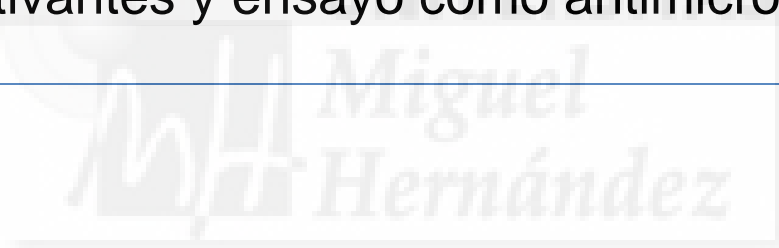


Universidad Miguel Hernández  
Facultad de Ciencias Experimentales

Proteínas de la superficie de *Streptococcus pneumoniae*: diseño de nuevas moléculas inactivantes y ensayo como antimicrobianos

---



**Lorena Albaladejo Tasso**

Tutores: Manuel Sánchez Angulo y Jesús Sanz Morales

Instituto de Biología Molecular y Celular

2015-2016

Grado en Biotecnología

## ANEXO: ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	aminoácidos
<b>Ala</b>	alanina
<b>CBM</b>	<i>choline binding module</i>
<b>CBP</b>	<i>choline binding protein</i>
<b>CBR</b>	<i>choline binding repeats</i>
<b>C-CPL1</b>	C-terminal de la endolisina con actividad muraminidasa CPL-1
<b>C-LytA</b>	C-terminal de la autolisina neumocócica LytA
<b>DAO</b>	D-aminoácido oxidasa
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>FAD</b>	<i>flavin adenine dinucleotide</i>
<b>GFP</b>	proteína fluorescente verde
<b>LB</b>	<i>Luria-Bertani medium</i>
<b>o.n.</b>	<i>overnight</i>
<b>PNa</b>	fosfato monosódico
<b>SAXS</b>	<i>small angle X ray scattering</i>
<b>THY</b>	<i>Todd-Hewitt Yeast medium</i>

# Índice

<b>1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
2.2. Estructura de la superficie del neumococo.....	4
2.3. Módulos de unión a colina.....	6
2.4. Módulos de unión a colina (CBMs): C-LytA y C-CPL1 .....	7
<b>3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	9
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
4.1. Cepas usadas.....	10
4.2. Medios de cultivo .....	10
4.2.1. Medio de cultivo THY.....	10
4.2.2. LB + ampicilina.....	10
4.3. Medidas de espectrofotometría .....	10
4.4. Purificación de C-LytA-DAO.....	11
4.4.1. Tampones para la purificación de C-LytA-DAO.....	11
4.4.2. Crecimiento <i>E. coli</i> BL21 pCPC21.....	11
4.4.3. Ruptura de las células y extracción de la enzima .....	11
4.4.4. Purificación de C-LytA-DAO .....	12
4.4.5. Cuantificación de la proteína .....	12
4.4.6. Diálisis de la proteína.....	12
4.4.7. Actividad de C-LytA-DAO.....	13
4.5. Proteínas con Módulos de Unión a Colina.....	13
4.6. Crecimiento de la cepa R6 e inoculación.....	13
4.7. Microscopía.....	14
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
5.1. C-LytA-GFP se une a <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
5.2. C-LytA provoca el alargamiento de las cadenas de <i>S. pneumoniae</i> .....	18

5.3. C-CPL1 afecta al crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> de manera más efectiva que C-LytA .....	21
5.4. C-LytA-DAO también se une a <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	26
5.5. La adición de colina 5 $\mu$ M no aumenta el efecto de estas CBMs en los cultivos de <i>S.pneumoniae</i> .....	28
<b>6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA</b> .....	<b>29</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>



## 1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El incremento en los niveles de resistencia de microorganismos infecciosos a los antimicrobianos tradicionales constituye un problema de primer orden en la sanidad actual, con unos costes sociales y económicos de elevada magnitud. Uno de los microorganismos que presenta dicha resistencia es *Streptococcus pneumoniae*. En el desarrollo de nuevos antimicrobianos contra dicha bacteria, es de gran interés el uso de módulos de unión a colina (CBMs). Hasta ahora había sido estudiada la capacidad y estabilidad de la unión a colina por parte de C-LytA y C-CPL1, habiendo pocos datos acerca de cómo la adición de estos CBMs podrían afectar al crecimiento y viabilidad de *S. pneumoniae*. Se presenta un trabajo donde se realiza un estudio comparativo de la capacidad de inferencia en el crecimiento de la cepa R6 de *S. pneumoniae* por parte de los módulos de unión a colina provenientes del C-terminal de la autolisina LytA (C-LytA), de sus variantes (C-LytA-GFP y C-LytA-DAO) y el C-terminal de la lisozima del fago Cp-1 (CPL-1).

**Palabras clave:** neumococo, proteínas de unión a colina, antimicrobiano, módulos de unión a colina, crecimiento

The increased levels of resistance of infectious microorganisms to traditional antimicrobials is a major problem in today's health, with elevated social and economic costs. One of the microorganisms that have such resistance is *Streptococcus pneumoniae*. In the development of new antimicrobials against these bacteria, it is interesting to study the use of choline-binding modules (CBMs). The capacity and stability of choline binding by C-LytA and C-CPL1 had been studied, but we have little information about how the addition of these CBMs could affect the growth and viability of *S. pneumoniae*. Some trials are presented to compare the ability of inference in the growth of R6 strain of *S. pneumoniae* by adding the C-LytA, C-LytA-GFP, C-LytA-DAO and C-CPL1 modules.

**Keywords:** pneumococcus, choline-binding proteins, antimicrobial, choline-binding modules, growth

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae*, también conocida como neumococo es una bacteria Gram positiva con morfología cocal. Esta bacteria se encuentra normalmente colonizando la nasofaringe de individuos sanos, incluyendo aproximadamente la mitad de todos los niños (Revai y cols., 2006). Es importante en algunos casos de meningitis, afectando principalmente a niños y ancianos.

Hasta 1967 esta bacteria había sido susceptible al tratamiento con penicilina. Sin embargo, ese año se describieron por primera vez cepas de neumococo resistentes a penicilina que también mostraban resistencia a tetraciclina (Hansmann y Bullen, 1967). A principios de siglo se introdujo la vacuna infantil antineumocócica conjugada pentavalente (PCV7), observándose una disminución en los niveles de resistencia a la penicilina en varios países (Kyaw y cols., 2006). A pesar de este hecho, se produjo un aumento de la resistencia por parte de los serotipos no incluidos en la vacuna, en especial el 19A multirresistente, que se ha observado en muchos países desde 2005 hasta 2009 (Liñares, Ardanuy, Pallares y Fenoll, 2010).

Las enfermedades neumocócicas constituyen la 4ª causa mundial de muerte, y representan asimismo la mayor causa de mortalidad en EEUU y Europa dentro de las enfermedades prevenibles por vacunas (Gamez y cols., 2012). A pesar de que en los países menos desarrollados siempre ha constituido una de las primeras causas de mortalidad infantil, en las últimas décadas la situación se ha complicado también para los países desarrollados, ya que las vacunas actuales sólo cubren una pequeña parte de los más de 90 serotipos distintos de neumococo (Singleton y cols., 2007).

Y en lo que respecta a los antibióticos, únicamente en el sur de Europa se ha pasado de un 5% a un 50% de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por parte de los análisis clínicos de neumococo en sólo una década (Albrich y cols., 2004).

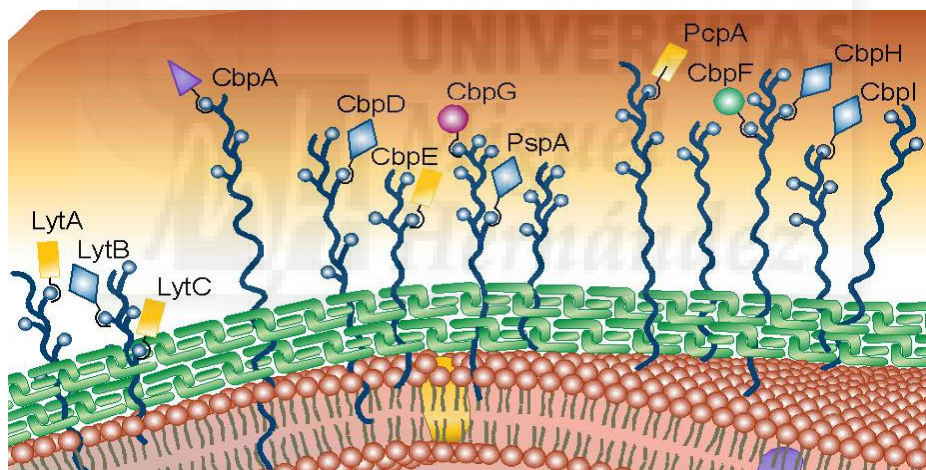
Teniendo en cuenta estos datos nos encontramos frente a un panorama realmente preocupante en el cual la única salida que tenemos es la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de antibióticos.

