figura 57.** Determinación de la concentración crítica de micelas de DPC en tampón fosfato 20 mM, pH 7,0 usando DPH como sonda. La flecha indica el valor determinado de la CMC.

### **3.2. Efecto de los péptidos derivados de CBR4 de LytA en cultivos planctónicos de *S. pneumoniae***

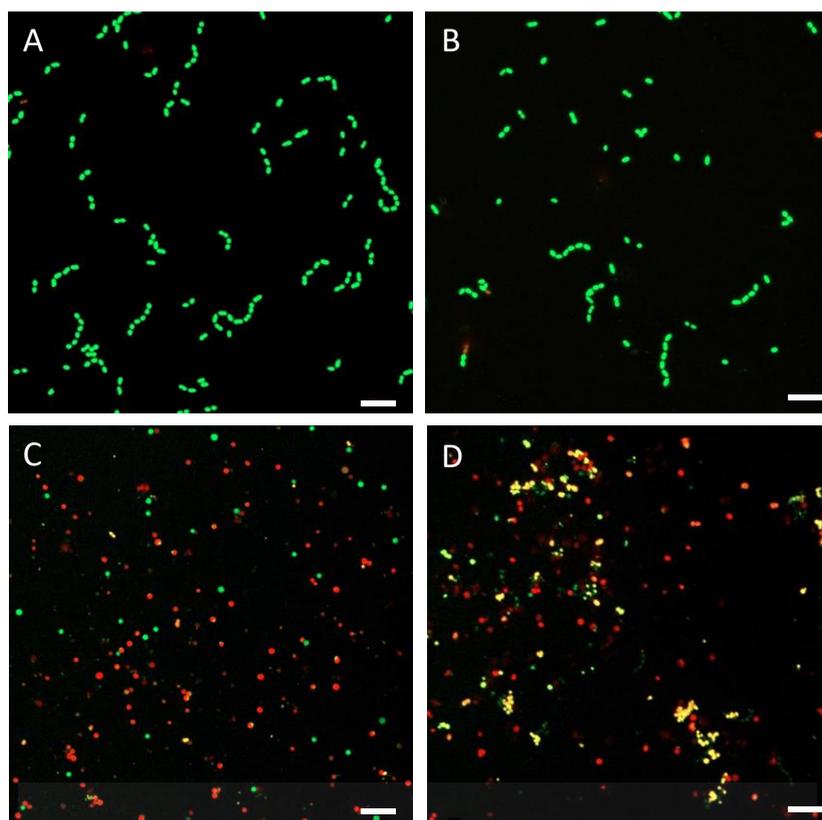
Los resultados mostrados en los apartados anteriores sugieren un comportamiento dual de los péptidos P4A, P4B y P4C tanto por su reconocimiento de colina (si bien con muy baja afinidad) en su conformación de horquillas  $\beta$  nativas, como por su comportamiento camaleónico al transformarse en hélices anfipáticas capaces de interactuar con estructuras micelares. En cualquiera de los dos casos, podría preverse un efecto de estos péptidos sobre el crecimiento y viabilidad de neumococo, ya fuera como emuladores de los CBMs (provocando encadenamiento celular), a pesar de su baja afinidad aparente por colina, o afectando a la membrana celular.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizó de nuevo la cepa no floculante R6CIB17. Un cultivo de esta cepa se creció sin agitación, y al llegar al inicio de la fase exponencial ( $D.O_{.550} = 0,1$ ), se añadieron los péptidos P4A, P4B o P4C a una concentración final de 10 o 30  $\mu\text{M}$ , tomándose medidas de  $D.O_{.550}$  sin voltear la muestra para comprobar la posible presencia de agregados celulares (Figura 58). En presencia de P4A, no se observó variación en el crecimiento del cultivo a ninguna de las concentraciones probadas con respecto al control sin péptido (Figura 58). En cambio, en presencia de P4B y P4C se observó la formación de flóculos a simple vista que finalmente sedimentaban dando lugar a la caída de la  $D.O.$ , siendo el efecto dependiente de la concentración. En el caso de P4C, este efecto sobre la densidad óptica resultó más evidente, y vino precedido de un aumento transitorio de la turbidez tras su adición a 30  $\mu\text{M}$  que presumiblemente se debe a la precipitación momentánea del péptido en medio C+Y.



**Figura 58.** Curva de crecimiento de la cepa *S. pneumoniae* R6CIB17 en medio C+Y en presencia de P4A (rojo), P4B (azul) y P4C (verde). Las concentraciones testadas de cada péptido son 10 µM (color claro) y 30 µM (color oscuro). La flecha roja indica el momento en el cual se adicionan los péptidos al cultivo, y la flecha negra indica el tiempo al cual se tomó la muestra para realizar la visualización por CLSM.

Con objeto de analizar el efecto de los péptidos sobre la morfología celular de *S. pneumoniae* R6CIB17, se recogió una muestra en cada caso al final de la fase exponencial; todas ellas fueron teñidas con el “kit” *BacLight LIVE/DEAD* y, tras ser mantenidas a 4 °C durante la noche, se visualizaron mediante CLSM (Figura 59). En presencia de P4A, los cultivos mostraron el mismo fenotipo que la muestra control, fundamentalmente diplos y cadenas cortas de células teñidas de verde (indicativo de una membrana celular intacta). Por el contrario, en las muestras procedentes de los cultivos incubados con P4B y P4C se observaron mayoritariamente restos celulares sin una estructura definida y teñidos de rojo, presumiblemente debido a daños producidos en la membrana.

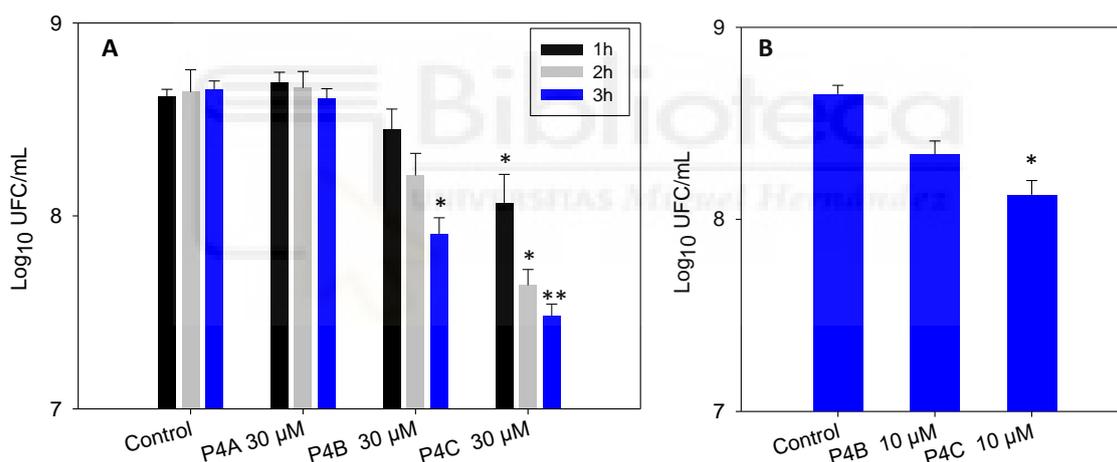


**Figura 59.** Imágenes tomadas con CLSM de la muestra de cada cultivo de *S. pneumoniae* R6CIB17 tratado con los péptidos P4A, P4B o P4C. En cada caso el péptido se añadió al cultivo a D.O.<sub>550</sub> de 0,1 a una concentración final de 30  $\mu$ M. **A.** R6CIB17 control, no tratado; **B.** Tratado con P4A a 30  $\mu$ M; **C.** Tratado con P4B a 30  $\mu$ M (sedimento); **D.** Tratado con P4C a 30  $\mu$ M (sedimento). Las muestras se tomaron en el minuto 200, y se tiñeron con el “kit” *BacLight* LIVE/DEAD para diferenciar bacterias con la membrana intacta (fluorescencia verde) de aquellas con la membrana dañada (fluorescencia roja). Barra 5  $\mu$ m.

### 3.2.1. Efecto bactericida de los péptidos derivados de CBR4 de *LytA* en cultivos de *S. pneumoniae*

Los resultados mostrados en la Figura 59 sugieren que los péptidos P4B y P4C presentan un mecanismo antibacteriano lítico y no basado en la agregación celular como se ha observado previamente para los CBMs completos “Resultados 2.2. Efecto de los CBMs exógenos en cultivos líquidos de *S. pneumoniae*”. Para comprobar esta hipótesis nos propusimos evaluar el efecto bactericida de dichos péptidos frente a *S. pneumoniae* R6CIB17 mediante ensayos de viabilidad en células en reposo (*resting cells*) a las cuales se les restringe de un medio nutritivo por lo que se mantienen en un estado metabólico fijo sin crecimiento.

Tras incubar el cultivo de *S. pneumoniae* R6CIB17 hasta una D.O.<sub>550</sub> de 0,3, este se centrifugó y se resuspendió en la mitad del volumen original empleando un tampón de baja fuerza iónica (5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0), con objeto de concentrar las bacterias y minimizar los problemas de solubilidad de los péptidos. A continuación, se añadió el correspondiente péptido P4A, P4B o P4C, y se mantuvo a 37 °C durante 1, 2 y 3 h, para realizar a continuación el recuento de células viables. La Figura 60.A muestra que, mientras que el péptido P4A a 30 µM no produjo un efecto detectable transcurridas las 3 h de incubación, los péptidos con mayor número de repeticiones sí que presentaron una apreciable actividad antimicrobiana, que se incrementaba con el tiempo de incubación. El péptido P4B a 30 µM muestra una bajada significativa de la viabilidad tras 3 h de incubación (Figura 60.A). Por su parte, P4C resultó ser el péptido más efectivo, presentando actividad tanto a 10 como a 30 µM (Figura 60.A y B), llegando en este último caso a valores de descenso superiores al 90 %.



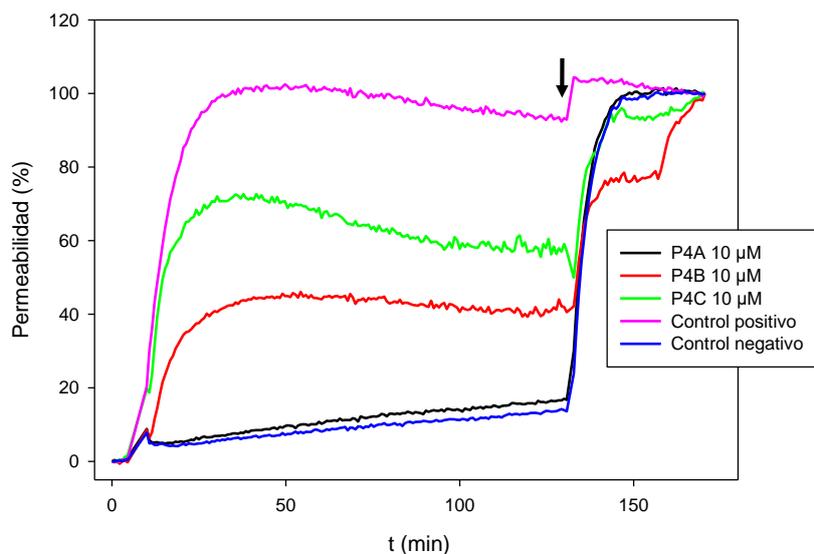
**Figura 60.** Actividad bactericida de los péptidos P4A, P4B y P4C frente a *S. pneumoniae* R6CIB17. En cada caso el cultivo en fase exponencial se concentró 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó durante 1, 2 o 3 h a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de P4A, P4B o P4C. **A.** Viabilidad celular de las muestras tras su incubación en presencia de 30 µM de compuesto durante 1, 2 y 3 h. **B.** Viabilidad celular de cultivos tratados 3 h con 10 µM de P4B o P4C. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos muestran los datos estadísticamente significativos (\*, P <0,05; \*\*, P <0,001).

Una vez confirmado el potencial antimicrobiano de los péptidos P4B y P4C nos propusimos comprobar su capacidad frente a dos cepas capsuladas de neumococo: *S. pneumoniae* D39 (serotipo 2), cepa parental de R6, y *S. pneumoniae* 3498 (serotipo 8), resistente a eritromicina y tetraciclina<sup>363</sup>. La CMI resultó de 80 µM para los dos péptidos y en ambas cepas, lo que sugiere que la presencia de la cápsula no impide la acción

bactericida de estas moléculas. Por lo tanto, estos resultados confirman que la presencia de un número de secuencias repetidas basadas en CBRs dentro de una misma cadena peptídica produce un efecto antimicrobiano que se incrementa con el número de repeticiones, siendo 2 el número mínimo de las mismas necesarias para detectar dicho efecto.

### 3.2.2. Ensayos de permeabilidad en cultivos de *S. pneumoniae*

El descenso en viabilidad producido por los péptidos P4B y P4C (Figura 60), junto con los daños observados en la membrana celular (Figura 59) y los resultados de interacción con micelas de detergentes medidos por CD (Figura 55 y 56) apuntan a un efecto desestabilizante sobre la membrana celular como posible mecanismo de su acción bactericida. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos *in vitro* destinados a analizar los cambios en la permeabilidad de la membrana “Materiales y Métodos 6.1.4. Ensayo de permeabilización de la membrana plasmática”. En primer lugar, nos propusimos analizar la entrada del colorante Sytox Green en respuesta a la adición de los péptidos. El experimento se realizó en presencia de un tampón de baja fuerza iónica (5 mM de fosfato sódico, pH 7,0) para evitar problemas de insolubilidad de los péptidos al que se le añadió 280 mM de sorbitol para mantener el equilibrio osmótico con las células. Tras la adición de los péptidos a una concentración final de 10  $\mu$ M no se detectó una mayor infiltración de la sonda en presencia de P4A, mientras que los péptidos P4B y P4C produjeron una permeabilización hasta del 40 % y 70 % respectivamente con respecto a la obtenida por la adición de Tritón X-100 (control positivo de permeabilización) (Figura 61). Este ensayo indica que los péptidos P4B y P4C son capaces de permeabilizar la membrana, y que dicho efecto se ve incrementado conforme aumentamos la cantidad de secuencias repetidas, siendo de nuevo 2 el número mínimo de repeticiones necesarias para observar un efecto. Este fenómeno podría ser la causa desencadenante de la salida prematura de enzimas líticas, dando lugar a la lisis celular prematura al igual que se había observado previamente con los EBAs “Resultados 1.1. Desestabilización de la membrana plasmática por efecto de la adición de EBAs”.



**Figura 61.** Permeabilidad de la membrana frente a la sonda Sytox Green de un cultivo de *S. pneumoniae* R6 tras la adición de péptido a 10 µM. La permeabilidad se expresa en porcentaje relativo a la misma muestra tratada con TX-100 al finalizar el ensayo. Ensayo realizado en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM, sorbitol, pH 7,0. En azul se muestra el control negativo (no tratado), en púrpura el control positivo (tratado con 0,1 % TX-100), y en negro, rojo y verde el cultivo tratado con P4A, P4B y P4C a 10 µM respectivamente. La flecha indica el momento en el cual se añaden 10 µL de TX-100 al 1 % para obtener el valor máximo de permeabilidad para cada muestra.

### 3.3. Determinantes moleculares de la función antimicrobiana de P4C

De los resultados llevados a cabo se puede concluir que P4C, el péptido con mayor capacidad antimicrobiana, presenta una afinidad por colina significativamente aumentada en comparación con los péptidos P4A y P4B, aunque aún residual (Figura 53, Tabla 12). Además mantiene el comportamiento camaleónico dilucidado anteriormente en P4A<sup>122</sup>, pudiéndose transformar de horquilla β a hélice α pero inducido a concentraciones menores del detergente DPC en comparación con el péptido P4A (Figura 56, Tabla 13), y presumiblemente responsable de su interacción con membranas lipídicas<sup>122</sup>. Con objeto de determinar la influencia relativa tanto del reconocimiento por colina como de la transición β→α sobre su mecanismo de acción, nos centramos en el péptido P4C, diseñándose variantes con el objetivo de discernir la importancia relativa de ambas propiedades biofísicas (reconocimiento de colina y perturbación de la membrana) en su actividad bactericida (Tabla 14). En el diseño de las variantes peptídicas se tuvo en cuenta tanto los tres residuos aromáticos constituyentes de la capa interna del sitio de unión a colina, como los residuos hidrofóbicos localizados en una de

las caras de la hélice  $\alpha$  anfipática que son esenciales para llevar a cabo la interacción péptido-membrana <sup>122</sup> (Figura 62 y Tabla 14).

Nombre	Secuencia	$\langle H \rangle^a$	$\langle \mu H \rangle^b$	% hélice predicha <sup>c</sup>	Efecto esperado con respecto a P4C
P4C	TGWKKIADKWYYFNEEGAMK TGWKKIADKWYYFNEEGAMK TGWKKIADKWYYFN	0,446	0,515	67	--
P4C_NOCH	TGIKKIADKIIYFNEEGAMK TGIKKIADKIIYFNEEGAMK TGIKKIADKIIYFN	0,441	0,439	66	Reconocimiento de colina: ↓ Desestabilización de membrana: ≈
P4C_NOME	TGWKKSADKWYYSNEEGAMK TGWKKSADKWYYSNEEGAMK TGWKKSADKWYYSN	0,184	0,369	38	Reconocimiento de colina: ≈ Desestabilización de membrana: ↓

**Tabla 14.** Secuencia de aminoácidos del péptido P4C y sus derivados. En azul se representa la secuencia correspondiente a la horquilla  $\beta$  de CBR4 (LytA<sub>239-252</sub>), residuos mutados en rojo y en negro la región correspondiente al bucle (LytA<sub>253-258</sub>).

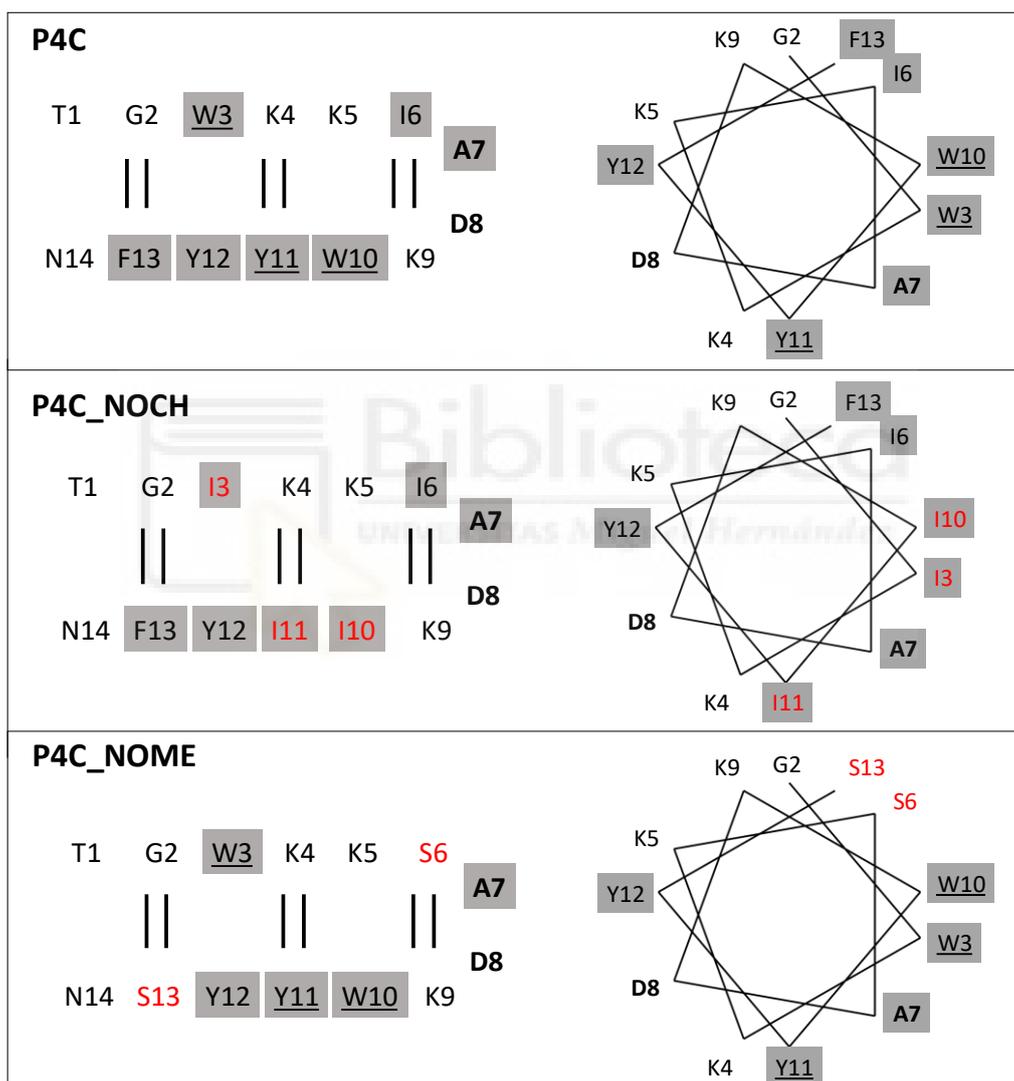
<sup>a</sup> Cálculo de la hidrofobicidad media de cada secuencia correspondiente a la horquilla  $\beta$  de la CBR mediante el servidor *Heliquest* (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

<sup>b</sup> Cálculo del momento hidrofóbico medio de la hélice  $\alpha$  teórica inducida por la membrana celular y formada por cada secuencia correspondiente a la horquilla de la CBR. Medida mediante el servidor *Heliquest* (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

<sup>c</sup> Porcentaje de hélice  $\alpha$  formada en presencia de micelas de DPC y predicho en función de la ecuación empírica: % Hélice =  $22,5 + 226 \times \langle H \rangle \times \langle \mu H \rangle$  <sup>158</sup>.

Por un lado, se diseñó el péptido P4C\_NOCH, cuyos residuos aromáticos implicados en la unión a colina (W3, W10 y Y11) se sustituyeron en cada caso por el aminoácido apolar isoleucina (I) (Figura 62), por lo que teóricamente este péptido no reconocería el ligando al no poder establecer las pertinentes interacciones catión- $\pi$  <sup>66</sup>. En cambio, conservaría gran parte de la anfipaticidad (estimada por su momento hidrofóbico) e hidrofobicidad de la hélice  $\alpha$  formada tras la interacción con micelas de detergentes y, probablemente, con membranas biológicas. El máximo contenido en hélice  $\alpha$  del péptido P4C\_NOCH, estimado según Zamora-Carreras *et al.* (2018) <sup>158</sup> (Tabla 14) es de un 66 %, muy próximo al del péptido nativo (67 %). Por lo tanto, podría predecirse que el péptido P4C\_NOCH debería conservar en su mayor parte la capacidad de desestabilizar la membrana celular. En lo que respecta al segundo péptido, P4C\_NOME, se persiguió obtener una hélice  $\alpha$  con un menor grado de hidrofobicidad y anfipaticidad, y por lo tanto con menor grado de interacción con micelas o membranas,

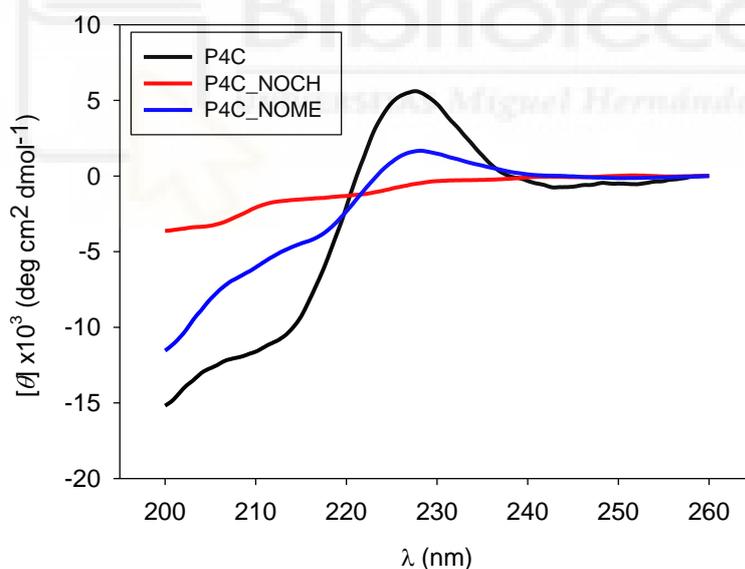
aunque manteniendo la conformación horquilla  $\beta$  con capacidad de unión al ligando en solución acuosa. De esta manera se introdujo un aminoácido polar (serina, S) en la cara hidrofóbica de la hélice, concretamente sustituyendo a los aminoácidos I6 y F13, pero sin modificar el resto de aminoácidos hidrofóbicos ya que son importantes tanto para el reconocimiento de colina (W3, W10 y Y11) (Figura 62), como para mantener la conformación del giro central de la horquilla  $\beta$  (A7). Como consecuencia, el porcentaje predicho de hélice  $\alpha$  para este péptido resultó menor (38 %) (Tabla 14).



**Figura 62.** Esquema de horquilla  $\beta$  y representación de ruedas helicoidales  $\alpha$  para las secuencias contenidas en los péptidos P4C, P4C\_NOCH y P4C\_NOME. Solo se representa una repetición peptídica. Los enlaces de hidrógeno están indicados mediante líneas verticales; los residuos implicados en el reconocimiento de la colina están subrayados; los residuos de giro se muestran en negrita; los residuos hidrofóbicos están sombreados en gris y los residuos mutados están coloreados en rojo. La numeración del 1 al 14 se usa para simplificar los datos, siendo la correspondencia con la numeración de aminoácidos en LytA<sub>239-252</sub>. Se consideró que T1 y N14 no forman parte de la rueda helicoidal porque no pertenecen a la hélice en el péptido P4A.

### 3.3.1. Caracterización estructural de las variantes peptídicas de P4C

En primer lugar, analizamos los espectros de CD en el UV lejano en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 (Figura 63). El espectro encontrado para el péptido P4C\_NOME presenta un pico positivo a 227 nm, aunque de menor intensidad que el encontrado para P4C, lo cual indica que los cambios introducidos en la secuencia afectan al entorno de los anillos aromáticos, y sugiere que la conformación en horquilla  $\beta$  original se mantiene, pero con un porcentaje de población menor. Por su parte, el espectro del péptido P4C\_NOCH presenta una importante pérdida de la estructura en horquilla  $\beta$  original, mostrando un espectro típico de conformación al azar, sin valores positivos de elipticidad y con un mínimo en torno a 200 nm. Esto podría ser debido a que, aunque la isoleucina sea un aminoácido con alta propensión a formar lamina  $\beta$ , las sustituciones romperían las interacciones estabilizantes  $\pi$ - $\pi$  (W4/Y12) y catión- $\pi$  (K5/W10) entre hebras que han demostrado ser esenciales para la estabilidad de la horquilla <sup>158</sup>.

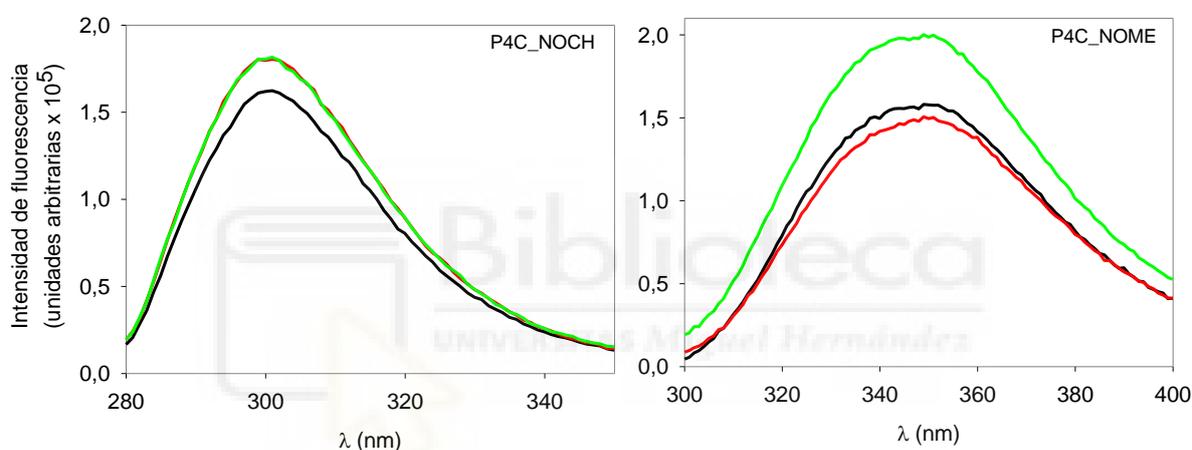


**Figura 63.** Espectros de CD en el UV lejano de P4C, P4C\_NOCH y P4C\_NOME registrados a 20 °C en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0.

#### 3.3.1.1. Reconocimiento de colina por parte de las variantes de P4C

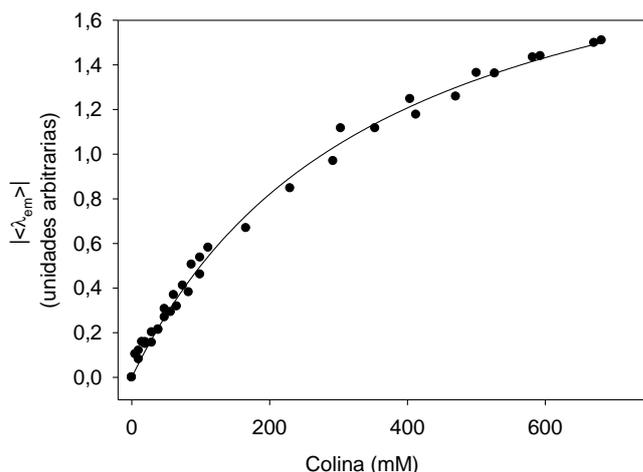
Para valorar si los péptidos mutantes P4C\_NOME y P4C\_NOCH eran capaces de reconocer colina libre se empleó la técnica de espectroscopia de fluorescencia, ya que mediante CD no se observó variación del espectro en presencia del ligando en ninguno

de los dos casos (datos no mostrados). En el caso del péptido P4C\_NOCH, y dado que no presenta triptófanos en su secuencia, sino tan solo tirosinas, se empleó 265 nm como longitud de onda de excitación<sup>358</sup>. La adición de una alta concentración de colina (500 mM) provocó un cierto aumento en la intensidad del espectro que, no obstante, debe ser achacado a un efecto inespecífico de la fuerza iónica, ya que se registró exactamente el mismo espectro en presencia de 500 mM NaCl (Figura 64), lo cual sugiere la incapacidad de reconocer el ligando por parte del péptido. Por el contrario, al excitar el péptido P4C-NOME a 280 nm (tirosinas y triptófanos) en presencia de colina se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia que es específico, ya que en 500 mM NaCl solo se ve ligeramente disminuida (Figura 64).



**Figura 64.** Espectro de fluorescencia de los péptidos P4C\_NOCH y P4C\_NOME registrado a 20 °C en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 (negro), en presencia de 500 mM colina (verde) o en presencia de 500 mM NaCl (rojo). P4C\_NOCH, excitando a 265 nm (izquierda) y P4C\_NOME, excitando a 280 nm (derecha).

A continuación, calculamos la afinidad de P4C\_NOME por colina libre mediante titulación por espectroscopía de fluorescencia (Figura 65). La  $K_d$  se calculó ajustando la curva a la ecuación de una hipérbola (Figura 65, Ecuación 6), asumiendo un único tipo de sitios de unión, obteniéndose un valor de  $360 \pm 20$  mM. Estos datos indican que el péptido P4C\_NOME muestra una afinidad por el ligando disminuida en casi dos veces respecto al péptido P4C parental ( $197 \pm 9$  mM, Tabla 12). En cualquier caso, se trata de afinidades muy bajas, aunque medibles.

