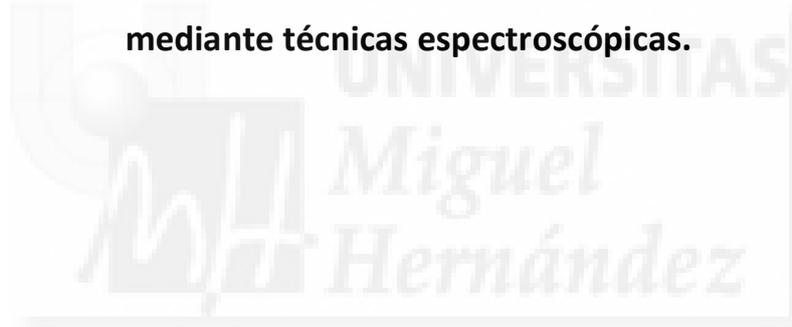


Universidad Miguel Hernández
Instituto de Biología Molecular y celular
(Área de Bioquímica y Biología Molecular)

**Caracterización de la estabilidad del módulo C-CbpD y su afinidad por colina
mediante técnicas espectroscópicas.**



Víctor Marín Delgado

Tutor: Jesús Miguel Sanz Morales

Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales (FCCEE)
Curso Académico 2014-2015

ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
2.2. Estructura de la superficie del neumococo	3
2.3. Proteínas de unión a colina	3
2.4. CbpD	4
2.5. Módulos de unión a colina	5
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Métodos generales	7
4.1.1. Preparación de disoluciones y tampones	7
4.1.2. Medida de la concentración de proteínas	7
4.2. Purificación del módulo C-CbpD	8
4.3. Dicroísmo circular	9
4.3.1. Titulación con cloruro de guanidinio	10
4.3.2 Titulación con colina.....	11
4.4. Efecto del pH sobre CbpD	12
4.5. Ensayo de desnaturalización térmica	13
4.6. Ensayo de afinidad por nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE	13
5. RESULTADOS Y DISCURSIÓN	
5.1. Purificación del módulo C-CbpD	15
5.2. Cálculo de la estabilidad frente a cloruro de guanidinio	15
5.2.1. Cálculo de los parámetros termodinámicos	19
5.3. Evaluación del Efecto del pH sobre CbpD	19
5.4. Evaluación del papel de la colina en la estabilidad térmica	20
5.5. Cálculo de afinidad por colina libre.....	22
5.6 Cálculo de la afinidad por colina en sustrato sólido	23
5.6.1. Isoterma de Langmuir	23
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	25
7. BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La alta morbilidad y mortalidad debido a enfermedades causadas por *Streptococcus pneumoniae*, particularmente en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos, se encuentra exacerbada por el incremento de la resistencia a antibióticos de determinadas cepas bacterianas, así como la ineficacia de las vacunas para cubrir todos los serotipos. Es necesario por lo tanto la investigación en nuevos antimicrobianos que sean capaces de combatir eficazmente a la totalidad de serotipos.

Las proteínas de unión a colina (CBPs), comunes a todas las variedades, constituyen un blanco de estudio insuficientemente estudiado como posible antibacteriano. Con vistas a su posible aplicación se han caracterizado algunas de las propiedades del módulo de unión a colina C-CbpD aislado, realizándose ensayos de estabilidad frente a desnaturalizantes químicos, estabilidad térmica y el papel del pH en su estructura mediante espectroscopia de dicroísmo circular. Además se ha determinado que se encuentra en forma monomérica en disolución, en contraposición a otras CBPs que suelen formar dímeros. También se ha medido su afinidad por análogos de colina en superficies sólidas que emulan la estructura de la pared bacteriana, los resultados indican que C-CbpD posee una afinidad por colina inferior a otros CBMs, probablemente debido a su carácter monomérico.

- **Palabras clave(6):** Neumococo, proteínas de unión a colina, C-CbpD, dicroísmo circular, antimicrobianos, nanopartículas magnéticas.

High morbidity and mortality due to *Streptococcus pneumoniae's* diseases, particularly in children, elderly and immunocompromised patients, is exacerbated by the increasing antibiotic resistance of certain bacterial strains as well as the ineffectiveness of vaccines to cover all serotypes. It is therefore necessary to research into new antimicrobials capable of effectively combat all serotypes.

The choline binding proteins (CBPs), common to all varieties, are a target of study insufficiently studied as possible antibacterial agents. With a view for its possible application as antimicrobial, we have characterized the stability of the choline-binding module CbpD against temperature, pH and chemical denaturants, all by circular dichroism spectroscopy. Furthermore it was determined that the protein is monomeric in solution, as opposed to other CBPs that typically form dimers. Affinity for choline analogues on solid surfaces which mimic the structure of the bacterial wall was also obtained and results show that C-CbpD has less affinity for choline than others CBMs, probably due to its monomeric character.

- **Keywords (6):** Pneumococcus, choline binding proteins, C-CbpD, circular dichroism, antimicrobials, magnetic nanoparticles.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Streptococcus pneumoniae*

Uno de los principales retos a los que se enfrenta la sociedad moderna es la aparición de microorganismos infecciosos resistentes a los antimicrobianos tradicionales, ya que éstos constituyen un problema mundial con unos enormes costes socioeconómicos asociados. En Europa se estiman más de 25000 muertes anuales y 2.5 millones días de hospitalización, con unos gastos resultantes de 1500 millones de euros, todo ello producido por la acción de microorganismos resistentes (Bush y cols., 2003).

Preocupa en especial el caso de *Streptococcus pneumoniae* (conocido como neumococo), debido a que es el causante de graves infecciones como la neumonía, meningitis bacteriana, bacteremia y otitis media (Tan, 2003; Maestro y Sanz., 2007). Se trata de una bacteria Gram-positiva que se encuentra habitualmente colonizando la nasofaringe de individuos sanos, incluyendo prácticamente la mitad de todos los niños (Revai y cols., 2006).

Se estima que las enfermedades neumocócicas causan la muerte de 1,6 millones de personas anualmente en todo el mundo, en especial en países en vías de desarrollo (OMS, 2007), constituyendo la cuarta causa de muerte en el mundo y la primera en EE.UU y Europa en enfermedades prevenibles por vacunas (Gamez y cols., 2012), siendo alarmante en el caso de ancianos y niños menores de 5 años ya que es a ellos a los que les afecta especialmente.

Las vacunas actuales sólo son capaces de cubrir una pequeña parte de los más de 90 serotipos distintos de neumococo. Además, si bien se produce la remisión de los serotipos cubiertos, ésta se ve compensada por un aumento en la incidencia de los otros (Singleton y cols., 2007). Respecto al tratamiento antibiótico cabe destacar que en el sur de Europa se ha pasado de un 5% a un 50% en la resistencia de neumococo a ciertos antibióticos beta-lactámicos en solo una década (Albrich y cols., 2004). En España el panorama es aún peor habiendo alcanzado cifras del 50-60% entre los aislados pediátricos en los años 80 (Liñares y cols, 2000).

Por lo tanto queda patente el gran problema que supone la resistencia creciente a los antibióticos tradicionales, constituyendo una amenaza que hay que enfrentar mediante la identificación razonada de nuevas dianas alternativas para poder desarrollar antimicrobianos novedosos que sean de ayuda en la lucha contra el microorganismo.

2.2. Estructura de la superficie del neumococo

S. pneumoniae posee unas proteínas en su superficie que constituyen un llamativo blanco antimicrobiano, que hoy en día se encuentra insuficientemente investigado, sobre el que potenciales nuevos medicamentos podrían ejercer su acción. Éstas intervienen en una gran variedad de procesos esenciales tanto para la viabilidad como para la virulencia bacterianas, entre otros: camuflaje frente al sistema inmune, liberación de toxinas o separación de las células al final de la división celular (Bergmann y cols., 2006). También participan en la adhesión a células del huésped para iniciar la infección o la autólisis espontánea, tanto en la fase estacionaria como la producida por los antibióticos beta-lactámicos, así como la formación de biopelículas (López y cols., 2004).

Las proteínas de unión a colina (CBPs, «Choline-binding proteins») son un grupo dentro de las proteínas de superficie que constituyen una familia de unos 15 miembros comunes a todos los serotipos y, como característica definitoria, comparten el reconocimiento específico de los residuos de colina que se encuentran dispuestos en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular del neumococo (Pérez-Dorado y cols., 2012). La respuesta que produce la interacción de las CBPs con colina posibilita el anclaje de estas a la estructura macromolecular de la pared bacteriana (**Figura 1**), desde donde son capaces de realizar su función biológica.