### **2.2. Estructura de la superficie del neumococo**

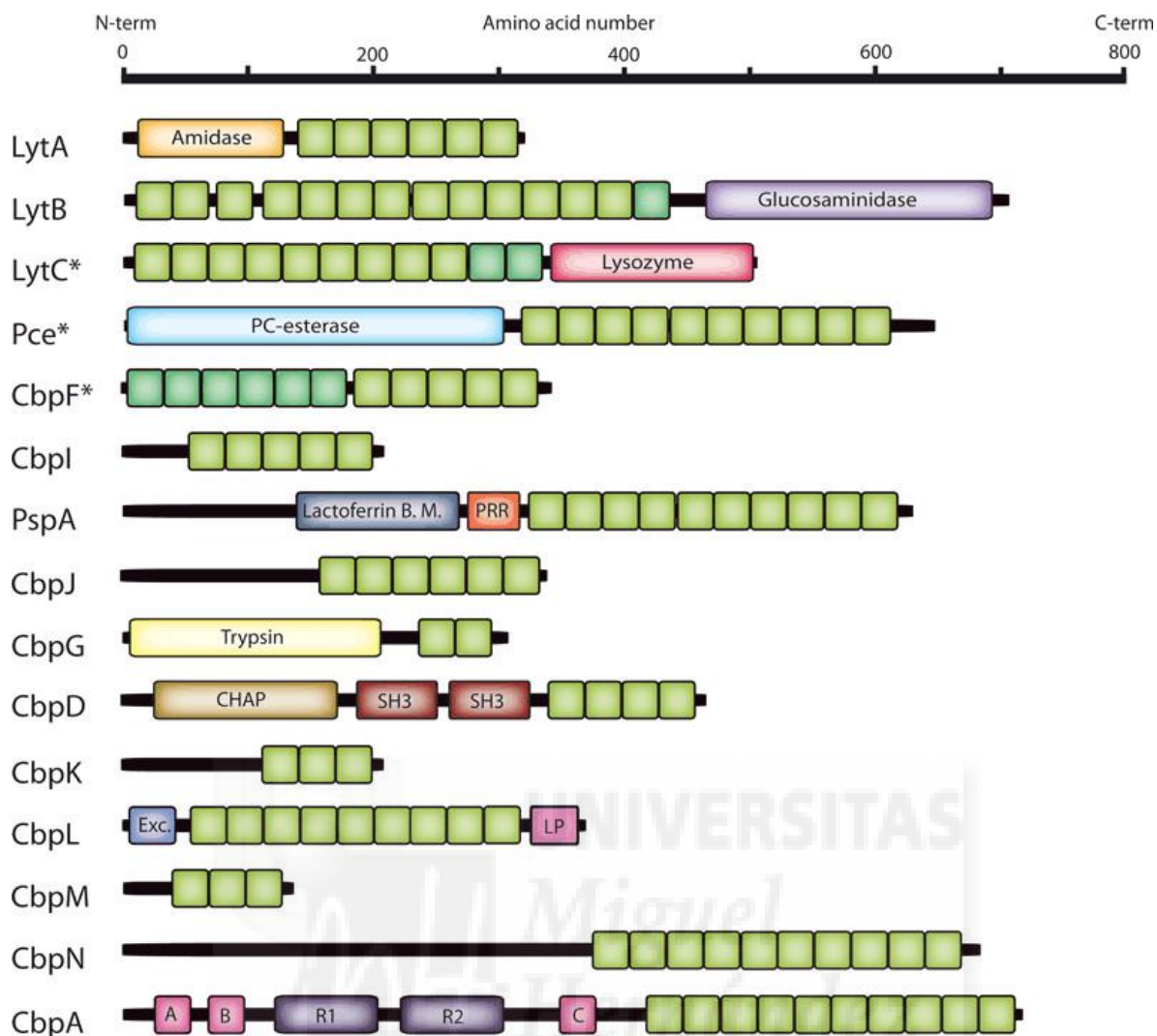
En la búsqueda de estos nuevos antimicrobianos se les está prestando especial atención a las proteínas asociadas a la superficie *S. pneumoniae* constituyen una buena

diana para la producción de nuevos antimicrobianos (Maestro y Sanz, 2007; Pérez-Dorado y cols., 2012). Estas proteínas intervienen en procesos esenciales para la viabilidad y virulencia bacterianas, como son: la adhesión al huésped, separación de las células hijas al final de la división celular, liberación de toxinas, camuflaje frente al sistema inmune, etc... (Bergmann y cols., 2006).

Dentro de estas proteínas asociadas a la superficie encontramos las proteínas de unión a colina (*Choline Binding Proteins*, CBPs), muchas de las cuales están implicadas en la virulencia de *S. pneumoniae* (Rosenow et al., 1997). Las CBPs constituyen una familia de alrededor de 15 miembros que comparten módulos de unión a colina (*Choline Binding Module*, CBMs). Estos módulos o dominios son los encargados de anclar las proteínas CBPs a la superficie de la bacteria, pues se unen a la fosforilcolina de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos presentes en la pared celular (Bergmann y cols., 2006) (**Figura 1**). Una vez ancladas, las CBPs pueden realizar su función biológica, gracias a que tienen un módulo catalítico (**Figura 2**).



**Figura 1.** Representación de la pared celular neumocócica que muestra 12 de las proteínas de unión a colina identificadas ancladas a los ácidos teicoicos. In vivo, ciertas CBPs como *CbpA* o *PspA* son más abundantes que otras.



**Figura 2.** En verde se representan los CBMs compuestos por varias CBRs. Los dominios funcionales están representados en otro color. (imagen adaptada de Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S. & Hermoso J.A., 2012)

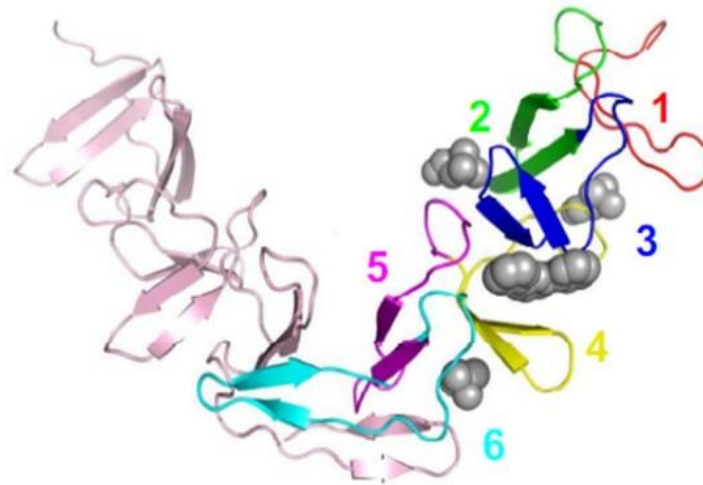
### 2.3. Módulos de unión a colina

Los CBMs usados en este estudio están constituidos por motivos repetidos de alrededor de 20 residuos (*Choline Binding Repeats*, CBRs), ricos en aminoácidos aromáticos. Estos motivos se disponen a lo largo del eje de una solenoide y cada CBR contiene un bucle y una horquilla-beta de forma que, cada sitio de unión a colina (constituido por dos CBRs) está configurado por dos horquillas consecutivas que aportan aminoácidos aromáticos, los cuales son fundamentales, ya que la carga positiva de la colina interacciona con los anillos  $\pi$  de los residuos aromáticos. Por tanto, esta interacción junto con las de van



der Waals que se forman son responsables de la afinidad de los CBMs por la colina. (**Figura 3**) (Fernández-Tornero y cols., 2001; Pérez-Dorado y cols., 2012).

---



**Figura 3.** Estructura de rayos X de C-LytA baso en el PDB 1HCX. Cada cadena del homodímero contiene seis motivos estructurales (coloreados en rojo, verde, azul, amarillo, magenta y cian) compuesto de una horquilla- $\beta$  y un lazo largo, que juntos constituyen cuatro sitios de unión a colina, ocupados en la estructura cristalina por tres residuos de colina y un residuo de N-óxido de N,N-dimetil dodecilamina (esferas grises) (adaptado a partir de Hernández-Rocamora, 2009).

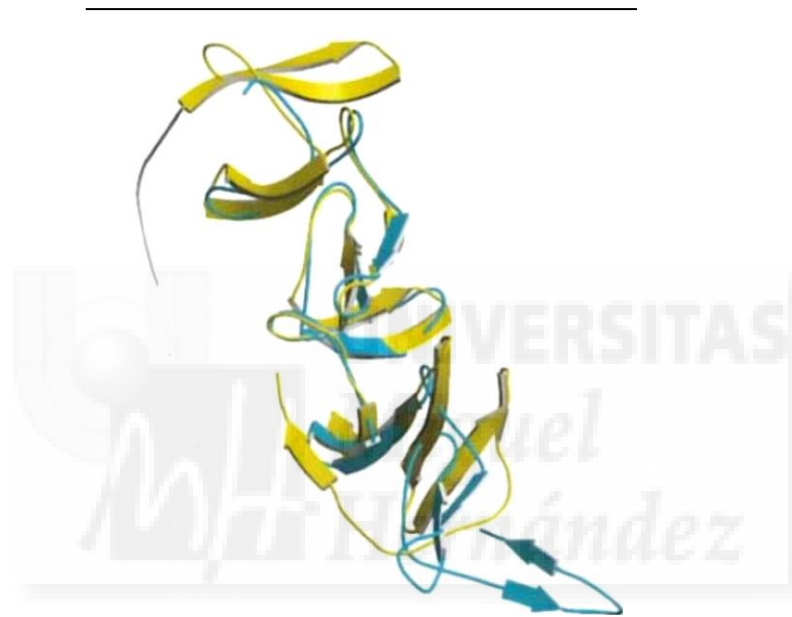
---

#### 2.4. Módulos de unión a colina (CBMs): C-LytA y C-CPL1

C-LytA (15 kDa) es el módulo C-terminal de la autolisina neumocócica LytA y, el principal representante de las proteínas de unión a colina. Este polipéptido de 135 aa contiene seis horquillas- $\beta$  conservadas que configuran cuatro sitios de unión a colina, cuya estructura se muestra en la **Figura 3**. La afinidad de C-LytA por colina y sus análogos estructurales ha dado como resultado el desarrollo de múltiples aplicaciones, como es su uso como “etiqueta” (*tag*) de afinidad para la purificación e inmovilización de proteínas (Sánchez-Puelles y cols., 1992).

Otro CBM usado ha sido el proveniente de la lisozima CPL-1. Esta es una proteína del fago Cp-1, que infecta y lisa a *S. pneumoniae*. CPL-1 es una endolisina con actividad muramidasa que hidroliza de forma específica y dependiente de colina la pared celular del neumococo. CPL1 posee un dominio catalítico en el extremo amino terminal, y un módulo de unión a colina (C-CPL1) en el extremo carboxilo terminal, unidos por un conector de aminoácidos cargados negativamente (Resch y cols., 2011).

A pesar de que los módulos C-CPL1 y C-LytA poseen una secuencia muy similar, con más del 50% de identidad y ambas con 6 repeticiones de unión a colina, la estructura tridimensional es significativamente diferente (**Figura 4**). Mientras que C-LytA presenta un único pliegue formando una superhélice, como se indicaba anteriormente, C-CPL1 muestra dos dominios claramente diferenciados dentro del módulo de unión a colina, CI y CII. Además, CPL1 dimeriza en presencia de colina, al igual que ocurre con LytA. También lo hacen los módulos C-CPL1 y C-LytA. Sin embargo, el mecanismo de dimerización podría no ser el mismo, según resultados obtenidos por la técnica SAXS (*small angle X ray scattering*) (Buey y cols., 2007).



**Figura 4.** Superposición estructural de CPL1 (amarillo) y C-LytA (azul).

---

Se ha observado que los módulos de unión a colina (CBMs) aislados presentan un gran potencial como antibióticos proteicos, ya que son capaces de competir con las CBPs completas del propio neumococo por la unión a colina, de manera que, la adición de CBMs exógenos como C-LytA y C-CPL1 inhiben en un 45% y 80%, respectivamente la actividad de las enzimas neumocócicas LytA y CPL-1, al competir estas últimas por la unión a la colina de la pared celular de la bacteria (Sánchez-Puelles y cols., 1990). Así pues, estos módulos podrían constituir nuevos agentes antimicrobianos polipeptídicos.