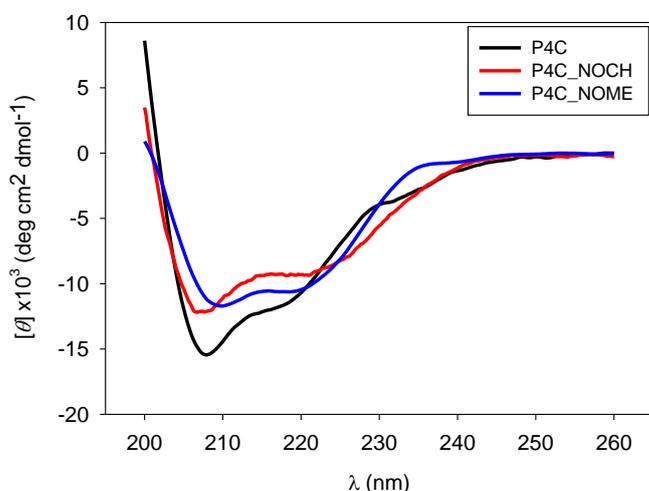


**Figura 65.** Titulación con colina del péptido P4C\_NOME. Representación del valor absoluto de la variación de la longitud de onda promedio de emisión ( $|\langle \lambda_{em} \rangle|$ ) debida a la unión de colina. La gráfica se ajustó a una hipérbola, asumiendo un modelo de unión simple (Ecuación 6).

### 3.3.1.2. Efecto del detergente DPC sobre la estructura de los péptidos P4C\_NOME y P4C\_NOCH

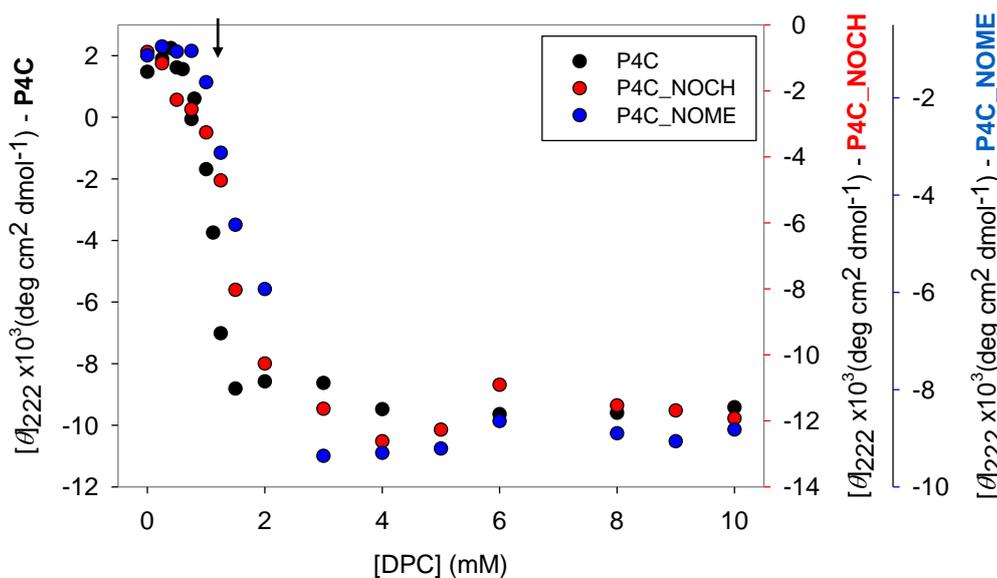
Los espectros de CD en el UV lejano de los péptidos P4C\_NOME y P4C\_NOCH se registraron en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de DPC, y presentaron dos bandas negativas, a 208 y 222 nm, típicas de una estructura hélice  $\alpha$  (Figura 66). Esto sugiere que ambas variantes peptídicas sufren un cambio conformacional, como previamente se encontró para el péptido P4C nativo. Es de destacar que, aunque la variante P4C\_NOCH se encuentra desestructurada en solución acuosa, mantiene el cambio conformacional a hélice  $\alpha$  en presencia de DPC. Por otro lado, decidimos no llevar a cabo una estimación de la composición de estructura secundaria de estos péptidos en base a la señal de CD ya que, como se ha mencionado anteriormente en el apartado de "Resultados 3.1.3. Evaluación de los péptidos derivados de LytA como interruptores moleculares", con esta técnica se subestima el contenido en hélice con respecto a lo observado por RMN<sup>158</sup>. La comparación de los tres espectros muestra que la elipticidad a 222 nm, típica de hélice  $\alpha$ , es similar en los tres casos (Figura 66). No obstante, también puede observarse que los espectros de P4C y P4C\_NOCH presentan el pico a 208 nm, característico de la estructura hélice  $\alpha$ , mucho más pronunciado en comparación con el espectro de P4C\_NOME, el cual muestra a su vez una elipticidad mayor en la región alrededor de los 235 nm, tal vez procedente de contribuciones positivas de aromáticos en conformación remanente de horquilla  $\beta$ . Estas pequeñas diferencias podrían explicarse debido a la posible menor tendencia de P4C\_NOME a

formar hélice  $\alpha$ , como se predice en función de sus parámetros de hidrofobicidad y momento hidrofóbico (Tabla 14).



**Figura 66.** Espectros de CD en el UV lejano de P4C, P4C\_NOCH y P4C\_NOME registrados a 20 °C en tampón fosfato 20 mM a pH 7,0 en presencia de DPC 10 mM.

A continuación, se realizó una titulación de los péptidos derivados de P4C empleando concentraciones crecientes de DPC y midiendo la señal de CD (Figura 67). La transición a hélice  $\alpha$  es en ambos casos cooperativa y ocurre a concentraciones inferiores a la CMC (1,2 mM). Sin embargo, y en comparación con P4C, los péptidos P4C\_NOCH y P4C\_NOME precisan una mayor concentración de DPC para completar la transición (Tabla 15), lo que sugiere que la interacción con las micelas está más impedida, sobre todo en este último caso.



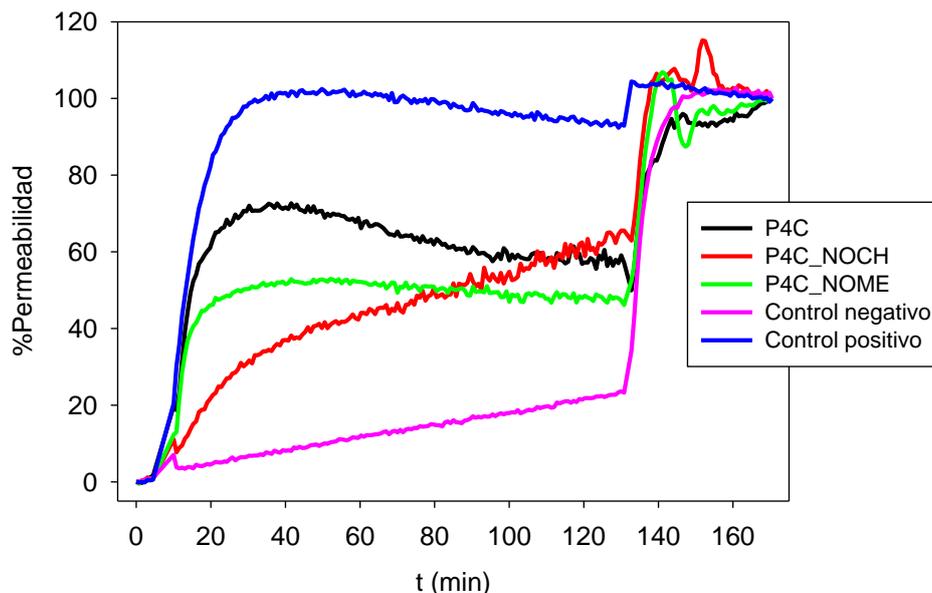
**Figura 67.** Evolución de la elipticidad molar a 222 nm de los péptidos P4C (negro), P4C\_NOCH (rojo) y P4C\_NOME (azul) en presencia de concentraciones crecientes de DPC. La flecha negra indica la CMC de DPC (1,2 mM).

<b>Péptido</b>	<b>Concentración de DPC (mM) <sup>a</sup></b>
P4C	1,43
P4C_NOCH	2,13
P4C_NOME	2,57

**Tabla 15.** Concentración de DPC (mM) a la cual la transición  $\beta \rightarrow \alpha$  está completa en un 90 % en los péptidos P4C, P4C\_NOCH y P4C\_NOME. <sup>a</sup> Los datos se calculan a partir del ajuste a una ecuación sigmoideal estándar sin significado físico.

### **3.3.2. Ensayos de permeabilidad de las variantes de P4C en cultivos de *S. pneumoniae***

La capacidad de permeabilización de la membrana celular de los péptidos P4C\_NOCH y P4C\_NOME se evaluó, al igual que el péptido parental P4C, en tampón 5 mM fosfato sódico, pH 7,0 más sorbitol 280 mM. El cultivo se incubó junto con los péptidos P4C, P4C\_NOME y P4C\_NOCH a una concentración final de 10  $\mu$ M en presencia de la sonda Sytox Green. Los resultados se representaron en forma de porcentaje respecto al 100 % de permeabilidad, obtenido al incubar las células con 0,1 % de Tritón X-100 (Figura 68). Como se puede observar, el péptido P4C\_NOME presenta una capacidad de permeabilización disminuida con respecto al péptido parental P4C (50 % frente al 70 %, respectivamente), en consonancia con su menor propensión a formar hélice  $\alpha$  (Tabla 14), siendo capaz de interactuar y permeabilizar la membrana, aunque en menor medida. En cuanto a P4C\_NOCH, cuya propensión a formar hélice es similar a la de P4C (Tabla 14), induce asimismo significativos valores de permeabilidad, aunque la cinética es mucho más lenta (Figura 68). Esto podría explicarse por el hecho de que P4C\_NOCH ha perdido completamente la capacidad de interactuar con la colina (Figura 64), y por lo tanto de reconocer y anclarse específicamente la pared, por lo que su inserción en membrana ha de producirse por simple difusión; en cambio, P4C\_NOME, con una cinética similar a P4C, mantiene una afinidad residual por el ligando que podría ser necesaria para una adsorción efectiva sobre la pared previa a la interacción con la membrana.



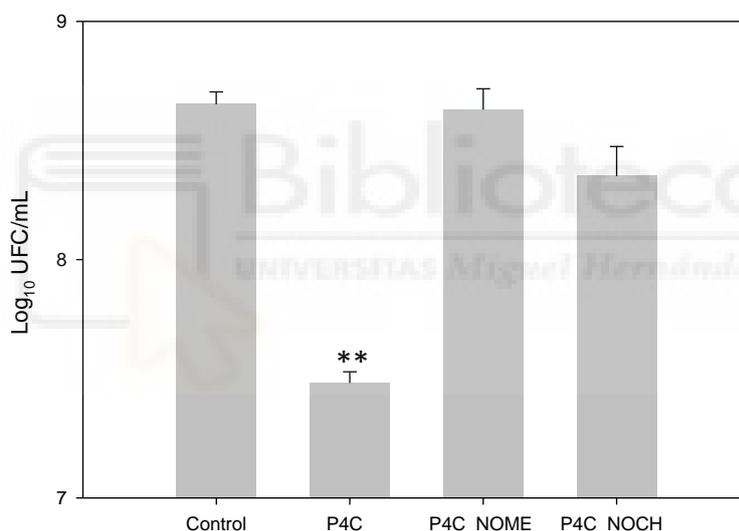
**Figura 68.** Permeabilidad de la membrana frente a la sonda Sytox Green de un cultivo de *S. pneumoniae* R6. La permeabilidad se expresa en porcentaje relativo a la misma muestra tratada con 0,1 % TX-100 al finalizar el ensayo. Ensayo realizado en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM, sorbitol, pH 7,0. En púrpura se muestra el control negativo (no tratado); en azul el control positivo (tratado con 0,1 % TX-100); y en negro, rojo y verde el cultivo tratado con 10  $\mu$ M del péptido P4C, P4C\_NOCH y P4C\_NOME respectivamente.

### 3.3.3. Efecto de las variantes peptídicas de P4C en cultivos de *S. pneumoniae*

Los experimentos biofísicos realizados con los péptidos mutantes indican que P4C\_NOCH no es capaz de reconocer la colina, mientras que P4C\_NOME sí lo hace, aunque con menor afinidad en comparación con el péptido P4C nativo. Por su parte, se ha demostrado que ambos péptidos derivados son capaces de interaccionar con micelas de DPC, así como que inducen la permeabilidad de la membrana de *S. pneumoniae*. Sin embargo, P4C\_NOME, debido a que presenta alterada la anfipaticidad de la hélice  $\alpha$ , posee una capacidad de inserción y permeabilidad disminuida.

Teniendo en cuenta esta información, procedimos a evaluar la capacidad bactericida sobre neumococo de los péptidos mutantes. Tras incubar el cultivo de *S. pneumoniae* R6CIB17 hasta una D.O.<sub>550</sub> final de 0,3 y ajustar el cultivo a una D.O.<sub>550</sub> de 0,6 con tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, se realizaron los ensayos bactericidas en presencia de los péptidos P4C, P4C\_NOME y P4C\_NOCH a 30  $\mu$ M durante 3 h a 37 °C. Como se puede observar en la Figura 69, en estas condiciones el péptido

parental P4C induce una disminución de aproximadamente una unidad logarítmica (90 %) en viabilidad celular, mientras que P4C\_NOCH provoca una pequeña reducción, aunque no estadísticamente significativa, y P4C\_NOME no produce ningún efecto medible. Por lo tanto, se puede concluir que los cambios introducidos en la secuencia del péptido P4C, aunque no impiden el cambio de conformación a hélice  $\alpha$  *in vitro*, tienen como consecuencia una disminución en la permeabilización de la membrana que se ve traducida en un descenso del efecto antimicrobiano frente a cultivos de *S. pneumoniae*, observándose una completa ausencia de actividad bactericida en el caso de P4C\_NOME. Estos resultados muestran la importancia de los residuos implicados en el mantenimiento del carácter anfipático de la hélice  $\alpha$  y, en menor medida, en el reconocimiento de colina para la actividad bactericida del péptido P4C.

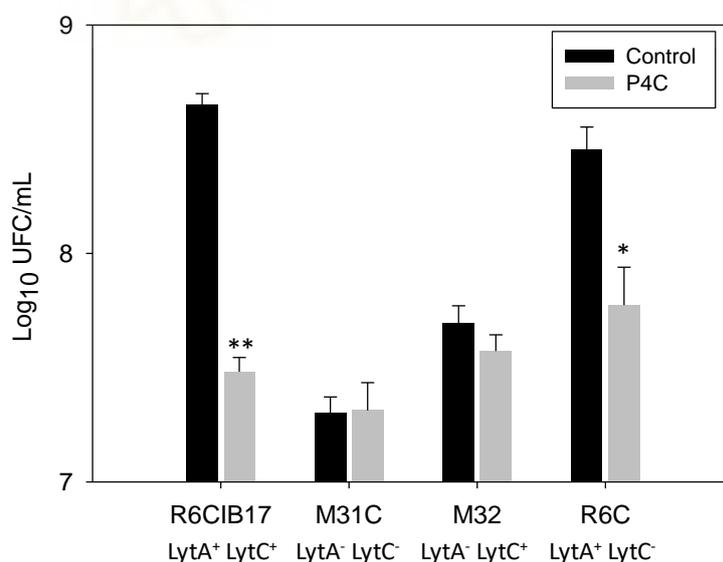


**Figura 69.** Actividad bactericida de los péptidos derivados de P4C frente a *S. pneumoniae* R6CIB17. El cultivo en fase exponencial de crecimiento se concentró 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó 3 h a 37 °C en presencia de 30  $\mu$ M de P4C, P4C\_NOME o P4C\_NOCH. Las barras de error representan la desviación estándar, y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos en comparación con el control en ausencia de compuesto. (\*\*,  $P < 0,0001$ ). Media de 5 ensayos.

### 3.4. Mecanismo biológico de la actividad antimicrobiana de P4C

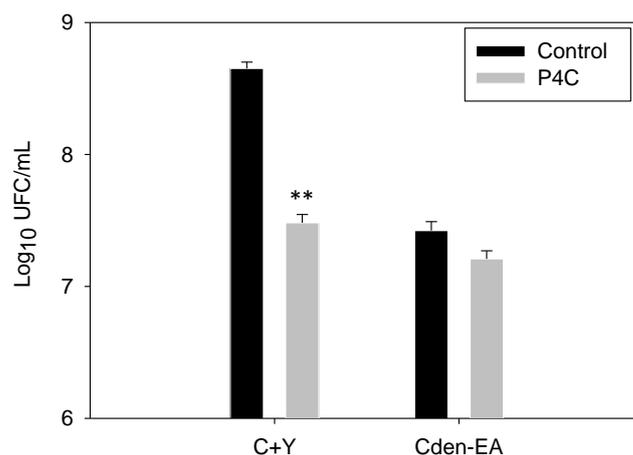
Los resultados mostrados en el apartado anterior indican que la variante P4C\_NOME, aun induciendo la permeabilidad de la membrana neumocócica solo de manera ligeramente inferior al péptido P4C (Figura 68), no es capaz de ejercer ningún efecto antibacteriano a 30  $\mu$ M, al contrario que el péptido parental (Figura 69). Por lo

tanto, se deduce que la permeabilidad celular no es suficiente por sí sola para inducir la lisis bacteriana, haciéndose necesario el concurso de otros agentes. Entre éstos, los candidatos más prometedores los constituyen las propias enzimas líticas del huésped, tal y como hemos mostrado más arriba en el capítulo dedicado a los EBAs "Resultados 1.1. Desestabilización de la membrana plasmática por efecto de la adición de EBAs". Para confirmar esta hipótesis llevamos a cabo ensayos de viabilidad con cepas mutantes deficientes en las enzimas líticas LytA y LytC (M31, M32 y R6C, Tabla 1). Tras el crecimiento en medio líquido C + Y hasta una D.O.<sub>550</sub> final de 0,25-0,3, las células se recogieron y se concentraron 2X en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, incubándose entonces 3 h a 37 °C en presencia de 30 µM del péptido P4C, y procediendo al recuento de células viables. Los resultados mostrados en la Figura 70 indican que el péptido P4C únicamente es efectivo frente a las cepas R6CIB17 y R6C, es decir aquellas en las que la enzima lítica LytA se encuentra presente, resultando un descenso significativo de la viabilidad. Estos resultados sugieren que la muerte celular ocasionada por el péptido P4C es dependiente de la enzima lítica LytA, posiblemente al generar daños en la membrana que facilitarían la liberación prematura y masiva de la autólisis.



**Figura 70.** Actividad bactericida de P4C frente a las cepas de *S. pneumoniae*: R6CIB17, R6C, M31C y M32. Los cultivos en fase exponencial de crecimiento se concentraron 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó 3 h a 37 °C en presencia de P4C 30 µM. Las barras de error representan las desviaciones estándar, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control en ausencia de compuesto. (\*, P <0,05; \*\*, P <0,001).

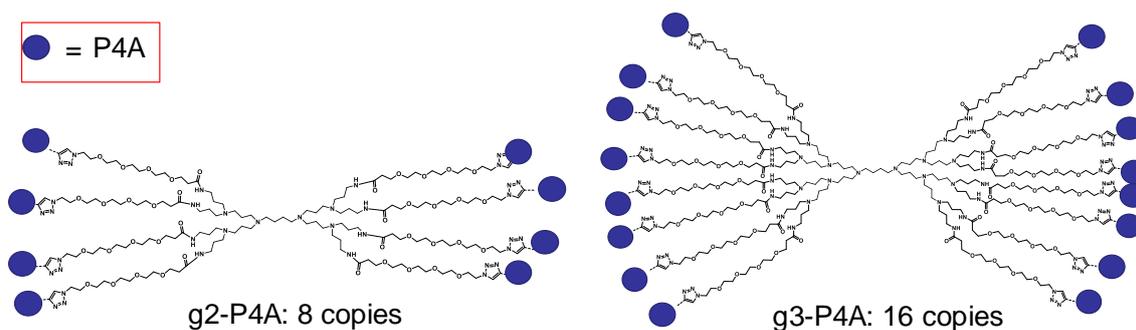
Por otro lado, también estudiamos el efecto de P4C sobre cultivos de neumococo crecido en el medio Cden-EA, en el cual se sustituye la colina por la EA. La EA es un análogo de colina capaz de incorporarse a los ácidos teicoicos, aunque no puede reemplazar las funciones fisiológicas de la colina, tales como el reconocimiento de las CBPs. En presencia de EA neumococo forma largas cadenas, al impedirse la separación de las células hijas tras la división celular <sup>79</sup>. La Figura 71 muestra que, al contrario que con el crecimiento en presencia de colina, no existen diferencias en la viabilidad en presencia o ausencia del péptido P4C a 30  $\mu$ M al emplear como medio de crecimiento Cden-EA. Este hecho podría achacarse a la nula adsorción del péptido P4C a la pared bacteriana al carecer de colina ésta última, aspecto que parece importante según se desprende de los resultados con el péptido P4C\_NOCH mostrados más arriba “Resultados 3.3.3. Efecto de las variantes peptídicas de P4C en cultivos de *S. pneumoniae*”. El hecho de que la variante P4C\_NOCH, que tampoco puede interactuar específicamente con la pared, posea no obstante una cierta actividad antimicrobiana sobre células crecidas con colina (Figura 69), y que las cepas deficientes de la enzima lítica LytA no sean efectivas frente a P4C (Figura 70), sugiere que la falta de efecto bactericida se debe más bien a que la autolisina LytA liberada no puede ejercer su acción autolítica, confirmando por lo tanto el papel de esta enzima en la actividad antimicrobiana de P4C.



**Figura 71.** Actividad bactericida del compuesto P4C frente a *S. pneumoniae* R6CIB17. Los cultivos en fase exponencial de crecimiento crecidos en medio C+Y o Cden-EA se concentraron 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó 3 h a 37 °C en presencia de P4C 30  $\mu$ M. Las barras de error representan las desviaciones estándar, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control en ausencia de compuesto. (\*\*, P<0,001).

### **3.5. Dendrímeros funcionalizados con el péptido P4A**

De los resultados expuestos hasta ahora podemos deducir que el incremento de repeticiones peptídicas lineales basadas en la secuencia de la CBR4 de LytA tiene como consecuencia un aumento de la actividad bactericida mediado por un mecanismo de desestabilización de la membrana gracias a la transformación de la horquilla  $\beta$  nativa a hélice  $\alpha$  anfipática, seguido, en el caso particular de *S. pneumoniae*, de la liberación incontrolada de la autolisina LytA. La comparación del efecto de P4A (una repetición) con el de P4B (dos repeticiones) y P4C (tres repeticiones) sugiere que el efecto se potencia con el número de repeticiones. Por otro lado, como se ha descrito más arriba, las variantes P4D y P4E, con 4 y 5 repeticiones, parecen adquirir una conformación similar a la nativa de un CBM, aunque presentan dificultades técnicas para ser estudiadas. Así pues, como alternativa, decidimos recurrir a técnicas nanotecnológicas basadas en el diseño de dendrímeros con un núcleo de PPI conteniendo varias copias del péptido P4A en la misma partícula, y que pudieran incrementar su eficacia por efectos de multivalencia<sup>276,279-282</sup>. El motivo de escoger P4A en lugar de P4B o P4C es de doble índole: por un lado, el aumento de las dificultades técnicas para la síntesis de estas nanopartículas conteniendo péptidos de un tamaño mayor; y por otro lado, puesto que P4A no presenta por sí solo ningún efecto apreciable sobre cultivos (Figura 60), los efectos producidos por la multivalencia del dendrímero sobre la actividad antibacteriana serían mucho más evidentes. Además, estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que la presentación multivalente de moléculas activas en dendrímeros de PPI conduce a un incremento exponencial en la afinidad por su blanco, dando lugar a una reducción de la dosis requerida de varios órdenes de magnitud. Un claro ejemplo son los dendrímeros de colina y atropina<sup>302,304</sup>. Basándonos en estos ejemplos, sintetizamos dos tipos de dendrímeros: de segunda generación, funcionalizado con 8 copias de P4A (g2-P4A) y de tercera generación, conteniendo 16 copias de P4A (g3-P4A) (Figura 72).



**Figura 72.** Representación de la estructura de los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A.

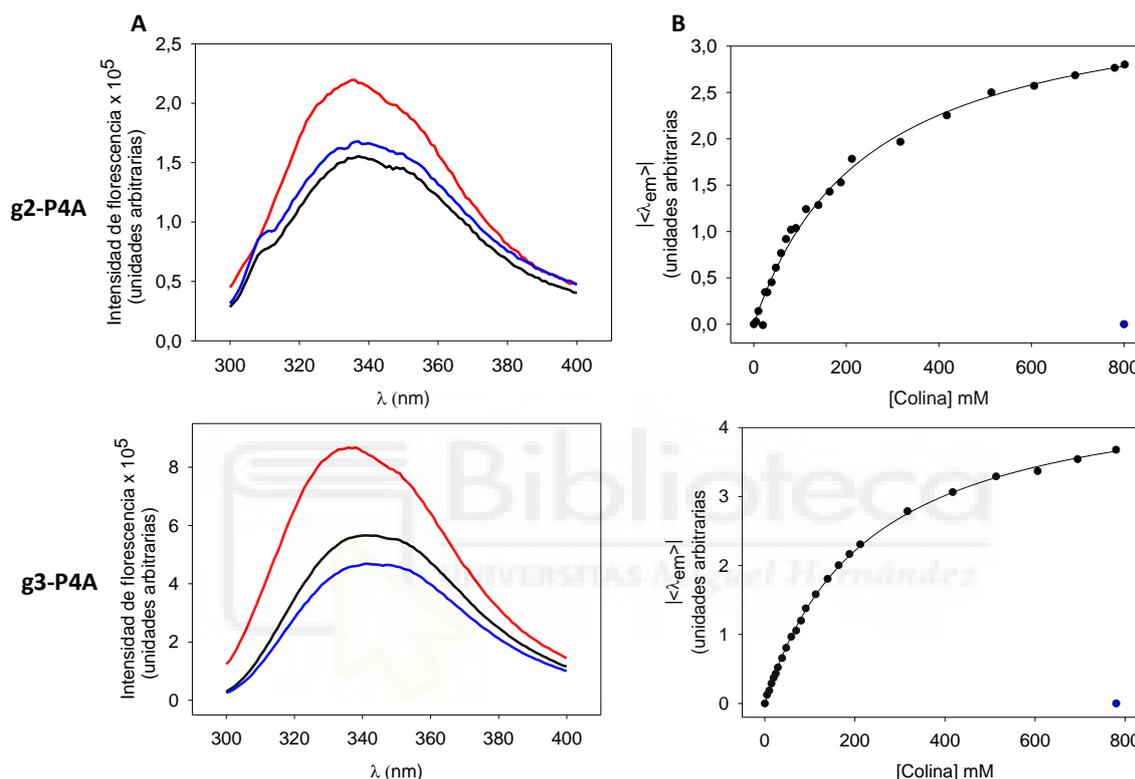
### 3.5.1. Caracterización estructural de los dendrímeros

#### 3.5.1.1. Afinidad por colina libre

En primer lugar, nos propusimos comprobar si la disposición múltiple de copias simples de horquillas  $\beta$  nativas pudiera generar un análogo de los CBMs naturales, de manera que se generaran sitios canónicos de unión a colina mediante la participación de dos péptidos P4A contiguos en el dendrímero. Para ello se determinó la afinidad de los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A por colina libre por cambios en la fluorescencia intrínseca del compuesto, registrando los espectros a concentraciones crecientes de ligando (Figura 73). Debido a la falta de aminoácidos aromáticos, la interacción con colina de los dendrímeros control g2 y g3 sin bioconjugarse no pudo detectarse por fluorescencia (dato no mostrado). Como se observa en la Figura 73, a medida que se añade colina, se observa para ambos dendrímeros (g2-P4A y g3-P4A) un incremento de la señal de fluorescencia, acompañado de un desplazamiento del máximo al azul, similar al encontrado en los CBMs (Figura 32), y en los péptidos P4A y sus derivados (Figura 53). Para comprobar si el efecto se debe a interacciones electrostáticas inespecíficas se realizó un experimento control en presencia de NaCl. La adición de sal provoca un moderado aumento (g2-P4A) o disminución (g3-P4A) en la intensidad de fluorescencia, pero sin afectar a la forma ni provocar un desplazamiento del espectro (Figura 73), lo que sugiere que el promedio de la intensidad de fluorescencia (relacionado con tal desplazamiento) constituye un parámetro válido para la medida de la especificidad de la interacción.

Al representar el promedio de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de colina se obtiene una gráfica que se ajusta bien a un modelo de un

único tipo de sitios (Ecuación 6, Figura 73). Con estos ajustes, la  $K_D$  determinada para g2-P4A y g3-P4A fue  $175 \pm 9$  mM y  $237 \pm 5$  mM respectivamente, por lo que podemos afirmar que los dendrímeros presentan una afinidad similar a los péptidos P4A, P4B y P4C, siendo muy baja, aunque detectable, en todos los casos, y descartándose por lo tanto cualquier interacción entre las copias de P4A para generar sitios de mayor afinidad como los que se encuentran en los CBMs (Tabla 9).

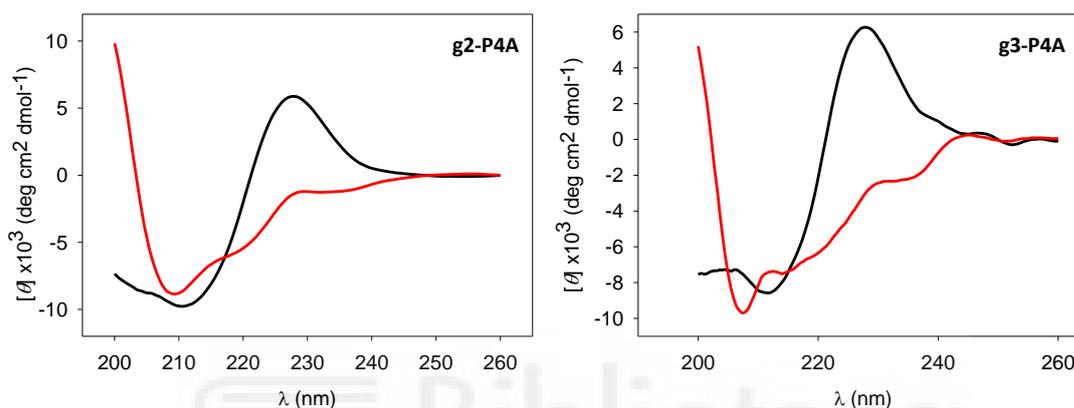


**Figura 73. A.** Espectros de fluorescencia de g2-P4A y g3-P4A en ausencia (negro) y en presencia de 780 mM de colina (rojo), y en presencia de 780 mM NaCl (azul) en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0, excitando a 280 nm. **B.** Representación del valor absoluto de la variación de la longitud de onda promedio de emisión ( $|\langle \lambda_{em} \rangle|$ ) en función a colina añadida a los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A. Las gráficas se ajustaron a una hipérbola, asumiendo un modelo de unión simple (Ecuación 6). El punto azul que se muestra corresponde a  $|\langle \lambda_{em} \rangle|$  en presencia de 780 mM de NaCl. Los datos corresponden a un experimento representativo.