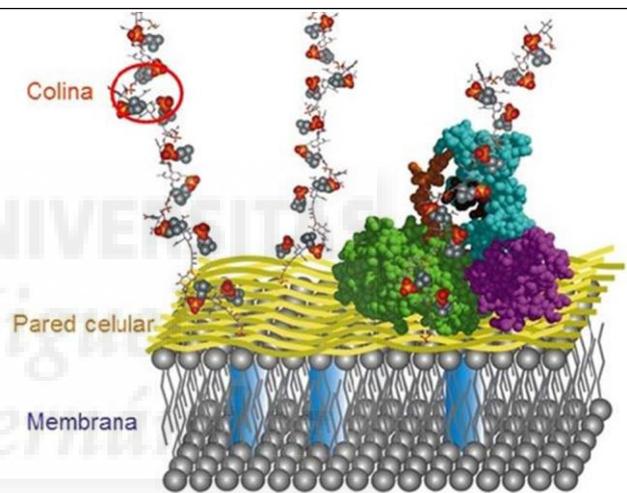


Figura 1 – Superficie de *S. pneumoniae* donde residuos de colina se encuentran unidos al ácido teicoico y éste a su vez al N-acetilmurámico de la pared celular. La colina sirve para el anclaje de las CBPs. (Hermoso y cols., 2003).

2.3. Proteínas de unión a colina

Las distintas CBPs tienen en común su estructuración en dos módulos diferentes, uno de reconocimiento de colina (CBM, «choline-binding module») y otro funcional (**Figura 2.a**). Los CBMs están constituidos por motivos repetidos normalmente de unos 20 residuos (CBRs, «Choline-binding repeats»), ricos en aminoácidos aromáticos que favorecen las interacciones catión- π y de van der Waals que se dan con la colina, siendo por tanto los determinantes de la afinidad por la misma.

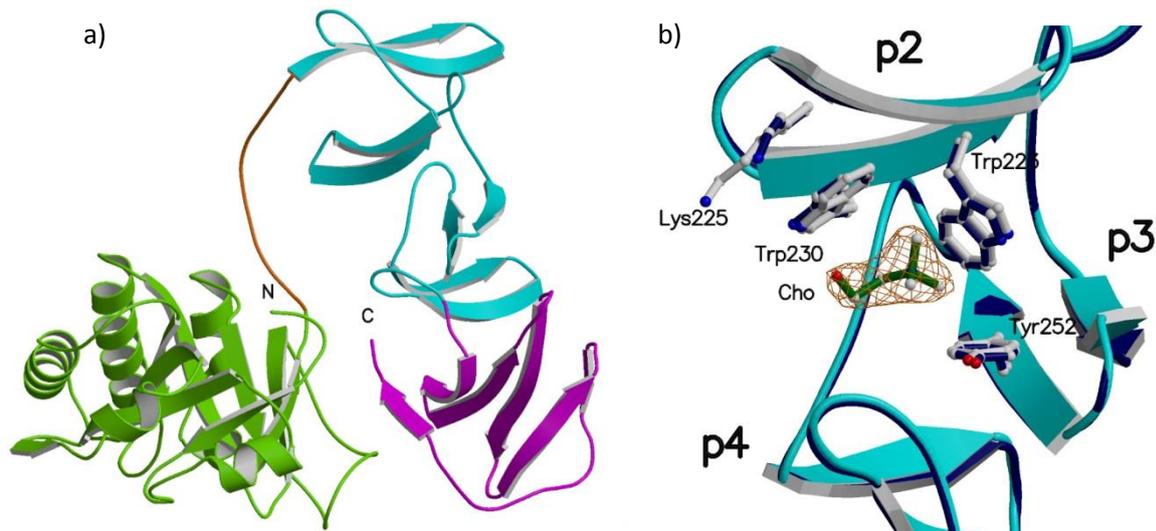


Figura 2 – a) Estructura tridimensional donde se muestra CPL1 que presenta un módulo catalítico (verde) y un módulo de unión a colina (cian y magenta) unidos por una región de estructura no definida (naranja). **b)** Dos repeticiones de unión a colina formando un sitio de unión a colina de tal forma que tres aminoácidos aromáticos (dos Trp y una Tyr) forman una cavidad en la cual se disponen los grupos metilo de la colina. Además el residuo de Lys estabiliza el grupo fosfato de la fosforil-colina mediante un enlace de hidrógeno (Hermoso y cols., 2003).

Éstos suelen formar un bucle y una horquilla-beta, de manera que cada sitio de unión a colina está configurado por dos horquillas consecutivas, que aportan los aminoácidos aromáticos, ya que los CBRs se disponen a lo largo del eje de una superhélice, por lo que cada sitio de unión está formado por dos CBRs. (**Figura 2.b**). El número de estas secuencias es muy variable (entre 3 y 18), dependiendo de la CBP (Fernández-Tornero y cols., 2001).

Los resultados del estudio de las CBPs ya es una realidad, pues el estudio de C-LytA (una de las más estudiadas e implicada en procesos de lisis de la pared celular) ha permitido desarrollar aplicaciones como su uso como etiqueta o «tag» de afinidad para la purificación e inmovilización de proteínas (Sanchez-Puelles y cols., 1992), lo que abre el camino a beneficios colaterales del estudio de estas proteínas y no solo en la lucha contra neumococo.

2.4. CbpD

CbpD es una de las proteínas de unión a colina que posee neumococo en su superficie. Su papel fisiológico parece ser que contribuye a la eliminación de células bacterianas no competentes por parte de las competentes mediante un proceso de lisis conocido como «fratricidio» (Eldholm and cols., 2010) así como de especies bacterianas que se encuentren en el mismo medio.

La proteína, cuya estructura tridimensional aún no está determinada, está constituida por un dominio CHAP (relacionado con la hidrólisis del peptidoglicano mediante un posible ataque nucleofítico por parte de residuos de cisteína), dos dominios SH3b (al parecer encargados de unirse al peptidoglicano de la célula a la que atacan) y una región C-terminal que consiste en un módulo de unión a colina (que se une a la célula atacante y que denominaremos C-CbpD) (**Figura 3**).



Figura 3 – Estructura modular de CbpD, donde se puede ver el dominio CHAP, los dos dominios SH3 y las cuatro repeticiones de unión a colina. Tomado de Mol. Oral Microbiol. (2012), 27, 221-245.

2.5. Módulos de unión a colina

La alta afinidad de los CBMs por la pared celular de neumococo se pone de manifiesto en la observación de que la adición de los módulos de unión a colina como C-LytA y C-CPL1 inhiben en un alto porcentaje la actividad de las enzimas completas LytA y CPL1 por desplazamiento de estas últimas de los ácidos teicoicos (Sánchez-Puelles y cols., 1990).

Por este motivo, los módulos de unión a colina podrían constituir nuevos agentes antimicrobianos polipeptídicos que impidieran la acción fisiológica de las CBPs por desplazamiento de las mismas de la pared, por lo que su estudio y caracterización es condición imprescindible para su posible utilización futura, como es el caso de C-CbpD.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Tal y como se ha descrito en el apartado introductorio, los módulos de unión a colina son de elevado interés por sus posibles aplicaciones entre las que destacan su papel como antimicrobianos. Caracterizar sus propiedades es de capital importancia. Módulos como C-LytA han sido especialmente estudiados, determinándose para el mismo su estabilidad y capacidad de unión a colina (Fernández-Tornero y cols., 2001; Maestro y Sanz, 2005), sin embargo los datos sobre el módulo de interés, C-CbpD son realmente escasos, siendo de igual modo un potencial agente antibacteriano.

OBJETIVOS

En este trabajo se realizará un estudio de las propiedades del módulo de unión a colina de la proteína CbpD de *Streptococcus pneumoniae* mediante técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular. Siendo los objetivos a determinar:

Objetivo 1: Cálculo de la estabilidad en el estado nativo.

Objetivo 2: Establecimiento de su estado oligomérico en disolución.

Objetivo 3: Evaluación del efecto del pH.

Objetivo 4: Evaluación del papel de la colina en la estabilidad térmica.

Objetivo 5: Cálculo de la afinidad por colina libre.

Objetivo 6: Cálculo de la afinidad por colina en sustrato sólido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Métodos generales

4.1.1. Preparación de disoluciones y tampones

Las distintas disoluciones utilizadas a lo largo de los experimentos fueron preparadas en tampón fosfato sódico (PNa) 20 mM, bien a pH 7,0, bien a pH 7,5.

Tanto la preparación de un pH como de la otro fue a partir de disoluciones de fosfato monosódico y disódico. Dependiendo de cuál se quisiera obtener se mezclaron distintos porcentajes de ambas disoluciones madre. Así:

- Para pH 7,5: 16% PNa (1M) y 84% PNa₂ (1M)
- Para pH 7,0: 39% PNa (1M) y 61% PNa₂ (1M)

Ajustándose a 20 mM según el volumen y añadiendo el resto de sales, agua y compuestos necesarios en cada caso, obtenidos de Sigma-Aldrich.

4.1.2. Medida de la concentración de proteínas

La concentración de proteína en disolución fue determinada mediante espectroscopía de absorción a una longitud de onda de 280 nm, en un espectrofotómetro Evolution 201 (Thermo Scientific) con una cubeta de cuarzo de paso óptico de 10 mm. La concentración se calculó mediante la extrapolación de esta medida utilizando la ecuación de Lambert-Beer (**Ecuación 1**).

$$A_{280 \text{ nm}} = C \cdot \epsilon_{280} \cdot l \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde l es el paso óptico de la cubeta en centímetros, C es la concentración y ϵ_{280} es el coeficiente de extinción molar a 280 nm de la proteína. Para C-CbpD éste es de $58900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, el cual se calculó a partir de la secuencia primaria (programa Protparam del servidor rExpasy <http://web.expasy.org/protparam>).