### 3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Como se ha ido comentando en los apartados anteriores, es de gran interés el uso de módulos de unión a colina frente al neumococo, dadas sus potenciales aplicaciones como antimicrobianos. Hasta ahora se habían hecho experimentos para comprobar la capacidad y estabilidad de la unión a colina por parte de C-LytA y C-CPL1. Sin embargo, existen pocos datos acerca de cómo la adición de estos CBMs podrían afectar al crecimiento y viabilidad de *S. pneumoniae*.

#### OBJETIVOS

En este trabajo se realiza un estudio comparativo de la capacidad de interferencia en el crecimiento de la cepa R6 de *S. pneumoniae* por parte de los módulos de unión a colina provenientes del C-terminal de la autolisina LytA (C-LytA), de sus variantes (C-LytA-GFP y C-LytA-DAO) y de la lisozima del fago Cp-1 (CPL-1), con los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Poner a punto la técnica de crecimiento de cultivos de la cepa R6 de *S. pneumoniae*

Objetivo 2: Observar los efectos producidos al añadir en cultivos de *S. pneumoniae* las distintas CBMs antes indicadas y determinar cuál de ellas posee un mayor potencial antimicrobiano

Objetivo 3: Comprobar el efecto sobre el crecimiento de neumococo debido a la generación de radicales libres usando una fusión C-LytA-DAO.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas usadas

Las cepas usadas en este trabajo pertenecen a la colección del laboratorio. *Streptococcus pneumoniae* R6 es una cepa acapsulada y no virulenta. Para obtener la proteína de fusión C-LytA-DAO se utilizó *Escherichia coli* BL21, con el plásmido pCPC21 (C. Moldes y cols., resultados no publicados). El manejo de las cepas y de los medios de cultivo siempre fue en condiciones asépticas para asegurar la esterilidad y evitar contaminaciones.

### 4.2. Medios de cultivo

Si no se indica lo contrario, todos los medios fueron esterilizados rutinariamente mediante autoclavado a 121°C, 1,2 atmósferas de presión de vapor y 20 minutos de tiempo de esterilización.

#### 4.2.1. Medio de cultivo THY

El medio usado para el crecimiento de la cepa R6 ha sido el THY. Para la preparación de este medio se emplearon: 30 gr de Bacto Todd Hewitt (BD, Ref: 249240), 5 gr de Bacto Extracto Levadura (BD) y agua hasta un litro.

#### 4.2.2. LB + ampicilina

El medio usado para el crecimiento de *E.coli* BL21 pCPC21 ha sido el medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina. Para su preparación en el laboratorio se adicionaron los siguientes componentes: 10g de Triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl. Se añade agua hasta llegar a un litro. Para elaborar LB sólido se adicionaban 20g de agar (2% final). En caso de requerir ampicilina se añadía después de haber autoclavado y a una concentración final de 100 µg/mL.

### 4.3. Medidas de espectrofotometría

A lo largo de este trabajo se utilizó un espectrofotómetro Evolution 201 UV-Visible de *ThermoFisher*® tanto para la medición rutinaria de la densidad óptica de los cultivos bacterianos, como de la cuantificación de proteínas.

Para determinar la densidad óptica de los cultivos de *E. coli* se utilizaron cubetas de plástico desechables con paso óptico de 1 cm y se midió la absorbancia aparente a 600 nm.

Para los cultivos de *S. pneumoniae* se utilizaron tubos SARTEDT de 5 mL con paso óptico de 1 cm y se midió la absorbancia aparente a 550 nm.

Para la medición de la concentración de proteínas se usaron cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

#### **4.4. Purificación de C-LytA-DAO**

Los siguientes tampones fueron usados rutinariamente para la purificación y el manejo de las proteínas purificadas durante la realización de este trabajo.

##### **4.4.1. Tampones para la purificación de C-LytA-DAO**

- Tampón de equilibrado: PNa 20 mM pH 7.5 con 20% de glicerol (P/V)
- Tampón de lavado: PNa 20 mM pH 7.5 con 20% de glicerol y 1.5 M NaCl
- Tampón de elución: PNa 20 mM pH 7.5 con 20% de glicerol, 1.5 M NaCl y 140 mM de colina al 2% (P/V)
- Tampón de diálisis: PNa 20 mM pH 7.5 con 10% de glicerol
- FAD 10 mM

##### **4.4.2. Crecimiento *E. coli* BL21 pCPC21**

Se inoculó la cepa en 10 mL de medio LB con ampicilina en un matraz de 50 mL. Una vez realizado este precultivo se dejó incubar a 37 °C con agitación durante toda la noche.

Tras ese tiempo se añaden los 10 mL del precultivo a un matraz que contiene 1L de LB y se le adiciona de nuevo ampicilina. Se deja crecer a 37°C con agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm. En ese momento se añadió IPTG a una concentración final de 500 µmolar para activar la expresión de la proteína. El cultivo se incubó a 30°C en agitación durante toda la noche.

##### **4.4.3. Ruptura de las células y extracción de la enzima**

Al día siguiente las células se recogieron con una centrifugación a 6000 rpm en una centrífuga *Avanti J-26 XP de Beckman Coulter®* con un rotor J-20, a 4°C durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 50 mL del tampón de equilibrado manteniendo el tubo a 4°C. Almacenamos las células a -20°C.

Tras la descongelación añadimos 500  $\mu$ L de FAD 10 mM (cofactor necesario para estabilizar la enzima y que posteriormente pueda actuar). A continuación se realizan 10 ciclos de sonicación, en un sonicador *Branson SONIFIER® 250*, de 15 segundos, una centrifugación en una centrífuga *Avanti J-26 XP de Beckman Coulter®* con un rotor J-14, a 4°C durante 10 minutos en la que quedará un precipitado que se descarta, quedándonos con el sobrenadante.

#### **4.4.4. Purificación de C-LytA-DAO**

La columna usada para purificar tiene 30 cm de largo y 2.5 cm de ancho. El lecho se forma con 5 g de DEAE-celulosa en tampón de equilibrado. Una vez se ha hinchado se añade un volumen de columna de tampón para estabilizar el lecho. A continuación, se pasa el extracto por la columna y se añade el tampón de lavado (PNa 20 Mm pH 7.5 con 20% de glicerol, NaCl 1.5 M) para eliminar las impurezas. Se añade este tampón hasta que en la prueba Bradford (kit comercial para cuantificar proteína; se realiza según indicaciones del fabricante) no salga color (para la realización de la prueba se añaden 5  $\mu$ L de Bradford y 20  $\mu$ L de muestra).

Una vez eliminadas las impurezas se procede a realizar la elución de la proteína de interés. El tampón de elución contiene PNa 20 Mm pH 7.5 con 20% de glicerol, NaCl 1.5 M y 140 mM de colina al 2% (P/V). La colina presente en el tampón provoca que la CBM C-LytA-DAO se una a ella y por tanto, se suelte de la columna de DEAE. Este hecho es el que nos permite eluir la proteína. Una vez recogida las diferentes fracciones que contienen a C-LytDAO se congela a -20 °C.

#### **4.4.5. Cuantificación de la proteína**

Se prepara una cubeta “blanco” la cual contiene 1 mL de tampón de elución y se establece un rango de lectura de 240 a 320 nm.

Se añade 1 mL de muestra a otra cubeta y se obtiene una curva con un máximo de absorción a 280 nm, un hombro a 290 nm y un mínimo a 260 nm, este último correspondiente al ADN. Para calcular la concentración en mg/mL, se utilizó la Ley de Lambert-Beer, conociendo que el Coeficiente de Extinción Molar de dicha proteína. Una vez calculada la concentración se divide entre el peso molecular de la proteína (en este caso 61.203 Da) para obtener la molaridad.

#### **4.4.6. Diálisis de la proteína**

Para la eliminación de la colina y la sal de la muestra de proteína se realizó una diálisis. Las membranas de diálisis fueron preparadas siguiendo las indicaciones del fabricante. El volumen de la muestra a dializar fue de 3 mL de la proteína. . El volumen de tampón de diálisis fue de 1 litro. Se realizaron 3 pases incubándose a 4°C con agitación suave durante unas 24 horas en total.

La muestra dializada fue centrifugada a 13000 rpm, a 4°C durante 3 minutos en una centrífuga Eppendorf para conseguir precipitar cualquier rastro de proteína desnaturalizada. Nos quedamos con la proteína soluble, presente en el sobrenadante.

#### **4.4.7. Actividad de C-LytA-DAO**

Una vez cuantificada la cantidad de proteína se calcula su actividad específica. Para ello se mezclan en un tubo eppendorf: 10µg de enzima y fenilglicina 25 mM como sustrato de la enzima en tampón PNa 20mM, pH7.5, glicerol 10%. El volumen de reacción es 900 µL y se deja reaccionar durante 10 minutos. Al pasar este tiempo se para la reacción con ácido acético (el volumen total pasa a ser de 1 mL) y se mide la absorbancia del benzoil fórmico, el producto de la reacción.

#### **4.5. Proteínas con Módulos de Unión a Colina**

Las siguientes proteínas purificadas utilizadas en este trabajo estaban disponibles en la colección del laboratorio: C-LytA, C-LytA-GFP y C-Cpl1. Todas las proteínas se mantenían congeladas a -80°C. Antes de su utilización, se descongelaban, se centrifugaban para eliminar la proteína desnaturalizada y posteriormente se determinaba su concentración mediante espectrofotometría UV. En el caso de C-CPL1, el coeficiente de extinción molar a 280 nm es de 81076 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, para C-LytA es de 62540 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y para C-LytA-GFP es de 111855 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### **4.6. Crecimiento de la cepa R6 e inoculación**

Los cultivos exponenciales de *S. pneumoniae* R6 utilizados en este trabajo se prepararon de la siguiente manera. El día anterior al experimento se preparan 4 tubos estériles conteniendo 4 mL de medio de cultivo THY. Tres de esos tubos se inoculan con 80, 40 y 20 µL respectivamente de un congelado de la cepa. Estas cuatro alícuotas se introducen en un baño termostaticado de *Polyscience*, el cual se programa para que tenga una temperatura de 15°C durante toda la noche. De esa manera la bacteria está en estado de latencia. A las 5 de la mañana la temperatura del baño se incrementa a 37°C automáticamente. De esta forma, la bacteria comienza a crecer y al cabo de unas horas el cultivo se encontrará en fase exponencial temprana. Sólo se utiliza uno de los cultivos para

inocular los tubos en los que realizaremos el experimento, generalmente el que presentaba una  $DO_{550}$  cercana a 0,2.

