

**Universidad Miguel Hernández**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

Grado en Biotecnología

2013-2017

**Determinación de la capacidad  
antimicrobiana frente a *Streptococcus  
pneumoniae* del módulo BioF**

**Daniel Esteve Moreno**

Tutores: Jesús Miguel Sanz Morales

Beatriz Maestro García-Donas

**Instituto de Biología Molecular y Celular**

Área de Bioquímica y Biología Celular

# Índice

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	1
1.2. Las proteínas de unión a colina .....	2
1.3. Las fasinas .....	4
1.4. Derivados de las proteínas C-LytA y BioF .....	5

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ..... 7

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Métodos generales.....	8
3.1.1. Preparación de disoluciones y tampones.....	8
3.1.2. Medida de concentración de proteínas .....	8
3.1.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida .....	8
3.1.4. Preparación del medio de <i>S. pneumoniae</i> .....	9
3.2. Obtención de la proteínas F-LytA.....	10
3.3. Ensayo con <i>S. pneumoniae</i> .....	11

## 4. RESULTADOS

4.1. Efecto de la proteína F-Lyt sobre cultivos líquidos de <i>S. pneumoniae</i> .....	12
4.2. Obtención de las proteínas BioF-GFP y BioF-GST .....	13
4.3. Purificación de BioF-GFP .....	18
4.4. Efecto de BioF-GFP sobre cultivos líquidos de <i>S. pneumoniae</i> .....	19
4.5. Efecto de BioF-GFP y F-LytA sobre la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> .....	20
4.6. Efecto de las proteínas F-Lyt y BioF-GFP en la morfología de las células de <i>S. pneumoniae</i> .....	21

## 5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de BioF-GFP y F-LytA sobre cultivos líquidos de <i>S. pneumoniae</i> .....	22
--	----

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1. Conclusiones .....	23
6.2. Perspectivas futuras.....	23

## 7. BIBLIOGRAFÍA ..... 24

## Resumen

El aumento de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a antibióticos y su alta tasa de mortalidad y morbilidad sobre todo en niños y ancianos, ha provocado la necesidad del desarrollo de nuevos antimicrobianos. Una de las dianas farmacológicas que se está estudiando actualmente son las proteínas de unión a colina (CBPs) que son comunes en todas las cepas de *S. pneumoniae*. Entre estas proteínas se encuentra LytA y a partir de su módulo de unión a colina C-LytA se ha desarrollado la proteína fusión F-LytA formada por dicho módulo y el dominio BioF de la fasina PhaF. Esta proteína F-LytA se ha comprobado que tiene capacidad antimicrobiana actuando tanto sobre la viabilidad como sobre el crecimiento de un cultivo de *S. pneumoniae*. Sin embargo, mediante el uso de la proteína control BioF-GFP se ha determinado que el responsable del efecto antimicrobiano de F-LytA es únicamente el módulo BioF, identificando así un nuevo tipo de péptidos antibacterianos frente a *S. pneumoniae*.

**Palabras clave:** *S. pneumoniae*, antimicrobianos, proteínas de unión a colina, viabilidad, crecimiento, BioF.

## Abstract

The increment of antibiotic resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and its high mortality and morbidity, has caused the need to develop new antimicrobials. Currently one of the most important pharmacologic targets are the choline binding proteins (CBPs) common to all strains. LytA is one of these proteins and with his module C-LytA and the domain BioF from the phasin PhaF we have developed the fusion protein F-LytA. The protein F-LytA has antimicrobial ability as it causes an effect on the viability and growth in a *S. pneumoniae* culture. However, the use of the control protein BioF-GFP has allowed to determine that the module BioF is the only responsible of the antimicrobial effect from the F-LytA protein, thus leading to a new type of antibacterial peptides against *S. pneumoniae*.

**Key words:** *S. pneumoniae*, antimicrobials, choline bindings proteins, viability, growth, BioF.

# 1. Introducción

## 1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Actualmente uno de los mayores retos a los que se enfrenta la comunidad sanitaria es el aumento en la prevalencia de patógenos resistentes a antibióticos. Esta problemática provoca graves efectos socioeconómicos a nivel mundial; como la muerte de 25000 personas al año solo en Europa y unos costes por hospitalización que alcanzan los 1500 millones de euros (Bush y cols., 2011).