Con el objetivo de permanecer dentro del rango de linealidad (rango de concentraciones del analito para las cuales el método da resultados directamente proporcionales a la concentración) se ha trabajado con unidades de absorbancia no mayores de la unidad o muy cercanas a la misma.

4.2. Purificación del módulo C-CbpD

Para la purificación de esta proteína se utilizó la estirpe de *Escherichia coli* BL21, que contiene el plásmido pET-C-CbpD con la secuencia de C-CbpD. El gen se encuentra bajo el control del promotor lac. La secuencia que codifica se muestra en la **Figura 4**.

Se sembró mediante estría escocesa una placa de agar a partir de un raspado de criotubo de células. Para ello se utilizó medio LB-agar y ampicilina 100x a 125 µL/L de cultivo. Se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Se repitió el proceso de siembra a partir de las placas resultantes anteriores.

Se preparó un pre-inóculo a partir de las segundas placas, utilizando 20 mL de medio LB líquido y 20 µL de ampicilina (1 µL ampicilina/mL de cultivo), dejándose incubar toda la noche a 30 °C con agitación a 200 rpm. Posteriormente se inocularon 2 L de medio LB con 10 mL de preinóculo por litro de cultivo, se añadió ampicilina a razón 1mL/L y se dejaron incubando a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,5 a 300nm. En ese momento se añadió 0,5 mL/L de IPTG (0,5 mM) como inductor del promotor lac y se dejó expresando durante 3 horas.

Las células crecidas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm (4420 g) en una centrífuga Beckman L8-70 con un rotor JA-10. El precipitado resultante se resuspendió cuidadosamente en 100 mL (50 mL/L de cultivo) de tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,5 y el resuspendido fue puesto en hielo. Las células se rompieron en un sonicador Branson 250, 10 ciclos de 15 segundos. Este sonicado fue centrifugado a 9000 rpm (98000 g) en la misma centrífuga con el rotor JA-20 durante 15 minutos.

El sobrenadante (extracto) se cargó en una columna cromatográfica con 3,4 g (1,7 g/L de cultivo utilizado) de DEAE-celulosa (Sigma-Aldrich) equilibrada en tampón fosfato 20mM pH 7,5. El DEAE (dietilaminoetanol) actúa como análogo de la colina, debido a ello esta resina permite a las CBPs presentes en nuestra muestra quedar inmovilizadas en la columna de manera específica.

```
GWKKINGSWYHFKSNGSKST
GWLKDGSSWYLLKLSGEMQT
GWLKENGSWYLLGSSGAMKT
GWYQVSGEWYYSYSSGALAI
NTTVDGYRVNSDGERV
```

Figura 4 – Secuencia de aminoácidos de la proteína sobre-expresada por la estirpe de *E. coli* BL21, transformada con el plásmido pET-C-CbpD. Se muestran separadas las 4 repeticiones de unión a colina (CBRs) y en azul una cola de función hasta ahora desconocida. Se observa abundancia en aminoácidos aromáticos (1 Phe, 10 Tyr, 8 Trp). En total son 97 aminoácidos, con una masa molecular de 11026 Da. Número de acceso AF278686.

Cuando hubo pasado todo el extracto la columna se lavó con un tampón de alta fuerza iónica (20 mM PNa a pH 7,5 y 1,5 M de NaCl) con el objetivo de eluir toda proteína adsorbida de manera inespecífica a nuestra columna por interacción iónica.

Posteriormente se eluyó la proteína de interés con un tampón fosfato 20 mM, pH 7,0 y 2% de colina p/v (143 mM) la cual competiría por el DEAE por los sitios de unión, desplazando a este y desorbiendo la proteína de la columna. Se recogieron fracciones en tubos eppendorf de 1,5 mL. Se procedió a medir la concentración de la proteína en disolución mediante espectroscopía de absorción tal y como se describe en el apartado 4.1.2, así las fracciones 4-13 fueron las que tenían una concentración superior a 0,1 mg/mL, las cuales fueron guardadas en un congelador a -20°C.

Además, para comprobar la pureza de las alícuotas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), utilizando el sistema Mini-Protean (Bio-Rad). El gel concentrador fue preparado a una concentración final de acrilamida del 4% (p/v) y el separador a una concentración de 15% (p/v). Los geles fueron teñidos con EZBlue™ (Sigma-Aldrich).

4.3. Dicroísmo circular

La técnica espectroscópica de dicroísmo circular se utilizó para observar los cambios producidos en las estructuras secundarias y terciarias de C-CbpD. Para ello se empleó un espectropolarímetro Jasco J-815 equipado con un termostato Peltier (PTC-423S/15). Se promedió utilizando 4 medidas del espectro cada vez. El espectro se registró de 210 a 260 nm, a 20°C o a 30°C dependiendo del experimento, mediante una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1mm. Para cada conjunto de medidas se utilizó un blanco con tampón fosfato sódico 20 mM y 100 mM NaCl (y dependiendo de la muestra con colina o sin ella), cuyo espectro fue sustraído posteriormente de las muestras.

Para el procesado de datos se utilizó el software de análisis científico SigmaPlot v10.0. Las operaciones realizadas con el programa engloban el cambio de unidades a elipticidad molar, la representación gráfica de los datos y el ajuste de los mismos a la ecuación correspondiente. Todos los datos se han convertido a unidades de elipticidad molar, que están normalizadas frente a la concentración de la muestra y el paso óptico de la cubeta (**Ecuación 2**).

$$[\theta]_{\lambda} = \theta_{\lambda} / ([P] \cdot n^{aa} \cdot d \cdot 10)$$

Ecuación 2

Donde $[\theta]$ es la elipticidad molar, θ es la elipticidad, $[P]$ la molaridad de la proteína en la disolución, n^{aa} el número de aminoácidos y d el paso óptico en centímetros.

4.3.1. Titulación con cloruro de guanidinio

El cloruro de guanidinio (GdmCl) fue utilizado como agente desnaturizante químico para observar el proceso de pérdida de estructura de C-CbpD a concentraciones crecientes de él. Se realizaron distintos ensayos de guanidinio, utilizando distintas concentraciones de proteína, colina y temperatura, pero en todos ellos se utilizó una cubeta de 1 mm de paso óptico y tampón fosfato 20 mM a pH 7, 100 mM de NaCl.

Una vez obtenidos los datos, éstos fueron procesados en SigmaPlot y las unidades convertidas a elipticidad molar. Se representaron, dependiendo del caso, la $[\theta]_{222}$, $[\theta]_{225}$ o la relación $[\theta]_{222}/[\theta]_{225}$ (que minimiza errores derivados de diferente concentración de las muestras), frente a la concentración de cloruro de guanidinio. La curva obtenida puede utilizarse para obtener los distintos datos termodinámicos.

Los principales datos termodinámicos de interés son el punto medio (de transición) y la energía libre, la cual está relacionada con la estabilidad de la proteína. El análisis de los datos se efectuará mediante el ajuste de la elipticidad molar frente a la concentración de guanidinio a la ecuación de Gibbs y la energía libre de reacción (**Ecuaciones 3.1 y 3.2**).

$$\Delta G_{UF} = \Delta G_{UF}^o - m \cdot [D] \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$\Delta G_{UF} = -R \cdot T \cdot \ln(K_{eq}) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Siendo R la constante universal de los gases ideales con un valor de $1,987 \cdot 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, T la temperatura en grados Kelvins, K_{eq} la constante de equilibrio, $[D]$ la concentración de desnaturizante y m la pendiente, la cual es una medida de lo abrupta que es una transición, relacionada con el incremento de área accesible de la proteína tras desnaturización (Myers y cols., 1995).

El punto medio es el punto de la transición en el cual la cantidad de proteína plegada (*folded*) es igual a la desplegada (*unfolded*) y por tanto la constante de equilibrio es igual a uno. De manera que sustituyendo en la ecuación 3.1 se obtiene (**Ecuación 3.3**):

$$\Delta G_{UF}^o = m \cdot [D]_{1/2} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Siendo $[D]_{1/2}$ la concentración de desnaturalizante en el punto medio. Ambos valores son desconocidos para nosotros, los cuales deberemos obtener igualando las ecuaciones 3.1 y 3.2, sustituyendo la ecuación 3.3 cuando sea necesario, así como aplicando la definición de constante de equilibrio (**Ecuación 3.4**). Con lo cual obtenemos (**Ecuación 3.5**):

$$K = \frac{(\theta_f - \theta)}{(\theta - \theta_u)} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$\theta = \frac{\theta_f + \theta_u \cdot \left[\exp\left(\frac{-m \cdot ([D]_{1/2} - [D])}{R \cdot T}\right) \right]}{1 + \exp\left(\frac{-m \cdot ([D]_{1/2} - [D])}{R \cdot T}\right)} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde θ es la elipticidad molar obtenida mediante el análisis de los datos y procesada según la ecuación 2, θ_f la elipticidad molar correspondiente al inicio de la curva (estado nativo plegado) y θ_u al final (estado desplegado), extrapoladas al punto 0 en el eje X. El ajuste de los datos se realizó en SigmaPlot mediante la herramienta Regression Wizard.