El cultivo se diluye 100 veces en tubos que contiene medio THY precalentado a 37°C y se comienza a seguir la evolución de su densidad óptica a intervalos regulares, generalmente de 20 minutos. Cuando los cultivos alcanzan la densidad óptica deseada, se les añade las diferentes CBPs a ensayar continuándose las medidas de su densidad óptica. En algunos momentos también se tomaban muestras para observación microscópica. Dichas muestras eran fijadas con formaldehído al 1% de concentración final. En todos los casos siempre se realizaba un cultivo control al que sólo se le añadía tampón.

#### **4.7. Microscopía**

Las diferentes muestras para observación microscópica fueron fijadas con formaldehído al 1% de concentración final y posteriormente almacenadas a 4° C para su observación posterior. Para la observación en contraste de fases se usó un microscopio electrónico Olympus BX50. Para la microscopía confocal de fluorescencia se utilizó un microscopio Leica TCS SPE.





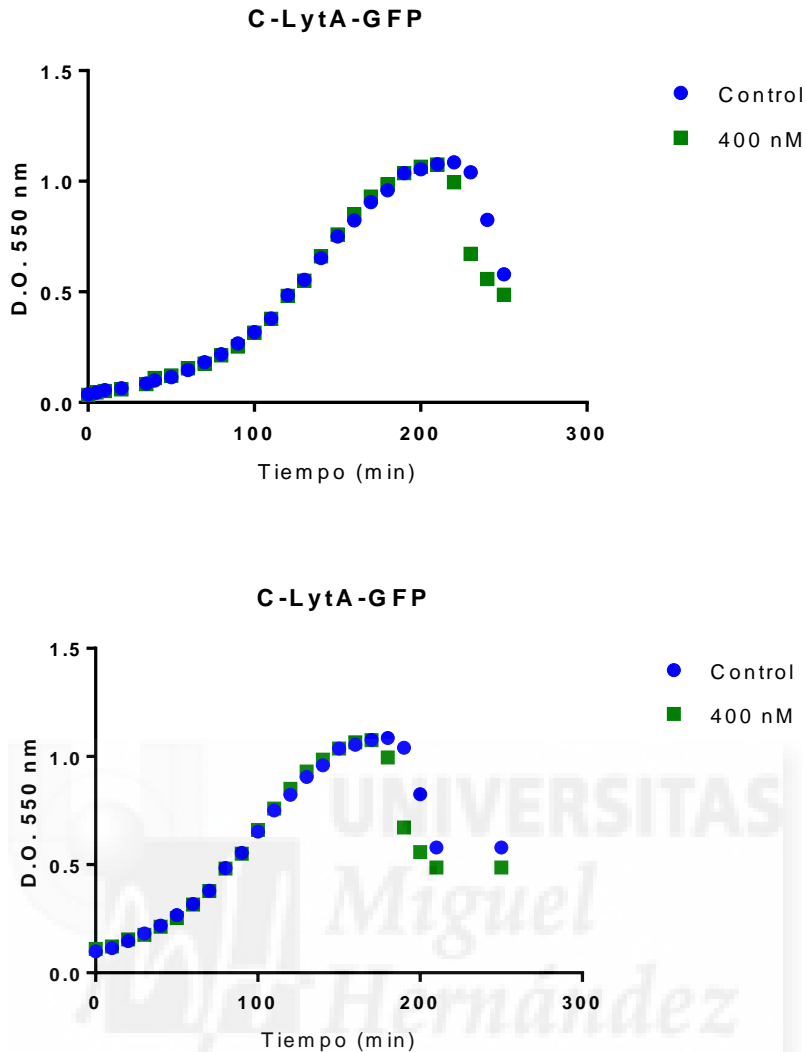
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. C-LytA-GFP se une a *Streptococcus pneumoniae*

Para demostrar que C-LytA era capaz de unirse a células vivas de *S. pneumoniae* se realizó el siguiente experimento utilizando la proteína de fusión C-LytA-GFP. Se dispusieron dos cultivos de *S. pneumoniae* R6. Cuando la densidad óptica alcanzó el valor de 0,1 se añadió C-LytA-GFP a una concentración de 400 nM a uno de ellos. Se midió la densidad óptica a intervalos regulares de tiempo. En paralelo se tomaron muestras para su observación microscópica.

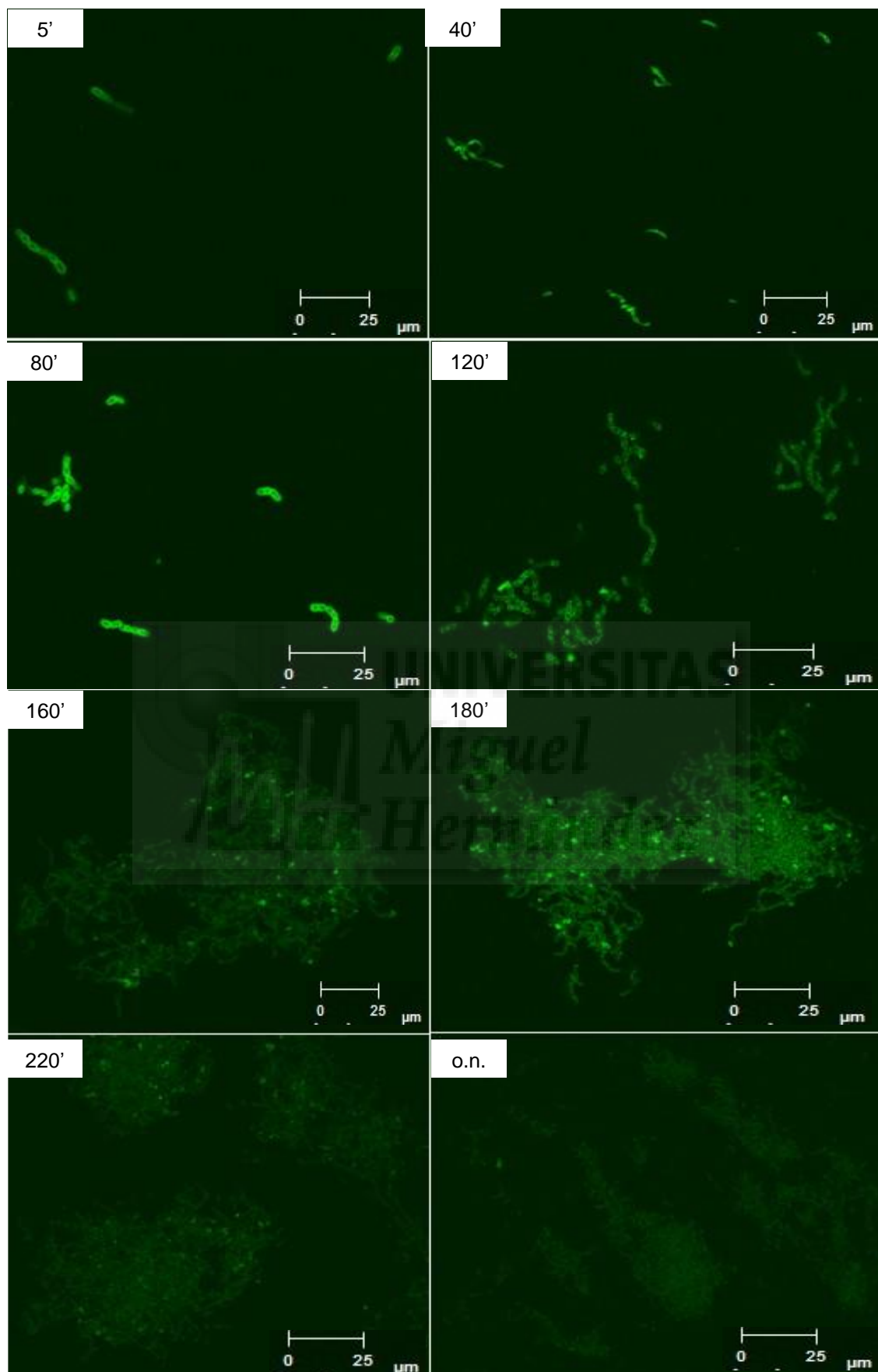
El experimento fue duplicado obteniéndose un resultado muy similar. En el **Figura 5** puede observarse que la adición de C-LytA-GFP no parece afectar a la forma de crecer del cultivo ya que su velocidad en la fase exponencial no se ve alterada. En cambio, sí que parece haber un efecto en la fase estacionaria.

En el cultivo control de R6 podemos observar el típico comportamiento de esta bacteria cuando es crecida en el medio líquido THY: una fase exponencial seguida de una fase estacionaria de una duración inferior a los 60 minutos y a continuación una bajada en la densidad óptica que característica de la fase de muerte producida por la activación de las autolisinas. En el caso de haber añadido C-LytA-GFP, lo que puede observarse es que la bajada de densidad óptica se produce de manera más temprana durante la fase estacionaria. Sin embargo esa bajada no es debida a la activación de las autolisinas, sino a la formación de grumos que sedimentan en el fondo del tubo.



**Figura 5.** En estas gráficas se representa el resultado de dos de los experimento: la  $DO_{550}$  correspondiente al crecimiento del neumococo en presencia de C-LytA-GFP y en su ausencia, control (agua destilada). Datos obtenidos al hacerlo por duplicado.

Para visualizar la presencia de C-LytA-GFP en la bacteria se observaron las muestras al microscopio confocal y se tomaron fotos de los diferentes tiempos muestreados. **(Figura 6)** La presencia de fluorescencia verde en las células nos indica que la proteína de fusión se ha unido a la pared celular. En el caso del control, no se observó nada de fluorescencia.



**Figura 6.** Fotos realizadas al microscopio confocal del cultivo de *S. pneumoniae* con C-LytA-GFP 400 nM. Las imágenes, ordenadas por fila, se corresponden con los tiempos 5, 40, 80, 120, 160, 180, 220 min y o.n.



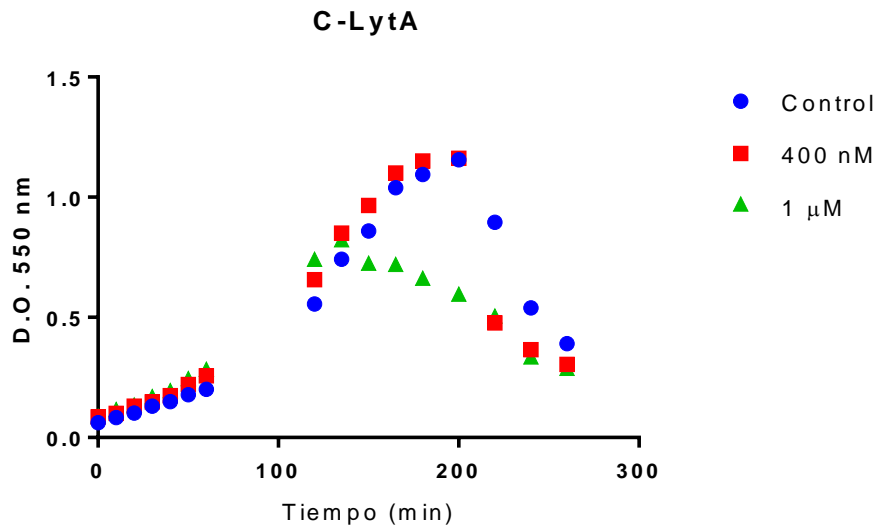
**Figura 7.** Fotos realizada al microscopio confocal del cultivo de *S. pneumoniae* con C-LytA-GFP 400 nM a tiempo 110 min. Puede observarse el tipo de cadenas de células de las que se ha venido hablando hasta ahora.