Entre estos microorganismos destaca la bacteria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* (E. Tacconelli y cols., 2017). Éste patógeno se encuentra generalmente colonizando la nasofaringe de individuos sanos sin causar ningún problema y está vinculado a patologías como la neumonía, la otitis media, la meningitis bacteriana o la sepsis (McCullers y Tuomanen, 2001). Estas enfermedades neumocócicas se estima que causan un total de 1,6 millones de muertes al año (OMS, 2007) constituyendo la cuarta causa de muerte a nivel mundial y la primera en el caso de Europa y EEUU dentro de las enfermedades prevenibles con vacunas (Gamez y Hammerschmidt, 2012).

Los principales obstáculos para el tratamiento de las enfermedades neumocócicas son: la aparición de resistencia frente a los antimicrobianos actuales y la eficacia restringida de las vacunas. Por un lado, las vacunas utilizadas hasta el momento solo cubren una pequeña parte de los 96 serotipos distintos de neumococo y además se incrementan la incidencia de casos clínicos originados por aquellos serotipos que no cubren las vacunas (Singleton y cols., 2007). Por otro lado, la resistencia de este patógeno frente a antimicrobianos convencionales ha aumentado considerablemente; siendo España y Francia países donde las muestras no susceptibles a penicilina y resistentes a macrólidos han aumentado más de un 50 % (Albrich y cols., 2004).

Por lo tanto, es de especial interés la búsqueda de dianas farmacológicas distintas a las estudiadas hasta el momento y el desarrollo de nuevos antimicrobianos que puedan hacer frente a las infecciones ocasionadas por *Streptococcus pneumoniae*. Entre estas dianas alternativas destacan las proteínas de superficie que son comunes en la mayoría de serotipos de neumococo y además participan de manera importante en su virulencia.

## 1.2. Las proteínas de unión a colina

En la superficie de neumococo existe un total de 4 familias de proteínas que participan en funciones cruciales para la viabilidad y la virulencia de éste patógeno (Pérez-Dorado y cols., 2012). Una de estas familias es la formada por las proteínas de unión a colina (*Choline Binding Protein*, CBP) que son comunes de todos los serotipos de neumococo y cuyo número varía entre 13 y 16 (Maestro y Sanz, 2016). Tal y como su nombre indica, estas proteínas se encuentran unidas a residuos de colina que modifican

uno o los dos residuos de N-acetilgalatosamina presentes en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared bacteriana; y de esta manera quedan ancladas las CBPs a la pared celular de neumococo. Las proteínas de unión a colina de neumococo llevan a cabo distintas funciones esenciales tanto para su virulencia como para su supervivencia, entre las que se encuentran; adhesión a las células del huésped, la separación de las células hijas resultantes

de la división celular y la formación de biopelículas (Maestro y Sanz, 2016).

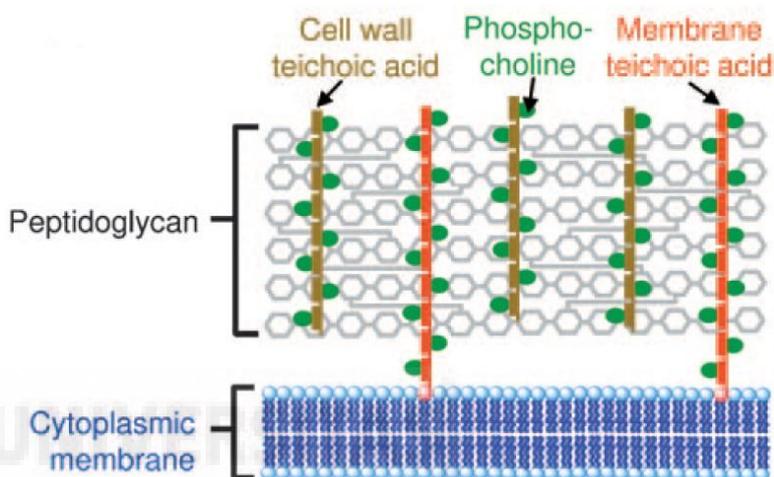
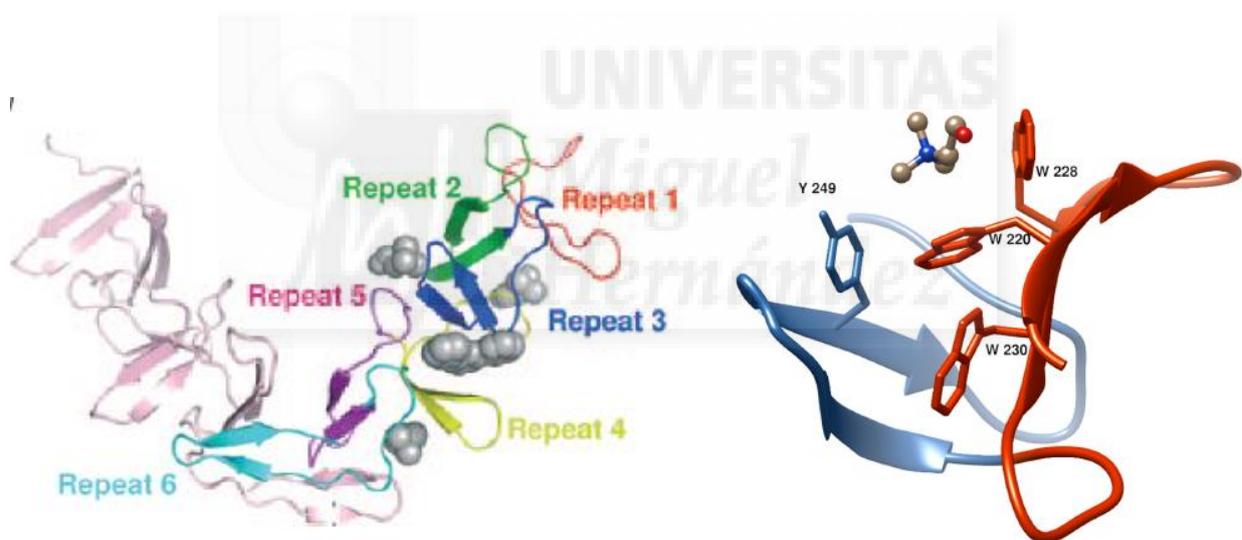