En el caso de que las líneas base tuvieran pendiente se ajustó tanto θ_u como θ_f a rectas con pendiente por lo que se le tuvo que dar también el valor de las mismas al programa, sustituyendo θ_u y θ_f por las **ecuaciones 3.6 y 3.7**:

$$\theta_u = -B \cdot [D] + \theta_u^0 \quad \text{Ecuación 3.6}$$

$$\theta_f = -b \cdot [D] + \theta_f^0 \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Siendo B la pendiente del tramo correspondiente a la línea base del final de la curva y b la del inicio.

4.3.2. Titulación con colina.

Se realizó una titulación de forma similar a la realizada para comprobar la desnaturalización por guanidinio en el apartado anterior, pero esta vez utilizando concentraciones crecientes de colina en una muestra a tampón fosfato 20 mM y 100 mM de NaCl, con el objetivo de obtener la constante de disociación. Una vez obtenidos los datos se representaron a una longitud de onda de 222 nm y la curva resultante se ajustó a la ecuación de una hipérbola (**Ecuación 3.8**), para obtener la constante de disociación de C-CbpD por colina libre (Copeland 2004).

$$y = \frac{ax}{b + x}$$

Ecuación 3.8

Donde y es la elipticidad molar registrada, x la concentración de colina, b la constante de disociación y a es el valor máximo de y .

4.4. Efecto del pH sobre CbpD

En este experimento se pretendía determinar el papel del pH sobre la integridad de la proteína C-CbpD, para ello se estudió su espectro de dicroísmo circular, tal y como se establece en el apartado 4.3 de este trabajo, a lo largo de un rango de pH desde 2,4 a 8. Este experimento se realizó por duplicado, utilizando ambas veces una concentración de proteína de 0,1 mg/mL pero una vez con 143 mM de colina y otra sin colina.

Se prepararon 12 tampones de distintos pH con los que se pretendía cubrir el rango descrito. Las concentraciones de los compuestos utilizados se establecieron según la ecuación de Hendersrsson-Hasselbach (**Ecuación 4**).

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{bases}]}{[\text{ácidos}]} \right)$$

Ecuación 4

Así pues los pH teóricos de las disoluciones madre preparadas fueron: 2.4, 3.0, 3.6, 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6.0, 6.54, 7.0, 7.5, 8.0. Para los pH 2.4 a 3.6 se utilizó una cantidad constante de 1,5 g de glicina a la que se adicionó la cantidad correspondiente de ácido clorhídrico y agua destilada. Los tampones 4.0, 4.6 y 5.0 se obtuvieron a partir de disoluciones 1M de ácido acético glacial y acetato sódico hidratado. Los tampones del 6.0 al 8.0 se obtuvieron usando dos disoluciones 1M de fosfato monosódico (PNa) y fosfato disódico (PNa₂).

A partir de estas disoluciones madre se hicieron muestras de un volumen final de 200 μL , a una concentración 20mM de los tampones, completando con agua destilada y colina en los casos necesarios y se volvió a medir el pH real de la disolución, comparándose con el teórico.

4.5. Ensayo de desnaturalización térmica

Con el objetivo de comprobar la estabilidad térmica de la proteína y el papel de la colina en ella, su temperatura de desnaturalización y su punto medio de desnaturalización térmica, se realizaron experimentos de dicrósmo circular a concentraciones variables de colina. Así pues, se siguió la elipticidad de una disolución de C-CbpD a 0,08 mg/mL a una longitud de onda de 222 nm durante un barrido térmico de 5 °C a 95 °C, a una velocidad de 60° C/hora y tomando puntos cada 0,2 °C.

Se midieron los espectros completos de 5 °C y 95 °C, tras llegar a este último se volvió a bajar la temperatura a 5 °C y se registró de nuevo el espectro para observar una posible reversibilidad. Todo ello se realizó con el equipamiento descrito en el apartado 4.3. El análisis de los datos como el punto medio se halló de la misma manera que en el apartado 4.3.1, utilizando la ecuación 3.5 y el programa SigmaPlot con su herramienta de Regression Wizard.

4.6. Ensayo de afinidad por nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE

Se pretendió realizar un ensayo de unión de C-CbpD a nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE-almidón (Chemicell) y calcular afinidad que guardan unas por otras. Todos los experimentos ejecutados con nanopartículas magnéticas fueron llevados a cabo con la ayuda de un imán (MagnetoPURE), que permitió el rápido cambio de la disolución en la que se encuentran inmersas las nanopartículas con pérdida mínima de las mismas.

El experimento consiste en probar distintas concentraciones de C-CbpD a una misma concentración de nanopartículas 0,25 mg/mL, a 5 mM de colina y sin colina, todo ello en un volumen final de 300 µL completado con buffer fosfato 20 mM y 100 mM de NaCl. Las diferentes concentraciones de proteína fueron incubadas durante 30 minutos en un tambor giratorio en tubos eppendorfs de 2 mL de punta redonda (debido a que de otra manera la tensión superficial de la disolución evita la correcta mezcla). Así parte de la proteína quedaría adsorbida por unión no covalente a las nanopartículas y parte en el sobrenadante, estableciéndose un equilibrio entre ambas.

Se midió la proteína no retenida por las nanopartículas tras la incubación: se retiró el sobrenadante con ayuda del imán y se volvió a aplicar el imán una segunda vez al sobrenadante a fin de evitar cualquier resto de nanopartícula que interfiriere en la medición espectrofotométrica anterior. Para obtener la curva de saturación de las nanopartículas con C-CbpD se midió la concentración de la misma en el segundo sobrenadante de la manera que se describe en el

apartado 4.1.2. La curva obtenida cuando se representa la masa de proteína retenida por masa de nanopartícula frente a una concentración inicial de proteína se denomina Isoterma de Langmuir, la cual se puede ajustar a la ecuación de una hipérbola, **Ecuación 5** (Hungs y cols., 2008).

$$q = \frac{q_m \cdot C_e}{K + C_e} \quad \text{Ecuación 5}$$

Siendo q la masa de proteína absorbida por masa de nanopartícula (μg proteína/mg nanopartículas), la cual es calculada a partir de la concentración de proteína en el segundo sobrenadante y volumen inicial de $300 \mu\text{L}$, q_m es la capacidad máxima de adsorción (μg proteína/mg nanopartículas), C_e es la concentración en equilibrio ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de C-CbpD y K es la constante de disociación ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre C-CbpD y las nanopartículas.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Purificación del módulo C-CbpD

En la **Figura 5** se muestran las distintas alícuotas de 1,5 mL obtenidas durante el paso de elución en la purificación de C-CbpD frente a sus concentraciones. Se escogieron las fracciones 7 a 12 por su mayor concentración de proteína, obteniéndose de estas cinco un total de 14,8 mg de proteína.

En cuanto a la electroforesis realizada para comprobar la pureza de las alícuotas determina que, efectivamente, es C-CbpD la que se encuentra en ellas (**Figura 6**).

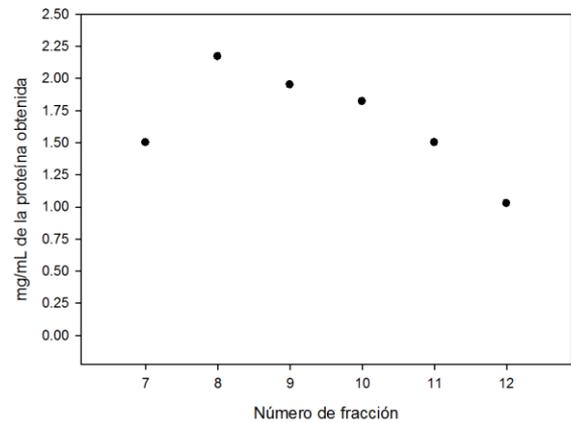


Figura 5 – Concentración de proteína eluida frente al número de la alícuota de 1,5 mL. La fracción número 8 fue la que mayor concentración alcanzó (2,17 mg/mL). Todas contenidas en tampón fosfato 20 mM y 147 mM de colina.