---

## 5.2. C-LytA provoca el alargamiento de las cadenas de *S. pneumoniae*

El siguiente paso fue comprobar si el módulo C-LytA aislado producía algún efecto en cultivos exponenciales de neumococo. Se examinó el efecto de añadir dos concentraciones distintas de C-LytA a los cultivos (400nM y 1  $\mu$ M) cuando estos alcanzaban una densidad óptica de 0.1.

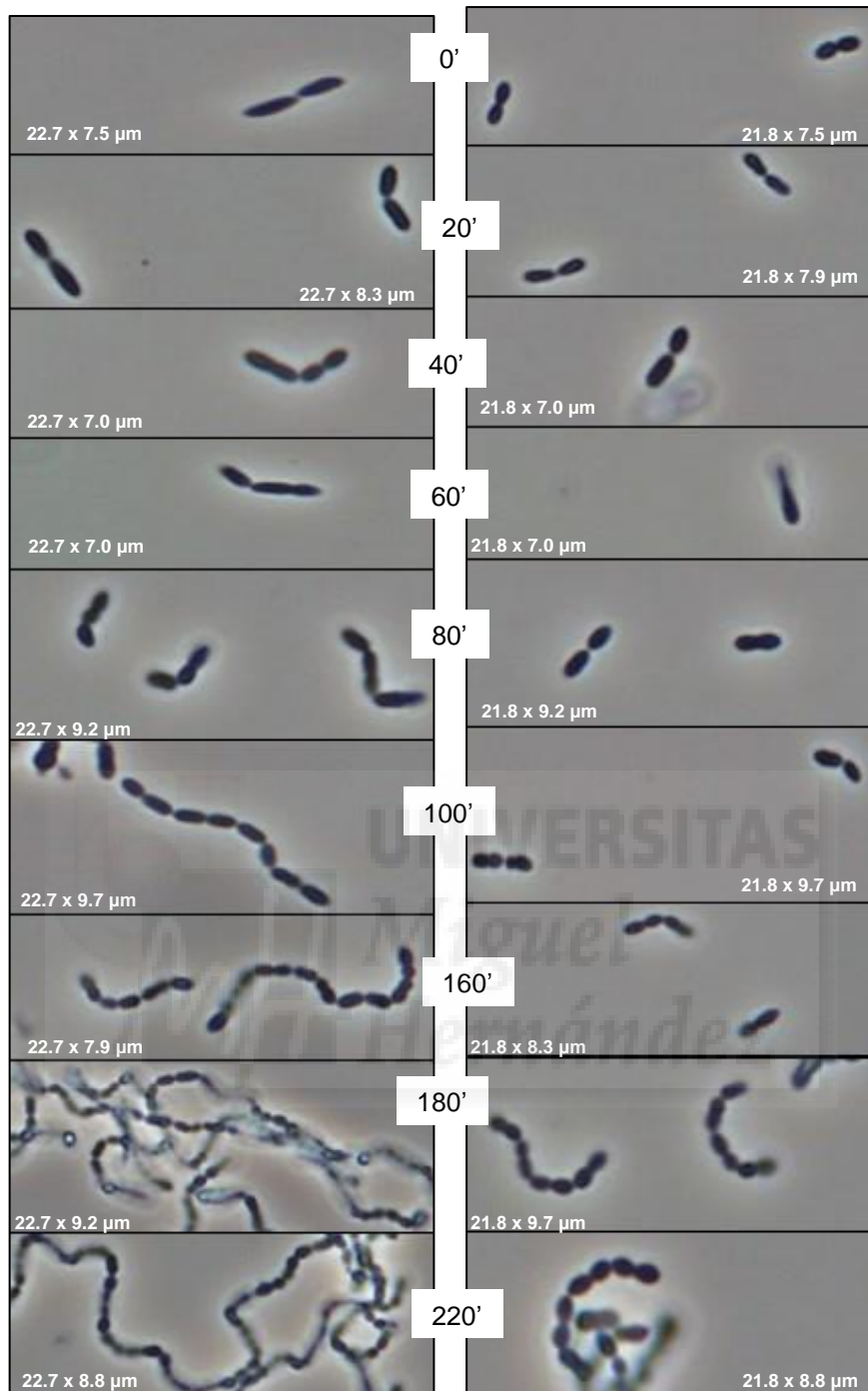
En el caso de añadir 400 nM de C-LytA se obtuvo un resultado muy similar al observado con C-LytA-GFP añadida a la misma concentración. Las células floculan y sedimentan cuando ya están en la fase estacionaria mucho antes que el cultivo control. Sin embargo, con la concentración de 1  $\mu$ M de C-LytA, lo que se observó es que la floculación sucede antes de llegar a la fase estacionaria. (**Figura 8**)



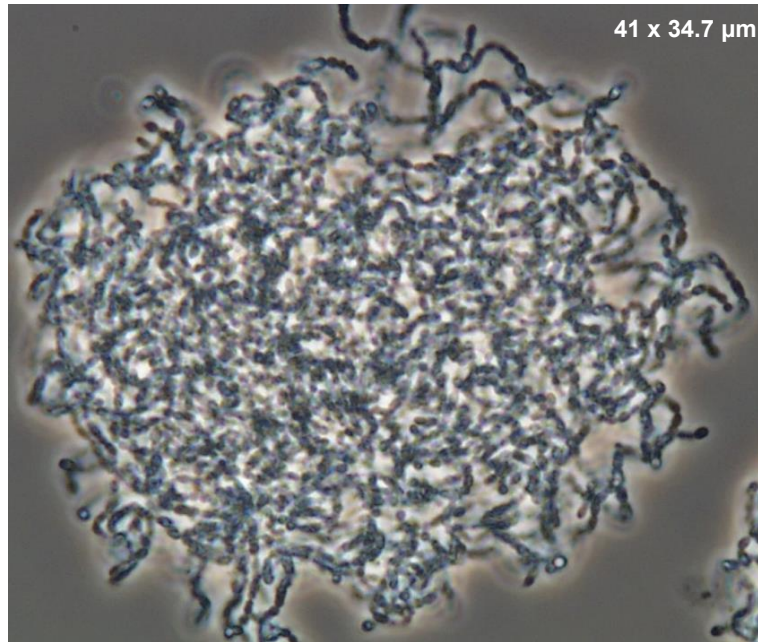
**Figura 8.** Representación del crecimiento del neumococo obtenido tras la adición de C-LytA a concentraciones 1  $\mu\text{M}$  y 400 nM y sin ella es decir, con el control (agua destilada).

---

Para entender por qué ocurre esa caída de  $\text{DO}_{550}$  antes de lo que lo haría normalmente se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos y se observaron al microscopio de contraste de fases. Lo que se pudo observar es que la adición de C-LytA provoca que las cadenas se hagan más largas. Además, se comprobó que la caída de densidad óptica se debe a que las cadenas tienden a hacerse más largas, se entrelazan entre si formando unos grandes agregados que al final sedimentan en comparación con el cultivo control.



**Figura 9.** Fotos realizadas al microscopio de contraste de fases del cultivo de *S. pneumoniae* con C-LytA 1 μM y el control (agua destilada). Las imágenes de la primera columna se corresponden con el cultivo que contiene la CBM y el de la segunda con el control, a tiempo 0,20,40,60,80,100,160,180 y 220 minutos.



**Figura 10.** Foto realizada al microscopio de contraste de fases del cultivo de *S. pneumoniae* en el cual se pueden observar las grandes acumulaciones de cadenas que pueden llegar a generarse al cabo de 180 minutos en presencia de C-LytA 1  $\mu$ M.

---

### 5.3. C-CPL1 afecta al crecimiento de *S. pneumoniae* de manera más efectiva que C-LytA

Resultados previos del laboratorio indicaban que el módulo C-CPL1 había mostrado *in vitro*, una mayor afinidad a la colina. El siguiente paso fue comprobar si dicho módulo podría tener un mayor efecto sobre el crecimiento del neumococo que el observado con C-LytA. Para ello se adicionaron distintas concentraciones de C-CPL1 a cultivos exponenciales de neumococo al igual que el resto de CBMs y se recogieron muestras a intervalos regulares para su posterior análisis microscópico.

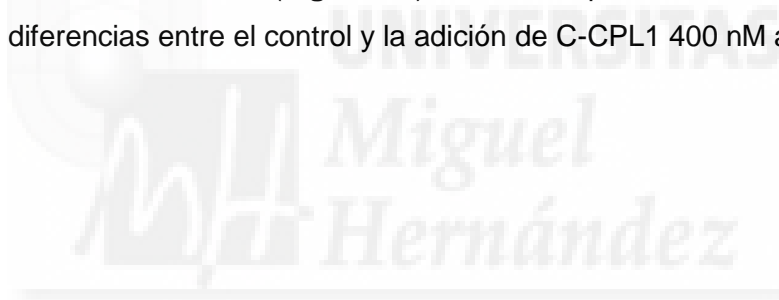
Al adicionar 400 nM de C-CPL1 en un cultivo al comienzo de su fase exponencial ( $DO_{550} = 0.1$ ) (**Figura 11 a**) se puede observar un comportamiento que recuerda al observado cuando usamos 1  $\mu$ M de C-LytA. Se comienza a observar la formación de grumos que van sedimentando lo que provoca una disminución de la densidad óptica. Por tanto, sí se observa un cambio en el crecimiento del neumococo en presencia/ausencia de la CBM.