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular *S. pneumoniae*. Las proteínas CBPs se unen a los residuos de fosforilcolina presentes en la superficie de la pared celular. (Víctor M. Hernández-Rocamora y cols., 2009)

La estructura de las CBPs consiste en dos módulos: un módulo de unión a colina y uno funcional. Por un lado, el módulo funcional (FM) es específico de cada proteína, le confiere una actividad concreta y generalmente se dispone en el extremo N-terminal de la proteína. Por otro lado, el módulo de unión a colina (CBM) se encuentra en la mayoría de estas proteínas en el extremo C-terminal y está formado por motivos de unos 20 aminoácidos aromáticos que se repiten (*Choline Binding Repeats*, CBRs). Estas repeticiones se estructuran en forma de bucle y horquilla  $\beta$  generándose una superestructura en forma de  $\beta, \beta$ -3 solenoide, y dando lugar a un sitio de unión a colina entre cada dos CBRs consecutivas; dicha unión se produce debido a interacciones de tipo catión- $\pi$  y van der Waals entre la colina y los dos primeros triptófanos de un CBR y la tirosina del siguiente (Maestro y Sanz, 2016).

La proteína de unión a colina de *S. pneumoniae* más estudiada es LytA. Esta proteína es una amidasa que lleva a cabo la hidrólisis del peptidoglicano de la pared celular dando lugar a una autólisis celular (Howard, L.V. y Gooder, H., 1974) que parece estar relacionada con su virulencia ya que durante este proceso se liberan diferentes toxinas (Martner, A. y cols., 2008; Eldholm, V. y cols., 2009).

Estructuralmente, el módulo funcional de LytA se dispone en el extremo N-terminal y el de unión a colina o C-LytA en el extremo C-terminal (García P. y cols., 1986). Este último está formado por un total de seis CBRs (CBR1-CBR6) que tienen una estructura de bucle y horquilla  $\beta$ , al igual que en la mayoría de proteínas de unión a colina (Fernandez-Tornero y cols., 2001; Li, Q y cols., 2015). Estos seis CBRs dan lugar a cuatro sitios de unión a colina de alta y baja afinidad (Medrano, F.J. y cols., 1996). Por último, una de las características a destacar de LytA es que dimeriza en presencia de colina debido a la acción del motivo CBR6 (Usobiaga, P. y cols., 1996).



**Figura 2. A) Estructura de la proteína LytA:** Está formada por 6 CBRs (*Choline Binding Repeats*) y cada una está compuesta por una horquilla  $\beta$  y un bucle que juntos dan lugar a un total de cuatro sitios de unión a colina (V́ctor M. Herńandez-Rocamora y cols., 2009). **B) Estructura sitio de unió a colina de LytA:** La unió a colina se produce entre dos CBRs consecutivos (en azul y naranja oscuro) y los residuos aromáticos se encuentra implicados en dicha unió (Maestro y Sanz, 2016).