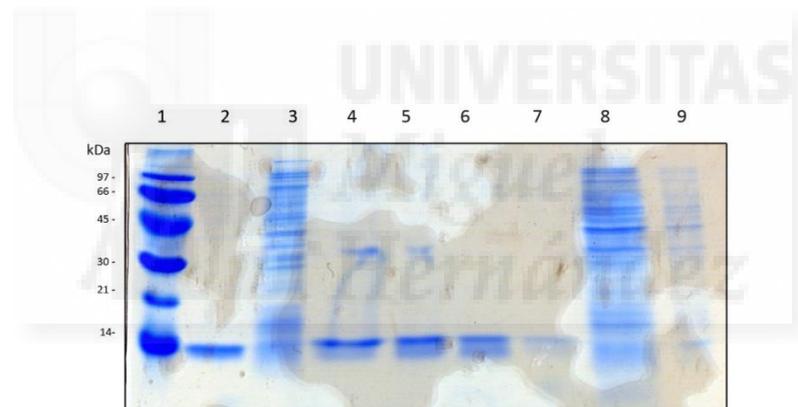


Figura 6 – Análisis de la expresión y purificación de C-CbpD por SDS-PAGE. (1) Marcador de peso molecular; (2) Control positivo de CbpD; (3) No retenido; (4-7) Alícuotas 9,10,12 y 16; (8) Extracto de la columna de purificación; (9) Extracto de un cultivo celular lisado.

5.2. Cálculo de la estabilidad frente a cloruro de guanidinio

En un primer ensayo se estableció el perfil de desnaturalización que poseía C-CbpD, con una concentración de 143 mM de colina, frente a cloruro de guanidinio caracterizado por difracción circular a 20 °C, representándose la curva obtenida en la **Figura 7**.

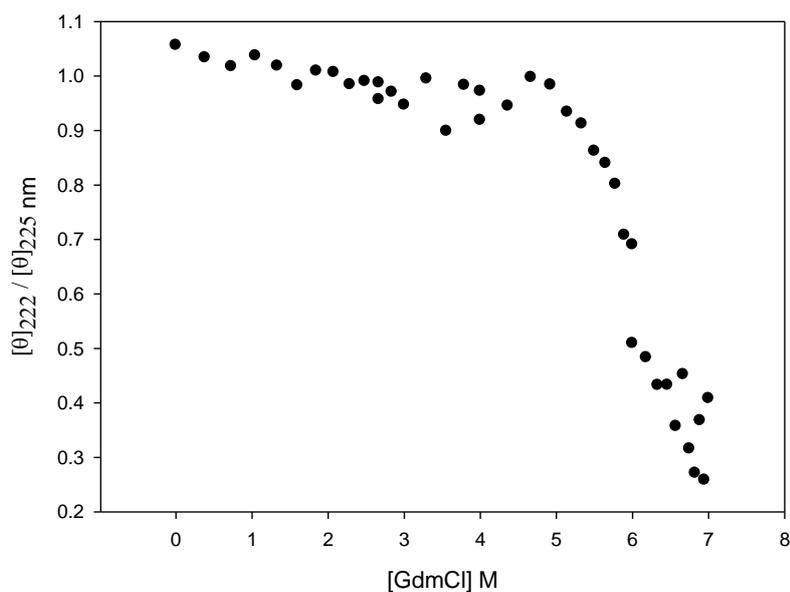


Figura 7 – Curva de desnaturalización a 20 °C del cociente de las elipticidades molares que presenta C-CbpD a 222 y 225 nm frente a cloruro de guanidinio.

Como puede observarse, el espectro a 7M de guanidinio sigue dando una cierta elipticidad sin formarse una línea base característica de este tipo de ensayos, que sugiere una estructura residual aún en esas concentraciones de desnaturalizante y por lo tanto una alta estabilidad a esta temperatura. Esto contrasta con los resultados obtenidos para otras CBP como C-LytA (uno de los módulos de unión a colina de neumococo más estudiados), cuya transición finaliza a 20 °C a concentraciones comprendidas entre 4,5 y 6 M (Maestro y Sanz, 2005).

Así pues se procedió a realizar un segundo ensayo en el que se aumentaba la temperatura a 30 °C, a fin de disminuir la estabilidad de la proteína ayudando de esta manera al desnaturalizante y obtener una curva completa. Ésta está representada en la **Figura 8.a**.

En este caso sí que se obtiene una curva completa en la titulación por guanidinio, que servirá para obtener los datos termodinámicos como el punto medio de desnaturalización o la energía libre. Se observa una pretransición entre 0 y 1 M de guanidinio. Destaca que aun utilizando una temperatura más elevada sigue presentando mayor estabilidad frente a guanidinio que C-LytA a 20 °C. Además tal y como se muestra en la **Figura 8.b**, el espectro resultante no es random-coil si no que posee estructura residual.

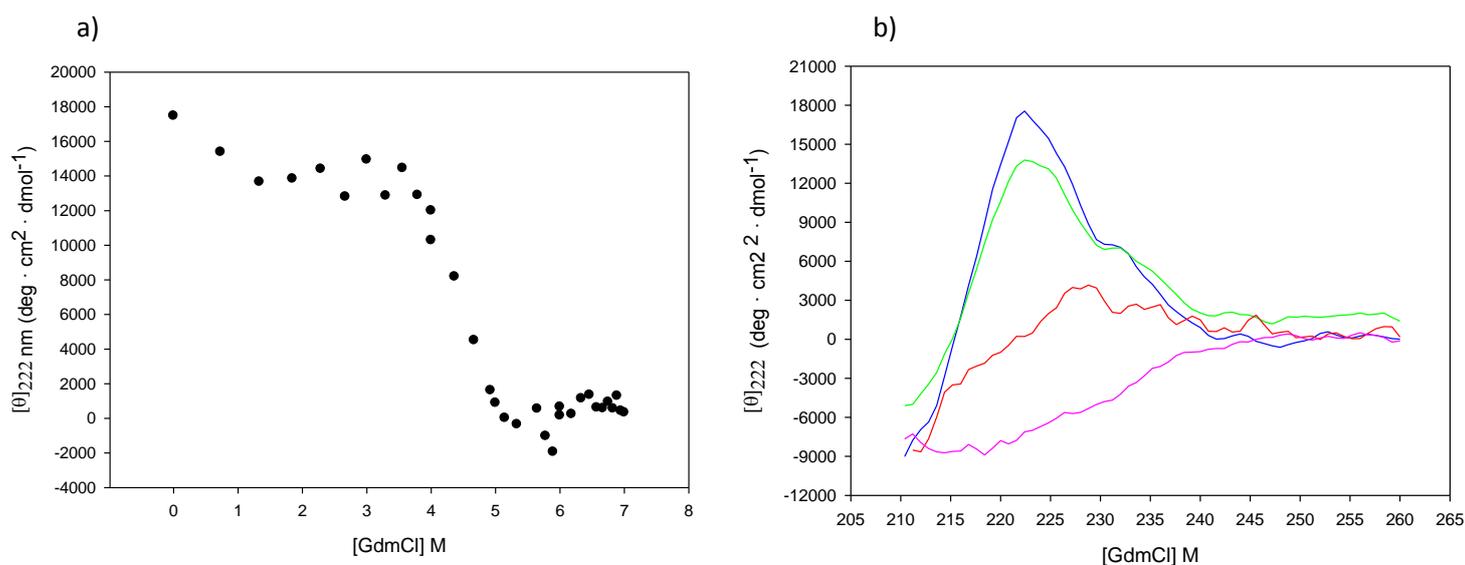


Figura 8 – a) Curva de desnaturalización a 30 °C de la elipticidad molar que presenta C-CbpD a 222 nm frente a cloruro de guanidinio. Se observa una pretransición entre 0 y 1 M. **b)** Elipticidad molar a 30 °C en función de la longitud de onda a concentración de guanidinio 0 M (azul), 1.3 M (verde), 7 M (rojo) y espectro de elipticidad molar a 95 °C ausencia de desnaturalizante (rosa). Se observa que en la desnaturalización por guanidinio hay estructura residual mediante que en la desnaturalización térmica la estructura resultante es random-coil.

Con objeto de comprobar el método de ajuste termodinámico de los datos, y dado que algunos CBMs forman oligómeros, se realizó un tercer ensayo similar al segundo pero utilizando una concentración inferior de proteína, concretamente la mitad **Figura 9**. Si CbpD fuera monomérica se esperaría un espectro similar, en cambio, si no fuera así, se observaría que disminuiría la estabilidad y que por lo tanto disminuiría la concentración de guanidinio necesario.