### 3.5.1.2. Evaluación de los dendrímeros como "interruptores moleculares"

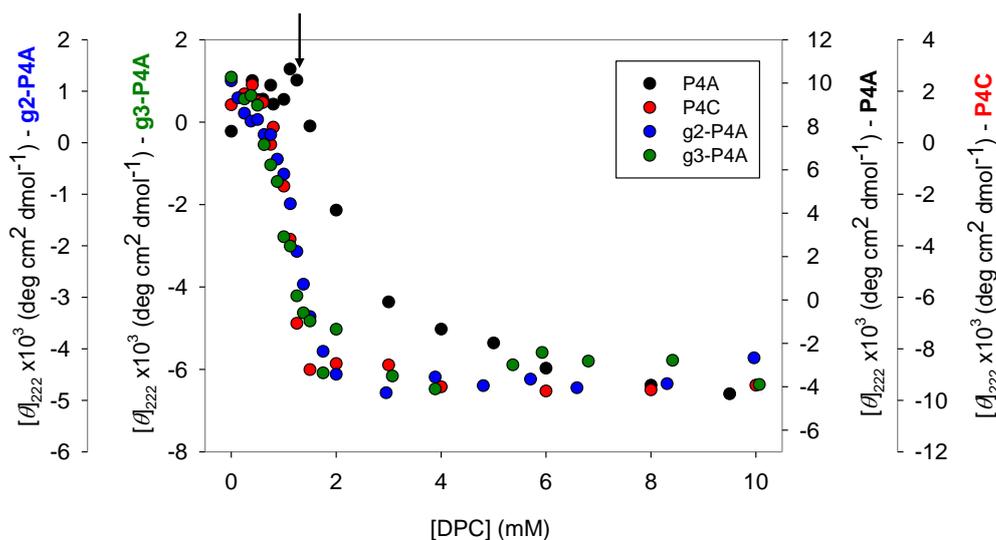
A continuación, se determinó el comportamiento de ambos dendrímeros derivatizados en presencia de DPC mediante CD. El espectro de ambos en el UV lejano en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 es característico de los CBRs de LytA, con un pico positivo a 227 nm propio de los aminoácidos aromáticos en un entorno rígido

(Figura 74), lo que indica que el péptido P4A en los dendrímeros está correctamente plegado. Por su parte, en presencia de 10 mM de DPC se obtiene un espectro característico de una estructura en hélice  $\alpha$ , indicando que en presencia de micelas la transición  $\beta \rightarrow \alpha$  tiene lugar en las subunidades peptídicas que conforman los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A, y que la disposición multivalente del péptido no parece ocasionar impedimento alguno para conservar el comportamiento camaleónico en presencia de DPC (Figura 74).



**Figura 74.** Espectros de CD en el UV lejano de g2-P4A (izquierda) y g3-P4A (derecha) a 20 °C. Para cada péptido, se muestran los espectros en tampón 20 mM fosfato sódico, pH 7,0 en ausencia (línea negra) y la presencia de 10 mM DPC (línea roja).

La titulación de ambos dendrímeros con concentraciones crecientes de DPC se muestra en la Figura 75. La transición de horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  es en todos los casos cooperativa, si bien puede observarse que el cambio conformacional  $\beta \rightarrow \alpha$  ocurre a concentraciones inferiores a la CMC de DPC, similares a las del péptido P4C, y a diferencia de lo observado con P4A, no requiere de la presencia de micelas para iniciar la transición (Tabla 16). Este resultado nos indica que el incremento de repeticiones peptídicas tanto en forma lineal como dendrímica está relacionado con un aumento de la capacidad de asociación con semi-micelas superficiales.



**Figura 75.** Evolución de la elipticidad molar a 222 nm de los compuestos P4A (negro), P4C (rojo), g2-P4A (azul) y g3-P4A (verde) en presencia de concentraciones crecientes de DPC. La flecha negra indica el momento en que se alcanza la CMC del DPC (1,2 mM). Los datos corresponden a la media de al menos 3 ensayos.

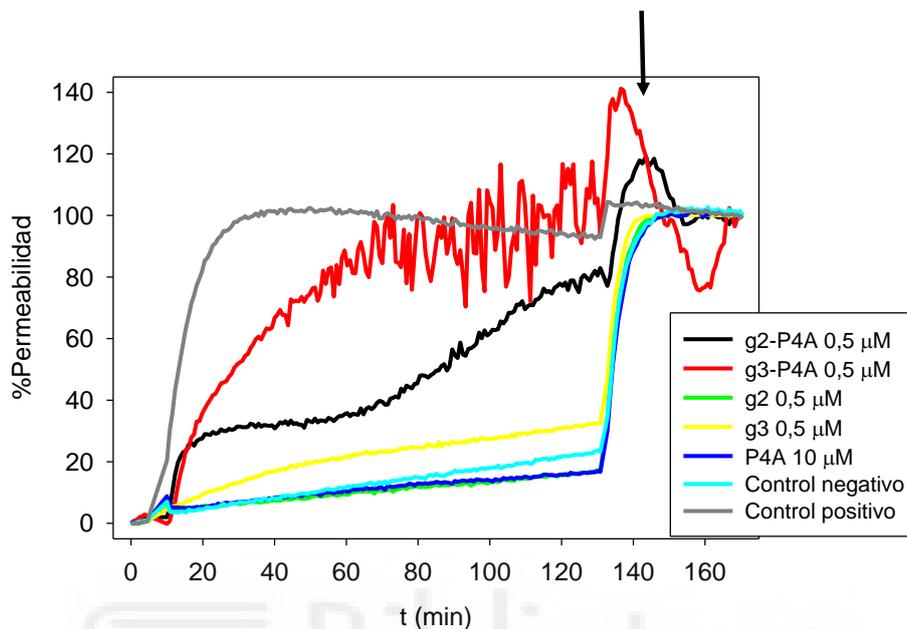
Compuesto	Concentración de DPC (mM) <sup>a</sup>
P4A	4,13
P4C	1,43
g2-P4A	1,84
g3-P4A	1,79

**Tabla 16.** Cálculo de la concentración de DPC (mM) en la que la transición horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  está completa en un 90% para P4A, P4C, g2-P4A y g3-P4A. <sup>a</sup> Los datos se calculan a partir del ajuste a una ecuación sigmoideal estándar sin significado físico.

### 3.5.1.3. Ensayo de permeabilidad de células de *S. pneumoniae*

La Figura 76 muestra el ensayo de permeabilidad de g2-P4A y g3-P4A y de los correspondientes dendrímeros control (g2 y g3) a una concentración final de 0,5  $\mu$ M en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0. Como control se ensayó además el péptido P4A a 10  $\mu$ M. Se eligió esta concentración para establecer una mejor comparativa, ya que la concentración de equivalentes de P4A en el dendrímero g3-P4A es de  $16 \times 0,5 \mu\text{M} = 8 \mu\text{M}$  en copias de péptido. Como se observa en la Figura 76, ninguno de los controles provocó daños en la membrana apreciables a nivel de infiltración de la sonda Sytox Green, mientras que los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A a 0,5  $\mu$ M inducen una permeabilización significativa. En el caso de g2-P4A se obtiene una permeabilidad de 70% comparado con el control positivo con Tritón X-100, mientras que en presencia

de g3-P4A se observa una cinética más rápida, obteniéndose a largos tiempos una señal muy ruidosa pero reproducible, cuyo origen no hemos podido determinar. En cualquier caso, el ensayo demuestra que los dendrímeros son capaces de inducir permeabilización a concentraciones inferiores a las de P4B y P4C (Figura 61).

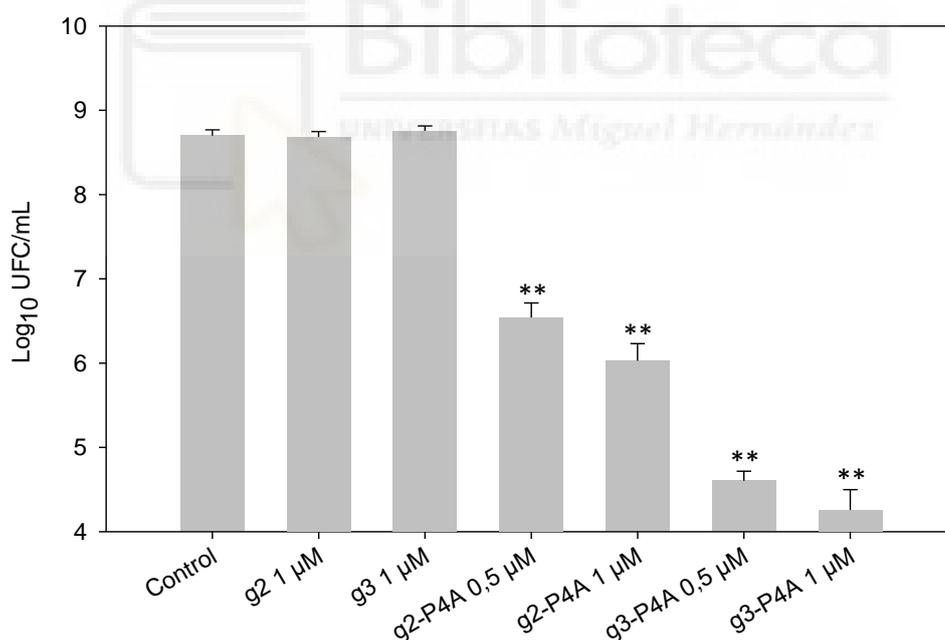


**Figura 76.** Permeabilidad de la membrana frente a la sonda Sytox Green de un cultivo de *S. pneumoniae* R6 tras la adición de g2-P4A, g3-P4A, comparado con el péptido P4A y los dendrímeros control g2 y g3. La permeabilidad se expresa en porcentaje relativo a la misma muestra tratada con 0,1 % TX-100 al finalizar el ensayo. Ensayo realizado en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0. Se muestra en color cian el control negativo (no tratado), en gris el control positivo (tratado con 0,1 % TX-100), en negro y rojo el cultivo tratado con g2-P4A y g3-P4A a 0,5 µM respectivamente, en verde y amarillo los controles g2 y g3 a 0,5 µM, y en azul el cultivo tratado con P3A a 10 µM. La flecha indica el momento en el cual se añade 10 µL de TX-100 al 1 % para obtener el valor máximo para cada muestra.

#### 3.5.1.4. Ensayo bactericida de g2-P4A y g3-P4A frente a cultivos de *S. pneumoniae*

Tras determinar que la disposición multivalente de P4A en forma dendrímica tiene como resultado la aparición de un efecto de permeabilidad de membrana plasmática similar al producido por la disposición lineal de la misma secuencia (péptidos P4B y P4C), se procedió a determinar el efecto que presentan g2-P4A y g3-P4A sobre la viabilidad celular de *S. pneumoniae*. Los dendrímeros, a una concentración final de 0,5 y 1 µM, se incubaron con un cultivo de *S. pneumoniae* R6CIB17 en tampón 5 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol pH 7,0 durante 3 h a 37 °C. Los resultados obtenidos indican que mientras el control de P4A 30 µM no afecta a la viabilidad del cultivo de neumococo

(como se había visto antes, Figura 60), los dendrímeros a una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  (4  $\mu\text{M}$  en equivalentes de P4A en el caso de g2-P4A y 8  $\mu\text{M}$  en g3-P4A) disminuyen la población bacteriana en 2 y 4 unidades logarítmicas respectivamente, lo cual representa en este último caso un efecto bactericida del 99,99 % (Figura 77). Los controles de dendrímero sin bioconjugar no ejercieron ningún efecto, demostrando que el observado para los compuestos g2-P4A y g3-P4A es debido exclusivamente al péptido. Es necesario recordar que al emplear una concentración de 30  $\mu\text{M}$  del péptido P4C (90  $\mu\text{M}$  en equivalentes de P4A) solo se obtuvo un descenso de una unidad logarítmica en viabilidad (Figura 60), lo que permite concluir que la disposición multivalente de varias copias peptídicas en dendrímeros conduce a un incremento exponencial en el efecto antimicrobiano de P4A. Por su parte, el aumento de la concentración hasta 1  $\mu\text{M}$  provocó una reducción adicional, aunque más discreta, de la viabilidad (Figura 77), señalando los límites del efecto multivalente de estas nanopartículas en este sistema.

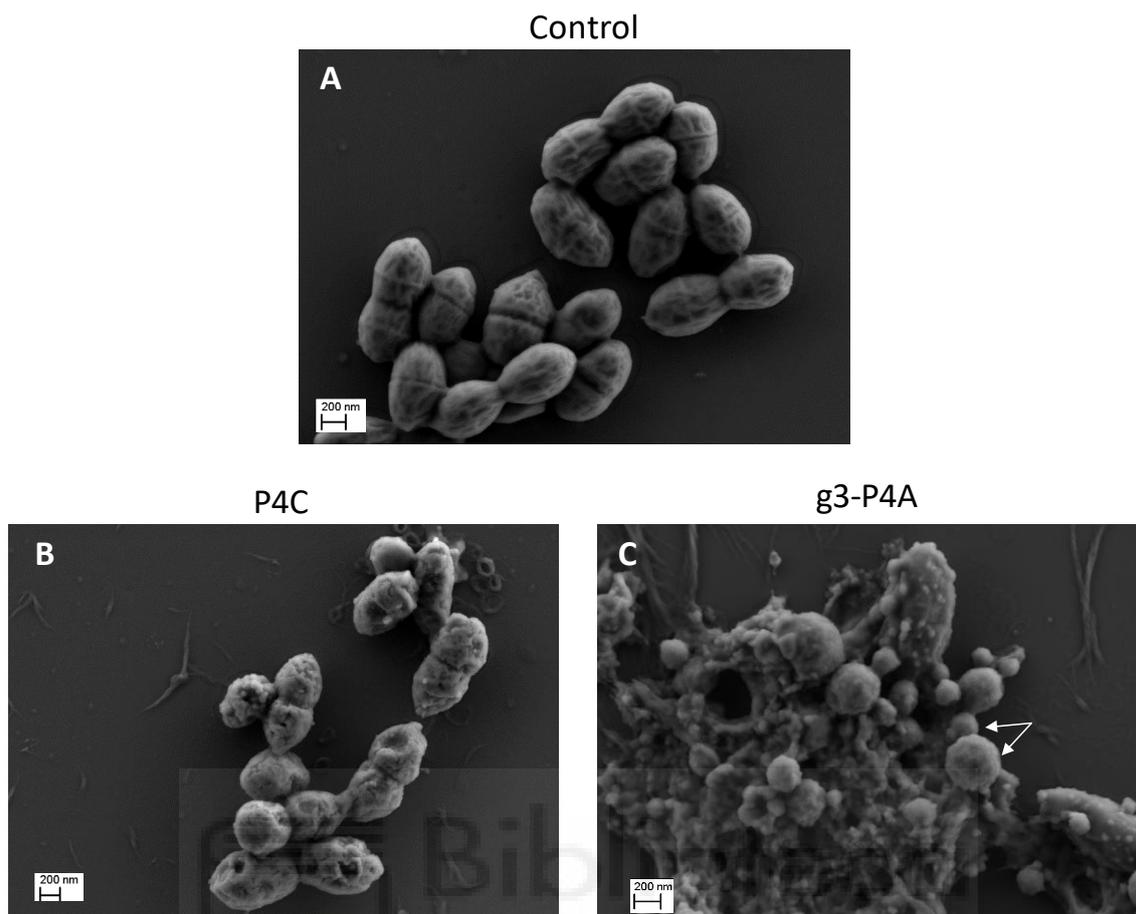


**Figura 77.** Actividad bactericida de los dendrímeros peptídicos frente a *S. pneumoniae* R6CIB17. El cultivo en fase exponencial se concentró 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó durante 3 h a 37 °C en presencia de g2-P4A y g3-P4A y sus respectivos controles (g2 y g3) a las concentraciones indicadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control en ausencia de compuesto. (\*\*,  $P < 0,0001$ ).

### **3.6. Microscopía electrónica de cultivos de *S. pneumoniae* en presencia del péptido P4C y del dendrímero g3-P4A**

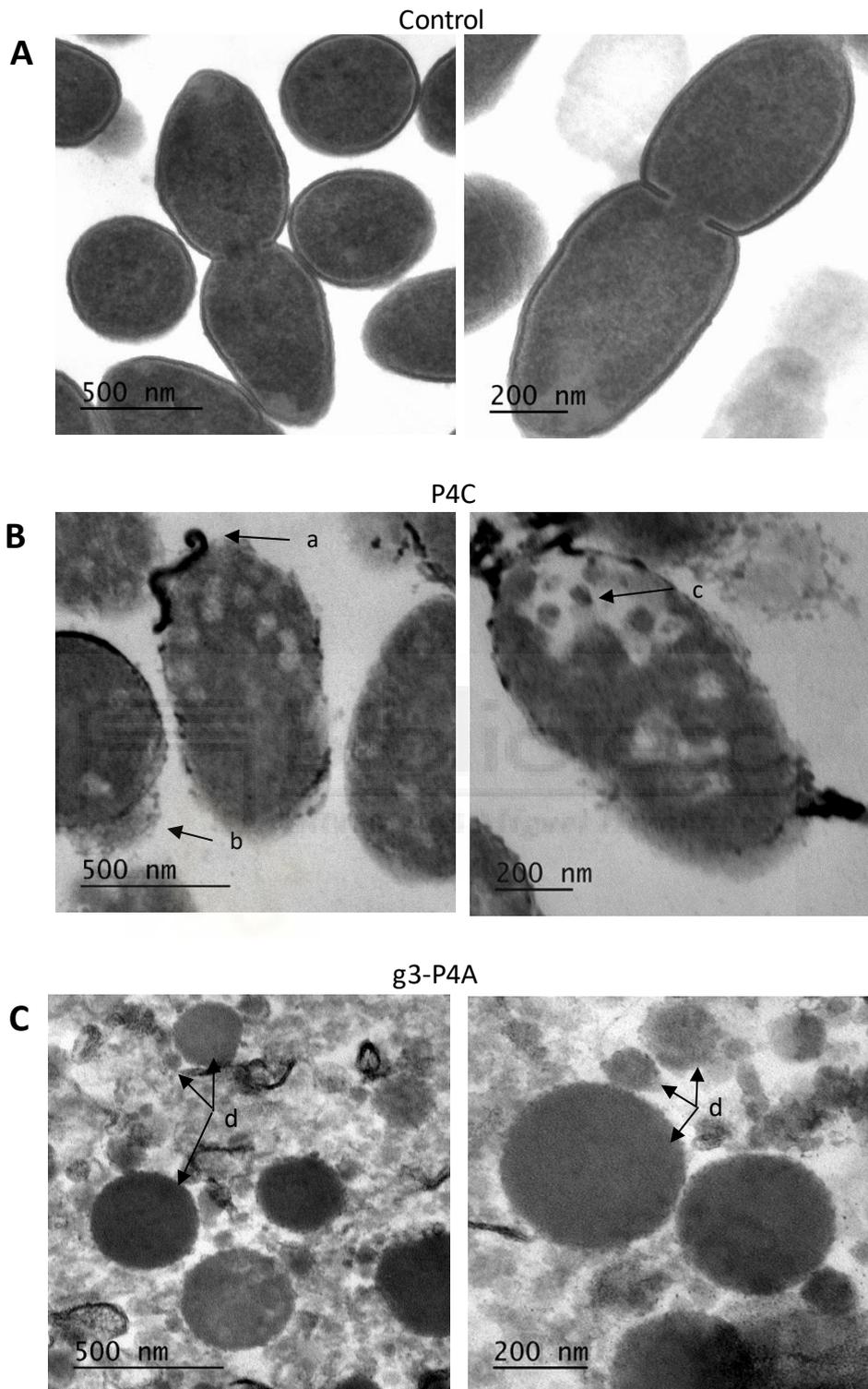
Los resultados mostrados hasta el momento sugieren que el efecto antimicrobiano de los dendrímeros funcionalizados no parece estar relacionado con su afinidad por colina, que sigue siendo marginal (Figura 73), sino más bien debido a una capacidad aumentada de desestabilización de la membrana celular (Figura 76). Con objeto de profundizar en este punto, nos propusimos analizar los posibles cambios en la morfología celular inducidos por estas nanopartículas y compararlos con los daños producidos por el péptido P4C. A tal fin llevamos a cabo estudios de FESEM y TEM sobre muestras de neumococo tratados con P4C o g3-P4A. Se seleccionaron estos compuestos ya que son los más efectivos, y representan diferentes estrategias de diseño, bien por la repetición de varias copias de una misma CBR en disposición lineal, o bien por la presentación de una sola repetición en disposición multivalente. Las muestras se tomaron de cultivos planctónicos de *S. pneumoniae* R6CIB17 incubados desde el inicio de la fase exponencial en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de P4C o 1  $\mu\text{M}$  de g3-P4A. Las células se recolectaron transcurridas 3 h de incubación.

La microscopia FESEM se empleó en primer lugar para comprender el impacto de los compuestos en la morfología externa de *S. pneumoniae* R6CIB17. Como se presenta en la Figura 78, los compuestos fueron capaces de inducir alteraciones morfológicas significativas en las células. El cultivo de *S. pneumoniae* no tratado mostró la forma de diplococo característica de esta bacteria, presentando una superficie lisa (Figura 78.A), mientras que la incubación en presencia del péptido P4C produjo una superficie áspera y lesionada (Figura 78.B). Por último, el tratamiento con el dendrímero g3-P4A indujo daños celulares mucho más drásticos, observándose restos celulares irregulares y vesículas esféricas (Figura 78.C).



**Figura 78.** Imágenes FESEM. **A.** control sin tratar. **B.** células tratadas con 30  $\mu\text{M}$  de P4C. **C.** células tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de g3-P4A. Las flechas blancas señalan las vesículas esféricas generadas por g3-P4A. Barra de escala, 200 nm.

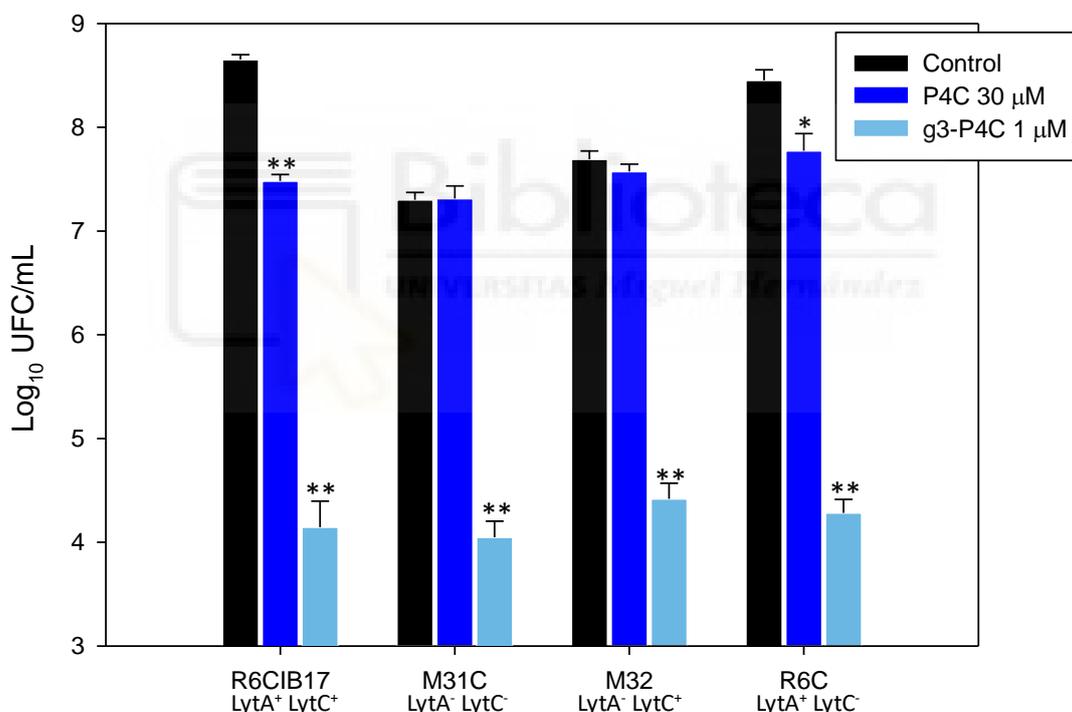
Para estudiar con mayor profundidad los daños producidos se empleó la microscopía TEM. La muestra no tratada presentaba la pared celular y la membrana citoplasmática intactas, así como un citoplasma homogéneo (Figura 79.A). Por su parte, el cultivo en presencia del péptido P4C muestra la desaparición de la pared y la membrana desestabilizada, aunque conservando la forma celular, junto con salida de parte del contenido citoplasmático al entorno exterior y la presencia de subestructuras circulares en el citoplasma (Figura 79.B). En cuanto a la muestra tratada con el dendrímero, se observan abundantes restos celulares y vesículas esféricas de distintos tamaños, citadas más arriba, y sin rastro alguno de células intactas (Figura 79.C). Este resultado indica que los compuestos son capaces de alterar y dañar la integridad de la pared y la membrana celular, obteniéndose, en el caso del dendrímero, un efecto mucho más drástico, lo que concuerda con los resultados de viabilidad (Figura 77).



**Figura 79.** Imágenes obtenidas por TEM de cultivos de *S. pneumoniae* R6CIB17. **A.** Control sin tratar. **B.** Células tratadas con P4C 30  $\mu$ M. **C.** Células tratadas con g3-P4A 1  $\mu$ M. Los daños celulares se indican a continuación: (flecha a) rotura de la pared/membrana celular, (flecha b) fuga de contenido intracelular, (flecha c) degradación del citoplasma y subestructuras citoplasmáticas, (flecha d) formación de vesículas de diferente tamaño. Las barras indican 500 y 200 nm.

### 3.7. Mecanismo biológico de la actividad de g3-P4A

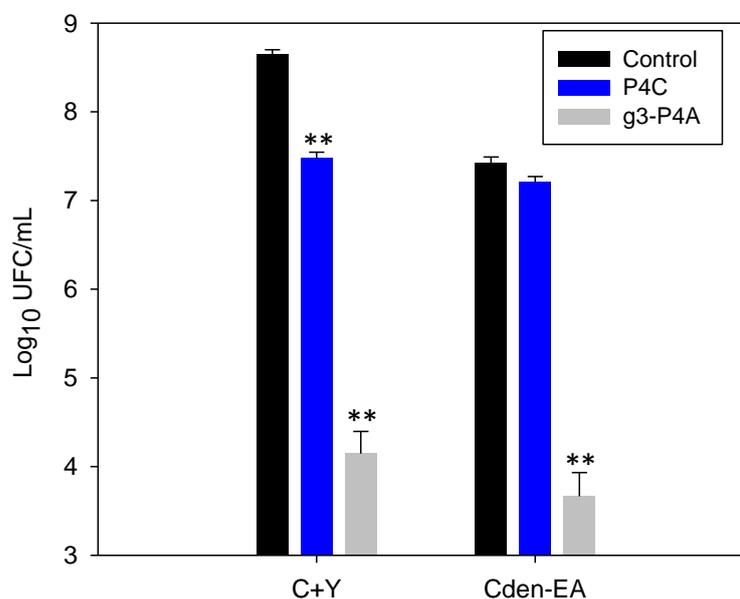
Las diferencias en cuanto a la morfología celular obtenidas tras el tratamiento con P4C y g3-P3A (Figura 78 y 79), apuntaban a un posible mecanismo antibacteriano del distinto. Así pues, procedimos en primer lugar a comprobar si las hidrolasas de la pared celular de neumococo estaban también involucradas en este proceso lítico, empleando de nuevo las cepas deficientes en enzimas líticas descritas en el apartado de “Resultados 3.4. Mecanismo biológico de la actividad antimicrobiana de P4C”. Como se observa en la Figura 80, y al contrario de P4C, el dendrímero g3-P4A reduce la viabilidad en 4-5 unidades logarítmicas en todas las cepas estudiadas con independencia de la presencia de las autolisinas LytA y LytC, indicando que el dendrímero ocasiona directamente la muerte celular sin el requerimiento de estas enzimas.



**Figura 80.** Actividad bactericida de P4C y g3-P4A frente a las cepas de *S. pneumoniae*: R6CIB17, R6C, M31C y M32. El cultivo en fase exponencial se concentró 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó durante 3 h a 37 °C en presencia de P4C 30 μM y g3-P4A 1 μM. Las barras de error representan las desviaciones estándar, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control en ausencia de compuesto. (\*, P < 0,05; \*\*, P < 0,001).

Por otro lado, la adición de 1 μM de g3-P4A redujo igualmente la viabilidad celular en 4 unidades logarítmicas cuando las bacterias fueron crecidas en medio Cden-EA, justo al contrario que P4C (Figura 81), demostrando que su actividad es

independiente de la presencia de colina en la pared, lo cual estaría de acuerdo con un mecanismo independiente del concurso de las CBPs hidrolasas de la pared celular.



**Figura 81.** Actividad bactericida de compuestos P4C y g3-P4A frente a *S. pneumoniae* R6CIB17. Los cultivos se crecieron en medio C+Y o medio Cden-EA, en fase exponencial se concentró 2X en tampón 20 mM fosfato sódico, 280 mM sorbitol, pH 7,0, y se incubó durante 3 h a 37 °C en presencia de P4C (30 μM) y g3-P4A (1 μM) durante 3 horas a 37 °C a las concentraciones indicadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control en ausencia de compuesto. (\*\*, P<0,001).

### 3.8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto g3-P4C

Los experimentos *in vitro* descritos anteriormente han demostrado que el dendrímero g3-P4A es el compuesto más eficiente entre los estudiados. Además, actúa de forma independiente de colina y no requiere la ayuda de las enzimas líticas propias de la bacteria para ocasionar la muerte celular, llevando a cabo su actividad antimicrobiana presumiblemente mediante la ruptura masiva de la membrana. Esto nos llevó a considerar al compuesto g3-P4A como un antimicrobiano eficaz y con un espectro que probablemente pudiera exceder a *S. pneumoniae*. Debido a su mayor poder antimicrobiano, decidimos centrarnos en el uso del dendrímero g3-P4A en los sucesivos experimentos. Con objeto de caracterizar más plenamente su función bactericida, se procedió en primer lugar a determinar la CMI utilizando los criterios del CLSI mediante el sistema de microdilución empleando las cepas neumocócicas capsuladas D39 y la multirresistente 3498 (Tabla 17). Como se observa en la tabla, los valores de CMI

obtenidos se encuentran en el rango micromolar al igual que los antibióticos tradicionales ( $\beta$ -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas) frente a neumococo<sup>303</sup>. Así pues, g3-P4A presenta una capacidad bactericida *in vitro* que puede compararse favorablemente con otros antibióticos.

Por otro lado, se procedió también a estimar el efecto antimicrobiano del dendrímero sobre otras dos estirpes patógenas, una Gram-positiva (*S. aureus*, resistente a meticilina) y una Gram-negativa (*P. aeruginosa*). Mientras que no se observó ningún efecto apreciable sobre la primera, sí que pudo observarse un efecto significativo sobre *P. aeruginosa* (Tabla 17), si bien a una concentración más elevada que frente a neumococo.

Cepa	CMI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ / $\mu\text{M}$ )
<i>S. pneumoniae</i> D39	0,10 / 2,7
<i>S. pneumoniae</i> 3498	0,15 / 3,9
<i>P. aeruginosa</i> CECT 110	0,75 / 20
<i>S. aureus</i> CECT 5190	> 0,75 / 20

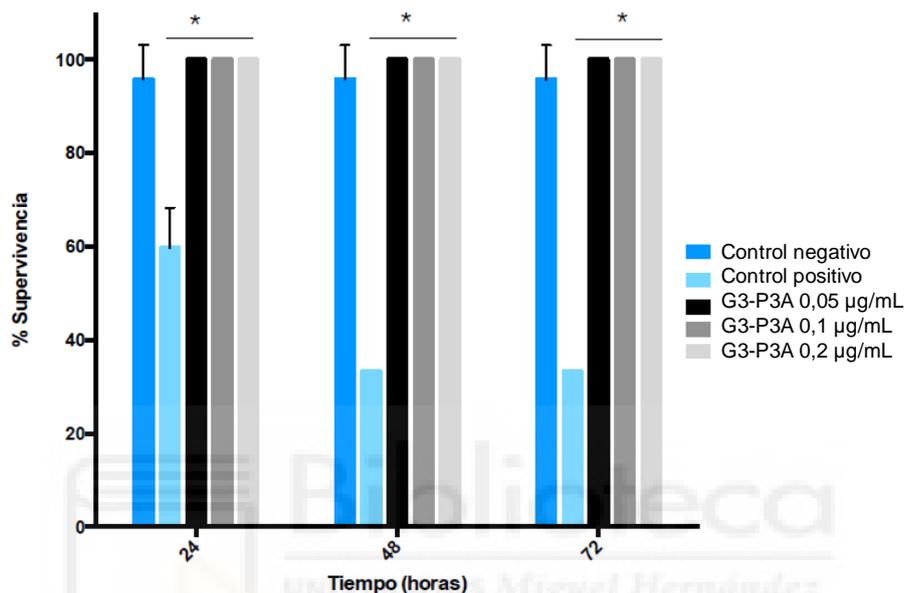
**Tabla 17.** CMI de g3-P4A en las cepas de *S. pneumoniae* D39 y 3498, *P. aeruginosa* CECT 110, *S. aureus* CECT 5190.