Además, para comprobar si tenía algún efecto el adicionar C-CPL1 al inicio o justo antes de la entrada en estado estacionario se realizó un segundo experimento con esta CBM los resultados del cual se observan en el (**Figura 11 b**). En él podemos ver cómo la

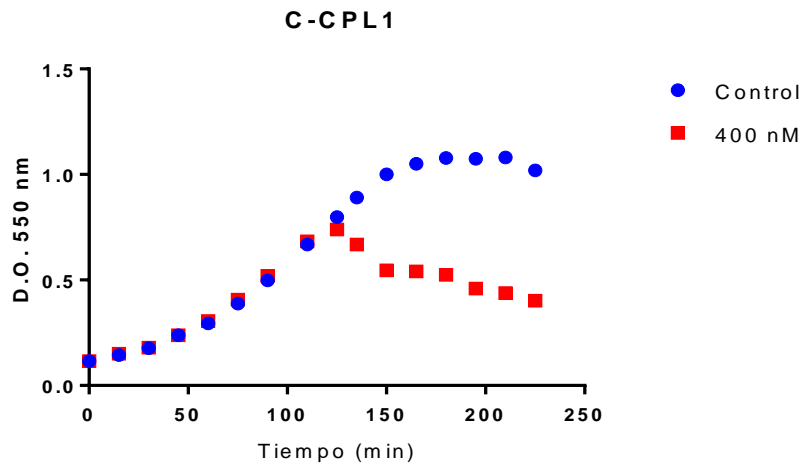
adición de C-CPL1 400 nM al inicio nos confirma lo observado en la gráfica anterior; y como, su adición en la entrada a la fase estacionaria no parece afectar al crecimiento del microorganismo, la curva cae un poco antes, pero las diferencias no parecen significativas.

Por último, y respecto a C-CPL1, se realizó un ensayo en el cual se adicionó esta CBM justo antes de la entrada a estado estacionario a concentraciones de 40 y 400 nM (**Figura 11 c**)). En este ensayo se pudo comprobar lo observado en el anterior es decir, que la adición de C-CPL1 antes de la fase estacionaria, ya sea a una u otra concentración parece no tener efecto sobre el crecimiento del neumococo.

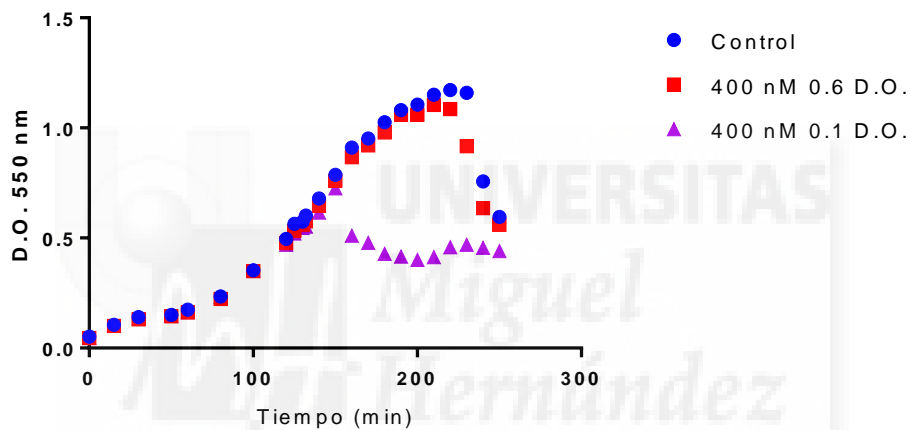
Para entender por qué ocurre esa caída de  $DO_{550}$  (al adicionar la CBM a  $DO$  0.1) antes de lo que lo haría normalmente se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos y se observaron al microscopio de contraste de fases. Lo que se pudo observar es que la adición de C-CPL1 provoca que las cadenas se hagan más largas. Además, se comprobó que la caída de densidad óptica se debe a que las cadenas tienden a hacerse más largas, se entrelazan entre si formando unos grandes agregados que al final sedimentan en comparación con el cultivo control. (**Figura 12**) Puede comprobarse en la **Figura 13** como no se observan diferencias entre el control y la adición de C-CPL1 400 nM a  $DO$  0.6.



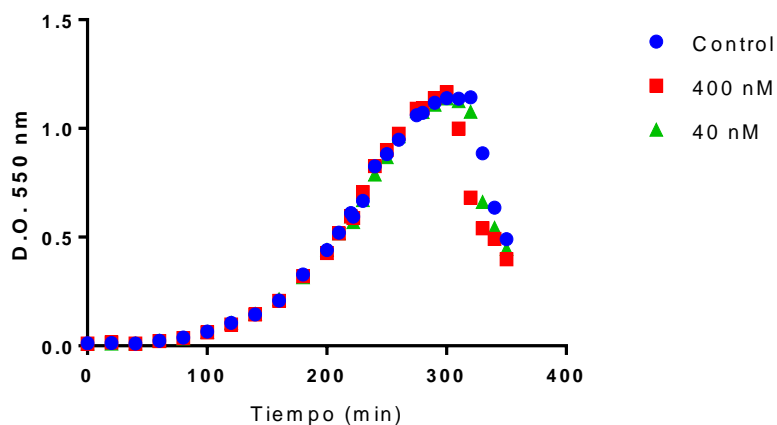




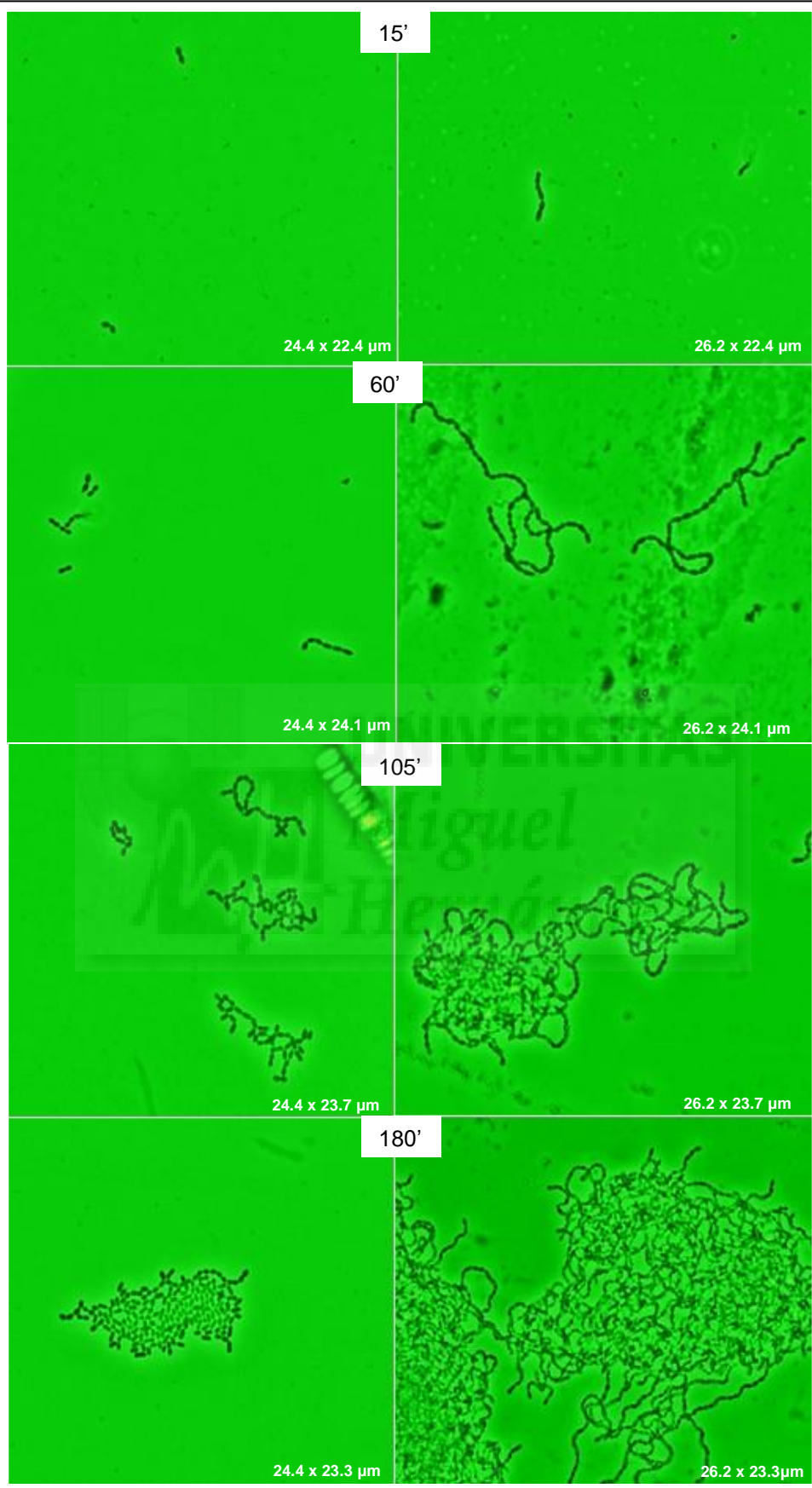
**C-CPL1 (principio crecimiento + estacionario)**