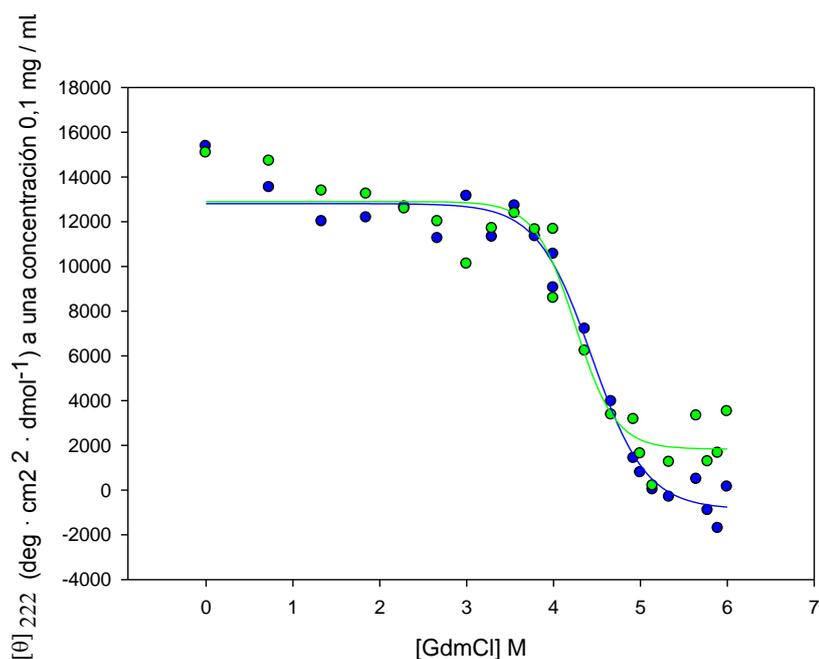


Figura 9 – Comparativa de la curva de desnaturalización a 30 °C de la elipticidad molar que presenta C-CbpD a 222 nm frente a cloruro de guanidinio a concentración 0,1 mg/mL (azúl) y a 0,05 mg/mL (verde). La línea continua es el ajuste a una curva sigmoide sin significado físico, y sin tener en cuenta la pretransición a concentraciones bajas de desnaturalizante, para la obtención de datos termodinámicos.

Como se puede observar en dicha figura, se deduce que C-CbpD es un monómero en disolución, ya que se presenta con un espectro muy similar tanto a una concentración como a otra y no se observa desplazamiento del mismo hacia valores inferiores de desnaturalizante cuando se encuentra en concentraciones inferiores.

El último ensayo consistió en comprobar el papel estabilizador de la colina, comparando la curva obtenida al realizar una titulación de guanidinio sin colina en el medio frente a la curva obtenida en el segundo ensayo a 30°C. La concentración de proteína es la misma y la temperatura también. El resultado obtenido se muestra en la **Figura 10**.

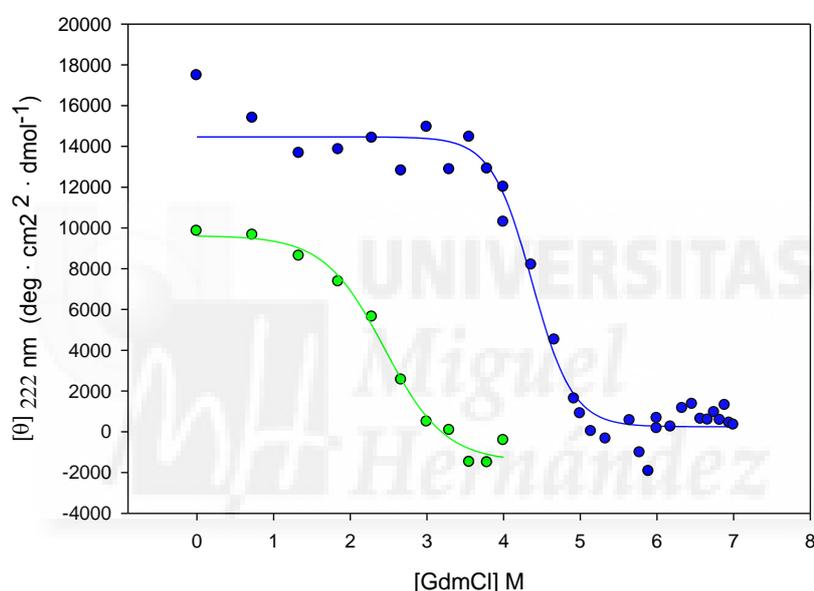


Figura 10 – Comparativa de la curva de desnaturalización a 30 °C de la elipticidad molar que presenta C-CbpD a 222 nm frente a cloruro de guanidinio, con 143 mM de colina (azul) y sin colina (verde). La línea continua es el ajuste a una curva sigmoide sin significado físico para la obtención de los datos termodinámicos.

Tras el mismo queda patente el papel estabilizador de la colina, pues se puede observar un brusco descenso de la estabilidad, produciéndose la transición a menos de la mitad de la concentración de desnaturalizante requerido para la muestra con 143 mM de colina. Además sin colina no se observa la pretransición entre 0 y 1 M de guanidinio.

5.2.1. Cálculo de los parámetros termodinámicos

En este apartado se pretende ofrecer un resumen donde están descritos los distintos parámetros termodinámicos calculados en base a lo descrito en el apartado 4.3.1 y los resultados obtenidos en las titulaciones con guanidinio del apartado 5.2.

Nº de ensayo y características	Punto medio ([D] _{1/2} M)	Pendiente (m kcal·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	ΔG ^o _{UF} kcal/mol
2 0.1 mg/mL a 30 °C 143 mM colina	4,3 ± 0,1	2,1 ± 0,3	9 ± 2
3 0.05 mg/mL a 30 °C 143 mM colina	4,2 ± 0,1	2,4 ± 0,7	10 ± 3
4 0.1 mg/mL a 30 °C sin colina	2,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	3 ± 0,6

Tabla 1 – Comparativa de los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de los ensayos del apartado 5.2

Como se puede observar en la **tabla 1** hay factores que afectan a la estabilidad de la proteína, cuya medida se toma de ΔG^o_{UF} que se calcula según la ecuación 3.3: ΔG_{UF} nos da la diferencia de energías entre los estados plegado y desplegado en cada concentración de desnaturalizante, lo que indica la capacidad para pasar de uno a otro y por tanto la estabilidad. Sin embargo lo que nos interesa es conocer la ΔG^o_{UF}, es decir, la energía libre en ausencia de desnaturalizante. La concentración de colina sería el principal factor que afecta radicalmente a la estabilidad ya que disminuye en más de 6 kcal·mol⁻¹ la energía libre inicial del sistema respecto al ensayo con colina.

5.3. Evaluación del Efecto del pH sobre CbpD

La capacidad de mantener la estructura a distintos pH es esencial para una proteína como CbpD ya que se sitúa en el exterior celular y por tanto está expuesta a los efectos del ambiente que le rodea. Además no solo es útil para el propio neumococo ya que si se quisiera utilizar C-CbpD con finalidad terapéutica debería comprobarse su estabilidad en un medio con tan diversos rangos de pH como es el cuerpo humano.

Así pues se comprobó la estabilidad de la misma mediante dicroísmo circular en un rango comprendido entre 2.4 y 8, tanto con 143 mM de colina como sin colina y cuyos resultados se muestran en la **Figura 11**.

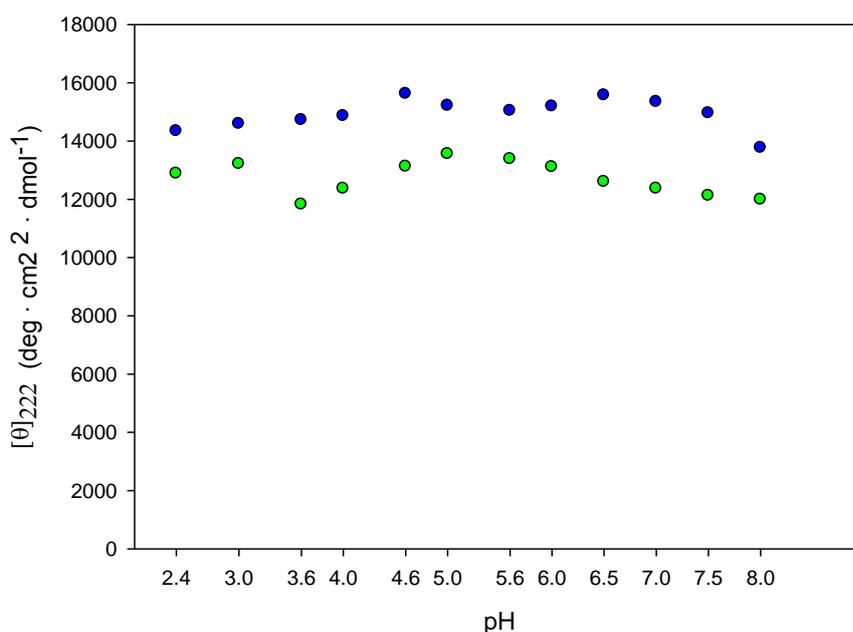


Figura 11 – Elipticidad molar de C-CbpD en función del pH, con 143 mM de colina (azul) y sin colina (verde). Apenas hay variación de la misma en todo el rango estudiado.

Como se puede observar no existe una gran variación en la estructura de C-CbpD en el rango estudiado, tanto en presencia como en ausencia de colina, lo que deja patente su estabilidad en los distintos pH estudiados.

5.4. Evaluación del papel de la colina en la estabilidad térmica

En el apartado 5.1 se ha comprobado el papel de la colina en cuanto a la estabilización frente un agente desnaturizante como el cloruro de guanidinio, en este se pretendía comprobar como actuaba el porcentaje de colina usado con C-CbpD frente a una desnaturización térmica, así como calcular el punto medio de desnaturización térmica.

Para ello se sometió a un barrido térmico una serie de muestras de proteína con concentraciones crecientes de colina y se midió su espectro de dicroísmo circular, obteniendo así la elipticidad que presenta a lo largo del rango de temperaturas **Figura 12**.