Todos estos resultados confirman que el dendrímero g3-P4A es un prometedor candidato como agente antimicrobiano no solo frente a *S. pneumoniae*, sino también frente a bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, por lo que podría constituir la base para el desarrollo de nuevos antibacterianos de amplio espectro. En este sentido, y para completar su caracterización, nuestra investigación se dirigió finalmente a evaluar su capacidad en un modelo animal de enfermedad neumocócica.

### 3.9. Actividad protectora de g3-P4A en un modelo animal: pez cebra

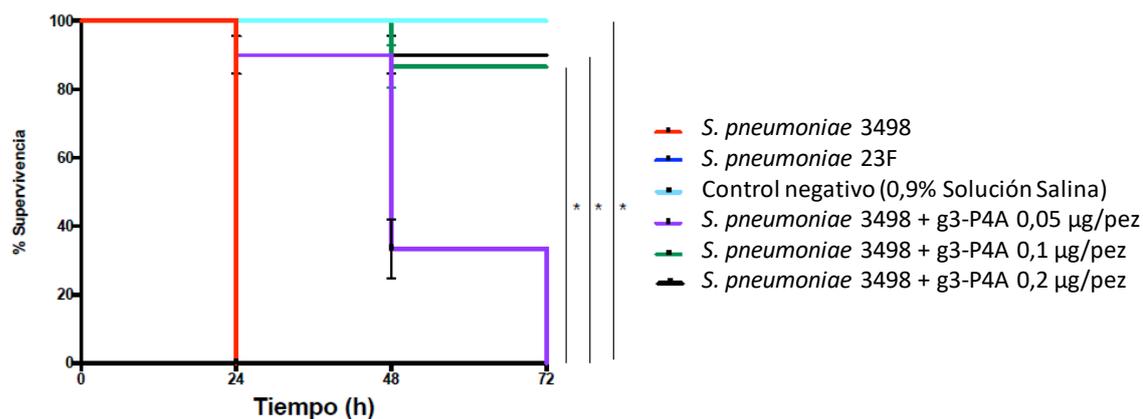
Para la validación *in vivo* de los resultados obtenidos hasta ahora, se empleó un el modelo de sepsis en peces cebra<sup>267,364,365</sup>, infectados con la cepa multirresistente 3498 de *S. pneumoniae* “*Materiales y Métodos 7. Ensayos con pez cebra como modelo animal*”. Como paso previo, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda en embriones de pez cebra. El test se inició inmediatamente después de la fecundación de los huevos y se continuó hasta las 72 hpf. Los embriones se distribuyeron

en placas de 96 pocillos y se expusieron al compuesto g3-P4A a concentraciones finales de 0,05, 0,1, y 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (1,3, 2,7 y 5,3  $\mu\text{M}$ ). Los datos obtenidos revelaron un valor de supervivencia del 100 % para todas las concentraciones probadas transcurridas las 72 h de exposición (Figura 82), lo que refleja la inocuidad del compuesto g3-P4A a tales concentraciones.



**Figura 82.** Ensayo de toxicidad aguda de g3-P4A en embriones de pez cebra. Se muestra el porcentaje de supervivencia en presencia de 0,05, 0,1 y 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de g3-P4A. Los embriones de pez cebra se expusieron al compuesto durante 24, 48 o 72 h. Las barras de error representan la desviación estándar en cada caso, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control (\*,  $p < 0,001$ ).

A continuación, se realizaron ensayos de eficacia protectora del dendrímero frente a una infección de *S. pneumoniae* en individuos adultos. Tras ser infectados con 10  $\mu\text{L}$  de  $10^6$  UFC de la cepa 3469 de *S. pneumoniae*, a excepción del grupo control, los peces se trataron con 0,05, 0,1 y 0,2  $\mu\text{g}$  por pez de g3-P4A a las 29 hpi. La Figura 83 muestran que el dendrímero g3-P4A es capaz de proteger frente a la infección, consiguiendo una supervivencia del 90 y 86 % a una concentración de 0,2 y 0,1  $\mu\text{g}$  por pez, respectivamente, mientras que, en el caso del grupo infectado y no tratado, la supervivencia fue del 0 % transcurridas 72 hpi. Paralelamente Se llevaron a cabo dos controles positivos, uno de ellos inoculando los peces con la cepa 3498, y otro con la cepa 23F, altamente patógena<sup>366</sup>.



**Figura 83.** Supervivencia de peces cebra adultos tratados con una única dosis de g3-P4A frente a una infección neumocócica (cepa 3498) a las concentraciones indicadas. El ensayo se siguió durante 72 horas. Como control negativo se empleó solución salina, y como control positivo las cepas 3498 y 23F sin tratar. Las barras de error representan la desviación estándar, y los asteriscos indican que los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el control (\*,  $p < 0,001$ ).

Estos prometedores resultados obtenidos *in vivo* confirman que el dendrímero g3-P4A es un potencial agente antimicrobiano frente a infecciones provocadas, al menos, por el patógeno *S. pneumoniae*. El compuesto presenta un potente efecto bactericida a concentraciones de 0,05 µg por pez ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a dosis única, sin mostrar efecto tóxico alguno en estas condiciones.





Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

## V. DISCUSIÓN

---



Neumococo constituye en la actualidad uno de los más importantes patógenos, causante de una alta mortalidad y morbilidad, responsable de infecciones que desembocan en enfermedades como neumonía adquirida en la comunidad, otitis media y meningitis <sup>1,26</sup>. Por otro lado, mientras que el descubrimiento de los antibióticos fue uno de los logros sanitarios más significativos de la Historia, la capacidad de adaptación bacteriana junto con el uso abusivo de estos compuestos ha llevado el desarrollo de cepas multirresistentes <sup>50</sup>. Esta situación ha promovido la búsqueda de tratamientos alternativos a los antibióticos tradicionales, especialmente dirigidos a bacterias con mayor relevancia clínica como es el caso de *S. pneumoniae*, clasificado como un patógeno de prioridad media en la lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos publicada por la OMS <sup>31</sup>, y como microorganismo con un nivel de amenaza grave para el CDC de los Estados Unidos <sup>32</sup>.

En este sentido, las proteínas de unión a colina de *S. pneumoniae* constituyen un atractivo blanco, aún insuficientemente explorado, sobre el que nuevos antimicrobianos podrían actuar. Estas proteínas intervienen en su práctica totalidad en procesos esenciales para la viabilidad y virulencia bacterianas, son comunes a todos los serotipos y comparten como característica principal el reconocimiento específico de los residuos de colina de la pared celular <sup>66</sup>.

### **1. ESTUDIO DE ÉSTERES DE AMINAS BICÍCLICAS (EBAs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE A *S. pneumoniae***

En nuestro laboratorio se había identificado previamente un tipo novedoso de moléculas análogas a la colina, los EBAs <sup>300</sup>, que mostraron ser capaces de detener el crecimiento bacteriano de neumococo y conferir protección contra la infección en modelos de pez cebra, presentando una MIC en el rango micromolar, similar a otros antibióticos <sup>302</sup>. Los EBAs se diseñaron originariamente como inhibidores de CBPs, capaces de generar el encadenamiento celular de forma semejante a la colina. Sin embargo, además de inducir la inhibición de la actividad de LytA *in vitro*, y a diferencia de lo que ocurre con la colina, la pérdida de viabilidad celular sugería fuertemente un mecanismo antibacteriano alternativo que debía investigarse.

Los ensayos sobre mutantes de R6 que carecen de una o más hidrolasas de pared celular sugieren que la autolisina LytA está implicada en la lisis inducida por los EBAs (Tabla 6). Por otro lado, los ensayos de permeabilidad celular (Figura 19) indicaron que estos compuestos desestabilizan la membrana celular, hecho que podría permitir la liberación incontrolada de LytA citoplasmática, induciendo la autólisis prematura del cultivo. Este efecto puede explicarse sobre la base de las estructuras químicas de los EBAs, ya que estas moléculas contienen un resto polar (que alberga un grupo amina terciaria) esterificado a una estructura poliaromática altamente hidrofóbica, que podría fácilmente interactuar con la bicapa lipídica (Tabla 5). De hecho, la Figura 20 muestra la correlación entre las características fisicoquímicas de los EBAs probados y su efecto biológico: cuanto más hidrofóbico es el resto no polar (reflejado por el parámetro  $\log P$ ), más rápidamente se incrementa la permeabilidad de la membrana y el compuesto muestra una MIC inferior. Esta hipótesis explicaría que el mecanismo desestabilizante de la membrana inducido por los EBAs es predominante sobre una teórica inhibición *in vivo* de LytA. De hecho, el compuesto EBA 31, el más efectivo de este estudio (Figura 21 y Figura 22), requiere una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para inducir el 50 % de inhibición de LytA *in vitro*<sup>302</sup> mientras que una concentración tan baja como 22  $\mu\text{M}$  (correspondiente a la MIC) es suficiente para mostrar un claro efecto bactericida.

Impulsados por estos hallazgos, evaluamos el efecto antibacteriano de los EBAs sobre biopelículas neumocócicas. Una biopelícula es la forma natural de crecimiento para muchas especies bacterianas, y se estima que más del 60 % de las infecciones bacterianas humanas, y hasta el 80 % de las que se vuelven crónicas, se disponen generando biopelículas<sup>186</sup>. En el caso de neumococo, aparece en biopelículas en la mucosa epitelial en niños con infecciones recurrentes de otitis media, en las glándulas adenoides y en la mucosa de pacientes con rinosinusitis crónica<sup>181</sup>. La importancia de las biopelículas en la microbiología médica reside en la susceptibilidad significativamente menor a los antibióticos que presentan las bacterias en este tipo de crecimiento<sup>367</sup>.

En un interesante estudio<sup>368</sup>, mostraron el efecto del ipratropio (EBA, amina cuaternaria análogo de colina) como un agente desensamblador *in vitro* de biopelículas

neumocócicas envejecidas. Sin embargo, no se detalló ningún mecanismo molecular para este evento, ni se detectó ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular a menos que se emplee en cooperación con otros antibióticos. La falta de efecto bactericida en este caso podría deberse, al menos en parte, a las bajas concentraciones de ipratropio utilizadas (alrededor de 4  $\mu$ M), que son incapaces de inducir cambios apreciables en la permeabilidad de la membrana (Figura 19, recuadro interior) y/o en la viabilidad de cultivos planctónicos <sup>300</sup>, dejando aparte posibles diferencias en los protocolos de formación de la biopelícula. Además, en el presente estudio nos hemos centrado en el estudio de las aminas terciarias poliaromáticas, ya que son los EBAs que han demostrado presentar un comportamiento antineumocócico más eficiente en cultivos planctónicos <sup>302</sup>. Los experimentos realizados en esta Tesis con los diferentes EBAs mostraron que estos compuestos son capaces de inhibir la formación y producir la disgregación de una biopelícula de *S. pneumoniae* tanto de una cepa no capsulada (cepa R6, Figura 21 y Figura 22) como de un transformante isogénico de R6 que expresa el polisacárido capsular 19A (Cepa P181, Figura 23), aunque el aclaramiento completo de la biopelícula requirió concentraciones superiores a la MIC (Tabla 5). Sin embargo, es sabido que la naturaleza de la estructura de la biopelícula y las características fisiológicas de las células que la conforman, confieren una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos, pudiendo ser incluso 1000 veces más resistentes en comparación con los cultivos planctónicos <sup>336,337</sup>. Por otro lado, aunque todos estos resultados estuvieron acompañados de una perturbación significativa de la membrana (Figura 19, 22 y 23), y de la viabilidad celular (Figura 21-23), no se puede descartar la posibilidad de que los EBAs estuvieran afectando negativamente a la estructura de la biopelícula también por el desplazamiento de las CBPs de la pared celular y/o del espacio extracelular ya que aquellos mutantes deficientes en estas hidrolasas muestran una capacidad disminuida para formar tales biopelículas <sup>110,190,193</sup>.

Los resultados obtenidos con biopelículas neumocócicas, junto con el mecanismo desvelado de desestabilización de la membrana de estos compuestos, nos impulsaron a probar el efecto de estas moléculas frente a biopelículas mixtas. Para este estudio elegimos *H. influenzae* ya que, además del reto de ser una bacteria Gram-negativa, junto con *S. pneumoniae*, son los patógenos predominantes asociados a otitis

media identificados a través del cultivo bacteriano <sup>339</sup> y con frecuencia forman biopelículas mixtas. El compuesto EBA 31 demostró ser capaz de inhibir la formación de una biopelícula mixta (Figura 25), así como de disgregar una previamente formada (Figura 26), a concentraciones del orden de micromolar, aunque fue más efectivo en la lisis de *S. pneumoniae* que en las células de *H. influenzae* (Figura 25-27). En este sentido, debe tenerse en cuenta que esta molécula fue seleccionada estrictamente por sus propiedades para ser efectiva frente a neumococo <sup>300,302</sup>, de manera que mientras que la lisis de NTHi se produciría por un efecto mayoritario de desestabilización de la membrana (Figura 24), en el caso de neumococo este proceso se vería además reforzado por la consiguiente salida de LytA, produciendo una lisis masiva (Tabla 6).

Para completar el estudio de la actividad de los EBAs, se evaluó la actividad de los EBAs 18, 26, 27 y 31 sobre el crecimiento de promastigotes de *L. donovani*, parásito de gran importancia clínica, para el que no existe vacuna, y para el que existen pocos fármacos, con importantes efectos secundarios y con altas tasas de resistencia <sup>369</sup>. Los cuatro EBAs testados resultaron ser efectivos frente a la proliferación de los promastigotes, y a concentraciones inferiores a la miltefosina (IC<sub>50</sub> 4,4 μM; <sup>370</sup>) medicamento de referencia actualmente frente a este parásito <sup>371</sup>. Este prometedor resultado de los EBAs sobre un agente patógeno eucariota abre una nueva vía de investigación en el grupo que contemplaría comenzar por evaluar la efectividad en la forma amastigote, la permeabilidad de la membrana o determinando si interfieren en la vía de síntesis de fosfatidilcolina, como ocurre con la miltefosina.

Como resumen de esta parte de la Tesis, podemos concluir que hemos demostrado la existencia de un segundo mecanismo que determina la actividad antimicrobiana de los EBAs, y que sería la desestabilización de la membrana bacteriana, lo que conduce en el caso de neumococo a una lisis prematura de la bacteria. Además, hemos comprobado la efectividad de estos compuestos frente un patógeno Gram-negativo (*H. influenzae*) y sobre biopelículas sencillas (de neumococo) o mixtas (*S. pneumoniae*-NTHi), de importancia en microbiología clínica. Más aún, hemos determinado que son capaces de inhibir la proliferación de un parásito protozoario (*L. donovani*). Estos resultados amplían el potencial de aplicación de los EBAs como agentes antibacterianos y sientan las bases para el diseño racional de nuevas variantes con

mayor capacidad de perturbación de membranas, además de abrir una nueva vía de investigación en el campo de la leishmaniosis.

## 2. ESTUDIO DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA (CBMs) COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS NO LÍTICOS FRENTE A *S. pneumoniae*

El conjunto de las CBPs de *S. pneumoniae* resulta esencial para la viabilidad y virulencia de la bacteria, y todas ellas comparten como característica principal el hecho de que reconocen la colina de la pared celular. Estos hechos han servido como soporte de muchas de las investigaciones del laboratorio, en la búsqueda de compuestos que podrían inhibir o interferir de manera simultánea la actividad de todas ellas, y que por tanto podrían representar un nuevo conjunto de antimicrobianos, como los expuestos en el apartado anterior. Sin embargo, el uso de compuestos como los EBAs, que inducen finalmente la lisis celular, no está desprovisto de consecuencias que pueden ser perjudiciales, como la liberación incontrolada de factores de virulencia y compuestos tóxicos del citoplasma bacteriano. Con esta motivación, decidimos investigar una línea alternativa y paralela de agentes antiinfecciosos no líticos: el efecto de los CBMs exógenos como agentes bloqueantes de la colina superficial de la bacteria, con objeto de generar la formación de largas cadenas que pudieran promover su fagocitosis por parte del huésped <sup>288</sup>. Un estudio semejante se había llevado previamente en nuestro laboratorio haciendo uso de dendrímeros de colina <sup>305,306</sup>. Además, estudios previos del laboratorio demostraron que los módulos C-LytA y C-Cpl1 son capaces de inhibir en un alto porcentaje la actividad de las enzimas LytA y Cpl1 por desplazamiento de éstas últimas de los ácidos teicoicos <sup>116</sup>, todo lo cual en su conjunto nos animaba a abordar este estudio.

Para realizar este trabajo, elegimos tres CBMs representativos, C-LytA, C-Cpl1 y C-CbpD, que difieren en tamaño, número de CBRs y estado de oligomerización (Tabla 9). En primer lugar, llevamos a cabo un estudio estructural de estas proteínas, analizando su estado oligomérico (Figura 30), determinando su número de CBSs (Figura 31), y su afinidad por colina libre (Figura 33) y por sustratos supramoleculares polidentados emuladores de la pared celular (Figura 35 y Figura 36). Estudios anteriores ya sugerían que no existe una relación directa entre la afinidad y el número de CBRs/CBSs, al menos

respecto a la colina libre <sup>128,126,130</sup>. Los datos presentados en esta Tesis, junto con los trabajos previos, permiten confirmar esta hipótesis. La afinidad por la colina en solución es similar en LytC y en Cpl1 <sup>128</sup> pero la primera contiene 7 sitios de unión por monómero <sup>126</sup> mientras que el segundo posee 5 sitios por dímero, como demostramos en esta Tesis. En la misma línea, la proteína LytA contiene 10 sitios canónicos y 2 no canónicos por dímero <sup>123</sup> pero aparentemente muestra una menor afinidad por el ligando que Cpl1 <sup>128,130</sup>, con solo 5 sitios por dímero. Por último, la afinidad por colina libre de C-CbpD, que presenta 3 CBSs por monómero, es mayor que la de C-Cpl1, con 5 CBSs por dímero (Figura 33 y Tabla 9). Por otro lado, cabe destacar que el valor de  $K_d$  obtenido para C-Cpl1 es tres veces inferior al previamente deducido para la proteína parental, Cpl1 <sup>127</sup>, lo que apuntaría a la existencia de un efecto desfavorable en esta última, que podría ser debido a la presencia de interacciones entre el módulo catalítico <sup>127</sup> y el CBM de la proteína que obstaculizarían la unión a colina, lo que a su vez podría estar complicando en parte la dimerización de la proteína <sup>347</sup>. En este sentido, los experimentos realizados por Buey y cols. (2007) <sup>173</sup> muestran que la dimerización de la proteína se produce a través del extremo N-terminal del CBM, y postulan la existencia de un CBS extra no canónico y ubicado en la primera horquilla  $\beta$  de dicho extremo, a partir del cual se llevaría a cabo la dimerización de Cpl1. Nuestros resultados de los experimentos calorimétricos y sujetos a análisis de van't Hoff (Figura 31) avalarían dicha hipótesis.

En cuanto a la afinidad por su sustrato en la pared, debemos sin embargo tener en cuenta que los CBMs no se unen a colina en forma libre, sino tal y como aparece en la pared celular, la cual contiene múltiples copias distribuidas a lo largo de esta estructura supramolecular, y por tanto el ligando en realidad está sujeto a efectos de multivalencia. Sin embargo, hasta el momento no se había realizado estudios de afinidad de las CBPs sobre sustratos polidentados, muy posiblemente por la dificultad de obtener muestras de paredes de manera homogénea entre diferentes experimentos. Por este motivo, en este trabajo decidimos utilizar dos sistemas emuladores de la estructura supramolecular de la pared celular (NPMs-DEAE- y “chips” de DEAPA para SRP) para evaluar la fortaleza de la unión de los CBMs. Como se muestra en la Tabla 9, la afinidad por dichos sustratos se incrementa entre 20 a 500 veces comparada con la colina libre,

disminuyendo la  $K_d$  del orden de milimolar a micromolar (Figura 35 y Figura 36). Los efectos de multivalencia han sido descritos como cruciales para muchas interacciones biológicas<sup>372</sup>, mostrándose como una potente estrategia para aumentar la afinidad y la especificidad por dianas biológicas<sup>373,374</sup>. De hecho, y como se ha mencionado más arriba, en nuestro laboratorio se había mostrado anteriormente que dendrímeros conteniendo entre 4-64 moléculas de colina por partícula, poseen una afinidad por los CBMs varios órdenes de magnitud por encima que la colina monovalente<sup>305</sup>

El estudio comparativo entre los diferentes CBMs evaluados muestra que tanto C-Cpl1 como C-CbpD poseen una mayor afinidad por sustratos supramoleculares que C-LytA, a pesar de que este último módulo presenta mayor número de CBSs (Tabla 9), y en consonancia con nuestras observaciones previas que indicaban que C-Cpl1 es un inhibidor más eficiente de la actividad de las hidrolasas LytA y Cpl1<sup>116</sup>. Por su parte, el oligómero LZ-C-LytA, obtenido mediante ingeniería de proteínas, muestra los CBRs en grupos ramificados (Figura 42) en vez de disponerse todos linealmente, demostrando una afinidad incrementada por la matriz SPR comparado con C-LytA aislada, lo que debe explicarse como una consecuencia de alcanzarse un grado incrementado de multivalencia (Figura 43 y Tabla 9).

Como previamente se ha especulado<sup>173</sup> las diferencias estructurales entre los CBMs estudiadas están probablemente relacionadas con sus diferentes funciones. La complejidad de sitios de unión a colina de alta y baja afinidad que presenta LytA posiblemente se deba a su actividad autolítica, la cual debe encontrarse perfectamente regulada con el propósito de evitar una prematura lisis celular. Por el contrario, Cpl1, al ser una endolisina fágica, requiere unirse fuertemente a la pared e hidrolizar con rapidez el péptidoglicano, con el objetivo de promover la propagación de viriones a la mayor prontitud. Siguiendo este razonamiento, la proteína CbpD, al intervenir en el fratricidio, posiblemente precisa de una fuerte interacción con la pared celular para desencadenar la lisis de las células no competentes con la participación de las lisozimas LytC y LytA. Es decir, la evolución podría haber seleccionado aquellos cambios en la afinidad que presenta cada CBM por el ligando y en su oligomerización como forma de regular de forma eficiente sus funciones fisiológicas.

En su conjunto, todos estos resultados indican que, a pesar de la gran similitud de secuencia entre los diferentes CBRs descritos hasta el momento, las bases biofísicas del reconocimiento de colina en la pared celular atienden a fenómenos complejos, y que merecen un mayor número de estudios estructurales.

A continuación, habiéndose demostrado la interacción de los CBMs con sustratos emuladores de la pared celular (Figura 35 y Figura 36), se evaluó el efecto de su adición a un cultivo líquido de neumococo, con la finalidad de saturar los sitios de unión a colina de la pared y hacerlos así no disponibles para la unión de las CBPs de la bacteria. Esto produjo en todos los casos la formación de cadenas, como consecuencia posiblemente de la inhibición de las hidrolasas involucradas en la separación de las células hijas tras la división celular (de manera semejante a la colina), pero, sobre todo, los CBMs indujeron la formación de agregados celulares (Figura 37 y Figura 39) con una eficacia que está directamente relacionada con su capacidad de interactuar con sustratos multidentados sintéticos (nanopartículas y *chips* de SPR): tanto C-Cpl1 como C-CbpD, los más afines por NPMs-DEAE, produjeron la formación de largas cadenas y la subsecuente agregación celular, a una concentración inferior que C-LytA (Figura 38), y a su vez este efecto fue mucho más evidente en el caso de la proteína LZ-C-LytA (Figura 44), la cual también mostró mayor afinidad por sustrato, medida por la técnica de SPR (Figura 43 y Tabla 9), así como la mayor estimulación de la fagocitosis por parte de los macrófagos (Figura 45). Además, estos datos nos permiten validar el uso de NPMs-DEAE y “chips” de DEAPA como modelos *in vitro* de la pared celular de neumococo respecto a la disposición de colina, técnica que puede ser empleada en el diseño y evaluación de nuevas variantes.

La formación de agregados celulares en los cultivos neumocócicos tratados con los CBMs sugiere un papel como agentes inductores de interacciones cruzadas entre las células, lo que finalmente conduce a su sedimentación. Este fenómeno puede tener lugar por el recubrimiento de la superficie celular por parte del polipéptido añadido, incrementándose de esta forma la hidrofobicidad de la superficie. De hecho, una inspección detallada de las propiedades de la superficie de los tres CBMs evaluados en esta Tesis (Figura 28.B) revela un cierto grado de anfipaticidad en sus estructuras, con la presencia de amplias regiones hidrofóbicas que podrían inducir la asociación proteína-

proteína de manera inespecífica entre moléculas ubicadas en células distintas. Estos agregados celulares resultaron ser más fácilmente fagocitados por los macrófagos peritoneales (Figura 45). Además, estudios previos evidencian que el control de la formación de cadenas en la bacteria permite la evasión del sistema inmune: se ha demostrado que solo el 1 % de la población de *S. pneumoniae* crecida en medio fisiológico forma largas cadenas susceptibles de eliminarse rápidamente mediante opsonofagocitosis, lo que resulta en que las muestras clínicas presenten siempre la morfología de diplococo<sup>288</sup>. El mecanismo por el cual el huésped puede subvertir esta estrategia de virulencia es mediante anticuerpos aglutinantes que inducen la formación de acúmulos celulares y en virtud de su mayor tamaño presentan mayor susceptibilidad a la deposición del complemento C3, fomentando en última instancia la fagocitosis<sup>288</sup>. También se ha comprobado que la elongación de la cadena neumocócica ocasionada por la presencia de colina en el medio o mediante el empleo de cepas deficientes de LytA promueve la opsonofagocitosis<sup>288</sup>.

Nuestros resultados, en su conjunto, apuntan a los CBMs como una nueva familia de agentes antimicrobianos para combatir las infecciones neumocócicas, al activar las defensas del organismo y bloquear potencialmente la diseminación y la adhesión, sin producir efectos negativos derivados de la lisis celular incontrolada.

### **3. ESTUDIO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA AUTOLISINA LytA COMO POSIBLES ANTIMICROBIANOS LÍTICOS FRENTE A *S. pneumoniae***

A pesar de que la familia de las CBRs de las proteínas de unión a colina de neumococo contienen secuencias altamente conservadas<sup>66</sup>, los CBMs presentan una gran diversidad en cuanto a su comportamiento, tanto en afinidad por colina libre como por superficies emuladoras de la pared celular. Tales diferencias deben proceder de las sutiles variaciones de secuencia entre las CBRs que, sin embargo, y como apuntamos, pueden redundar en un comportamiento muy distinto de los CBMs a los que pertenecen. Por esta razón, nos propusimos investigar la derivación de posibles reglas que relacionasen el número y tipo de repeticiones de los CBMs con la afinidad por su sustrato, con el objetivo de diseñar racionalmente CBMs con las características deseadas, y preferiblemente más pequeños. Para ello, se afrontó el estudio de un

sistema extremadamente básico consistente en la simple repetición de una CBR, aprovechando que las CBRs son estructuras en horquilla  $\beta$  robustas y que adquieren su conformación en disolución de manera espontánea, no necesitando, al menos para adquirir su estructura secundaria, ni al resto de la proteína ni al ligando <sup>121,122</sup>.

Las secuencias P4A-P4C se basan en la CBR4 de LytA como núcleo principal y contienen 1-3 horquillas separadas por un mismo bucle (Tabla 11), siendo capaces de adquirir una estructura secundaria con características nativas, de acuerdo a los espectros de dicroísmo circular (Figura 46) y a los cambios conformacionales detectados por esta técnica inducidos por la interacción con colina (Figura 48), la cual induce un incremento en su estabilidad térmica (Figura 49, Tabla 12). Los tres péptidos poseen una estabilidad marginal a 25 °C, consistente con una estructura flexible. Es interesante comprobar cómo, a medida que aumenta el número de repeticiones, disminuye la estabilidad del péptido (Tabla 12). Este hecho podría explicarse, al menos en parte, por la posibilidad de interacciones péptido-péptido en su estado desnaturalizado, que desplazaría el equilibrio hacia éste último estado con más intensidad en el caso de las variantes más largas. De hecho, las transiciones térmicas llevadas a la máxima temperatura tras el desplegamiento son solo completamente reversibles en el caso de P4A (Figura 49).

El incremento en estabilidad termodinámica a 25 °C inducido por la unión de colina y calculado a partir de los datos de desnaturalización térmica (Tabla 12), es muy discreto en el caso de P4A y P4B ( $< 1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) y más significativo en el caso de P4C ( $2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), datos que están en consonancia con las constantes de disociación del ligando deducidas de los experimentos de titulación seguidos por fluorescencia (Tabla 12, Figura 53). En cualquier caso se trata de afinidades residuales, con constantes de disociación muy altas, lo que sugiere que el ligando se une a "semisitios" con solo dos aromáticos aportados por cada horquilla, en lugar de a sitios canónicos con el concurso de dos horquillas próximas (Figura 7). En todo caso también parece claro un cambio significativo de afinidad con la adición de la tercera horquilla (P4C), lo que sugiere que solo a partir de este número de repeticiones pueden configurarse en alguna medida los sitios de unión canónicos. Esto explicaría por qué no se han descrito, hasta ahora, CBPs con menos de tres CBRs (Figura 6). Desafortunadamente, la insolubilidad de las variantes

con 4 y 5 CBRs impidió obtener conclusiones más definidas en este aspecto. Asimismo, los problemas técnicos surgidos por la adsorción inespecífica de los péptidos P4A-P4C a superficies impidieron medir su afinidad por el ligando cuando éste se encuentra en un sustrato polimérico, como se ha descrito previamente para los CBMs.

Una vez determinados los límites de nuestras construcciones sintéticas como emuladores de los CBMs, nos propusimos como alternativa su ensayo como moléculas perturbadoras de la membrana celular de *S. pneumoniae*. Nuestra hipótesis se basaba en observaciones previas según las cuales el péptido P4A adquiere una conformación de hélice  $\alpha$  anfipática en presencia de micelas de detergentes como el DPC o de vesículas lipídicas<sup>122</sup>. Los resultados mostrados en las Figura 55 y 56 indican que las versiones más largas (P4B y P4C) no solo siguen un patrón similar a P4A con DPC, sino que la transición ocurre a concentraciones de detergente mucho más bajas e incluso menores que la CMC (Tabla 13). Este fenómeno se ha descrito en algunas otras proteínas, incluido el propio módulo completo C-LytA<sup>362</sup>, y se ha explicado en base a la interacción preferente del detergente con el polipéptido, de manera que las moléculas del primero se acumulan preferentemente sobre el segundo y forma las denominadas "hemimicelas" en su superficie<sup>360,361</sup>. Es probable, por tanto, que P4B y P4C tengan ya un tamaño suficiente como para albergar estas hemimicelas, en contraposición con el más pequeño, P4A.