Este alto conocimiento sobre LytA ha permitido el uso de su módulo C-LytA como etiqueta de afinidad para la inmovilizaci3n de proténas (Sanz, J.M. y cols., 1988; Sanchez-Puelles y cols., 1990; Maestro y cols., 2008); y adeḿs abre la posibilidad al uso de CBMs como antimicrobianos que sean capaces de desplazar las CBPs naturales presentes en la superficie de *S. pneumoniae*.

### 1.3. Las fasinas

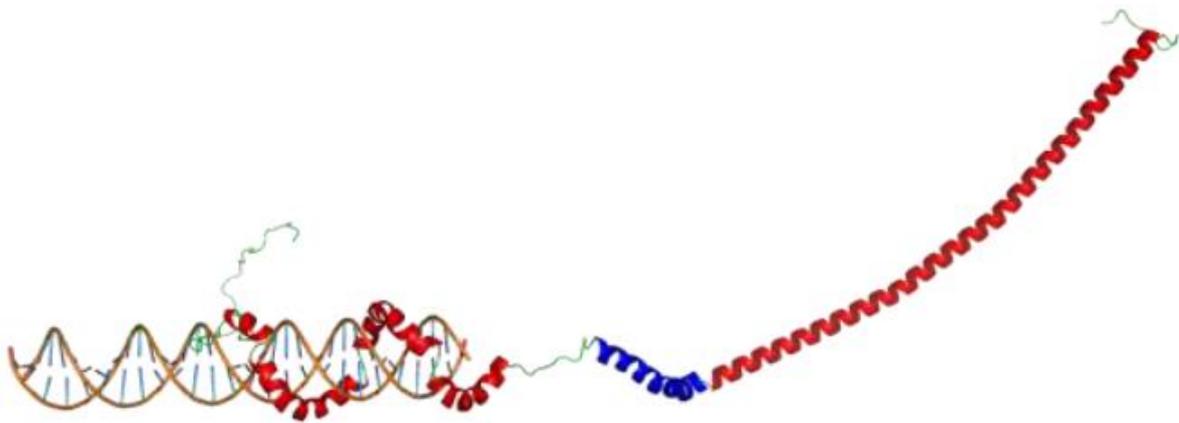
Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres biodegradables, producidos por algunas bacterias, que se acumulan en forma de gránulos como reserva de energía durante periodos de limitación de nutrientes, pero en presencia de un exceso de fuentes de carbono (Anderson y Dawes, 1990; Lee, 1996). En los últimos años, estos compuestos están adquiriendo una gran importancia en el campo de la biomedicina, entre otros, debido a que presentan características similares a los plásticos y además son biodegradables y biocompatibles.

Estos gránulos de PHA se encuentran rodeados por una capa de proteínas (*granule-associated proteins*, GAPs) y fosfolípidos, aunque la presencia de éstos últimos se encuentra aún en discusión (Bresan y cols., 2016). Mientras que, en el caso de las proteínas han sido identificadas cuatro tipos (Steinbüchel y cols., 1995): PHA sintasas, PHA despolimerasas, fasinas y un último grupo con proteínas heterogéneas involucradas en la síntesis de los monómeros de PHA (Jendrossek y Pfeiffer, 2014; Sznajder y cols., 2015).

Las fasinas son las proteínas más abundantes en el gránulo de PHA (Mayer y cols., 1996), presentan un bajo peso molecular y están formadas por un dominio hidrofóbico asociado al PHA y un dominio hidrofílico expuesto al citoplasma (Potter y Steinbüchel, 2005; Maestro y cols., 2017). Además, muchas de ellas presentan un motivo cremallera de leucinas que sugiere la oligomerización de estas proteínas (Maestro y cols., 2013). Entre las bacterias que dan lugar a PHA destacan las especies del género *Pseudomonas* cuyos gránulos de PHA están cubiertos por una capa con las fasinas PhaF y PhaI (Prieto, M.A. y cols., 1999)

Dentro del género *Pseudomonas*, la principal fasina presente en los gránulos de PHA es PhaF y; al igual que el resto de fasinas, está formada por dos dominios (Prieto y cols., 1999; Moldes y cols., 2004): el dominio N-terminal de unión a PHA y el dominio C-terminal de unión a DNA (Prieto y cols., 1999; Galán y cols., 2011). Estructuralmente, la proteína PhaF consiste en una hélice anfipática en el dominio N-terminal de unión a PHA, separado del dominio de unión a DNA por una cremallera de leucinas implicada presumiblemente en la tetramerización de la proteína (Maestro y cols., 2013).

El dominio N-terminal de la fasina PhaF de *Pseudomonas putida* se conoce como BioF y ha sido utilizado debido a su alta afinidad por los gránulos de PHA para la inmovilización y purificación de proteínas recombinantes de dichos gránulos (Moldes y cols., 2004; Moldes y cols., 2006).