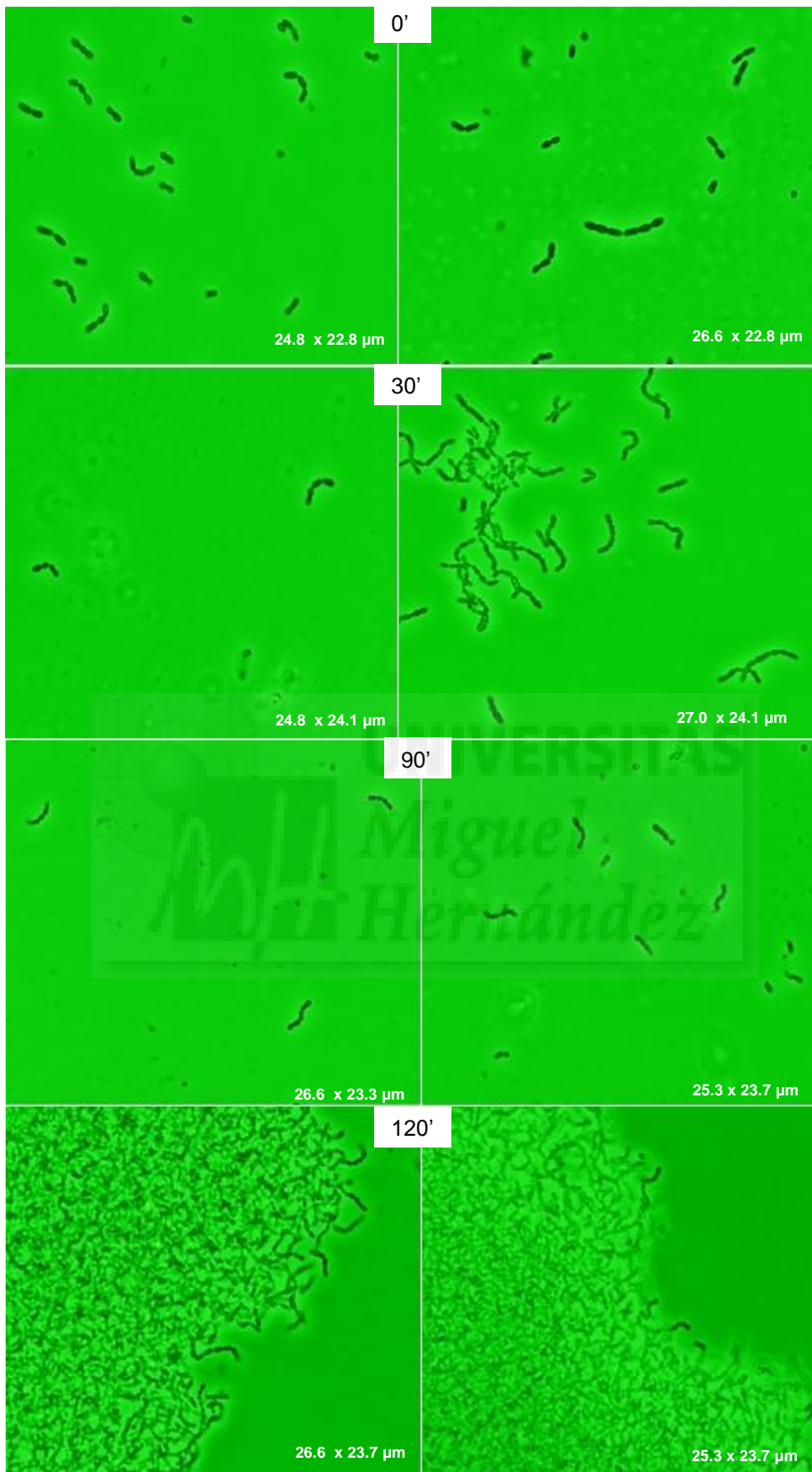
**C-CPL1 (estacionario)**



**Figura 11.** Representación gráfica de los datos obtenidos en tres experimentos realizados. a) se corresponde con la comparación de la curva de crecimiento en ausencia o presencia de C-CPL1 400 nM. b) compara la adición de C-CPL1 400 nM a DO 0.1 y a DO 0.6. c) nos representa una comparación entre la adición de C-CPL1 400 nM y 40 nM a 0.6. Todas las gráficas van acompañadas del control (agua destilada).



**Figura 12.** Fotos realizadas al microscopio del cultivo de *S. pneumoniae* con C-CPL1 400 nM (segunda columna), adicionado a una DO 0.1, y el control (primera columna). Las imágenes, ordenadas por fila, se corresponden con los tiempos 15. 60. 105 v 180.

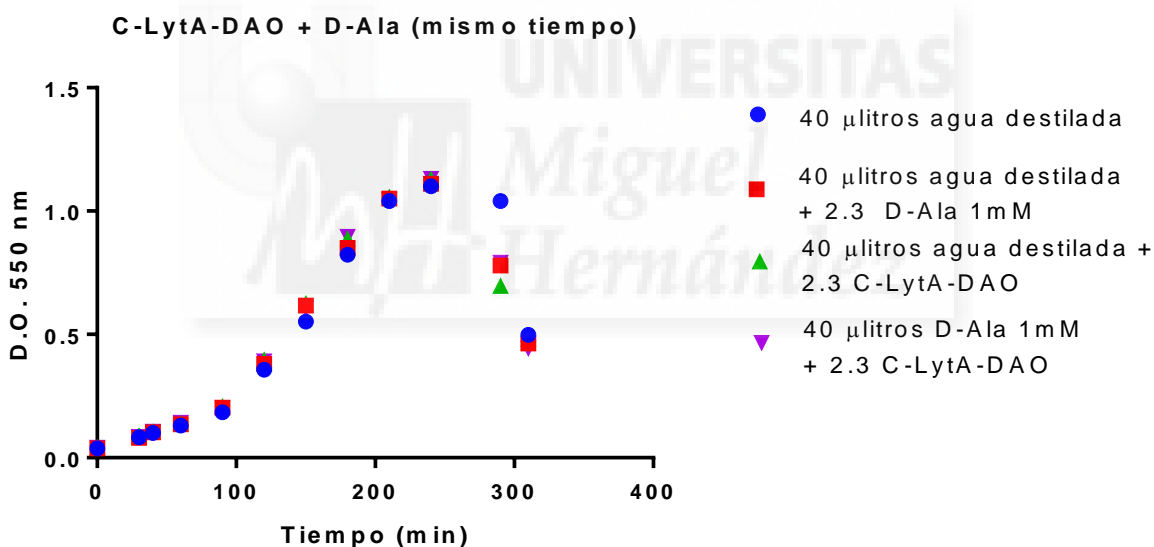


**Figura 13.** Fotos realizadas al microscopio del cultivo de *S. pneumoniae* con C-CPL1 400 nM (segunda columna), añadido a una DO de 0.6, y el control (primera columna). Las imágenes, ordenadas por fila, se corresponden con los tiempos 0, 30, 90 v 120.

#### 5.4. C-LytA-DAO también se une a *Streptococcus pneumoniae*

El siguiente ensayo se realizó comprobar si C-LytA-DAO producía algún efecto en cultivos exponenciales de neumococo. C-LytA-DAO está formado por el módulo de unión a colina C-LytA al cual se ha incorporado la enzima DAO, D-aminoácido oxidasa, la cual lleva a cabo una desaminación oxidativa que genera radicales libres.

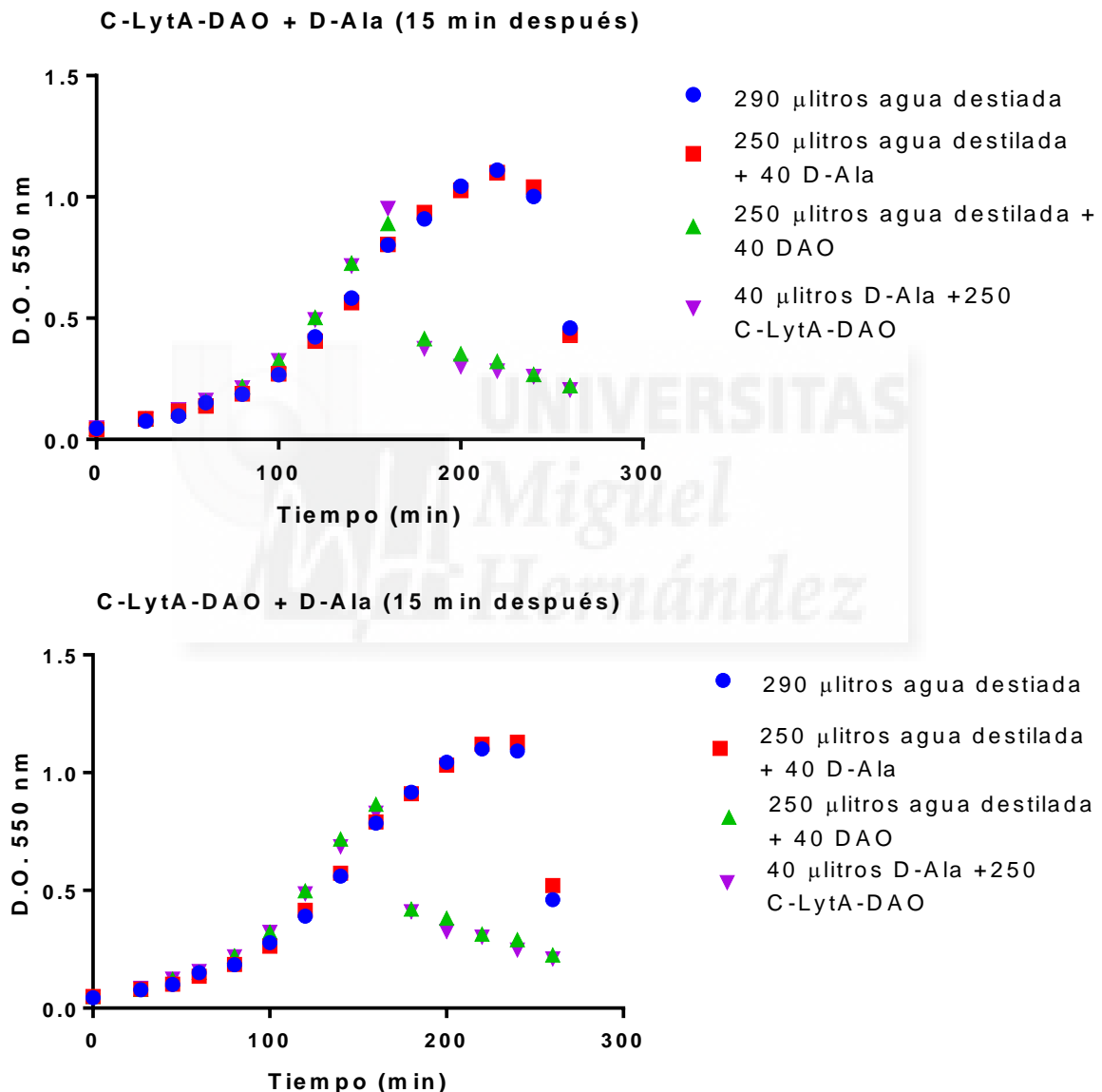
Los resultados obtenidos al adicionar C-LytA-DAO junto con su sustrato, D-Ala al mismo tiempo (**Figura 14**), cuando se alcanzaba una densidad óptica de 0.1, no fueron los esperados, ya que lo que deberíamos haber observado un efecto similar a lo ocurrido con C-LytA (**Figura 5**); sin embargo lo que se observa es que en presencia o ausencia de C-LytA-DAO el crecimiento es similar al control. Este resultado parece indicarnos que la DAO no está afectando al crecimiento, lo cual puede deberse a que o bien realmente no afecte, o a que la cantidad adicionada de este CBM no sea suficiente como para observar efecto alguno.



**Figura 14.** En esta gráfica se representa la  $DO_{550}$  correspondiente al crecimiento del neumococo en presencia de C-LytA-DAO con y sin D-Alanina y en su ausencia. La D-Ala en todos los casos se adicionó al mismo tiempo que C-LytA-DAO.

Para comprobar si efectivamente el problema observado se debía a lo comentado en el párrafo anterior, se llevó a cabo otro experimento en el cual se adicionaron 250 µL de C-LytA-DAO, y la D-Ala se adicionó en todos los casos 15 minutos después de haber añadido la CBM (**Figura 15**). En este caso lo que se observa es que en aquellos tubos

donde no se adicionó C-LytA-DAO el crecimiento fue el que suele seguir la bacteria. Sin embargo, en aquellos donde se adicionó C-LytA-DAO sola o con su sustrato, la D-Ala, se observó un efecto similar a C-LytA es decir, la curva cae antes, ya que el neumococo llega antes al estado estacionario. Pero a pesar de que sí existen diferencias respecto a la no adición de la CBM, no se observan diferencias entre la adición del sustrato de la DAO o no. Por tanto, es posible que la DAO no esté teniendo efecto sobre el crecimiento, y este efecto se deba únicamente a la presencia de C-LytA.