En línea con su interacción preferente con DPC, los péptidos P4B y P4C ejercen un efecto bactericida sobre cultivos planctónicos de neumococo (Figura 58, Figura 59 y Figura 60) que puede relacionarse con su actividad permeabilizadora de la membrana bacteriana (Figura 61), siendo los efectos más acusados los provocados por el péptido más largo, P4C. A la vista de los resultados mostrados en la Figura 61, esta función permeabilizadora de los péptidos, aun siendo significativa, ha de ser considerada no obstante como moderada puesto que nunca se alcanzan los niveles de permeación obtenidos en el control positivo (detergente). En este sentido, aunque no se ha elucidado la estructura tridimensional de P4C, el análisis estructural de la interacción entre las micelas de DPC y la hélice anfipática adquirida por el péptido base P4A descartaría la formación de poros o estructuras similares, ya que el péptido se localiza cerca de la superficie, ligeramente inclinado y solo parcialmente inmerso en la bicapa lipídica<sup>122</sup>, con un papel más detabilizador que destructor de la membrana. Estas

hipótesis necesitarán, por supuesto, una confirmación experimental en estudios posteriores, y deberán además de explicar las inusuales estructuras circulares o cilíndricas que se observan en el citoplasma (Figura 79.B).

Con objeto de identificar con más detalle el papel de la unión a colina y de la interacción con la membrana en el mecanismo antibacteriano de estos péptidos, y tomando como referencia el más activo (P4C), se diseñaron dos variantes (P4C\_NOCH y P4C\_NOME) (Tabla 14 y Figura 62). En el péptido P4C\_NOCH se sustituyeron los aminoácidos aromáticos presuntamente implicados en la unión a colina (Figura 8) por sendos residuos hidrofóbicos, de manera que la capacidad de formar una hélice anfipática quedará más o menos intacta, pero la unión a colina quedaría reducida o incluso eliminada, como así parece ser (Figura 64). Por su parte, el péptido P4C\_NOME mantendría en principio el sitio de unión a colina intacto, pero contendría residuos polares en otras tantas posiciones hidrofóbicas del péptido original, provocando una presumible disminución de su interacción con la membrana lipídica. Así, la Figura 64 y Figura 65, indican que, aunque la afinidad por colina se reduce en cierta medida, el péptido P4C\_NOME todavía conserva la capacidad marginal de reconocer al ligando libre. En cuanto a su capacidad de formar la hélice anfipática en presencia de micelas de DPC, ambas variantes ven reducida su interacción con el detergente (Figura 67, Tabla 15), siendo P4C\_NOME el que precisa más cantidad del aditivo, e iniciando su transición a concentraciones muy próximas a la CMC, lo que indica una capacidad bastante reducida para albergar hemimicelas en su superficie. Por su parte, los datos de permeabilidad celular (Figura 68) y viabilidad bacteriana en cultivos planctónicos (Figura 69) muestran coherencia entre sí: P4C\_NOME pierde cierta capacidad de desestabilizar la membrana con respecto a la secuencia original, pero esta pérdida es suficiente para eliminar completamente su actividad antibacteriana. Por otro lado, el reconocimiento de colina en la pared parece ser importante en cuanto a la adsorción previa de estos péptidos sobre la superficie bacteriana, puesto que la variante P4C\_NOCH, si bien llega con el tiempo a presentar valores de permeabilidad similares a P4C (compatible con su capacidad de formar la hélice anfipática), presenta sin embargo una cinética claramente más lenta, mientras que en cultivos presenta una actividad bactericida más reducida, pero no nula.

El aspecto de los restos celulares mostrados en la Figura 59 indican un resultado de lisis bacteriana a consecuencia de la adición de los péptidos. Sin embargo, como apuntamos más arriba, tal lisis debe acaecer no como un resultado de la destrucción de la membrana sino más bien como una consecuencia de la perturbación de la misma, puesto que la adición del péptido en el cultivo no origina la lisis inmediata del cultivo (Figura 58). Es más, allí donde las condiciones son más controladas (péptido P4B a 10  $\mu$ M) el cultivo prosigue normalmente hasta el final de la fase exponencial, donde la densidad óptica comienza a decrecer abruptamente, no habiendo lugar la correspondiente fase estacionaria (Figura 58). Por otro lado, el empleo de cepas mutantes deficientes en una o las dos enzimas autolíticas de *S. pneumoniae* (LytA y LytC) apuntan al concurso necesario de la amidasa LytA en el proceso de lisis (Figura 70). Las más recientes hipótesis sobre el mecanismo de actuación de LytA sugieren que solo el 3 % de esta autolisina se encuentra normalmente en la superficie bacteriana, mientras que el 97 % restante permanece en el citoplasma a la espera de una señal fisiológica, aún desconocida, que provoque la movilización de la enzima y desencadene la autólisis al final de la fase estacionaria <sup>146</sup>. En este sentido, nuestros resultados sugieren que el mecanismo bactericida de los péptidos P4B y P4C se debe a un efecto perturbador de la membrana, no drástico pero suficiente para ayudar a la salida de LytA desde su reservorio citoplasmático. En el caso del péptido menos potente y a la menor concentración (P4B a 10  $\mu$ M), la lisis comenzaría en el momento en que LytA comienza a moverse naturalmente hacia el exterior (Figura 58), solo que favorecida en este caso por la membrana permeabilizada por el péptido. Por su parte, en condiciones más drásticas (P4B a mayor concentración, o P4C) la liberación masiva e incontrolada de LytA se produciría directamente desde el citoplasma sin esperar a la señal fisiológica de transporte al exterior, provocando una lisis más temprana del cultivo (Figura 58). La participación necesaria de LytA en la autólisis prematura de los cultivos se ve asimismo confirmada por el hecho de que el reemplazo de la colina de la pared, ligando esencial de la autolisina, por etanolamina, disminuye drásticamente la actividad antibacteriana (Figura 71).

Los efectos y mecanismos moleculares ejercidos por los péptidos P4B y P4C son muy similares a los descritos más arriba para los ésteres de aminas bicíclicas (EBAs). Sin

embargo, mientras que estos últimos son moléculas sintéticas, P4B y P4C son secuencias de péptidos que se encuentran de manera natural contenidas en la proteína LytA, lo cual no deja de ser sorprendente a primera vista. Es decir, de manera natural las CBRs adquieren, dentro de LytA, una conformación en horquilla  $\beta$  que tiene un papel fisiológico de reconocimiento de colina, pero sin embargo estas secuencias son también susceptibles de transformarse en una conformación en hélice  $\alpha$  que puede incluso llegar a ser tóxica para la bacteria. Creemos que esta aparente paradoja puede, no obstante, cumplir un papel fisiológico relevante. LytA es la única CBP que no posee péptido señal<sup>66</sup>, y todavía no se conoce su mecanismo de translocación a través de la membrana hacia la pared celular. Una posible hipótesis contemplaría que las CBRs de algunas moléculas del reservorio citoplasmático de LytA actuaran como "interruptores moleculares"<sup>122,158,159</sup> transformándose en hélices  $\alpha$  anfipáticas frente a un estímulo adecuado, y que estas CBRs transformadas desestabilizaran la membrana celular desde el interior, facilitando así el transporte del resto de las moléculas de la enzima. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que el cambio conformacional  $\beta \rightarrow \alpha$  inducido por micelas de detergente se puede observar experimentalmente para el resto de CBRs de LytA (Zamora-Carreras, comunicación personal, y datos del laboratorio no mostrados) e incluso del propio módulo C-LytA completo<sup>122</sup>. La corroboración experimental de esta hipótesis novedosa y relevante se está llevando a cabo en el laboratorio en el momento de escritura de esta tesis doctoral.

Como se describe en el apartado "Resultados 3.2.1. Efecto bactericida de los péptidos derivados de CBR4 de LytA en cultivos de *S. pneumoniae*" los péptidos P4B y P4C son también activos frente a cepas capsuladas de neumococo, una de ellas multirresistente a antibióticos (D39 y 3498 serotipo 8). Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria sobre las cepas capsuladas resultó en ambos casos de 80  $\mu$ M. Aunque los resultados son prometedores, teniendo en cuenta que se trata de moléculas no especialmente diseñadas como antimicrobianos, se hace necesaria una estrategia para aumentar su capacidad antibacteriana y reducir la dosis hasta niveles terapéuticamente más aceptables. En este sentido, el laboratorio había ensayado previamente con éxito la aplicación de conceptos de multivalencia para el ensayo de dendrímeros de colina y de atropina como compuestos antineumocócicos donde las dosis precisas se reducen en

varios órdenes de magnitud con respecto al ligando libre <sup>302,304</sup>. Además, como se muestra más arriba, la proteína LZ-C-LytA podría considerarse como un "minidendrímero" (Figura 42) que, incluso así, muestra un incremento muy apreciable en su actividad con respecto a C-LytA (Figura 44).

En colaboración con el grupo del Prof. E. W. Meijer de la Universidad Técnica de Eindhoven (Holanda), quien posee toda la tecnología química necesaria para la síntesis de los compuestos, se diseñaron los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A, conteniendo 8 y 16 copias respectivamente del péptido P4A (Figura 16). La disposición ramificada de las horquillas  $\beta$  en los dendrímeros no ayudó a configurar sitios canónicos de unión a colina, por lo que el reconocimiento de la misma seguía siendo tan residual como el del péptido aislado (Figura 73). Sin embargo, los dendrímeros tenían una entidad suficiente como para albergar hemimicelas de DPC, posibilitando la interacción con este detergente en concentraciones similares a P4C (Figura 75, Tabla 16) y formándose asimismo hélices  $\alpha$  (Figura 74). Estas características se traducen en un fuerte incremento de la desestabilización de la membrana bacteriana, que llega a adquirir valores de permeabilidad similares a los de la adición de Triton X-100, y a unas concentraciones del orden de nanomolar (Figura 76). Estos resultados adquieren mayor valor si se comparan con los de los péptidos P4B y P4C, donde hay que recordar que concentraciones 8 veces superiores (en términos de equivalentes de CBRs) solo son capaces, como máximo, de permeabilizar la membrana en un 70 % del valor obtenido con el detergente Tritón X-100 (Figura 61). La disposición dendrímica de los péptidos, en donde varias copias están confinadas en una misma partícula, podría posibilitar una acumulación local importante de péptido en una región reducida de la membrana, provocando una desestabilización más intensa mientras que cuando se ensayan los péptidos aislados, éstos probablemente se distribuyen por toda la superficie y de alguna manera se diluye su actividad.

La disposición ramificada de P4A en los dendrímeros resultó asimismo ser decisiva en cuanto a la adquisición de una estructura antimicrobiana muy efectiva. Con concentraciones 10-20 veces inferiores (en términos de equivalentes de CBRs) respecto a P4C, se obtuvieron descensos en viabilidad bacteriana entre 1 y 3 unidades logarítmicas mayores (Figura 60 y Figura 77). También se observan diferencias drásticas

en cuanto al daño celular provocado por ambos tipos de compuestos a corto plazo tras la adición de la molécula correspondiente. El péptido P4C provoca cambios visibles en la morfología celular (Figura 78) causados por la práctica desaparición de la pared celular junto con la aparición de ciertas subestructuras en el citoplasma (Figura 79), si bien todavía conserva la integridad celular; por el contrario el dendrímero g3-P4A causa la destrucción total de la célula, junto con la aparición de vesículas esféricas de diferente tamaño (Figura 78 y Figura 79). Estos resultados nos llevan a especular sobre la posibilidad de que P4B y P4C actúen mediante el mecanismo de electroporación molecular o de balsa de hundimiento (Figura 13) causando una perturbación moderada de la membrana que genere pequeños y transitorios desperfectos que son aprovechados por las moléculas de LytA aún en citoplasma para salir al exterior de manera incontrolada. Por su parte, la eficacia de los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A provocaría una intensificación en su poder desestabilizador de la membrana, provocando su rotura masiva y la creación de vesículas de muy diferente tamaño, tal y como prevé el modelo de alfombra (Figura 13). Obviamente estas hipótesis deben servir únicamente como punto de partida para su confirmación experimental.

El incremento de actividad del dendrímero se traduce asimismo en una menor CMI sobre las cepas capsuladas D39 y 3498 (Tabla 17). En estos casos el efecto del dendrímero comparado con P4C es más matizado, siendo la CMI 4 veces inferior al péptido lineal si se tienen en cuenta los equivalentes de CBRs, por lo que es probable que la cápsula presente un impedimento sustancial a la difusión de una entidad de cierto tamaño como es g3-P4A. En todo caso, se trata de concentraciones molares similares a los antibióticos actuales<sup>303</sup>.

La desestructuración de la membrana en el caso de g3-P4A es de tal magnitud que hace innecesario el concurso de LytA para la lisis del cultivo (Figura 80 y Figura 81). Esto nos llevó a ensayar al dendrímero frente a otros microorganismos, pudiéndose observar un apreciable efecto positivo sobre *P. aeruginosa* (Tabla 17), lo que da pie a planificar futuros ensayos sobre otras bacterias gram-negativas y evaluar su posibilidad como antimicrobiano de amplio espectro. En apoyo a esta aproximación, hay que resaltar que la literatura muestra, cada vez con más intensidad, ejemplos de dendrímeros peptídicos antimicrobianos<sup>283</sup>. Además de incrementar su actividad por

multivalencia, la estructura dendrímica confiere en general al péptido mostrado una protección frente al ataque de peptidasas plasmáticas, mejorando su farmacocinética.

En función de los resultados mostrados, el dendrímero g3-P4A resultó ser por lo tanto la construcción basada en CBRs más prometedora en cuanto a su uso como antimicrobiano, lo que motivó su elección para su ensayo en un modelo de enfermedad neumocócica (sepsis) en pez cebra, utilizando la cepa multirresistente 3498. El compuesto resultó ser muy eficaz como protector frente a la sepsis bacteriana (Figura 83), con una supervivencia de cerca del 90 % con una dosis de 100 ng por pez en dosis única, que no resultó tóxica en modelos de embrión de este animal (Figura 82). Este resultado confirmaría la elección de disposiciones dendrímicas de CBRs como una línea novedosa de desarrollo de nuevos antimicrobianos, principalmente dirigidos frente a *S. pneumoniae*, pero que también podrían contemplar un mayor espectro de acción.







## VI. CONCLUSIONES

---



1.- Los ésteres de aminas bicíclicas (EBAs) ejercen su función bactericida frente a *S. pneumoniae* no como análogos de colina, sino más bien como agentes perturbadores de la membrana celular, favoreciendo la salida prematura de la autolisina LytA desde su reservorio citoplasmático e induciendo por este motivo la autólisis del cultivo.

2.- Los EBAs poseen un marcado efecto inhibitor y desagregador de biopelículas formadas por cepas de *S. pneumoniae*, sean o no capsuladas. Dichos efectos se extienden asimismo a biopelículas mixtas de *S. pneumoniae* y la bacteria Gram-negativa *H. influenzae* no tipificable, siendo neumococo el organismo más susceptible a su acción.

3.- La acción de los EBAs no se circunscribe únicamente al entorno bacteriano, sino que resultaron ser efectivos frente a la proliferación de promastigotes de *L. donovani*, un parásito causante de importantes enfermedades por todo el mundo. Las concentraciones necesarias resultaron ser más bajas que las de la miltefosina, un medicamento utilizado para combatir a este patógeno.

4.- Los módulos de unión a colina (CBMs) procedentes de las proteínas de unión a colina de *S. pneumoniae*, poseen una afinidad por colina libre que no está relacionada directamente con el número de repeticiones de unión a colina (CBRs), el número de sitios de unión a colina (CBSs) o el estado oligomérico de la proteína.

5.- Se ha provisto de evidencia experimental a la hipótesis de que el CBM de la lisozima Cpl1 es capaz de reconocer 5 moléculas de colina en su forma dimérica. Por su parte, el CBM de la proteína CbpD une 3 moléculas de colina, y nunca abandona su estado monomérico.

6.- Los CBMs incrementan de manera exponencial su afinidad por sustratos supramoleculares pensados para emular a la pared celular y que contienen varias moléculas de análogos del ligando natural (colina), como son las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE y "chips" de SPR funcionalizados con DEAPA. Este hecho pone de manifiesto la importancia de efectos multivalentes en el reconocimiento

biológico de sustratos, en concreto en este caso la interacción entre dos sistemas multidentados (la pared y los CBMs).

7.- La multivalencia, y por lo tanto la afinidad, del sistema de interacción entre CBMs y sustratos supramoleculares funcionalizados, puede incrementarse sustancialmente asimismo mediante la ingeniería de oligómeros de CBMs. En nuestro trabajo, ésto se ha realizado mediante la inserción de una secuencia de oligomerización por cremallera de leucinas perteneciente a otra proteína.

8.- Los CBMs son capaces de adsorberse a la pared celular cuando son añadidos exógenamente en cultivos planctónicos. Como consecuencia, se originan cadenas de células incapaces de separarse y con gran tendencia a la agregación, lo que constituye un mecanismo no lítico que promueve la fagocitosis celular por macrófagos de peritoneo de ratón. El efecto agregante es directamente proporcional a la afinidad del CBM por sustratos polidentados.

9.- Se han construido péptidos sintéticos consistentes en la repetición de 1, 2 o 3 secuencias idénticas correspondientes a la CBR4 de la autolisina LytA de *S. pneumoniae* (péptidos P4A, P4B y P4C). Los tres péptidos adquieren estructura secundaria de tipo nativo en solución acuosa, y son capaces de reconocer colina de manera específica, aunque marginal.

10.- Los péptidos P4B y P4C sufren un cambio conformacional de horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  inducido por micelas de detergente, de manera similar a lo anteriormente descrito para P4A, pero en concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica, probablemente debido a la acumulación de semi-micelas de detergente en la superficie peptídica.

11.- Los péptidos P4B y P4C, no así P4A, ejercen un efecto bactericida sobre cultivos *in vitro* de neumococo, tanto de cepas no capsuladas como capsuladas. El efecto se debe a la perturbación de la membrana celular, lo que origina la salida de la amidasa LytA y la posterior digestión de la pared celular y la lisis del cultivo.

12.- El efecto de P4B y P4C se basa fundamentalmente en su capacidad de cambiar de conformación y asociarse a micelas de detergente y presumiblemente a membranas celulares, aunque también precisan de cierta unión, al menos marginal, a la colina de la pared celular.

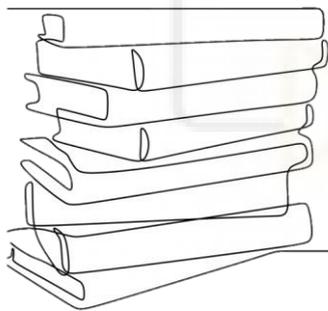
13.- La disposición de una CBR como el péptido P4A en múltiples copias en la superficie de dendrímeros de PPI (g2-P4A y g3-P4A, con 8 y 16 moléculas, respectivamente) permite reducir las dosis antibacterianas hasta concentraciones del orden de nanomolar.

14.- Al contrario que los péptidos P4B y P4C, las células de *S. pneumoniae* tratadas con los dendrímeros g2-P4A y g3-P4A provocan la destrucción bacteriana mediante un mecanismo independiente de las enzimas líticas del patógeno y de la presencia de colina en la superficie, lo que posibilita su empleo como antimicrobiano de más amplio espectro frente a otro tipo de patógenos como *P. aeruginosa*.

15.- El dendrímero g3-P4A, en bajas concentraciones, ejerce un efecto de protección frente a enfermedad neumocócica en modelos animales de pez cebra, en condiciones en las que su posible toxicidad no es detectable.

16.- Como conclusión final, hemos estudiado en esta Tesis Doctoral las características biofísicas, mecanismo de acción y potencial antimicrobiano de tres grupos de compuestos (EBAs, CBMs, y CBRs), que abarcan un amplio espectro molecular, con distintos mecanismos de acción (líticos y no líticos) y diseñados en un principio para combatir la enfermedad neumocócica, pero que, en algunos casos, demuestran la capacidad de tratar patologías provocadas también por otros microorganismos como *H. influenzae* y *Leishmania*. Además, hemos demostrado la aplicación del concepto químico de multivalencia para la construcción de oligómeros y nanopartículas capaces de ejercer un efecto bactericida a unas dosis muy reducidas, señalando el camino para mejorar la actividad biológica de los fármacos actuales y de otros nuevos que se puedan desarrollar.





## VII. BIBLIOGRAFÍA

---



1. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol*. 2018;9:1366.
2. Pasteur. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med (Paris)*. 1881;10:94–103.
3. Sternberg GM. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull* . 1881;2:781–783.
4. Gram C. Ueber die isolirte färbung der schizomycetes in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschr Med*. 1884;2:185–189.
5. Klein E. Micro-organisms and disease. *Practitioner*. 1884;32:321-352.
6. Weichselbaum A. Ueber die aetiologie der acuten lungen- und rippenfellentzündungen. *Med Jahrb*. 1886;82:483–554.
7. Chester FD. A manual of determinative bacteriology. *The MacMillan Co., New York*. 1901.
8. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*. 1928;27(2):113-159.
9. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation os pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*. 1944;79(2):137-158.
10. Butterfield EE, Peabody FW. The action of pneumococcus on blood. *J Exp Med*. 1913;17(5):587-592.
11. Cole R. The production of methemoglobin by pneumococci. *J Exp Med*. 1914;20(4):363-378.
12. Barnard JP, Stinson MW. The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun*. 1996;64(9):3853-3857.
13. Brzin B. Reversion of alpha- into beta-hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia*. 1969;25(9):985-986.
14. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3373-3375.
15. Murray PR. Modification of the bile solubility test for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1979;9(2):290-291.
16. Kamerling JP. Pneumococcal polysaccharides: A chemical view. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz, Ed. Larchmont, NY: Mary Ann Liebert. 2000; Inc, pp. 81–114.
17. Sørensen UB, and Blom, J. Capsular polysaccharide is linked to the outer surface of type 6<sup>a</sup> pneumococcal cell walls. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1992;100:891-893.
18. Yother J. Capsules. The Pneumococcus. Tuomanen EI, Mitchell TJ, Morrison D y Spratt BG, Eds. Washington, DC: American Society for Microbiology Press. 2004:30–48.
19. Eberhardt A, Hoyland CN, Vollmer D, y col. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 2012;18(3):240-255.
20. Geno KA, Saad JS, Nahm MH. Discovery of Novel Pneumococcal Serotype 35D, a Natural WciG-Deficient Variant of Serotype 35B. *J Clin Microbiol*. 2017;55(5):1416-1425.
21. Ndlangisa K, du Plessis M, Allam M, y col. Invasive Disease Caused Simultaneously by Dual Serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(1).
22. Domenech M. *Biofilmes de Streptococcus pneumoniae: Genética, composición y terapia*. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología III, Universidad Complutense de Madrid; 2012.
23. WHO. Weekly Epidemiological Record. World Health Organization: Geneva, Switzerland 2007;pp. 93–104.

24. GDB 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(11):1191-1210.
25. Revai K, McCormick DP, Patel J, Grady JJ, Saeed K, Chonmaitree T. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media. *Pediatrics*. 2006;117(5):1823-1829.
26. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, y col. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):893-902.
27. UNICEF. Pneumonia: The Forgotten Killer Of Children. United Nations Children's Emergency Fund: New York, NY, USA, 2006.2006.
28. UNICEF. Pneumonia: UNICEF DATA 2018 <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumon..>
29. UNICEF. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014.
30. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S, Eds. 13th ed. Washington D.C. Public Health Foundation, 2015.
31. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. E. Tacconelli and N. Magrini. 2017.
32. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance threats in the United States. Department of Health and Human Services. 2013.
33. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177113.
34. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Vacunación frente a neumococo en grupos de riesgo. 2015.
35. Malito E, Bursulaya B, Chen C, y col. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(14):5229-5234.
36. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, y col. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1737-1746.
37. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--United States, 1998-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54(36):893-897.
38. Rose M, Zielen S. Impact of infant immunization programs with pneumococcal conjugate vaccine in Europe. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(10):1351-1364.
39. Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine*. 2010;28(26):4249-4259.
40. Skinner JM, Indrawati L, Cannon J, y col. Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine*. 2011;29(48):8870-8876.
41. McFetridge R, Meulen AS, Folkerth SD, y col. Safety, tolerability, and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2015;33(24):2793-2799.
42. Caro-Aguilar I, Indrawati L, Kaufhold RM, y col. Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain. *Vaccine*. 2017;35(6):865-872.

43. Devine VT, Cleary DW, Jefferies JM, y col. The rise and fall of pneumococcal serotypes carried in the PCV era. *Vaccine*. 2017;35(9):1293-1298.
44. Cornick JE, Bentley SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. *Microbes Infect*. 2012;14(7-8):573-583.
45. Hansman D, Bullen M. A resistant pneumococcus. *Lancet*. 1967;2:264-265.
46. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):361-385.
47. Hakenbeck R, Bruckner R, Denapaite D, Maurer P. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2012;7(3):395-410.
48. Appelbaum PC, Scragg JN, Bowen A, Bhamjee A, Hallett AF, Cooper R. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *The Lancet*. 1977;310(8046):995-997.
49. Appelbaum PC. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol*. 1987;6(4):367-377.
50. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P T*. 2015;40:277-283.
51. Henriques-Normark B. Molecular epidemiology and mechanisms for antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. En *Molecular Biology of Streptococci*. Hakenbeck R, Chhatwal GS, Eds. *Horizon Bioscience*: Norfolk, UK. 2007:269–290.
52. Todorova K, Maurer P, Rieger M, y col. Transfer of penicillin resistance from *Streptococcus oralis* to *Streptococcus pneumoniae* identifies murE as resistance determinant. *Mol Microbiol*. 2015;97(5):866-880.
53. Albrich WC, Monnet DL, Harbarth S. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(3):514-517.
54. Lovering AL, Safadi SS, Strynadka NC. Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:451-478.
55. Fischer H, Tomasz A. Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1985;163(1):46-54.
56. Garcia-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem*. 1987;262(32):15400-15405.
57. Gisch N, Peters K, Zähringer U, Vollmer W. The pneumococcal cell wall. In *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions*, 1st ed.; Brown, JM, Hammerschmidt S, Orihuela C, Eds. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015:145–167.
58. Skov Sorensen UB, Blom J, Birch-Andersen A, Henrichsen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun*. 1988;56(8):1890-1896.
59. Fischer W. Lipoteichoic acids and lipoglycans. In *Bacterial Cell Wall*; Ghuysen JM, Hakenbeck R, Eds. *Elsevier Science B.V*: Amsterdam, The Netherlands, 1994:199–215.
60. Seo HS, Cartee RT, Pritchard DG, Nahm MH. A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *J Bacteriol*. 2008;190(7):2379-2387.
61. Gisch N, Kohler T, Ulmer AJ, y col. Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15654-15667.
62. Denapaite D, Bruckner R, Hakenbeck R, Vollmer W. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist*. 2012;18(3):344-358.

63. Fischer W, Behr T, Hartmann R, Peter-Katalinic J, Egge H. Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem.* 1993;215(3):851-857.
64. Behr T, Fischer W, Peter-Katalinic J, Egge H. The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur J Biochem.* 1992;207(3):1063-1075.
65. Jennings HJ, Lugowski C, Young NM. Structure of the complex polysaccharide C-substance from *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Biochemistry.* 1980;19(20):4712-4719.
66. Maestro B, Sanz JM. Choline Binding Proteins from *Streptococcus pneumoniae*: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials. *Antibiotics (Basel).* 2016;5(2).
67. Brundish DE, Baddiley J. Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J.* 1968;110(3):573-582.
68. Karlsson C, Jansson PE, Skov Sorensen UB. The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms. Mono-substituted or di-substituted with phosphocholine. *Eur J Biochem.* 1999;265(3):1091-1097.
69. Fischer W. Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol.* 2000;151(6):421-427.
70. Volanakis JE, Kaplan MH. Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1971;136(2):612-614.
71. Vassal-Stermann E, Lacroix M, Gout E, *et al.* Human L-ficolin recognizes phosphocholine moieties of pneumococcal teichoic acid. *J Immunol.* 2014;193(11):5699-5708.
72. Sharif O, Matt U, Saluzzo S, *et al.* The scavenger receptor CD36 downmodulates the early inflammatory response while enhancing bacterial phagocytosis during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2013;190(11):5640-5648.
73. Leon MA, Young NM. Specificity for phosphorylcholine of six murine myeloma proteins reactive with Pneumococcus C polysaccharide and beta-lipoprotein. *Biochemistry.* 1971;10(8):1424-1429.
74. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 1995;377(6548):435-438.
75. Kharat AS, Tomasz A. Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol Microbiol.* 2006;60(1):93-107.
76. Lopez R, Garcia E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(5):553-580.
77. Rane L, Subbarow Y. Nutritional Requirements of the Pneumococcus: I. Growth Factors for Types I, II, V, VII, VIII. *J Bacteriol.* 1940;40(5):695-704.
78. Badger E. The structural specificity of choline for the growth of type iii pneumococcus. *J. Biol. Chem.* 1944;153:183-19
79. Tomasz A. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of Pneumococcus: chanin formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;59(1):86-93.
80. Yother J, Leopold K, White J, Fischer W. Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J Bacteriol.* 1998;180(8):2093-2101.
81. Severin A, Horne D, Tomasz A. Autolysis and cell wall degradation in a choline-independent strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 1997;3(4):391-400.

82. Damjanovic M, Kharat AS, Eberhardt A, Tomasz A, Vollmer W. The essential *tacF* gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2007;189(19):7105-7111.
83. Lull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1250-1256.
84. Moscoso M, Obregon V, Lopez R, Garcia JL, Garcia E. Allelic variation of polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8706-8713.
85. Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, y col. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One.* 2008;3(7):e2683.
86. Campuzano S, Serra B, Lull D, Garcia JL, Garcia P. Cloning, expression, and characterization of a peculiar choline-binding beta-galactosidase from *Streptococcus mitis*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(18):5972-5980.
87. Hakenbeck R, Madhour A, Denapaite D, Bruckner R. Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(3):572-586.
88. Denapaite D, Bruckner R, Nuhn M, y col. The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal? *PLoS One.* 2010;5(2):e9426.
89. Ronda C, Garcia JL, Lopez R. Characterization of genetic transformation in *Streptococcus oralis* NCTC 11427: expression of the pneumococcal amidase in *S. oralis* using a new shuttle vector. *Mol Gen Genet.* 1988;215(1):53-57.
90. Reichmann P, Nuhn M, Denapaite D, y col. Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. *J Bacteriol.* 2011;193(11):2888-2889.
91. Sanchez-Beato AR, Ronda C, Garcia JL. Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain: molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J Bacteriol.* 1995;177(4):1098-1103.
92. Demarest SJ, Salbato J, Elia M, y col. Structural characterization of the cell wall binding domains of *Clostridium difficile* toxins A and B; evidence that Ca<sup>2+</sup> plays a role in toxin A cell surface association. *J Mol Biol.* 2005;346(5):1197-1206.
93. Ho JG, Greco A, Rupnik M, Ng KK. Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(51):18373-18378.
94. Makino SI, Yamamoto K, Asakura H, Shirahata T. Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186(2):313-317.
95. Makino S, Yamamoto K, Murakami S, y col. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microb Pathog.* 1998;25(2):101-109.
96. To H, Nagai S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(7):813-820.
97. Ogawa Y, Ooka T, Shi F, y col. The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J Bacteriol.* 2011;193(12):2959-2971.
98. Perez-Dorado I, Galan-Bartual S, Hermoso JA. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(4):221-245.
99. Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology.* 2006;152(Pt 2):295-303.
100. Garcia JL, Sanchez-Beato AR, Medrano FJ, Lopez R. Versatility of choline-binding domain. *Microb Drug Resist.* 1998;4(1):25-36.
101. Galán-Bartual S, Pérez-Dorado I, García P, Hermoso JA. Chapter 11 - Structure and Function of Choline-Binding Proteins. In *Streptococcus Pneumoniae: Molecular*

- Mechanisms of Host-Pathogen Interactions. 1<sup>st</sup> ed. Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C, Eds. Cambridge, MA, USA: Academic Press; 2015:207-230.
102. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, *y col.* Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1997;25(5):819-829.
  103. Luo R, Mann B, Lewis WS, *y col.* Solution structure of choline binding protein A, the major adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *Embo j.* 2005;24(1):34-43.
  104. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):288-301.
  105. Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A, Haelbich S, Skerka C, Zipfel PF. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol.* 2007;178(9):5848-5858.
  106. Ronda C, Garcia JL, Garcia E, Sanchez-Puelles JM, Lopez R. Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem.* 1987;164(3):621-624.
  107. De Las Rivas B, Garcia JL, Lopez R, Garcia P. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol.* 2002;184(18):4988-5000.
  108. Rico-Lastres P, Diez-Martinez R, Iglesias-Bexiga M, *y col.* Substrate recognition and catalysis by LytB, a pneumococcal peptidoglycan hydrolase involved in virulence. *Sci Rep.* 2015;5:16198.
  109. Martner A, Dahlgren C, Paton JC, Wold AE. Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun.* 2008;76(9):4079-4087.
  110. Moscoso M, Claverys JP. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol.* 2004;54(3):783-794.
  111. Senkovich O, Cook WJ, Mirza S, *y col.* Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. *J Mol Biol.* 2007;370(4):701-713.
  112. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1999;67(9):4720-4724.
  113. Mitchell TJ. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol.* 2000;151(6):413-419.
  114. Ramos-Sevillano E, Urzainqui A, Campuzano S, *y col.* Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun.* 2015;83(2):591-603.
  115. Garcia E, Garcia JL, Garcia P, Arraras A, Sanchez-Puelles JM, Lopez R. Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(3):914-918.
  116. Sanchez-Puelles JM, Sanz JM, Garcia JL, Garcia E. Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene.* 1990;89(1):69-75.
  117. Garcia P, Garcia JL, Garcia E, Sanchez-Puelles JM, Lopez R. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene.* 1990;86(1):81-88.
  118. Sanz JM, Diaz E, Garcia JL. Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol Microbiol.* 1992;6(7):921-931.