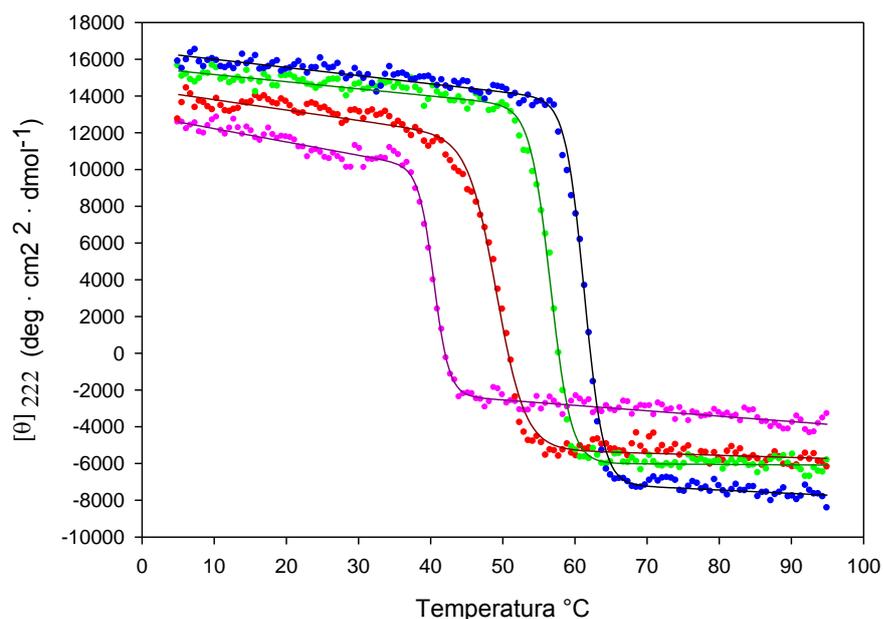


Figura 12 – a) Comparativa de los diferentes barridos de temperatura efectuados a distintas concentraciones de colina. De izquierda a derecha: 0, 10, 48, 143 mM de colina. Se puede observar que conforme esta aumenta, aumenta a su vez la temperatura a partir de la cual empieza a producirse la desnaturalización. La línea continua es el ajuste a una curva sigmoide sin significado físico para obtener los puntos medios.

De esto se deduce, y apoya la hipótesis, que la colina actúa estabilizando C-CbpD, puesto que al aumentar su cantidad aumenta la temperatura a la cual empieza a producirse la transición entre los estados plegados y desplegados, lo que parece común a otras CBP como CPL1 (Sanz y cols., 1993). También varía el punto medio de desnaturalización térmica tal y como se muestra en la **tabla 2**. Además se puede ver que el punto medio es inferior al de C-LytA y CPL1 (Sanz y cols., 2006) **tabla 3**, por lo tanto es más inestable térmicamente que C-LytA, lo que contrasta con que es químicamente más estable frente a guanidinio según se muestra en el apartado 5.2.

Colina	$[T]_{1/2}$ °C
0 mM	40.09 ± 0.05
10 mM	48.64 ± 0.07
48 mM	56.35 ± 0.04
143mM	61.03 ± 0.04

Tabla 2 – Comparativa del punto medio de desnaturalización térmica ($[T]_{1/2}$) en función de la cantidad de colina.

CBM	Colina mM	$[T]_{1/2}$ °C
C-CbpD	10	48.64 ± 0.04
	0	40.09 ± 0.05
C-LytA	10	$69,6 \pm 0,2$
	0	62.02 ± 0.5
C-CPL1	10	50.9 ± 0.1
	0	42.9 ± 0.1

Tabla 3 – Comparativa del punto medio de desnaturalización térmica ($[T]_{1/2}$) entre distintos CBM.

Por otro lado se intentó comprobar la reversibilidad de la transición volviendo a la temperatura inicial rápidamente tras llegar al final del barrido, sin embargo en todos los casos se había producido la agregación de las proteínas, observable tanto por el espectro de dicroísmo circular como por la turbidez de la muestra.

Para determinar si esta agregación se producía durante la transición o bien durante algún momento posterior del barrido, se repitió el experimento para cada una de las concentraciones, parando el barrido justo al final de la transición y volviendo a la temperatura inicial rápidamente. Pero de la misma manera que cuando se hacía el barrido completo se producía agregación, que igualmente se observaba en el espectro de dicroísmo circular como por la turbidez de la muestra, por lo que se determinó que la transición térmica de C-CbpD era un proceso no reversible y no pueden calcularse los parámetros termodinámicos.

5.5. Cálculo de la afinidad por colina libre

En este apartado se intentó evaluar la afinidad que presenta C-CbpD por su ligando natural: la colina. Para ello se comparó la elipticidad que presenta a distintas concentraciones de colina a 20 °C, **Figura 13**.

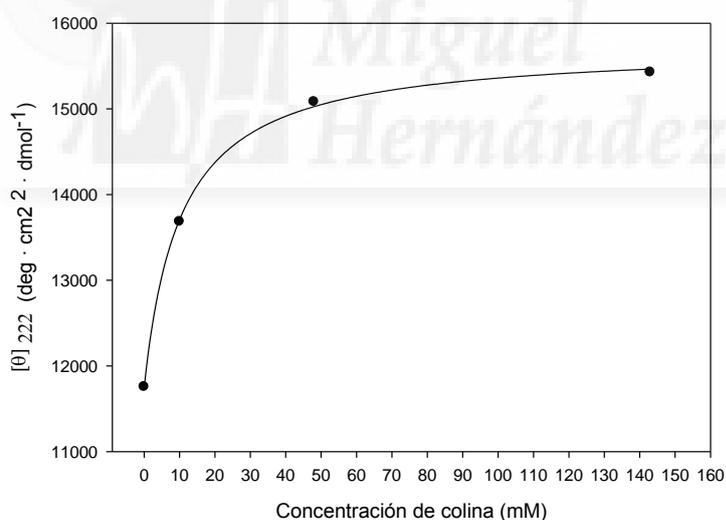


Figura 13 – Elipticidad molar en función de la concentración de colina a 20 °C. La línea continua es el ajuste a una hipérbola para obtener la constante de disociación.

La constante de disociación se llevó a cabo mediante el ajuste de los datos a la ecuación de una hipérbola (ecuación 3.8). La constante de disociación obtenida para C-CbpD fue de 10 ± 1 mM. Comparándose con la constante de disociación de C-CPL1 ($0,59 \pm 0,09$ mM) y de C-LytA, se observa una menor afinidad que cualquiera de las dos (J. M. Sanz, comunicación personal), posiblemente debido a que ésta no dimeriza al unir colina.

5.6. Cálculo de la afinidad por colina en sustrato sólido

Debido a que la actividad del módulo C-CbpD en la naturaleza es unirse a la colina inmovilizada, como la de la pared de los ácidos teicoicos de neumococo, así pues se pensó que medir la afinidad por ligando en superficies sólidas que emulan la estructura de la pared bacteriana sería un método próximo a la realidad.

El proceso de unión a sustrato sólido fue caracterizado mediante la utilización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE, gracias a las cuales se cuantificó la cantidad de proteína retenida por las mismas así como la constante de disociación.

5.5.1 Isoterma de Langmuir

Se obtuvieron las isotermas de Langmuir, obtenidas a 5mM de colina y sin colina, mediante la representación de la masa de C-CbpD frente a la masa de nanopartícula respecto a la concentración inicial de proteína. La razón de hacerlo a 5mM es que se había visto que una pequeña concentración de proteína para otras CBP como C-LytA y C-CPL1 no solo no inhibía la interacción si no que la aumentaba, debido a que estas concentraciones inducen su dimerización y la afinidad del dímero por la nanopartícula es mayor que la del monómero colina (J. M. Sanz, comunicación personal). Sin embargo como C-CbpD se ha comprobado que es monomérica en disolución (apartado 5.2), la colina, aún en baja concentración, disminuye la unión.

Las curvas obtenidas fueron ajustadas a una hipérbola (ecuación 5) que ha permitido obtener la constante de disociación para ambas concentraciones **Figura 14**. La constante de disociación para 5mM de colina es de $0,7\pm 0,1$, mientras que en ausencia de colina es de $0,2\pm 0,1$. Esto determina que C-CbpD tiene mayor afinidad por análogos de colina en ausencia de la misma.