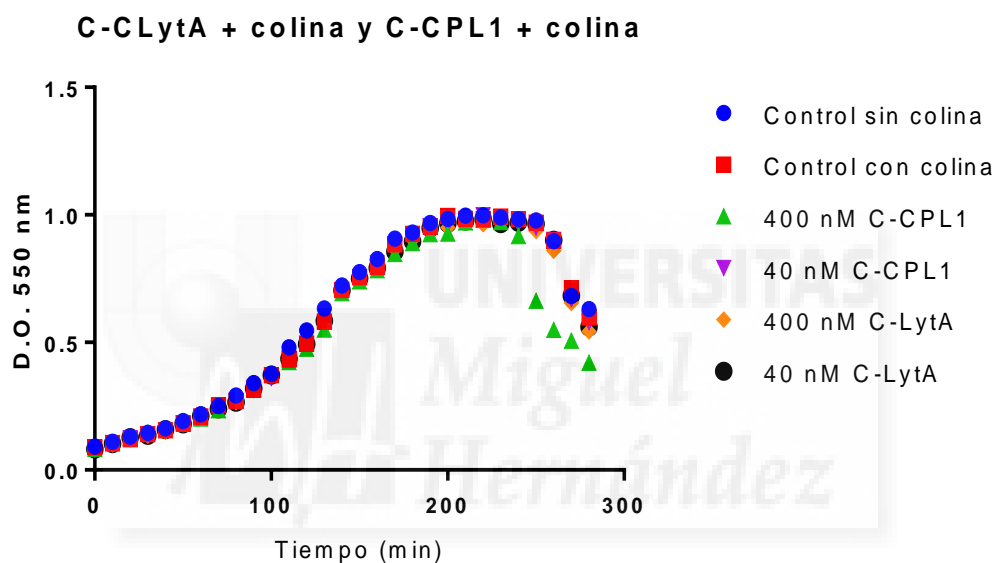


**Figura 15.** En estas dos gráficas se representa la  $DO_{550}$  correspondiente al crecimiento del neumococo en presencia de C-LytA-DAO con y sin D-Alanina y en su ausencia. La D-Ala en todos los casos se adicionó 15 minutos después de la adición de C-LytA-DAO. Datos obtenidos al hacerlo por duplicado.

### 5.5. La adición de colina 5 $\mu\text{M}$ no aumenta el efecto de estas CBMs en los cultivos de *S.pneumoniae*

En un experimento realizado *in vitro* se vio que al adicionar una pequeña cantidad de colina junto con los CBMs, éstos aumentaban su afinidad por la unión a sustratos (García-Asencio *et al.* resultados sin publicar). Por tanto, y basado en esa observación se realizó un ensayo para comprobar si eso ocurría también en los cultivos *in vivo*.

Tal y como puede observarse en el **Figura 16**, si se comparan las  $\text{DO}_{550}$  obtenidas tanto en presencia como en ausencia de alguno de los CBMs o de colina, éstas son muy similares por lo que, parece ser que *in vivo* la unión no es tan eficiente como *in vitro*.



**Figura 16.** Representa una comparación entre la adición de C-CPL1 40 o 400 nM más colina 5  $\mu\text{M}$  y C-LyTA 40 o 400 nM más colina 5  $\mu\text{M}$ , con sus correspondientes controles.

## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras los ensayos realizados se ha podido observar como la adición de módulos de unión a proteínas sí interfiere en el crecimiento de *S. pneumoniae*. Este hecho es debido a que las CBMs que se están adicionando compiten eficientemente con las CBPs por la unión a la fosfocolina existente en la pared celular de neumococo. Al existir esta competición las CBPs de la bacteria no pueden unirse a la fosfocolina y por tanto, no podrán cumplir su función. Recordemos que muchas de esas funciones son esenciales para la viabilidad celular (ej.: procesos de división celular) o para su patogenicidad (ej.: liberación de toxinas, adhesión al hospedador). Claro ejemplo de ello es lo que se ha observado en las muestras al microscopio y es que, al interferir en su división, las células no pueden separarse y se forman largas cadenas de células no divididas. La formación de cadenas y agregados se ha visto que causa problemas en la viabilidad e infectividad de neumococo, y además estas cadenas son más susceptibles a ser eliminadas por los macrófagos (Maestro y Sanz, 2016). Por otro lado al constituir un procedimiento antimicrobiano no lítico, se minimiza la liberación de toxinas bacterianas al medio.

Hasta ahora lo que se había conseguido era poder inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae* a base de adicionar exógenamente colina o análogos de ésta. Pero como terapéuticamente hablando el uso de las cantidades de colina que serían necesarias que ingiriera un humano no pueden administrarse, es necesario la búsqueda de vías alternativas y, una de ellas sería centrarse en los CBMs como tratamiento antimicrobiano.

En este trabajo se ha podido comprobar que tanto el CBM C-LytA con el C-CPL1 tienen efectos sobre *S. pneumoniae*. Con ambos módulos se obtiene una modificación del crecimiento de la bacteria siendo ésta más pronunciada tras la adición de C-CPL1 al inicio del crecimiento. También ha podido observarse que tras la adición de C-LytA-DAO la generación de radicales libres por parte de esta proteína no tiene efecto sobre el crecimiento y por lo tanto, no sería interesante su empleo como antimicrobiano. Por último, se pudo comprobar que a diferencia de lo ocurrido *in vitro*, el adicionar las CBMs junto con colina parece no ser muy eficiente *in vivo*.

El estudio basado en la adición de CBMs será útil en un futuro para comprender mejor la interacción de las CBPs con sus sitios de unión en la pared celular del neumococo y, que finalmente esta comprensión nos permita diseñar una forma de atacar a la bacteria mucho más efectiva.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Albrich, W. C., Monnet, D. L., & Harbarth, S. (2004). *Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes. Emerging Infectious Diseases journal*, 10, 3, 514-517.
2. Bergmann, S., & Hammerschmidt, S. (2006). *Versatility of pneumococcal surface proteins. Microbiology*, 152, 2, 295-303.
3. Buey, R. M., Monterroso, B., Menéndez, M., Diakun, G., Chacón, P., Hermoso, J. A., & Díaz, J. F. (2007). *Insights into molecular plasticity of choline binding proteins (pneumococcal surface proteins) by SAXS. Journal of molecular biology*, 365, 2, 411-424.
4. Castillo Martín, F. (1996). Neumococo resistente a la penicilina. Un grave problema de salud pública. *Asociación Española de Pediatría*, 45:233-235.
5. Donkor, Enric S. & Badoe, Ebenezer V. (2014). *Insights into Pneumococcal Pathogenesis and Antibiotic Resistance. Advances in Microbiology*, 4,627-643.
6. 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. Nature Structural & Molecular Biology*, 8,12, 1020-1024.
7. Gamez, G., & Hammerschmidt, S. (2012). *Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development. Current drug targets*, 13,3, 323-337.
8. García-Vera, César, Ruiz Andrés, María Ángeles, Arana Navarro, Teresa, Moneo Hernández, Isabel, Castillo Laita, José Antonio, Macipe Costa, Rosa & Revillo Pinilla, María José (2011). Serotipos de neumococo en nasofaringe de niños preescolares sanos tras la vacunación antineumocócica conjugada heptavalente. *Medicina Clínica*, 137, 1:1-7.
9. Goldstein, Fred W. (1999). *Penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae: selection by both  $\beta$ -lactam and non-  $\beta$ -Lactam antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 141-144.



10. Hakenbeck, Regine, Grebe, Thorsten, Zähler, Dorothea & Stock, Jeffrey B. (1999).  *$\beta$ -lactam resistance in Streptococcus pneumoniae: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. Molecular Microbiology*, 33, 4 ,673-678.
11. Hansman D, Bullen MM (1967). *A resistant pneumococcus. Lancet*, 2: 264-265.
12. Kyaw, Moe H., Lynfield, Ruth, Schaffner, William, Craig, Allen S. , Hadler, James, Reingold, Arthur, Thomas, Ann R. , Harrison, Lee H., Bennett, Nancy M. , Farley, Monica M., Facklam, Richard R., Jorgensen, James H. , Besser, John, Zell, Elizabeth R. , M.Stat., Schuchat , Anne & Whitney, Cynthia G. (2006). *Effect of Introduction of the Pneumococcal Conjugate Vaccine on Drug-Resistant Streptococcus pneumonia. The New England Journal of Medicine*, 354:1455-63.
13. Lázaro, Edurne & Oteo, Jesús (2006). Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 30:10-19.
14. Liñares, J., Ardanuy, C., Pallares, R. & Fenoll, A. (2010). *Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in Streptococcus pneumoniae over a 30-years period. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Clinical Microbiology and Infection*, 16, 402-410.
15. López, R., & García, E. (2004). *Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. FEMS Microbiology Reviews*, 28, 5, 553-580.
16. Maestro, B., González, A., García, P., & Sanz, J. M. (2007). *Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. FEBS Journal*, 274, 2, 364-376.
17. Maestro, B., & Sanz, J. M. (2007). *Novel approaches to fight Streptococcus pneumoniae. Recent patents on anti-infective drug discovery*, 2,3, 188-196.
18. Maestro, B., & Sanz, J.M. (2016). *Choline Binding Proteins from Streptococcus pneumoniae: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Death of New Antimicrobials. Antibiotics*, 5, E21.

19. Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S., & Hermoso, J. A. (2012). *Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. Molecular oral microbiology*, 27, 4, 221-245.
20. Prado J., Valeria (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Chilena de Infectología*, 18, Supl. 1:6-9.
21. Resch, G., Moreillon, P., & Fischetti, V. A. (2011). *A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance. International journal of antimicrobial agents*, 38, 6, 516-521.
22. Revai, K., McCormick, D. P., Patel, J., Grady, J. J., Saeed, K., & Chonmaitree, T. (2006). *Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media. Pediatrics*, 117, 5, 1823-1829.
23. Rosenow, Carsten, Ryan, Patricia, Weiser, Jeffrey N., Syd Johnson, Fontan, Patricia, Ortqvist, Ake & Masure, Robert (1997). *Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of Streptococcus pneumoniae. Molecular Microbiology*, 25, 5, 819-829.
24. 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, 1, 69-75.
25. 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, 16, 1784-1792.