119. Wren BW. A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol Microbiol.* 1991;5(4):797-803.
120. Janecek S, Svensson B, Russell RR. Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus species*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;192(1):53-57.
121. Maestro B, Santiveri CM, Jimenez MA, Sanz JM. Structural autonomy of a beta-hairpin peptide derived from the pneumococcal choline-binding protein LytA. *Protein Eng Des Sel.* 2011;24(1-2):113-122.
122. Zamora-Carreras H, Maestro B, Strandberg E, Ulrich AS, Sanz JM, Jimenez MA. Micelle-Triggered beta-Hairpin to alpha-Helix Transition in a 14-Residue Peptide from a Choline-Binding Repeat of the Pneumococcal Autolysin LytA. *Chemistry.* 2015;21(22):8076-8089.
123. Li Q, Cheng W, Morlot C, y col. Full-length structure of the major autolysin LytA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2015;71(Pt 6):1373-1381.
124. Garcia JL, Diaz E, Romero A, Garcia P. Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol.* 1994;176(13):4066-4072.
125. Varea J, Saiz JL, Lopez-Zumel C, y col. Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase? *J Biol Chem.* 2000;275(35):26842-26855.
126. Perez-Dorado I, Gonzalez A, Morales M, y col. Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(5):576-581.
127. Hermoso JA, Monterroso B, Albert A, y col. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure.* 2003;11(10):1239-1249.
128. Monterroso B, Saiz JL, Garcia P, Garcia JL, Menendez M. Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28618-28628.
129. Maestro B, Sanz JM. Accumulation of partly folded states in the equilibrium unfolding of the pneumococcal choline-binding module C-LytA. *Biochem J.* 2005;387(Pt 2):479-488.
130. Medrano FJ, Gasset M, Lopez-Zumel C, Usobiaga P, Garcia JL, Menendez M. Structural characterization of the unligated and choline-bound forms of the major pneumococcal autolysin LytA amidase. Conformational transitions induced by temperature. *J Biol Chem.* 1996;271(46):29152-29161.
131. Garcia P, Paz Gonzalez M, Garcia E, Garcia JL, Lopez R. The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol.* 1999;33(1):128-138.
132. Garcia P, Gonzalez MP, Garcia E, Lopez R, Garcia JL. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol.* 1999;31(4):1275-1281.
133. Sanchez-Puelles JM, Ronda C, Garcia JL, Garcia P, Lopez R, Garcia E. Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the lytA gene. *Eur J Biochem.* 1986;158(2):289-293.
134. Holtje JV, Tomasz A. Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J Biol Chem.* 1974;249(21):7032-7034.
135. Vollmer W, Tomasz A. Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2001;39(6):1610-1622.
136. De las Rivas B, Garcia JL, Lopez R, Garcia P. Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist.* 2001;7(3):213-222.
137. Jedrzejewski MJ. Unveiling molecular mechanisms of pneumococcal surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clin Chim Acta.* 2006;367(1-2):1-10.
138. Mann B, Orihuela C, Antikainen J, y col. Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. *Infect Immun.* 2006;74(2):821-829.

139. Quin LR, Moore QC, 3rd, McDaniel LS. Pneumolysin, PspA, and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice. *Infect Immun*. 2007;75(4):2067-2070.
140. Li J, Glover DT, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun*. 2007;75(12):5877-5885.
141. Frolet C, Beniazza M, Roux L, y col. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol*. 2010;10:190.
142. Moscoso M, Garcia E, Lopez R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol*. 2006;188(22):7785-7795.
143. Claverys JP, Havarstein LS. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(3):219-229.
144. Gillespie SH, McHugh TD, Ayres H, Dickens A, Efstratiou A, Whiting GC. Allelic variation in *Streptococcus pneumoniae* autolysin (N-acetyl muramoyl-L-alanine amidase). *Infect Immun*. 1997;65(9):3936-3938.
145. Howard LV, Gooder H. Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1974;117(2):796-804.
146. Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, y col. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J Biol Chem*. 2012;287(14):11018-11029.
147. Berry AM, Paton JC. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun*. 2000;68(1):133-140.
148. Martner A, Skovbjerg S, Paton JC, Wold AE. *Streptococcus pneumoniae* autolysin prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect Immun*. 2009;77(9):3826-3837.
149. Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, Ohnstad HS, Havarstein LS. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology*. 2009;155(Pt 7):2223-2234.
150. Tomasz A, Albino A, Zanati E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*. 1970;227(5254):138-140.
151. Tomasz A, Waks S. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(10):4162-4166.
152. Moreillon P, Tomasz A. Penicillin resistance and defective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence for two kinds of antibiotic pressure operating in the clinical environment. *J Infect Dis*. 1988;157(6):1150-1157.
153. Moscoso M, Domenech M, Garcia E. Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol*. 2010;77(4):1052-1064.
154. Kietzman CC, Gao G, Mann B, Myers L, Tuomanen EI. Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium. *Nat Commun*. 2016;7:10859.
155. Tomasz A, Westphal M. Abnormal autolytic enzyme in a pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(11):2627-2630.
156. Fernandez-Tornero C, Lopez R, Garcia E, Gimenez-Gallego G, Romero A. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol*. 2001;8(12):1020-1024.

157. Mellroth P, Sandalova T, Kikhney A, y col. Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*. 2014;5(1):e01120-01113.
158. Zamora-Carreras H, Maestro B, Strandberg E, Ulrich AS, Sanz JM, Jimenez MA. Roles of Amphipathicity and Hydrophobicity in the Micelle-Driven Structural Switch of a 14-mer Peptide Core from a Choline-Binding Repeat. *Chemistry*. 2018;24(22):5825-5839.
159. Zamora-Carreras H, Maestro B, Sanz JM, Jimenez MA. Turncoat polypeptides: We adapt to our environment. *Chembiochem*. 2019.
160. Minor DL, Jr., Kim PS. Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature*. 1996;380(6576):730-734.
161. Li W, Kinch LN, Karplus PA, Grishin NV. ChSeq: A database of chameleon sequences. *Protein Sci*. 2015;24(7):1075-1086.
162. Lella M, Mahalakshmi R. Metamorphic Proteins: Emergence of Dual Protein Folds from One Primary Sequence. *Biochemistry*. 2017;56(24):2971-2984.
163. Buck M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q Rev Biophys*. 1998;31(3):297-355.
164. Diaz MD, de la Torre BG, Fernandez-Reyes M, Rivas L, Andreu D, Jimenez-Barbero J. Structural framework for the modulation of the activity of the hybrid antibiotic peptide cecropin A-melittin [CA(1-7)M(2-9)] by Nepsilon-lysine trimethylation. *Chembiochem*. 2011;12(14):2177-2183.
165. Fernandez-Tornero C, Garcia E, Lopez R, Gimenez-Gallego G, Romero A. Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J Mol Biol*. 2002;321(1):163-173.
166. Fernandez-Tornero C, Garcia E, de Pascual-Teresa B, Lopez R, Gimenez-Gallego G, Romero A. Ofloxacin-like antibiotics inhibit pneumococcal cell wall-degrading virulence factors. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19948-19957.
167. Usobiaga P, Medrano FJ, Gasset M, y col. Structural organization of the major autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6832-6838.
168. Romero P, Lopez R, Garcia E. Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2007;282(24):17729-17737.
169. Sandalova T, Lee M, Henriques-Normark B, y col. The crystal structure of the major pneumococcal autolysin LytA in complex with a large peptidoglycan fragment reveals the pivotal role of glycans for lytic activity. *Mol Microbiol*. 2016;101(6):954-967.
170. Romero P, Garcia E, Mitchell TJ. Development of a prophage typing system and analysis of prophage carriage in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(6):1642-1649.
171. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(6):357-362.
172. Perez-Dorado I, Campillo NE, Monterroso B, y col. Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24990-24999.
173. Buey RM, Monterroso B, Menendez M, y col. Insights into molecular plasticity of choline binding proteins (pneumococcal surface proteins) by SAXS. *J Mol Biol*. 2007;365(2):411-424.
174. Eldholm V, Johnsborg O, Straume D, y col. Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol Microbiol*. 2010;76(4):905-917.
175. Guiral S, Mitchell TJ, Martin B, Claverys JP. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8710-8715.

176. Kausmally L, Johnsborg O, Lunde M, Knutsen E, Havarstein LS. Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol.* 2005;187(13):4338-4345.
177. Bateman A, Rawlings ND. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(5):234-237.
178. Layec S, Gerard J, Legue V, y col. The CHAP domain of Cse functions as an endopeptidase that acts at mature septa to promote *Streptococcus thermophilus* cell separation. *Mol Microbiol.* 2009;71(5):1205-1217.
179. Havarstein LS, Martin B, Johnsborg O, Granadel C, Claverys JP. New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol.* 2006;59(4):1297-1307.
180. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-745.
181. Domenech M, Garcia E, Moscoso M. Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Biotechnol.* 2012;5(4):455-465.
182. Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:194.
183. Mayanskiy AN, Chebotar IV, Lazareva AV, Mayanskiy NA. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2015;33(3):16-22.
184. Tikhomirova A, Kidd SP. *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathog Dis.* 2013;69(2):114-126.
185. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108.
186. Wolcott RD, Ehrlich GD. Biofilms and chronic infections. *Jama.* 2008;299(22):2682-2684.
187. Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis.* 2004;190(9):1661-1669.
188. Sanchez CJ, Hurtgen BJ, Lizcano A, Shivshankar P, Cole GT, Orihuela CJ. Biofilm and planktonic pneumococci demonstrate disparate immunoreactivity to human convalescent sera. *BMC Microbiol.* 2011;11:245.
189. Carrolo M, Frias MJ, Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 2010;5(12):e15678.
190. Domenech M, Garcia E, Prieto A, Moscoso M. Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ Microbiol.* 2013;15(2):502-516.
191. Oggioni MR, Trappetti C, Kadioglu A, y col. Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol.* 2006;61(5):1196-1210.
192. Muñoz-Elías EJ, Marcano J, Camilli A. Isolation of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Mutants and Their Characterization during Nasopharyngeal Colonization. *Infect Immun.* 2008;76:5049-5061.
193. Domenech M, Ruiz S, Moscoso M, Garcia E. In vitro biofilm development of *Streptococcus pneumoniae* and formation of choline-binding protein-DNA complexes. *Environ Microbiol Rep.* 2015;7(5):715-727.
194. Blanchette KA, Orihuela CJ. Future perspective on host-pathogen interactions during bacterial biofilm formation within the nasopharynx. *Future Microbiol.* 2012;7(2):227-239.
195. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:107-131.
196. Domenech M, Ramos-Sevillano E, Garcia E, Moscoso M, Yuste J. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2013;81(7):2606-2615.

197. EMA, European Medicines Agency. Antimicrobial resistance in human medicine. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/antimicrobial-resistance/antimicrobial-resistance-human-medicine>. Published 2018.
198. Tagliabue A, Rappuoli R. Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. *Front Immunol*. 2018;9:1068.
199. FDA, Food and Drug Administration. Antimicrobial Resistance Information from FDA. <https://www.fda.gov/EmergencyPreparedness/Counterterrorism/MedicalCountermeasures/MCMIssues/ucm620149.htm>. Published 2019.
200. EMA, European Medicines Agency. Development of antibiotics for children - towards a global approach. <https://www.ema.europa.eu/en/news/development-antibiotics-children-towards-global-approach>. Published 2018.
201. Nuti R, Goud NS, Saraswati AP, Alvala R, Alvala M. Antimicrobial Peptides: A Promising Therapeutic Strategy in Tackling Antimicrobial Resistance. *Curr Med Chem*. 2017;24(38):4303-4314.
202. Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2071-2074.
203. Hermoso JA, Garcia JL, Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(5):461-472.
204. Fenton M, Ross P, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng Bugs*. 2010;1(1):9-16.
205. Pastagia M, Schuch R, Fischetti VA, Huang DB. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 10):1506-1516.
206. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(1).
207. Vazquez R, Garcia E, Garcia P. Phage Lysins for Fighting Bacterial Respiratory Infections: A New Generation of Antimicrobials. *Front Immunol*. 2018;9:2252.
208. Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(1):16-21.
209. Travkova OG, Moehwald H, Brezesinski G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017;247:521-532.
210. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*. 2018;8(1).
211. Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol*. 2016;26(1):R14-19.
212. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock RE. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol*. 2013;9(12):761-768.
213. Haney EF, Hancock RE. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers*. 2013;100(6):572-583.
214. Hancock RE, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(5):321-334.
215. Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):1727-1732.
216. Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J*. 2009;2:e1.
217. Veldhuizen EJ, Schneider VA, Agustiandari H, *γ col*. Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides. *PLoS One*. 2014;9(4):e95939.
218. Gwyer Findlay E, Currie SM, Davidson DJ. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics. *BioDrugs*. 2013;27(5):479-493.

219. Felicio MR, Silva ON, Goncalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem.* 2017;5:5.
220. Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* 2015;1268:43-66.
221. Gagnon MC, Strandberg E, Grau-Campistany A, y col. Influence of the Length and Charge on the Activity of alpha-Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry.* 2017;56(11):1680-1695.
222. Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 2001;501(2-3):146-150.
223. Hong SY, Park TG, Lee KH. The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides.* 2001;22(10):1669-1674.
224. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002;66(4):236-248.
225. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):27-55.
226. Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(10):7738-7745.
227. Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1398-1406.
228. Lee TH, Hall KN, Aguilar MI. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(1):25-39.
229. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(9):1184-1202.
230. Da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, y col. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov Today.* 2017;22(2):234-248.
231. Zhu M, Liu P, Niu Z-W. A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chemical Letters.* 2017;28(4):703-708.
232. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30(3):131-141.
233. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, y col. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 2001;306(2):257-264.
234. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, y col. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology.* 2002;106(1):20-26.
235. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-250.
236. Shah P, Hsiao FS, Ho YH, Chen CS. The proteome targets of intracellular targeting antimicrobial peptides. *Proteomics.* 2016;16(8):1225-1237.
237. Neale C, Hsu JC, Yip CM, Pomes R. Indolicidin binding induces thinning of a lipid bilayer. *Biophys J.* 2014;106(8):L29-31.
238. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski Lda S, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 2013;4:353.
239. Schmidt NW, Wong GC. Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2013;17(4):151-163.

240. Mahlapuu M, Hakansson J, Ringstad L, Bjorn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:194.
241. Ageitos JM, Sanchez-Perez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*. 2017;133:117-138.
242. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333-1341.
243. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(6):1206-1215.
244. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):449-465.
245. Bals R, Wang X, Wu Z, y col. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*. 1998;102(5):874-880.
246. Ciornei CD, Sigurdardottir T, Schmidtchen A, Bodelsson M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2845-2850.
247. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*. 2000;8(9):402-410.
248. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*. 2010;15(1-2):40-56.
249. McGregor DP. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(5):616-619.
250. Gutierrez D, Fernandez L, Rodriguez A, Garcia P. Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon To Kill *Staphylococcus aureus*? *MBio*. 2018;9(1).
251. Czaplowski L, Bax R, Clokie M, y col. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):239-251.
252. Kusuma C, Jadanova A, Chanturiya T, Kokai-Kun JF. Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(2):475-482.
253. Grundling A, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* mutants with increased lysostaphin resistance. *J Bacteriol*. 2006;188(17):6286-6297.
254. Jado I, Lopez R, Garcia E, Fenoll A, Casal J, Garcia P. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(6):967-973.
255. Schmelcher M, Powell AM, Camp MJ, Pohl CS, Donovan DM. Synergistic streptococcal phage lambdaSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(20):8475-8486.
256. Daniel A, Euler C, Collin M, Chahales P, Gorelick KJ, Fischetti VA. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(4):1603-1612.
257. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):1225-1228.
258. Vouillamoz J, Entenza JM, Giddey M, Fischetti VA, Moreillon P, Resch G. Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(5):416-421.
259. Vazquez R, Garcia P. Synergy Between Two Chimeric Lysins to Kill *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2019;10:1251.
260. Rodriguez-Cerrato V, Garcia P, Del Prado G, y col. In vitro interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal),

- cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):1159-1162.
261. Diez-Martinez R, De Paz HD, Garcia-Fernandez E, y col. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1763-1773.
262. Vazquez R, Domenech M, Iglesias-Bexiga M, Menendez M, Garcia P. Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen. *Sci Rep.* 2017;7(1):16506.
263. Letrado P, Corsini B, Diez-Martinez R, Bustamante N, Yuste JE, Garcia P. Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus. *Future Microbiol.* 2018;13:1215-1223.
264. Totté JE, van Doorn MB, Pasmans SG. Successful Treatment of Chronic *Staphylococcus aureus*-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphfect SA.100: A Report of 3 Cases. *Case Rep Dermatol.* 2017;9:19-25.
265. Mao J, Schmelcher M, Harty WJ, Foster-Frey J, Donovan DM. Chimeric Ply187 endolysin kills *Staphylococcus aureus* more effectively than the parental enzyme. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;342(1):30-36.
266. Resch G, Moreillon P, Fischetti VA. A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(6):516-521.
267. Diez-Martinez R, de Paz HD, Bustamante N, Garcia E, Menendez M, Garcia P. Improving the lethal effect of cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5355-5365.
268. Donovan DM, Foster-Frey J. LambdaSa2 prophage endolysin requires Cpl-7-binding domains and amidase-5 domain for antimicrobial lysis of streptococci. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;287(1):22-33.
269. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, y col. Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio.* 2014;5(4):e01379-01314.
270. Schirmeier E, Zimmermann P, Hofmann V, y col. Inhibitory and bactericidal effect of Artilysin((R)) Art-175 against colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(3):528-529.
271. Krishna VD, Wu K, Su D, Cheeran MCJ, Wang JP, Perez A. Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety. *Food Microbiol.* 2018;75:47-54.
272. Jia L. Global Governmental Investment in Nanotechnologies. *Curr Nanosci.* 2005;1(3):263-266.
273. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J.* 2018;26(1):64-70.
274. Dilnawaz F, Acharya S, Sahoo SK. Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. *Int J Pharm.* 2018;538(1-2):263-278.
275. Kim Y, Park EJ, Na DH. Recent progress in dendrimer-based nanomedicine development. *Arch Pharm Res.* 2018;41(6):571-582.
276. Garcia-Gallego S, Franci G, Falanga A, y col. Function Oriented Molecular Design: Dendrimers as Novel Antimicrobials. *Molecules.* 2017;22(10).
277. Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(15):2106-2129.
278. Barnard A, Smith DK. Self-assembled multivalency: dynamic ligand arrays for high-affinity binding. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(27):6572-6581.
279. Tam JP, Lu YA, Yang JL. Antimicrobial dendrimeric peptides. *Eur J Biochem.* 2002;269(3):923-932.

280. Chamorro C, Boerman MA, Arnusch CJ, Breukink E, Pieters RJ. Enhancing membrane disruption by targeting and multivalent presentation of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(9):2171-2174.
281. Nordstrom R, Malmsten M. Delivery systems for antimicrobial peptides. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017;242:17-34.
282. Siriwardena TN, Stach M, He R, y col. Lipidated Peptide Dendrimers Killing Multidrug-Resistant Bacteria. *J Am Chem Soc*. 2018;140(1):423-432.
283. Scorciapino MA, Serra I, Manzo G, Rinaldi AC. Antimicrobial Dendrimeric Peptides: Structure, Activity and New Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).
284. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000;68(10):5690-5695.
285. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1989;57(8):2324-2330.
286. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, y col. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis*. 1995;172(1):119-123.
287. Hirst RA, Gosai B, Rutman A, y col. *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J Infect Dis*. 2008;197(5):744-751.
288. Dalia AB, Weiser JN. Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody. *Cell Host Microbe*. 2011;10(5):486-496.
289. Bustamante N, Campillo NE, Garcia E, y col. Cpl-7, a lysozyme encoded by a pneumococcal bacteriophage with a novel cell wall-binding motif. *J Biol Chem*. 2010;285(43):33184-33196.
290. Bustamante N, Iglesias-Bexiga M, Bernardo-Garcia N, y col. Deciphering how Cpl-7 cell wall-binding repeats recognize the bacterial peptidoglycan. *Sci Rep*. 2017;7(1):16494.
291. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*. 2001;294(5549):2170-2172.
292. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. 2003;71(11):6199-6204.
293. McCullers JA, Karlstrom A, Iverson AR, Loeffler JM, Fischetti VA. Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*. 2007;3(3):e28.
294. Doehn JM, Fischer K, Reppe K, y col. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(9):2111-2117.
295. Domenech M, Garcia E, Moscoso M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4144-4148.
296. Blazquez B, Fresco-Taboada A, Iglesias-Bexiga M, Menendez M, Garcia P. PL3 Amidase, a Tailor-made Lysin Constructed by Domain Shuffling with Potent Killing Activity against Pneumococci and Related Species. *Front Microbiol*. 2016;7:1156.
297. Corsini B, Diez-Martinez R, Aguinagalde L, y col. Chemotherapy with Phage Lysins Reduces Pneumococcal Colonization of the Respiratory Tract. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(6).
298. Briese T, Hakenbeck R. Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem*. 1985;146(2):417-427.
299. Sanz JM, Lopez R, Garcia JL. Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase. A new single-step procedure for purification of this autolysin. *FEBS Lett*. 1988;232(2):308-312.

300. Maestro B, Gonzalez A, Garcia P, Sanz JM. Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. *Febs j.* 2007;274(2):364-376.
301. Silva-Martin N, Retamosa MG, Maestro B, y col. Crystal structures of CbpF complexed with atropine and ipratropium reveal clues for the design of novel antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(1):129-135.
302. de Gracia Retamosa M, Diez-Martinez R, Maestro B, y col. Aromatic Esters of Bicyclic Amines as Antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(46):13673-13677.
303. Cunha BA, Schoch PE, Bottone EJ. *Antibiotic Essentials*. Jones and Bartlett Publishers LLC: Sudbury, MA, USA. 2009.
304. Hernandez-Rocamora VM, Reulen SW, de Waal B, Meijer EW, Sanz JM, Merckx M. Choline dendrimers as generic scaffolds for the non-covalent synthesis of multivalent protein assemblies. *Chem Commun (Camb).* 2011;47(21):5997-5999.
305. Hernandez-Rocamora VM, Maestro B, de Waal B, y col. Multivalent choline dendrimers as potent inhibitors of pneumococcal cell-wall hydrolysis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(5):948-951.
306. Ribes S, Riegelmann J, Redlich S, y col. Multivalent choline dendrimers increase phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* R6 by microglial cells. *Chemotherapy.* 2013;59(2):138-142.
307. Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol.* 1991;219(1):37-44.
308. Brent R, Ptashne M. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(7):4204-4208.
309. Hoskins J, Alborn WE, Jr., Arnold J, y col. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* 2001;183(19):5709-5717.
310. Lopez R, Sanchez-Puelles JM, Garcia E, Garcia JL, Ronda C, Garcia P. Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet.* 1986;204(2):237-242.
311. Domenech M, Araujo-Bazan L, Garcia E, Moscoso M. In vitro biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* as a predictor of post-vaccination emerging serotypes colonizing the human nasopharynx. *Environ Microbiol.* 2014;16(4):1193-1201.
312. Domenech M, Garcia E. N-Acetyl-l-Cysteine and Cysteamine as New Strategies against Mixed Biofilms of Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* and Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(2).
313. Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, y col. Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol.* 2007;189(1):38-51.
314. Ramos-Sevillano E, Moscoso M, Garcia P, Garcia E, Yuste J. Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 2011;6(8):e23626.
315. Ramos-Sevillano. Enfermedad Neumocócica Invasiva: Mecanismos Moleculares de Patogenicidad y Protección. Universidad Complutense de Madrid. 2013.
316. Garcia-Cobos S, Moscoso M, Pumarola F, y col. Frequent carriage of resistance mechanisms to beta-lactams and biofilm formation in *Haemophilus influenzae* causing treatment failure and recurrent otitis media in young children. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(9):2394-2399.
317. Sambrook J, Russell, D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
318. Lacks S, Hotchkiss RD. A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. *Biochim Biophys Acta.* 1960;39:508-518.
319. Fenoll A, Munoz R, Garcia E, de la Campa AG. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F0 complex of

- the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H(+)-ATPases. *Mol Microbiol.* 1994;12(4):587-598.
320. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
321. Pace CN, Scholtz JM. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach.* ed T E Creighton. 1997;2:299-321.
322. Chattopadhyay A, London E. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal Biochem.* 1984;139(2):408-412.
323. Archibald AR, Coapes HE. Bacteriophage SP50 as a marker for cell wall growth in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1976;125(3):1195-1206.
324. Mosser JL, Tomasz A. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem.* 1970;245(2):287-298.
325. Beech JP, Ho BD, Garriss G, Oliveira V, Henriques-Normark B, Tegenfeldt JO. Separation of pathogenic bacteria by chain length. *Anal Chim Acta.* 2018;1000:223-231.
326. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J.* 2000;78(3):1606-1619.
327. Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM, Pelletier SL. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. Harding SE, Rowe AJ, Horton JC, Eds. *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science.* Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1992:90-125
328. Maestro B, Galan B, Alfonso C, Rivas G, Prieto MA, Sanz JM. A new family of intrinsically disordered proteins: structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PLoS One.* 2013;8(2):e56904.
329. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18(15):2714-2723.
330. Pierce B, Tong W, Weng Z. M-ZDOCK: a grid-based approach for Cn symmetric multimer docking. *Bioinformatics.* 2005;21(8):1472-1478.
331. Ortega A, Amoros D, Garcia de la Torre J. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys J.* 2011;101(4):892-898.
332. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845-858.
333. Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1999;38(22):7235-7242.
334. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358(9276):135-138.
335. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macia MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *Apmis.* 2017;125(4):304-319.
336. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-39.
337. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-193.
338. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(2):294-308.
339. Ngo CC, Massa HM, Thornton RB, Cripps AW. Predominant Bacteria Detected from the Middle Ear Fluid of Children Experiencing Otitis Media: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150949.
340. Domenech M, Garcia E. Fluorescence Imaging of *Streptococcus pneumoniae* with the Helix pomatia agglutinin (HPA) As a Potential, Rapid Diagnostic Tool. *Front Microbiol.* 2017;8:1333.

341. WHO, World Health Organization. Leishmaniasis. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Published 2018.
342. Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;170(2):55-64.
343. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1425-1430.
344. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, y col. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-1612.
345. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2876-2890.
346. Fukada H, Sturtevant JM, Quioco FA. Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1983;258(21):13193-13198.
347. Sanz JM, Garcia JL, Laynez J, Usobiaga P, Menendez M. Thermal stability and cooperative domains of CPL1 lysozyme and its NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal modules. Dependence on choline binding. *J Biol Chem*. 1993;268(9):6125-6130.
348. Garcia-Bustos JF, Tomasz A. Teichoic acid-containing muropeptides from *Streptococcus pneumoniae* as substrates for the pneumococcal autolysin. *J Bacteriol*. 1987;169(2):447-453.
349. Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D, y col. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Biochem*. 2012;421(2):657-666.
350. Maestro B, Velasco I, Castillejo I, Arevalo-Rodriguez M, Cebolla A, Sanz JM. Affinity partitioning of proteins tagged with choline-binding modules in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr A*. 2008;1208(1-2):189-196.
351. Tarazona NA, Maestro B, Revelles O, Sanz JM, Prieto MA. Role of leucine zipper-like motifs in the oligomerization of *Pseudomonas putida* phasins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;1863(2):362-370.
352. Marqus S, Pirogova E, Piva TJ. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):24.
353. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751(2):119-139.
354. Wei Y, Thyparambil AA, Latour RA. Protein Helical Structure Determination Using CD Spectroscopy for Solutions with Strong Background Absorbance from 190-230 nm. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1844(12):2331-2337.
355. Honda S, Kobayashi N, Munekata E. Thermodynamics of a beta-hairpin structure: evidence for cooperative formation of folding nucleus. *J Mol Biol*. 2000;295(2):269-278.
356. Santiveri CM, Santoro J, Rico M, Jimenez MA. Thermodynamic analysis of beta-hairpin-forming peptides from the thermal dependence of (1)H NMR chemical shifts. *J Am Chem Soc*. 2002;124(50):14903-14909.
357. Xu Y, Oyola R, Gai F. Infrared study of the stability and folding kinetics of a 15-residue beta-hairpin. *J Am Chem Soc*. 2003;125(50):15388-15394.
358. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Protein Fluorescence 3rd ed; SpringerVerlag: New York. 2006.
359. Johnson WC, Jr. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1988;17:145-166.
360. Turro NJ, Lei, X.-G., Ananthapadmanabhan, K.P. and Aronson, M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS system. *Langmuir*. 1995;11:2525-2533.
361. Samsó M, Daban JR, Hansen S, Jones GR. Evidence for sodium dodecyl sulfate/protein complexes adopting a necklace structure. *Eur J Biochem*. 1995;232(3):818-824.

362. Maestro B, Sanz JM. Extensive unfolding of the C-LytA choline-binding module by submicellar concentrations of sodium dodecyl sulphate. *FEBS Lett.* 2007;581(3):375-381.
363. Ardanuy C, de la Campa AG, García E, y col. Spread of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 8-ST63 Multidrug-Resistant Recombinant Clone, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1848-1856.
364. Neely MN, Pfeifer JD, Caparon M. *Streptococcus-zebrafish* model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun.* 2002;70(7):3904-3914.
365. Benard EL, van der Sar AM, Ellett F, Lieschke GJ, Spaink HP, Meijer AH. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J Vis Exp.* 2012;(61):3781.
366. Soriano F, Cafini F, Aguilar L, y col. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1234-1240.
367. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:357-372.
368. Vandeveldel NM, Tulkens PM, y col. Modulation of the activity of moxifloxacin and solithromycin in an *in vitro* pharmacodynamic model of *Streptococcus pneumoniae* naive and induced biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2015;70(6):1713-1726.
369. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, y col. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006052.
370. Staderini M, Piquero M, Abengozar MA, y col. Structure-activity relationships and mechanistic studies of novel mitochondria-targeted, leishmanicidal derivatives of the 4-aminostyrylquinoline scaffold. *Eur J Med Chem.* 2019;171:38-53.
371. Saugar JM, Delgado J, Hornillos V, y col. Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. *J Med Chem.* 2007;50(24):5994-6003.
372. Yoon HR, Choi H, Choi YA, y col. Fabrication of Oligomeric Avidin Scaffolds for Valency-Controlled Surface Display of Functional Ligands. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018;57(38):12410-12414.
373. Fasting C, Schalley CA, Weber M, y col. Multivalency as a chemical organization and action principle. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(42):10472-10498.
374. Choi S-K. *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications.* Wiley-Interscience: New York (USA)2004.