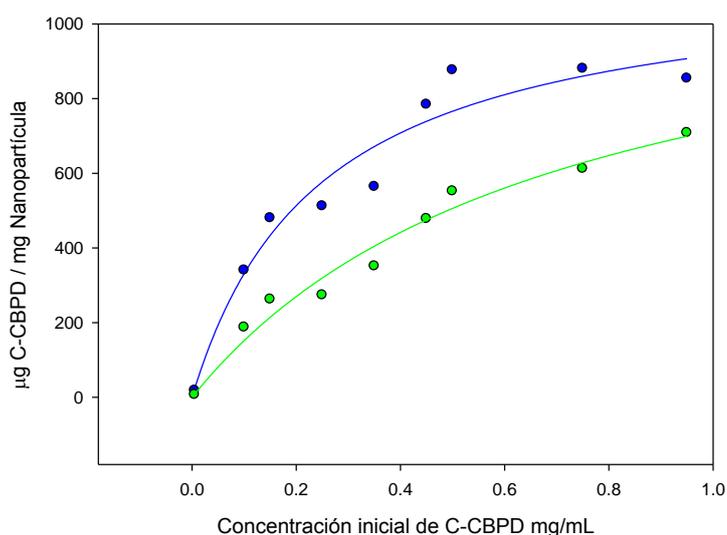


Figura 14 – Isotermas de Langmuir obtenidas sin (azul) y con colina (verde) 5 mM y ajustadas a una hipérbola.

Comparándolo con el módulo C-LytA, uno de los módulos de unión a colina de neumococo más estudiados, se puede comprobar que la afinidad de C-CbpD es mayor que esta ya que tiene una constante de disociación de $0,9 \pm 0,2$ en ausencia de colina, al igual que de C-CPL1 que es $0,3 \pm 0,1$ (J. M. Sanz, comunicación personal). La mayor afinidad por nanopartículas de C-CbpD con respecto a C-LytA o C-CPL1 contrasta con su menor afinidad por colina libre. Sin embargo, hay que tener en cuenta que C-LytA y C-CPL1 unen colina libre con mucha afinidad porque la necesitan para dimerizar, cosa que no hace C-CbpD.



6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados sobre C-CbpD para la caracterización de sus propiedades, junto a una posible proyección futura, se exponen a continuación:

- I. La estabilidad que presenta C-CbpD frente a desnaturalizantes químicos como el cloruro de guanidinio es muy alta si la comparamos con otras CBP como C-LytA. No se consigue la completa desnaturalización de C-CbpD mediante el uso de este tipo de agentes, ni siquiera a muy altas concentraciones y una temperatura elevada. Su alta estabilidad por lo tanto es una cualidad favorable para su posible uso como antimicrobiano.

El proceso de desplegamiento frente a desnaturalizantes químicos podría ser mejor caracterizado llevando a cabo ensayos similares mediante fluorescencia, debido a que permitiría caracterizar mejor la pérdida progresiva de estructura conforme se va aumentando la concentración de desnaturalizante. De esta manera permitiría discernir mejor los posibles estados intermedios de plegamiento tal y como sugiere la posible pretransición que se observa a bajas concentraciones de cloruro de guanidinio.

- II. Los ensayos para comprobar el estado de oligomerización de la proteína determinan que forma monómeros en disolución. Ésto contrasta con otros módulos de unión a colina como C-LytA y C-CPL1 que forman dímeros, poniéndose de manifiesto en los procesos de unión a superficies sólidas como nanopartículas funcionalizadas: una mínima concentración de colina disminuye la unión de C-CbpD con la nanopartícula, en contraposición con los otros dos módulos que una mínima cantidad favorece su dimerización y por lo tanto aumenta la afinidad del dímero por la nanopartícula.
- III. La colina juega un papel clave en la estabilización de la proteína tal y como se ha mostrado en los experimentos de desnaturalización química y térmica. Si se comparan las curvas de desnaturalización química con y sin colina se observa que disminuye en gran medida la elipticidad en ausencia del ligando. Es debido a que cambia el entorno de los triptófanos, responsables de la banda positiva de elipticidad.

Mientras que en el caso de la desnaturalización térmica disminuye radicalmente la temperatura a la cual se empieza a dar la transición conforme hay concentraciones menores de colina en el medio. Podría afinarse más esta variación del punto a partir del cual se da la transición si se realizaran más experimentos a una mayor variedad de concentraciones de colina.

- IV. La desnaturalización térmica de C-CbpD es un proceso irreversible debido a que se produce la agregación de la proteína cuando se da la transición entre los estados plegado y desplegado. Además la temperatura de fusión es inferior a la de C-LytA o C-CPL1, lo que contrasta con su mayor estabilidad frente a cloruro de guanidinio.
- V. C-CbpD se mantiene estable en un gran rango de pH, tanto en presencia como en ausencia de colina. Ésta versatilidad en ambientes con distintos pH es igualmente una cualidad favorable para su posible uso como antimicrobiano.
- VI. La unión de C-CbpD a nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE indica que tiene mayor afinidad por éstos análogos que C-LytA o C-CPL1, quizás debido a que su pequeño tamaño en comparación permite una mayor cantidad de moléculas por nanopartícula además teniendo en cuenta que las otras dimerizan y por lo tanto aumentan de tamaño.

Como conclusión final destacar que al tener más afinidad por nanopartículas, probablemente la va a tener por la pared celular de neumococo, así que puede que sea un mejor antimicrobiano que C-LytA o C-CPL1. También es muy resistente a pH y a desnaturalizantes químicos como el cloruro de guanidinio. Esto contrasta con su inestabilidad térmica, lo cual es un inconveniente para su uso terapéutico. Una perspectiva futura sería su estabilización térmica mediante ingeniería de proteínas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, GA., Kishony, R., Kreiswirth, BN., Kutter, E., Lerner, SA., Levy, S., Lewis K., Lomovskaya, O., Miller, JH., Mobashery, S., Piddock, LJ., Projan, S., Thomas, CM., Tomasz, A., Tulkens, PM., Walsh, TR., Watson, JD., Witkowski, J., Witte, W., Wright, G., Yeh, P & Zgurskaya, H. I. (2011). *Tackling antibiotic resistance*. Nat. Rev. Microbiol., 9, 894-896.
2. Tan, T. Q. (2003). *Antibiotic resistant infections due to Streptococcus pneumoniae: impact on therapeutic options and clinical outcome*. Curr. Opin. Infect. Dis., 16, 271-277.
3. Maestro, B., & Sanz, J. M. (2007). *Novel approaches to fight Streptococcus pneumoniae*. Recent Pat. Antiinfect. Drug. Discov., 2, 188-196.
4. WHO (2007). *Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization*. Wkly. Epidemiol. Rec. 82, 93-104.
5. Gamez, G., & Hammerschmidt, S. (2012). *Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development*. Curr. Drug Targets, 13, 323-337.
6. Singleton, R. J., Hennessy, T. W., Bulkow, L. R., Hammitt, L. L., Zulz, T., Hurlburt, D. A. & Parkinson, A. (2007). *Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage*. Jama, 297, 1784-1792.
7. Albrich, W. C., Monnet, D. L., & Harbarth, S. (2004). *Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes*. Emerg. Infect. Dis., 10, 514-517.
8. Liñares y cols. (2000). *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. Ed. Mary Ann Liebert, 399-407.
9. Bergmann, S., & Hammerschmidt, S. (2006). *Versatility of pneumococcal surface proteins*. Microbiol., 152,295-303.
10. Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S., & Hermoso, J. A. (2012). *Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts*. Mol. Oral Microbiol., 27, 221-245.
11. López, R., & García, E. (2004). *Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage*. FEMS Microbiol. Rev., 28, 553-580.
12. Hermoso, J. A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., Menéndez, M. *Structural Basis for Selective Recognition of Pneumococcal Cell Wall by Modular Endolysin from Phage Cp-1 Structure*. (2003). Struct., 11, 1239-1249.
13. Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., & Romero, A. (2001). *A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA*. Nat. Struct. Mol. Biol., 8, 1020-1024.

14. Sánchez-Puelles, J., Sanz, J. M., Garcia, J., & Garcia, E. (1990). *Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases*. *Gene*, 89, 69-75.
15. Vegard Eldholm, Ola Johnsborg, Daniel Straume, Hilde Solheim Ohnstad, Kari Helene Berg, Juan A. Hermoso and Leiv Sigve Håvarstein (2010). *Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide*. *Mol. Microbiol.*, 76, 905-917.
16. Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nat.*, 227, 680-685.
17. Myers, J.K., Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1995). *Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding*. *Protein Sci.*, 4, 2138-2148.
18. Copeland, R. A. (2004). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. Ed. John Wiley & Sons, 76-78.
19. Hung, C. W., Holoman, T. R., Kofinas, P., & Bentley, W. E. (2008). *Towards oriented assembly of proteins onto magnetic nanoparticles*. *Biochem. Eng. J.*, 38, 164-170.
20. Galen S. Loving, Matthieu Sainlos and Barbara Imperiali (2010). *Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores*. *Trends Biotechnol.*, 28, 73.
21. Maestro, B., & SANZ, J. (2005). *Accumulation of partly folded states in the equilibrium unfolding of the pneumococcal choline-binding module C-LytA*. *Biochem. J.*, 387, 479-488.
22. Sanz, J. M., Garcia, J. L., Laynez, J., Usobiaga, P., & Menéndez, M. (1993). *Thermal stability and cooperative domains of CPL1 lysozyme and its NH₂- and COOH-terminal modules. Dependence on choline binding*. *J. Biol. Chem.*, 268, 6125-6130.
23. Maestro, B., Gonzalez, A., García, P., Sanz, J.M. (2006). *Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclin amines*. *FEBS J.*, 274, 364-376.