## VIII. ANEXOS



# **Widening the Antimicrobial Spectrum of Esters of Bicyclic Amines: *In Vitro* Effect on Gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and Gram-negative Non-Typeable *Haemophilus influenzae* biofilms**

Emma Roig-Molina,<sup>a</sup> Mirian Domenech,<sup>b</sup> María de Gracia Retamosa,<sup>a,§</sup>  
Montserrat Nácher-Vázquez,<sup>b</sup> Luis Rivas,<sup>b</sup> Beatriz Maestro,<sup>a</sup>  
Pedro García,<sup>b,c</sup> Ernesto García,<sup>b,c</sup> Jesús M. Sanz<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Avda  
Universidad s/n, Elche-03202, Spain.

<sup>b</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9. 28040-Madrid, Spain

<sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES),  
Ramiro de Maeztu, 9. 28040-Madrid, Spain

<sup>§</sup> Current address: Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-US) and Centro de  
Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Sevilla, Spain

Running Head: EBAs Against Pneumococcal and NTHi Biofilms

\*Address correspondence to Jesús M. Sanz (jmsanz@cib.csic.es). Centro de  
Investigaciones Biológicas, CSIC. c/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040-Madrid, Spain

E.R.-M. and M.D. contributed equally to this work.

## Highlights

- Esters of bicyclic amines (EBAs) destabilize the bacterial membrane
- EBAs trigger the premature autolysis of *Streptococcus pneumoniae* by LytA autolysin
- EBAs disrupt mixed biofilms formed by *S. pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*
- Broad-spectrum effect of EBAs is useful to fight antimicrobial resistance



## Abstract

Antibiotic resistance is a global current threat of increasing importance. Moreover, biofilms represent a medical challenge since the inherent antibiotic resistance of their producers demands the use of high doses of antibiotics over prolonged periods. Frequently, these therapeutic measures fail, contributing to bacterial persistence, therefore demanding the development of novel antimicrobials. Esters of bicyclic amines (EBAs), which are strong inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* growth, were initially designed as inhibitors of pneumococcal choline-binding proteins on the basis of their structural analogy to the choline residues in the cell wall. However, instead of mimicking the characteristic cell chaining phenotype caused by exogenously added choline on planktonic cultures of pneumococcal cells, EBAs showed an unexpected lytic activity. In this work we demonstrate that EBAs display a second, and even more important, function as cell membrane destabilizers. We then assayed the inhibitory and disintegrating activity of these molecules on pneumococcal biofilms. The selected compound (EBA 31) produced the highest effect on *S. pneumoniae* (encapsulated and non-encapsulated) biofilms at very low concentrations. EBA 31 was also effective on mixed biofilms of non-encapsulated *S. pneumoniae* plus non-typeable *Haemophilus influenzae*, two pathogens frequently forming a self-produced biofilm in the human nasopharynx. These results support the role of EBAs as a promising alternative for the development of novel, broad-range antimicrobial drugs encompassing both Gram-positive and Gram-negative pathogens.

**Keywords:** EBAs, broad-spectrum antimicrobials, membrane permeability, mixed biofilms

**Abbreviations:** EBAs, Esters of bicyclic amines; *NTPn* non-typeable (non-encapsulated) pneumococci; *NTHi*, non-typeable *Haemophilus influenzae*.

## 1. INTRODUCTION

Infectious diseases are increasingly more difficult to control due to the global dissemination of antimicrobial (frequently multidrug) resistance (AMR). Nowadays AMR is one of the major threats in human health, aside from the associated social and economic burden. In addition, the effectiveness of antibiotics under clinical use is increasingly threatened by rising resistance and a dearth of new candidates in the pipeline. Among infectious diseases, respiratory pathologies are a leading cause of illness and death in people of all ages. In particular, lower respiratory tract infections are the leading infectious source of death, ranking as the fifth cause of mortality worldwide [1]. Nasopharynx and lungs undergo a constant and essential chemical communication with the local microbiota [2, 3]. In particular, the healthy nasopharynx is colonized by different microorganisms: encapsulated *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) frequently associated with non-typeable (non-encapsulated) pneumococci (NTPn) and with strains of *Streptococcus pseudopneumoniae* and other  $\alpha$ -hemolytic (viridans) streptococci [4], as well as with non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) to form mixed biofilms [5].

*S. pneumoniae* is a leading human pathogen and a major cause of severe disease, including community-acquired pneumonia, bacteremia and meningitis. Colonization begins shortly after birth, and pneumococci are carried asymptotically in the nasopharynx of healthy children [6]. Overall, the mortality rate of pneumococcal infections in the pediatric population is higher than that originated by AIDS, malaria and measles altogether [7]. Moreover, pneumococcal pneumonia caused 55.4% of deaths due to lower respiratory tract infections in all ages, being responsible of more than 1,500,000 deaths worldwide in 2015 [1]. Pneumococcal biofilms in children appear on adenoid and mucosal epithelium with recurrent middle ear infections and otitis media with effusion, and on the sinus mucosa of patients with chronic rhinosinusitis [8].

The Gram-negative NTHi is an opportunistic pathogen that colonizes the nasopharynx of near 80% of humans [9]. Colonization promotes the development of disease and produces bacterial reservoirs which facilitate person-to-person transmission. NTHi is the main bacterial cause of chronic otitis media with effusion, recurrent acute otitis media, and

acute otitis media coursing with treatment failure [10], mostly accompanied by *S. pneumoniae* and, to a lesser extent, by *Moraxella catarrhalis* and other species [10].

AMR is frequently found in diseases due to *S. pneumoniae* and *NTHi* which, as such, have been included by the World Health Organization among the 12 bacterial pathogens prioritized for the critical development of new antibiotics ([http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)). In this sense, our laboratory has proposed the choline-binding proteins (CBPs) from *S. pneumoniae* as new targets in the quest for novel antimicrobials [11-13] to overcome the current resistance threats. CBPs constitute a family of 13–16 members, present in all pneumococcal isolates, which are located at the bacterial cell wall by their specific recognition of choline residues in teichoic and lipoteichoic acids by a choline-binding module (CBM). CBPs play important roles such as adhesion to the host, daughter cell separation, autolysis and release of toxins [14]. Addition of high concentrations of choline to the medium causes the inhibition of those CBPs involved in cell separation upon division, inducing the formation of chains without any apparent loss of cell viability [15, 16]. In the search for choline analogs with higher affinities to CBPs (and therefore lower inhibitory concentrations), we found that esters of bicyclic amines (EBAs) such as atropine and ipratropium behaved as very efficient inhibitors of the enzymatic activity of some CBPs (*i.e.*, LytA, LytC and Pce) *in vitro* [11]. However, when exogenously added to pneumococcal planktonic cultures, EBAs cause cell deformations and lysis instead of the cell chaining phenotype foreseen for a choline analog, as well as a decrease in viability by several orders of magnitude [11, 13]. These observations suggested the existence of a novel antimicrobial mechanism for these compounds.

In this work we have investigated the molecular basis driving the antipneumococcal effect of EBAs. We focused on EBA18, EBA26, EBA27 and EBA31 compounds as the most efficient antipneumococcal molecules in a previous study and, in the particular case of EBA31 assayed *in vivo* in zebrafish models [13]. Our results indicate a membrane-destabilizing effect underlying their lethal activity. This prompted us to assess the inhibitory and/or disintegrating effect *in vitro* of these molecules both on pneumococcal

and mixed *NTPn*–*NTHi* *in vitro* biofilms, the latter accounting for a model of polymicrobial infections [17]. Our results support the notion that EBAs negatively affect biofilms of both Gram-positive and Gram-negative bacteria and may constitute a novel family of broad-range antimicrobials.

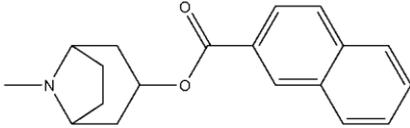
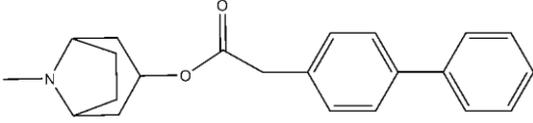
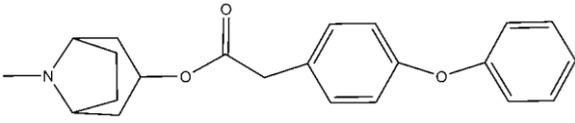
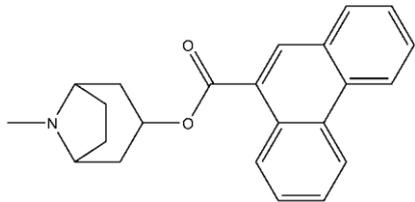
## 2. MATERIALS AND METHODS

**2.1. EBA and chemical reagents.** EBAs were synthesized by the Combinatorial Chemistry Platform in the Barcelona Scientific Park (Spain) as tertiary amines [13] (Table 1). EBA solutions were always freshly prepared in water by obtaining the corresponding hydrochloride. Solid powder was added to a 15 mM HCl aqueous solution to a final concentration of 10 mM, and then subjected to magnetic stirring for 2 hours. All other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated.

### 2.2. Bacterial strains and growth conditions.

Pneumococcal planktonic cultures were grown without aeration in C medium [18] containing potassium phosphate buffer (33 mM, pH 8.0; CpH8 medium) eventually supplemented with 0.8 mg/ml yeast extract (C+Y medium). Optical density at 550 nm ( $OD_{550}$ ) was monitored in a Thermo Spectronic spectrophotometer (Waltham, MA, USA). Pneumococcal biofilms were produced using *S. pneumoniae* strain R6 or *S. pneumoniae* P181, an isogenic serotype 19A transformant of R6 (Table 2). Bacterial strains were grown at 37°C in C+Y medium. Biofilm formation on 96-well polystyrene microtiter plates (Costar 3595; Corning) was obtained as previously described [19, 20]. Briefly, cells were grown in C+Y medium to an  $OD_{550}$  of 0.5–0.6, harvested by centrifugation ( $3800 \times g$ , 4 °C, 10 min), resuspended in an equal volume of fresh C+Y medium, and diluted 1/100; then, 200  $\mu$ l containing  $5 \times 10^6$  colony forming unit (CFU)/ml were dispensed into 96-well polystyrene microtiter plates (Costar 3595; Corning). When glass-bottomed dishes (WillCo-dish; WillCo Wells B.V., The Netherlands) were employed, 2 ml of culture were used per well.

**Table 1** Structure and characteristics of EBAs used in this study<sup>a</sup>

Compound	Chemical structure	log <i>P</i> <sup>b</sup>
18		4.1
26		4.6
27		4.7
31		4.9

<sup>a</sup> EBA identification as previously described [13]. Structures were rendered with ChemDraw 10.0 (CambridgeSoft, U.K.)

<sup>b</sup> Logarithm of estimated partition ratio in octanol:water, calculated using the Molinspiration web utilities (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) (Molinspiration Cheminformatics, Nova Ulica, Slovak Republic)

For the inhibition of biofilm formation, EBAs were added to the bacteria at the beginning of the incubation in the plates or glass-bottom dishes. For dispersal experiments, biofilm formation was allowed for 5 h at 34°C (for R6) or 5 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> (for P181). Planktonically grown cells were aspirated off and the biofilm was rinsed with sterile distilled H<sub>2</sub>O. The resulting biofilms were treated for an additional 1 h at 37°C with various concentrations of EBAs in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9. Controls carried the same volume of buffer instead of EBA solution. The biofilms were then washed twice with sterile distilled H<sub>2</sub>O and disaggregated by gentle pipetting and vortexing [21]. Afterwards, 10-fold dilution series were prepared in phosphate-buffered saline (PBS). The absorbance at 595 nm (*A*<sub>595</sub>) was measured with a VersaMax microplate absorbance reader (Molecular Devices). The quantification of viable cells (planktonic and biofilm cells) was performed in blood agar plates. Colonies were counted after overnight incubation at 37°C. The susceptibility of planktonically grown R6 and P181 cells to the antibacterial agents was determined by the broth microdilution method according to CLSI guidelines [22].

**2.3. Cell permeability assays.** *S. pneumoniae* R6 was grown in C+Y medium at 37°C to an OD<sub>550</sub> of 0.5–0.6, corresponding to approximately 10<sup>8</sup> CFU/ml, while NTHi 54997 was grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in brain-heart infusion medium supplemented with 10 µg/ml each of hemin and NAD (sBHI medium). For both microorganisms the corresponding culture was then sedimented by centrifugation (3800 × g, 4°C, 10 min). Cells were resuspended in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 280 mM sorbitol and SYTOX Green fluorophore (1 µM), to a final cell concentration of 2.5 × 10<sup>7</sup> CFU/ml, and dispensed in 90 µl aliquots in a 96-well Nunc F96 MicroWell black polystyrene plate (Thermo Scientific). The plate was read in a BMG POLARstar Galaxy Microplate Reader (Offenburg, Germany) by monitoring the fluorescence in real time using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. Gain was adjusted using cells incubated with 0.1% Triton X-100 as the maximal value of permeabilization. After a stable basal fluorescence read out was obtained, 10 µl of the corresponding compound were added to each well (EBA stock solution, 1% Triton X-100 for positive control and buffer for the negative control) and incubation proceeded for 2 h. The assay was terminated by addition of 10 µl of 1% Triton X-100 to obtain the respective maximum value for each well. Experiments were performed in triplicate, and the results are expressed in percentage of fluorescence intensity with respect to the value obtained by the late addition of Triton X-100.

Membrane permeability was also assayed using 3,5-dipropylthiacarbocyanine (diSC3-5) (Thermo Fisher). The fluorescence intensity of this probe varies in response to changes in transmembrane potential [32]. Pneumococcal cultures were similarly processed as above, except that cells were resuspended in PBS buffer containing 0.6 µM diSC3-5, and subsequently dispensed in multiwell plates (90 µl) onto which 10 µl of the corresponding compound were added. Fluorescence was measured after a 1h incubation using excitation and emission wavelengths of 622 and 670 nm, respectively. Sodium deoxycholate (DOC) was added at 0.1% final concentration to register the maximum values of fluorescence.

**Table 2.** Bacterial strains used in this study, MICs and Lytic activity of EBA 31

Strain	Characteristics	Reference	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Decrease in OD <sub>550</sub> (%) <sup>b</sup>
<i>S. pneumoniae</i>				
R6	Non-encapsulated strain derived from D39 (Hex <sup>+</sup> , <i>lytA</i> <sup>+</sup> )	[23]	180 (EBA 18); 90 (EBA 26); 90 (EBA 27); 22 (EBA 31)	89
M11	R6 derivative (Hex <sup>-</sup> ; <i>lytA</i> <sup>+</sup> )	[24]		25
M22	M11 derivative (Nov <sup>r</sup> )	[25]		78
M31	M11 derivative (Hex <sup>-</sup> ; $\Delta$ <i>lytA</i> )	[26]		82
R6B	R6 derivative (Hex <sup>+</sup> ; <i>lytB</i> )	[24]		2
R6C	R6 derivative (Hex <sup>+</sup> ; <i>lytC</i> )	[24]		
P046	R6 derivative ( <i>lytA lytC</i> )	[24]		
P181	M11 transformed with 5086 DNA (serotype 19A)	[19]	32 (EBA 31)	
P233	R6 transformed with M22 DNA (Nov <sup>r</sup> )	[27]		
D39	Encapsulated strain (NCTC 07466, serotype 2) ( <i>lytA</i> <sup>+</sup> )	[28]	16 (EBA 31)	82
P095	D39 derivative ( <i>lytA</i> )	[29]		20
P096	D39 derivative ( <i>lytB</i> )	[30]		65
P093	D39 derivative ( <i>lytC</i> )	[30]		85
P139	D39 derivative ( <i>lytA lytC</i> )	[31]		14
P170	D39 derivative ( <i>lytA lytB lytC</i> )	[31]		28
5086	serotype 19A; clinical isolate	[19]		
<i>H. influenzae</i>				
54997	Non-typeable clinical isolate	[27]	63 (EBA 31)	

<sup>a</sup> MICs of the R6 strain were reported in a previous publication [13].

<sup>b</sup> EBA 31 (100  $\mu\text{M}$  final concentration) was added to exponentially growing cultures of the indicated strains. Decrease in OD<sub>550</sub> compared with an untreated control of the corresponding strain after 4 h incubation at 37°C. Values are the average of three determinations.

**2.4. Mixed biofilm formation assay and quantification, susceptibility testing and antibiofilm therapy.** The bacterial strains used for mixed biofilms were *NTHi* 54997 and the novobiocin-resistant (Nov<sup>r</sup>) *NTPn* P233 (Table 2). Biofilm formation was assessed with crystal violet [27]. *NTHi* 54997 was grown at 37°C in sBHI medium as described above to an OD<sub>550</sub> of 0.5, sedimented by centrifugation, resuspended in an equal volume of C+Y medium supplemented with hemin and NAD (15 µg/ml each) [s(C+Y) medium], and diluted 100-fold. *NTPn* P233 was grown at 37°C in C+Y medium to the same OD<sub>550</sub>, sedimented by centrifugation, resuspended in an equal volume of s(C+Y), and diluted 100-fold. Inocula of  $5 \times 10^6$  to  $7 \times 10^6$  CFU of each strain were dispensed into 96-well polystyrene microtiter plates (Costar 3595; Corning) (final volume of 200 µl) and glass-bottomed dishes (WillCo-dish; WillCo Wells B.V., The Netherlands) (final volume of 2 ml). For the inhibition of biofilm formation, EBA 31 was added to the bacteria at the beginning of the incubation. For dispersal of biofilms, biofilm formation was allowed for 5 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, then the planktonic, non-adherent cells were removed by aspiration and the biofilm was rinsed with sterile distilled H<sub>2</sub>O. The resulting biofilms were treated with various concentrations of EBA 31 in 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 for 1 additional hour at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Controls were run with the same amount of buffer without EBA. The biofilms were then washed twice with sterile distilled H<sub>2</sub>O, disaggregated as above, and viable cells (planktonic and biofilm cells) quantified in blood agar plates containing novobiocin (10 µg/ml) for *NTPn* and chocolate agar plates supplemented with 0.16 µg/ml ampicillin for *NTHi*. Colonies were counted after overnight incubation at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

**2.5. Microscopic observation of biofilms and staining with HPA.** For the observation of biofilms at the confocal laser scanning microscope (CLSM), biofilms were grown on glass-bottomed dishes (WillCo-dish; WillCo Wells B.V., The Netherlands) for 5–6 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation with EBAs, the culture medium was removed and the biofilm rinsed with sterile water to remove non-adherent bacteria. The biofilms were then stained with HPA conjugated to Alexa Fluor 488 (25 µg/ml), the *BacLight* LIVE/DEAD bacterial viability kit, or SYTO 59; all staining procedures involved

incubation for 10–20 min at room temperature in the dark. After staining, biofilms were gently rinsed with 0.5 ml of PBS. CLSM observations were made at a magnification of 63× with a Leica TCS-SP2-AOBS-UV microscope equipped with an argon ion laser. Images were analyzed with LCS software from Leica. Projections were obtained in the  $x$ – $y$  (individual scans at 0.5  $\mu\text{m}$  intervals) and  $x$ – $z$  (images at 6  $\mu\text{m}$  intervals) planes.

### 3. RESULTS

**3.1. Membrane destabilization by EBAs.** As stated above, EBAs show a lytic effect when added to a pneumococcal planktonic culture [11, 13], contrary to the typical cell chaining phenotype induced by standard choline analogs. In an attempt to identify whether CBPs having cell wall hydrolase activity were involved in this process, EBA 31 (the most efficient EBA tested so far) [13] was added to cultures of *S. pneumoniae* R6 or D39 strains deficient in at least one peptidoglycan hydrolase, namely LytA, LytB, and LytC (Table 2). Of note, bacterial lysis by EBAs only decreased significantly in LytA-deficient mutants, suggesting the active involvement of this autolysin in the lysis induced by EBAs. Moreover, the simultaneous presence of choline chloride (150 mM) in the R6 and D39 cultures led to a substantial reduction of EBA-induced bacterial lysis along with a significant recovery of viability (Table 3), compatible with the partial inhibition of the LytA activity [15, 16]. To check whether EBAs might induce the release of cytoplasmic LytA by promoting its translocation across the membrane, cell permeability in EBA-treated pneumococci was analyzed using the entrance of the SYTOX Green vital dye (Fig. 1). All EBAs tested (Table 1) destabilized the *S. pneumoniae* membrane to permeability levels close to those caused by the Triton X-100 detergent, being EBA 31 the compound with the fastest kinetics (Fig. 1). To further confirm the effect EBAs on the cell membrane, experiments were carried out using the fluorescent compound diSC3-5, a probe of the polarization state of the membrane [32]. Figure 1B shows that addition of EBAs causes a significant change in the fluorescence of the probe, indicative of a high degree of membrane depolarization (around 50%) with respect to the addition of sodium deoxycholate (DOC).

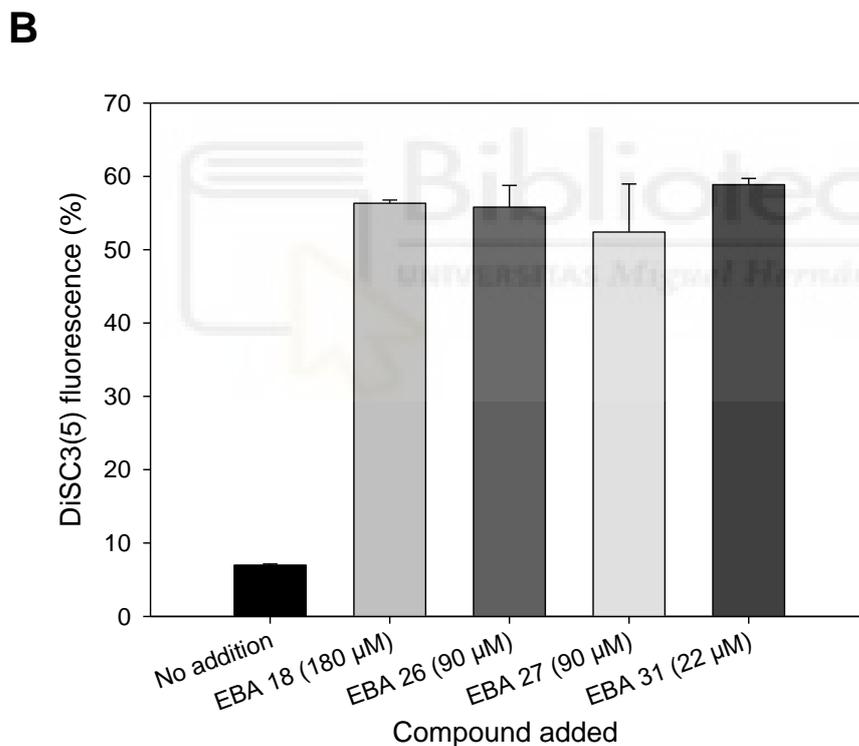
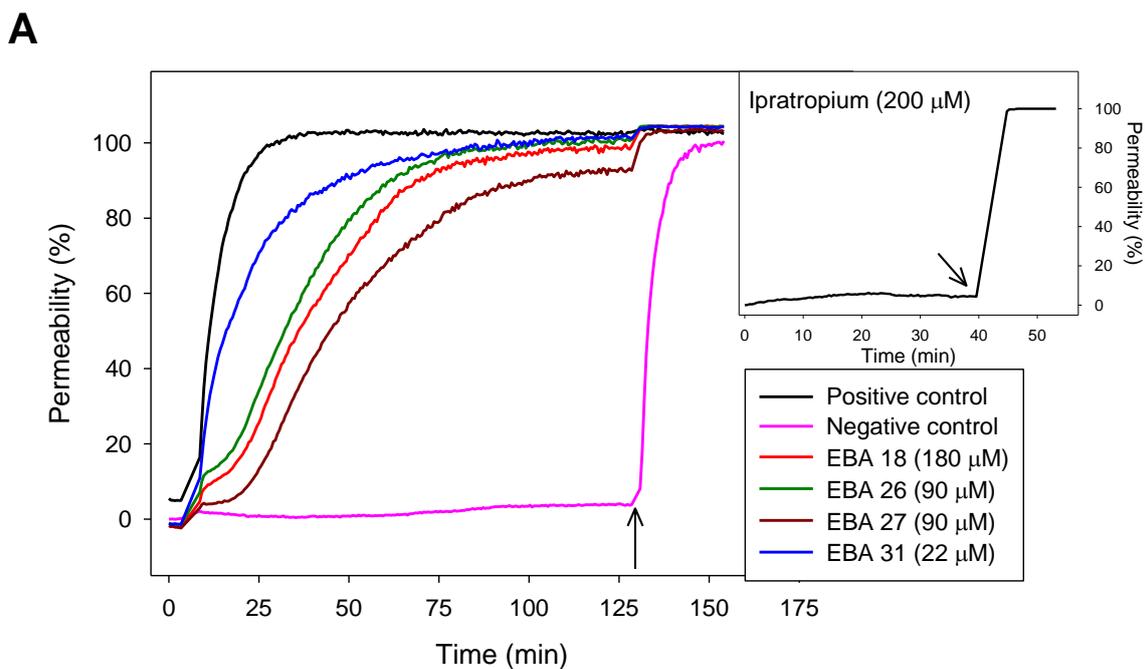
These results corroborate an additional activity of EBAs on membrane permeability besides the already described binding and inhibition of CBPs.

**Table 3.** Effect of choline chloride on the antimicrobial activity of EBA 31<sup>a</sup>

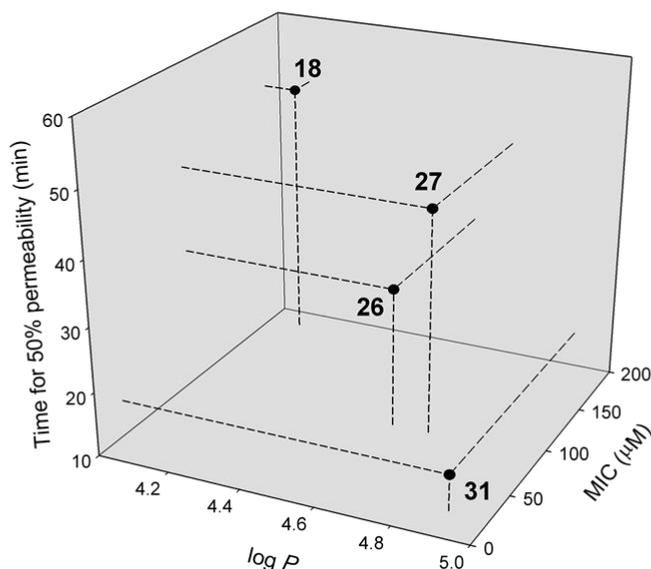
Addition	Decrease in OD <sub>550</sub> with respect to control (%)		Cell viability with respect to control (%)	
	R6	D39	R6	D39
None	89	82	< 0.001	< 0.001
Choline chloride	27	37	2.4	0.1

<sup>a</sup> Exponentially growing cultures of the *NTPn* strain R6 received EBA 31 at 0.1 mM (final concentration). Another part of the culture was left untreated (control). Half of the treated culture also received choline chloride (at 143 mM final concentration) and bacteria were incubated for 4 h at 37°C. The values of OD<sub>600</sub> and bacterial viability were recorded at the beginning and at the end of the experiment. Values are the average of three independent experiments.

The chemical features of EBAs are key to explain this effect, as these molecules contain a polar moiety (harboring a tertiary amine group) esterified to a highly hydrophobic, polycyclic, aromatic structure (Table 1), prone to insertion into biological membranes. In fact, Fig. 2 shows the correlation between the physico-chemical features of tested EBAs and their antimicrobial effect on pneumococcus: the higher the hydrophobicity of the aromatic moiety (as reflected by the log *P* parameter, see Table 1), the faster kinetics on induction of membrane permeability (arbitrarily represented as the time needed to achieve 50% of maximum permeability) and the lower MIC values are displayed. In this sense, EBA 31 proved to be the optimal compound. The observed correlation between non-polarity and antibacterial performance also explains why quaternary ammonium EBAs (*i.e.*, derivatives of ipratropium), which bear a permanent positive charge, are much less efficient in triggering pneumococcal lysis than their less polar, tertiary amine counterparts, such as the EBAs tested in this study [13]. Accordingly, Figure 1 (inset) shows that addition of ipratropium (with an estimated log *P* of -1.4) to a concentration up to 200 μM barely induced any changes in membrane permeability even after a 40 min incubation.

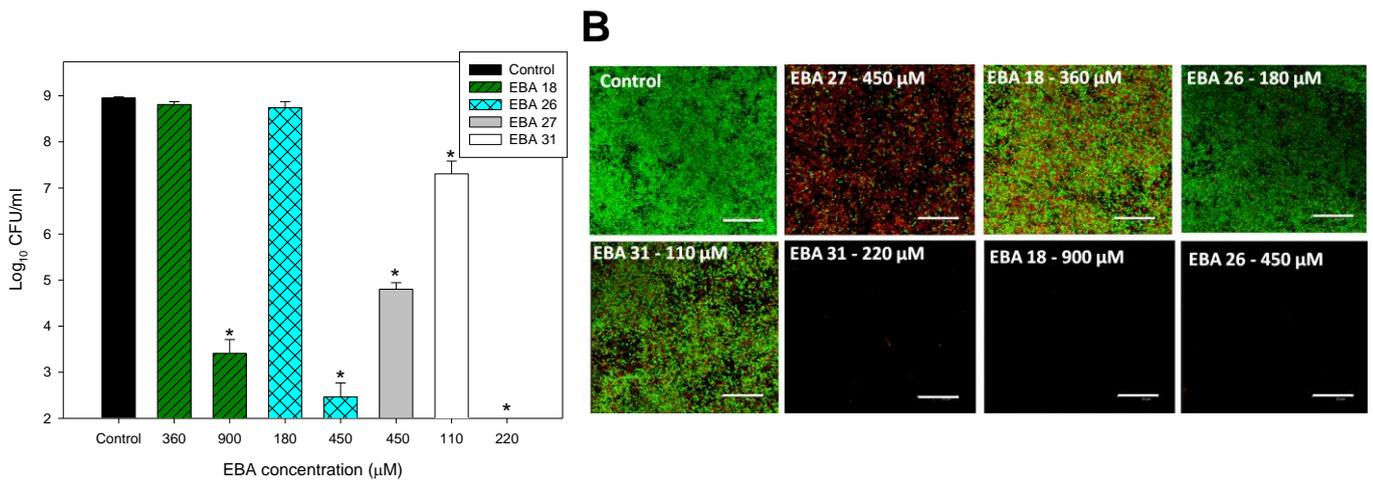


**Figure 1. A,** Evaluation of permeability of pneumococcal cells. *S. pneumoniae* R6 cells were incubated in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 280 mM sorbitol. Positive control: Triton X-100 was added at 0.1% (final concentration); negative control: only buffer added. EBAs were assayed at their respective MICs. *Inset:* Incubation with 200  $\mu\text{M}$  ipratropium bromide. Arrows indicate addition of 0.1% Triton X-100 to all samples. **B,** Depolarization of the pneumococcal membrane monitored by diSC3-5 fluorescence assays. *S. pneumoniae* R6 cells were incubated in PBS buffer. Fluorescence is related to the maximum values obtained after addition of 0.1% DOC; negative control: only buffer added. EBAs were assayed at their respective MICs.



**Figure 2.** Correlation between biochemical and microbiological features of EBAs. Three-dimensional plot representing the log  $P$  parameter, MICs in planktonic pneumococcal R6 cultures and time needed to reach 50% of total membrane permeability.

**3.2. Effect of selected EBAs on pneumococcal biofilms.** It has been previously reported that addition of choline chloride to pneumococcal cultures inhibit the formation of biofilms by blocking and/or releasing CBPs from the cell wall, without affecting the viability of the residual cells in the biofilm [24]. However, in our case, the existence of a second, membrane-destabilizing mechanism by EBAs (that is more biologically relevant than their choline-like CBP-inhibiting activity) prompted us to assay their antimicrobial effect on these biofilms. Biofilm formation by the non-encapsulated strain *S. pneumoniae* R6 was strongly inhibited upon addition of EBAs to the cultures at concentrations close to their corresponding MICs (data not shown). Moreover, the capacity of EBAs to cause biofilm disintegration was tested by monitoring both the structure of the biofilm — using CLSM — and the viability of the remaining cells. A disruption effect on the biofilm of *S. pneumoniae* R6 was observed in all cases, being EBA 31 the most effective compound (Fig. 3A). Furthermore, the membrane of non-dispersed cells was severely compromised upon incubation with EBAs (Fig. 3B), in line with the perturbation mechanism observed *in vitro* for these compounds (Fig. 1).

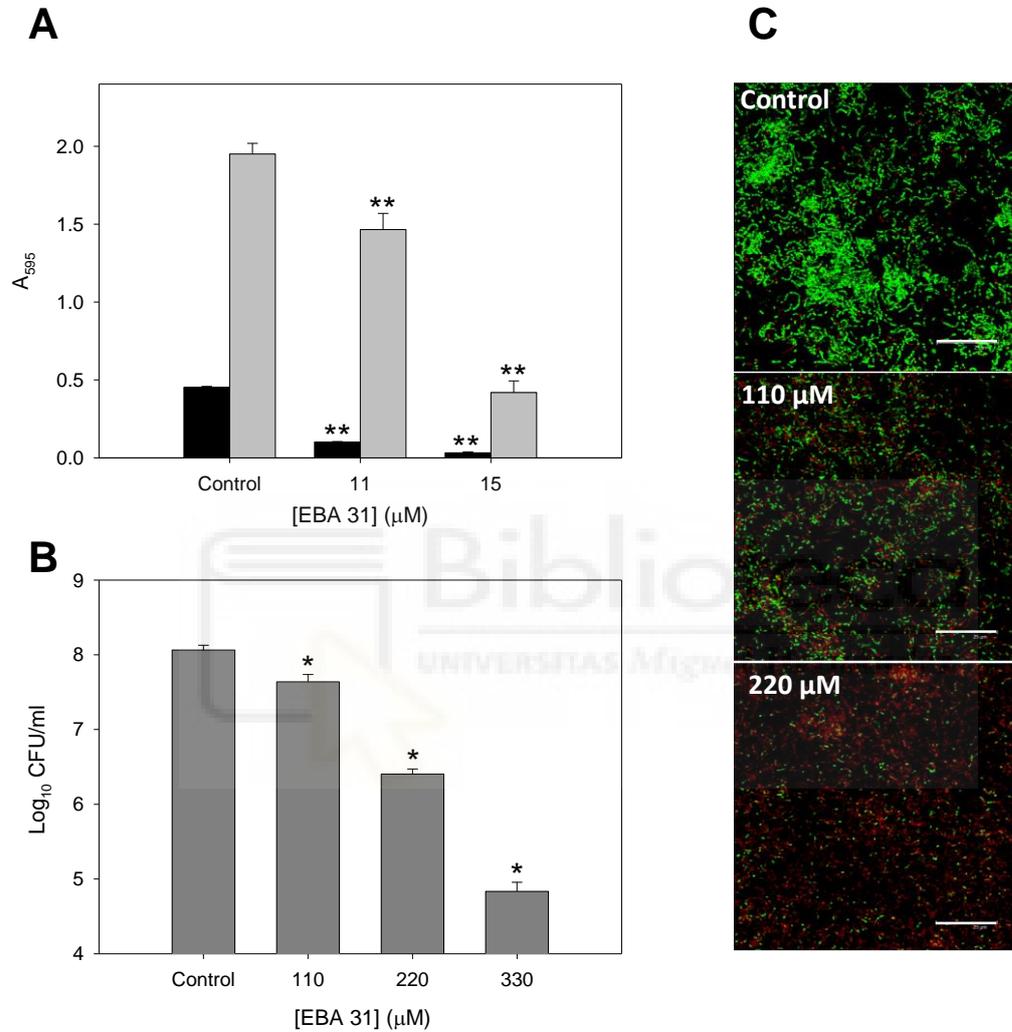


**Figure 3.** Disintegration of NTPn R6 biofilms. Biofilms were incubated with EBAs at 37°C for 1 h. Controls included biofilms incubated for 1 h in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9). **A.** The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least three independent experiments, each performed in triplicate. Error bars represent the standard error. Asterisks-marked results are statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared to the control. **B.** CLSM of biofilm-grown *S. pneumoniae* R6 treated with EBAs, for 1 h at 37°C. Biofilms were stained with the BacLight kit. Scale bars, 25  $\mu$ m.

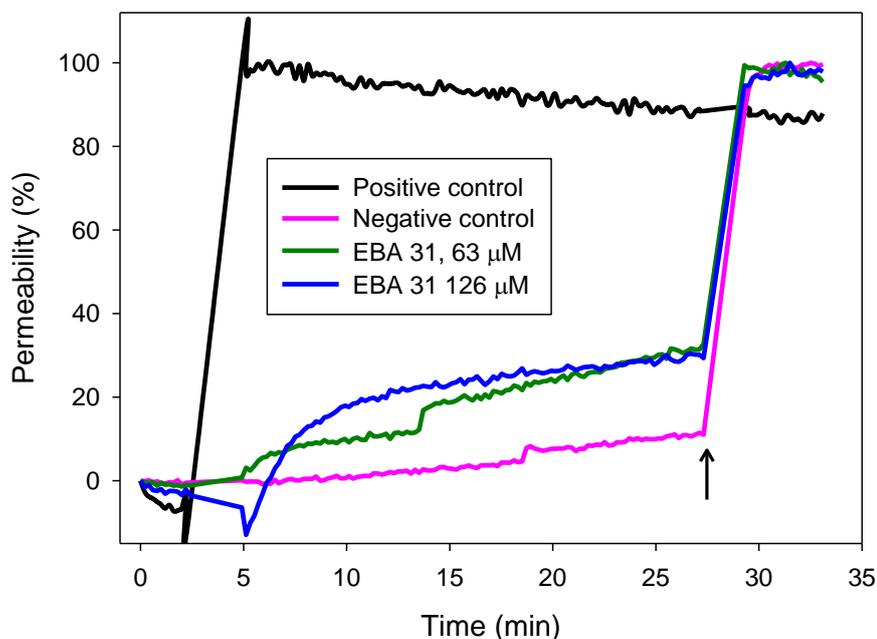
The effect of the EBA 31 was further tested using biofilms formed by an encapsulated *S. pneumoniae* strain. Serotype 19A was chosen since it is still a frequent cause of severe disease despite being included in the current conjugate vaccines and, in addition, its capsular polysaccharides allow significant biofilm formation under *in vitro* conditions [19]. Addition of EBA 31 at concentrations around the MIC (Table 2), inhibited biofilm formation by *S. pneumoniae* P181 (Fig. 4A), and also disintegrated the biofilm formed by this encapsulated strain (Figs. 4B and 4C), although the decrease in viability was lower than on R6 (Fig. 3). In any case, the induction of a structurally compromised cell membrane was also detected in this strain (Fig. 4C).

**3.3. Effect of EBA 31 in mixed NTPn–NTHi biofilms.** After demonstrating the effectivity of EBAs to prevent and eliminate the biofilm of encapsulated and non-encapsulated pneumococcal strains, we explored whether this antimicrobial activity might be expanded to Gram-negative organisms such as NTHi. A MIC value of 63  $\mu$ M was obtained for planktonic cultures of NTHi 54997 (Table 2), demonstrating the effectivity of EBAs against this microorganism. Moreover, EBA31 induced an increase in the NTHi inner membrane permeability similar to NTPn, although with a less marked effect (Fig. 5).

In any case, this result suggests a similar bactericidal mechanism for the two organisms, which is probably exacerbated in *S. pneumoniae* due to the additional participation of the LytA autolysin (see above).



**Figure 4.** Effect of EBA 31 on biofilms formed by the encapsulated *S. pneumoniae* P181 strain. **A.** Inhibition of biofilm formation. *S. pneumoniae* P181 was distributed in the wells of a microtiter plate, which was then incubated for 5 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in the presence of EBA 31. Black and grey bars indicate growth and biofilm formation respectively. **B.** Disaggregation of biofilms. Cells growing as biofilms were incubated with EBA 31 at 37°C for 1 h under 5% CO<sub>2</sub>. The results represent the mean ± standard error of at least three independent experiments, each performed in triplicate. Error bars represent the standard error. Asterisks-marked results are statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ) compared to the control. **C.** CLSM of biofilm-grown *S. pneumoniae* P181 treated with EBA 31, for 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Biofilms were stained with the BacLight kit. Scale bars, 25 μm.

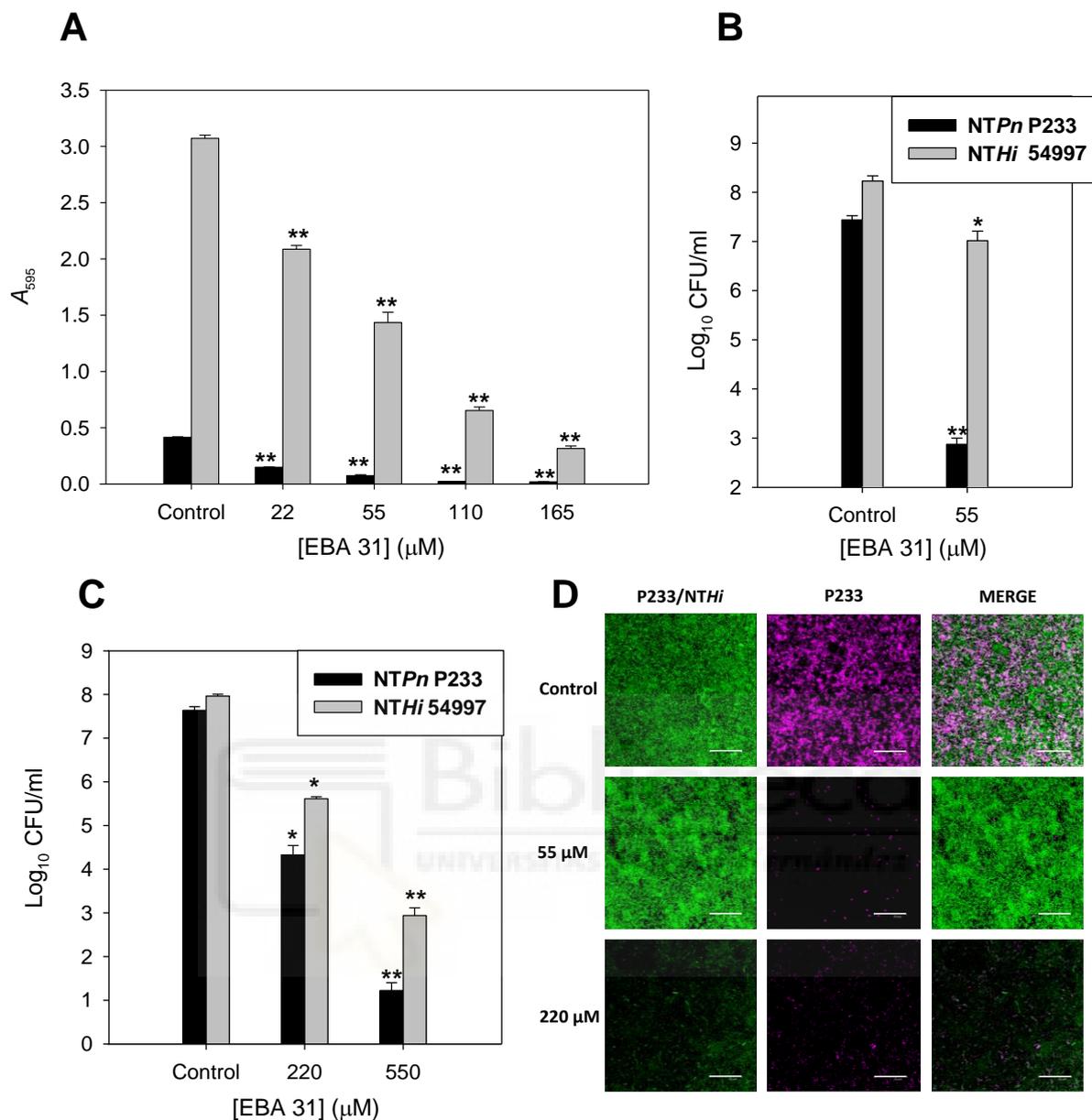


**Figure 5.** Evaluation of permeability of *H. influenzae* cells. NTHi 54997 cells were incubated in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 280 mM sorbitol. Positive control: Triton X-100 was added at 0.1% (final concentration); negative control: only buffer added. EBA31 was assayed at 1× MIC (63 μM) and 2× MIC (126 μM). Arrow indicates addition of 0.1% Triton X-100 to all samples.

The effect of EBA 31 on NTPn P233 and mixed NTPn P233–NTHi 54997 biofilms was then examined. A significant reduction was observed in the formation of mixed biofilms at concentrations around the respective MICs (Table 2, Fig. 6A): EBA 31 at 55 μM was sufficient to completely inhibit the formation of the biofilm generated by *S. pneumoniae* P233, whereas the cell viability of NTHi 54997 in mixed biofilms decreased in more than 90% (Fig. 6B). EBA 31 also showed a disintegrating and bactericidal effect on mixed biofilms. Incubation of preformed NTPn P233–NTHi 54997 biofilms with this compound at 220 μM caused reductions in the viability of 2 and 3 log units for NTHi 54997 and NTPn P233 strain respectively, whereas at 550 μM, EBA 31 increased cell death in both cases, with practical eradication of the population (Fig. 6C). Figure 6D shows the distribution of the populations that form the biofilm using SYTO 59 together with the *Helix pomatia* agglutinin HPA, which recognizes the αGlcNAc residues of the cell wall teichoic and lipoteichoic acids of *S. pneumoniae* [27, 33]. Moderate concentrations of EBA 31 (55 μM) caused the selective eradication of *S. pneumoniae*, whereas higher concentrations (220 μM) exerted a clear bactericidal effect on both species.

#### 4. DISCUSSION

AMR is considered by WHO as one of the most serious concerns for global health (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>). This situation has promoted the search for alternatives to the antibiotics currently in use. In this sense, previous results of our group identified a novel type of molecules, namely esters of bicyclic amines (EBAs) as efficient antipneumococcal compounds capable of arresting bacterial growth and of conferring protection from infection in zebrafish models with MICs at the micromolar range [13], similar to other antibiotics. However, although EBAs were initially designed as pneumococcal CBP inhibitors to induce a cell chaining phenotype (and, indeed, they demonstrate a specific inhibition of the LytA autolysin *in vitro* [13]), here they are instead responsible of bacterial lysis with a prominent involvement of LytA, according to the results obtained from mutants deficient in one or more CBP cell-wall hydrolases (Table 2). This apparent paradox suggested an alternative antibacterial mechanism by EBAs to be elucidated. The increase in pneumococcal cell permeability by EBAs (Fig. 1) points to a membrane disruption activity closely related to the hydrophobic nature and dimension of their respective polycyclic, aromatic moieties (Fig. 2). The extent of membrane damage probably allows the uncontrolled release of cytoplasmic LytA and the triggering of the premature autolysis of the culture. This hypothesis would explain that the membrane-destabilizing mechanism induced by EBAs is predominant over any theoretical inhibition of LytA by the compounds. In fact, 100  $\mu$ M EBA 31 is needed to account for 50% inhibition of LytA *in vitro* [13], whereas as low as 22  $\mu$ M (the MIC), is sufficient to display a clear bactericidal effect. All these results prompted us to test the effect of EBAs on pneumococcal biofilms.



**Figure 6.** Effect of EBA 31 on mixed *NTPn* P233–*NTHi* 54997 biofilms. **A.** EBA 31 was added to the initial biofilm at the indicated concentrations and incubated for 6 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> to allow formation of the biofilm. Black and grey bars indicate growth and biofilm formation respectively. **B.** Inhibition of mixed biofilm formation. Cell viability from the mixed biofilm in the presence of EBA 31 (55  $\mu\text{M}$ ) is indicated. The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least 3 independent experiments, each performed in triplicate. Asterisks-marked results are statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ) compared to the control. **C.** Disintegration of mixed biofilms. Cell viability is displayed after incubating the biofilm in the presence of 220 or 550  $\mu\text{M}$  of EBA 31 for 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least 3 independent experiments, each performed in triplicate. Asterisks-marked results are statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ) compared to the control. **D.** CLSM image of the distribution of the populations in mixed *NTPn*–*NTHi* biofilms. The mixed biofilms were stained with a combination of SYTO 59 (green) and HPA lectin conjugated with Alexa Fluor 488 (pink). *First row:* untreated control; *Second row,* inhibition of biofilm formation by EBA 31 (55  $\mu\text{M}$ ). The compound was added to the culture at the beginning of the biofilm formation and incubated for 6 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. *Third row,* disruption of biofilm by EBA 31 (220  $\mu\text{M}$ ). Magnification bar = 25  $\mu\text{m}$ .

A biofilm is the natural form of growth for many bacterial species. Moreover it is believed that more than 60% of human bacterial infections, and up to 80% of those that become chronic, involve microbial growth in biofilms [34]. The medical importance of biofilms lies in the significant decrease of antibiotic susceptibility under this type of growth [35]. In fact, antibiotic-susceptible strains form thicker biofilms than resistant ones [36], and the antibiotic concentrations needed to eradicate biofilm-forming bacteria can be up to 1,000 times higher than those required to eliminate planktonic microorganisms [37]. In an interesting, related study, Vandeveldel *et al* [38] have previously reported the effect of ipratropium as a disassembling agent *in vitro* for aged pneumococcal biofilms, although no molecular mechanism was detailed for this event and no significant effect on cellular viability was detected either unless employed in cooperation with other antibiotics. Lack of bactericidal effect in this case could be due, at least in part, to the low concentrations of ipratropium used by these authors (around 4  $\mu\text{M}$ ), which are unable to induce appreciable changes in planktonic cell viability [11] and/or in membrane permeability (no detected effect at 200  $\mu\text{M}$  - see Fig. 1, inset), as well as/or to the different protocols followed for biofilm formation. Rather, in the present study we have focused on tertiary amine, polyaromatic EBAs due to their most efficient antipneumococcal activity on planktonic cultures [13]. Tested EBAs were capable of inhibiting and disintegrating biofilms formed by the NTPn R6 strain (Fig. 3), as well as those of an isogenic R6 transformant expressing the 19A capsular polysaccharide (Fig. 4), causing a strong perturbation of the cell membrane (according to the *BacLight* staining procedure) concomitant with a decrease in viability, although we cannot rule out the possibility that EBAs also negatively affect biofilm structure by displacing some pneumococcal CBPs from the cell wall and/or the biofilm extracellular space [24, 39, 40].

The promising results with pneumococcal biofilms, together with the unveiled membrane-destabilizing mechanism of EBAs, prompted us to check the effect of these molecules on the Gram-negative pathogen *H. influenzae*. In fact, *S. pneumoniae* and NTHi are the predominant otopathogens associated with otitis media as identified through bacterial culture [10] and frequently form mixed biofilms. Taking advantage of the *in vitro*

mixed NTP*n*–NTH*i* biofilm development procedure recently developed [27], we tested the antimicrobial effect of EBA 31 and showed that this compound also demonstrated inhibiting and disintegrating properties in this system (Fig. 6). Although the bactericidal effect of EBA 31 was higher for *S. pneumoniae* than for *H. influenzae* cells, it should be remarked that the EBAs tested in this study derive from a screening process strictly based on antipneumococcal properties [11, 13], and that pneumococcal lysis is boosted by the release of the LytA autolysin (Table 2), whereas it is likely that effects on NTH*i* arise basically from membrane perturbation effects (Fig. 5).

## 5. CONCLUSIONS

We show here the existence of a second mechanism governing the antimicrobial activity of EBAs based on the severe destabilization of the bacterial cell membrane, leading, in the case of *S. pneumoniae*, to premature autolysis. Moreover, EBAs inhibit and disintegrate monospecies biofilms formed by pneumococci, as well as mixed NTP*n*–NTH*i* systems. These results broaden the potential application of EBAs as antimicrobials targeted both to Gram-positive and Gram-negative microorganisms, and pave the way for the rational design of new variants with enhanced membrane-inserting, and therefore antimicrobial, properties.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. T. Seisdedos and G. Elvira for their help with CLSM, and S. Ruiz and M. Garzón for skillful technical assistance.

Funding: this work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BIO2013-47684-R, BIO2016-79323-R and SAF2017-88664-R), and the RETICS-FEDER RICET RD16/0027/0010. The CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) is an initiative of the Spanish Instituto de Salud Carlos III.

## REFERENCES

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaborators, Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet Infect. Dis.*, 17 (2017) 1133-1161.
- [2] M.R. Redinbo, The microbiota, chemical symbiosis, and human disease, *J. Mol. Biol.*, 426 (2014) 3877-3891.
- [3] Y. Belkaid, T.W. Hand, Role of the microbiota in immunity and inflammation, *Cell*, 157 (2014) 121-141.
- [4] C.D. Doern, C.A. Burnham, It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations, *J. Clin. Microbiol.*, 48 (2010) 3829-3835.
- [5] A. Tikhomirova, S.P. Kidd, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm, *Pathog. Dis.*, 69 (2013) 114-126.
- [6] J.N. Weiser, The pneumococcus: why a commensal misbehaves, *J. Mol. Med. (Berl.)* 88 (2010) 97-102.
- [7] I. Rudan, K.L. O'Brien, H. Nair, L. Liu, E. Theodoratou, S. Qazi, I. Luksic, C.L. Fischer Walker, R.E. Black, H. Campbell, G. Child Health Epidemiology Reference, Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries, *J Glob Health*, 3 (2013) 010401.
- [8] M. Domenech, E. García, M. Moscoso, Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*, *Microb. Biotechnol.* 5 (2012) 455-465.
- [9] A.R. Foxwell, J.M. Kyd, A.W. Cripps, Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 294-308.
- [10] C.C. Ngo, H.M. Massa, R.B. Thornton, A.W. Cripps, Predominant bacteria detected from the middle ear fluid of children experiencing otitis media: a systematic review, *PLoS One*, 11 (2016) e0150949.
- [11] B. Maestro, A. González, P. García, J.M. Sanz, Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines, *FEBS J.* 274 (2007) 364-376.
- [12] N. Silva-Martín, M.G. Retamosa, B. Maestro, S.G. Bartual, M.J. Rodes, P. García, J.M. Sanz, J.A. Hermoso, Crystal structures of CbpF complexed with atropine and ipratropium reveal clues for the design of novel antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2014) 129-135.
- [13] M.G. Retamosa, R. Diez-Martinez, B. Maestro, E. García-Fernández, B. de Waal, E.W. Meijer, P. García, J.M. Sanz, Aromatic esters of bicyclic amines as antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 54 (2015) 13673-13677.

- [14] B. Maestro, J.M. Sanz, Choline binding proteins from *Streptococcus pneumoniae*: a dual role as enzybiotics and targets for the design of new antimicrobials, *Antibiotics (Basel)* 5 (2016) 21.
- [15] T. Briese, R. Hakenbeck, Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline, *Eur. J. Biochem.* 146 (1985) 417-427.
- [16] S. Giudicelli, A. Tomasz, Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation, *J. Bacteriol.* 158 (1984) 1188-1190.
- [17] T. Bjarnsholt, The role of bacterial biofilms in chronic infections, *APMIS* 121 (2013) 1-51.
- [18] S. Lacks, R.D. Hotchkiss, A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 508-518.
- [19] M. Domenech, L. Araújo-Bazán, E. García, M. Moscoso, *In vitro* biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* as a predictor of post-vaccination emerging serotypes colonizing the human nasopharynx, *Environ. Microbiol.* 16 (2014) 1193-1201.
- [20] M. Domenech, E. García, M. Moscoso, Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*, *Environ. Microbiol.* 11 (2009) 2542-2555.
- [21] M. Domenech, E. Ramos-Sevillano, E. García, M. Moscoso, J. Yuste, Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* 81 (2013) 2606-2615.
- [22] CaLSI, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard-ninth edition: M07-A9 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 19087, USA, 2012.
- [23] J. Hoskins, W.E. Alborn, Jr., J. Arnold, L.C. Blaszcak, S. Burgett, B.S. DeHoff, S.T. Estrem, L. Fritz, D.J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J.S. Glass, H. Khoja, A.R. Kraft, R.E. Lagace, D.J. LeBlanc, L.N. Lee, E.J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S.M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C.W. Mundy, T.I. Nicas, F.H. Norris, M. O'Gara, R.B. Peery, G.T. Robertson, P. Rockey, P.M. Sun, M.E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C.A. Zook, R.H. Baltz, S.R. Jaskunas, P.R. Rosteck, Jr., P.L. Skatrud, J.I. Glass, Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5709-5717.
- [24] M. Moscoso, E. García, R. López, Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 7785-7795.
- [25] C. Ronda, J.L. García, R. López, Characterization of genetic transformation in *Streptococcus oralis* NCTC 11427: expression of the pneumococcal amidase in *S. oralis* using a new shuttle vector, *Mol. Gen. Genet.* 215 (1988) 53-57.
- [26] J.M. Sanchez-Puelles, C. Ronda, J.L. García, P. García, R. López, E. García, Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene, *Eur. J. Biochem.* 158 (1986) 289-293.
- [27] M. Domenech, E. García, N-acetyl-L-cysteine and cysteamine as new strategies against mixed biofilms of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017), e01992-16.

- [28] J.A. Lanie, W.L. Ng, K.M. Kazmierczak, T.M. Andrzejewski, T.M. Davidsen, K.J. Wayne, H. Tettelin, J.I. Glass, M.E. Winkler, Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 38-51.
- [29] E. Ramos-Sevillano, A. Urzainqui, S. Campuzano, M. Moscoso, F. Gonzalez-Camacho, M. Domenech, S. Rodríguez de Córdoba, F. Sánchez-Madrid, J.S. Brown, E. García, J. Yuste, Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response, *Infect. Immun.* 83 (2015) 591-603.
- [30] E. Ramos-Sevillano, M. Moscoso, P. García, E. García, J. Yuste, Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*, *PLoS One*, 6 (2011) e23626.
- [31] E. Ramos-Sevillano, Enfermedad neumocócica invasiva: mecanismos moleculares de patogenicidad y protección. Ph. D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid (2013).
- [32] M. Wu, E. Maier, R. Benz, R.E. Hancock, Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 38 (1999) 7235-7242.
- [33] M. Domenech, E. García, Fluorescence imaging of *Streptococcus pneumoniae* with the *Helix pomatia* agglutinin (HPA) as a potential, rapid diagnostic tool, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1333.
- [34] R.D. Wolcott, G.D. Ehrlich, Biofilms and chronic infections, *JAMA*, 299 (2008) 2682-2684.
- [35] K. Lewis, Persister cells, *Annu. Rev. Microbiol.* 64 (2010) 357-372.
- [36] R. Camilli, A. Pantosti, L. Baldassarri, Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30 (2011) 97-102.
- [37] R.M. Donlan, J.W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 167-193.
- [38] N.M. Vandeveld, P.M. Tulkens, G.G. Muccioli, F. Van Bambeke, Modulation of the activity of moxifloxacin and solithromycin in an *in vitro* pharmacodynamic model of *Streptococcus pneumoniae* naive and induced biofilms, *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (2015) 1713-1726.
- [39] M. Domenech, E. García, A. Prieto, M. Moscoso, Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms, *Environ. Microbiol.* 15 (2013) 502-516.
- [40] M. Domenech, S. Ruiz, M. Moscoso, E. García, *In vitro* biofilm development of *Streptococcus pneumoniae* and formation of choline-binding protein-DNA complexes, *Environ. Microbiol. Rep.* 7 (2015) 715-727.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. A,** Evaluation of permeability of pneumococcal cells. *S. pneumoniae* R6 cells were incubated in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 280 mM sorbitol. Positive control: Triton X-100 was added at 0.1% (final concentration); negative control: only buffer added. EBAs were assayed at their respective MICs. *Inset:* Incubation with 200  $\mu$ M ipratropium bromide. Arrows indicate addition of 0.1% Triton X-100 to all samples. **B,** Depolarization of the pneumococcal membrane monitored by diSC3-5 fluorescence assays. *S. pneumoniae* R6 cells were incubated in PBS buffer. Fluorescence is related to the maximum values obtained after addition of 0.1% DOC; negative control: only buffer added. EBAs were assayed at their respective MICs

**Figure 2.** Correlation between biochemical and microbiological features of EBAs. Three-dimensional plot representing the log *P* parameter, MICs in planktonic pneumococcal R6 cultures and time needed to reach 50% of total membrane permeability.

**Figure 3.** Disintegration of NTPn R6 biofilms. Biofilms were incubated with EBAs at 37°C for 1 h. Controls included biofilms incubated for 1 h in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9). **A.** The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least three independent experiments, each performed in triplicate. Error bars represent the standard error. Asterisks-marked results are statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared to the control. **B.** CLSM of biofilm-grown *S. pneumoniae* R6 treated with EBAs, for 1 h at 37°C. Biofilms were stained with the *BacLight* kit. Scale bars, 25  $\mu$ m.

**Figure 4.** Effect of EBA 31 on biofilms formed by the encapsulated *S. pneumoniae* P181 strain. **A.** Inhibition of biofilm formation. *S. pneumoniae* P181 was distributed in the wells of a microtiter plate, which was then incubated for 5 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in the presence of EBA 31. Black and grey bars indicate growth and biofilm formation respectively. **B.** Disgregation of biofilms. Cells growing as biofilms were incubated with EBA 31 at 37°C for 1 h under 5% CO<sub>2</sub>. The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least three independent experiments, each performed in triplicate. Error bars represent the standard error. Asterisks-marked results are statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ) compared to the control. **C.** CLSM of biofilm-grown *S. pneumoniae* P181 treated with EBA 31, for 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Biofilms were stained with the *BacLight* kit. Scale bars, 25  $\mu$ m.

**Figure 5.** Evaluation of permeability of *H. influenzae* cells. NTHi 54997 cells were incubated in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 280 mM sorbitol. Positive control: Triton X-100 was added at 0.1% (final concentration); negative control: only buffer added. EBA31 was assayed at 1 $\times$  MIC (63  $\mu$ M) and 2 $\times$  MIC (126  $\mu$ M). Arrow indicates addition of 0.1% Triton X-100 to all samples.

**Figure 6.** Effect of EBA 31 on mixed NTPn P233–NTHi 54997 biofilms. **A.** EBA 31 was added to the initial biofilm at the indicated concentrations and incubated for 6 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> to allow formation of the biofilm. Black and grey bars indicate growth and

biofilm formation respectively. **B.** Inhibition of mixed biofilm formation. Cell viability from the mixed biofilm in the presence of EBA 31 (55  $\mu\text{M}$ ) is indicated. The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least 3 independent experiments, each performed in triplicate. Asterisks-marked results are statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ) compared to the control. **C.** Disintegration of mixed biofilms. Cell viability is displayed after incubating the biofilm in the presence of 220 or 550  $\mu\text{M}$  of EBA 31 for 1 h at 37°C under 5%  $\text{CO}_2$ . The results represent the mean  $\pm$  standard error of at least 3 independent experiments, each performed in triplicate. Asterisks-marked results are statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ) compared to the control. **D.** CLSM image of the distribution of the populations in mixed *NTPn*–*NTHi* biofilms. The mixed biofilms were stained with a combination of SYTO 59 (green) and HPA lectin conjugated with Alexa Fluor 488 (pink). *First row*: untreated control; *Second row*, inhibition of biofilm formation by EBA 31 (55 $\mu\text{M}$ ). The compound was added to the culture at the beginning of the biofilm formation and incubated for 6 h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . *Third row*, disruption of biofilm by EBA 31 (220  $\mu\text{M}$ ). Magnification bar = 25  $\mu\text{m}$ .