**Figura 3. Estructura de la fasina PhaF.** A la izquierda de la imagen se muestra el dominio de unión a ADN en rojo y a la derecha también en rojo se representa el módulo BioF. En azul se muestra la estructura de cremallera de Leucinas responsable de la oligomerización.

#### 1.4. Derivados de las proteínas C-LytA y BioF

Tal y como se ha mencionado anteriormente, es interesante el estudio del módulo C-LytA como posible antimicrobiano frente a *S. pneumoniae*, ya que actuaría compitiendo con la unión a colina de la pared y desplazando la unión de las CBPs naturales del patógeno. Sin embargo, también se debe tener en cuenta el uso de proteínas recombinantes formadas por la unión de C-LytA y otra proteína, de tal manera que la fusión provoque alguna mejora de su actividad inhibitoria. Un ejemplo de tipo de proteínas recombinantes es F-LytA que consiste en el módulo C-LytA y el dominio N-terminal de la fasina PhaF, BioF (Moldes y cols., 2004).

Por un lado, se ha demostrado la fusión BioF a otra proteína no provoca una alteración ni de la actividad enzimática ni del plegamiento de los dominios de unión (Moldes y cols., 2004; Moldes y cols., 2006) y además podría formar tetrámeros al igual que sucede en la proteína completa PhaF, posibilitando en teoría una unión más fuerte a la pared celular.

Sin embargo, en estudios anteriores realizados en este mismo laboratorio (Trabajo de Fin Máster de Marina Bernabéu Cantó) se ha realizado la caracterización de la estructura y el plegamiento de la proteína recombinante F-LytA, mostrando dichos estudios que F-LytA es menos estable química y termodinámicamente que el módulo C-LytA aislado; debido a que el tag de afinidad BioF induce una transición de horquilla  $\beta$  a hélice  $\alpha$  en el módulo C-LytA provocando que se desestabilice y explicando así mismo la disminución en su afinidad por colina.

Por lo tanto, resulta evidente la importancia del estudio de la posible capacidad de BioF como un antimicrobiano alternativo frente a *S. pneumoniae*; ya que el efecto desestabilizador que induce sobre el módulo C-LytA en la quimera F-LytA también podría producirse sobre las CBPs naturales de éste patógeno.



## 2. Antecedentes y objetivos

Tal y como se ha mencionado en el apartado introductorio es de gran interés el desarrollo de nuevos antimicrobianos basados en el uso de los módulos de unión a colina de las CBP, como C-LytA. Este módulo se ha demostrado que, añadido de manera externa, produce un efecto de agregación celular en cultivo de *S. pneumoniae*, y que estos agregados son más fácilmente fagocitados por los macrófagos (Sánchez-Angulo y cols., manuscrito en preparación). Por ello, es interesante la búsqueda de nuevos antimicrobianos derivados de C-LytA que confieran mejoras frente a la proteína aislada. Uno de estos derivados es la proteína F-LytA que podría tetramerizar debido a la presencia de un motivo de cremallera de leucinas presente en el dominio BioF, y además, unirse a PHB a través de dicho tag de afinidad. En anteriores trabajos realizados en este mismo laboratorio la proteína F-LytA se ha logrado caracterizar estructural y termodinámicamente, y se ha llegado a concluir que el tag de afinidad BioF desestructura C-LytA, y provoca la disminución de su afinidad por colina. Sin embargo, se desconoce en qué medida afecta BioF a la acción de C-LytA *in vivo* y si la desestabilización observada en F-LytA se produce también sobre las CBPs naturales de *S. pneumoniae*.

### OBJETIVOS

Este trabajo se centra principalmente en determinar el efecto de F-LytA sobre cultivos de *S. pneumoniae* y si dicho efecto es debido a la acción de BioF o a C-LytA, mediante la determinación del efecto de la fusión BioF-GFP:

- **Objetivo 1:** Determinación del efecto F-Lyt sobre *S. pneumoniae*
- **Objetivo 2:** Puesta a punto de la purificación de BioF-GFP y BioF-GST
- **Objetivo 3:** Determinación efecto BioF-GFP sobre *S. pneumoniae*

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Métodos generales

##### 3.1.1. Preparación de disoluciones y tampones

A lo largo de este trabajo se han utilizado diferentes disoluciones y la mayoría de ellas se basan en el tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0; al cual se añadieron las distintas sales y componentes necesarios, según el ensayo. Este tampón se obtuvo a partir de una disolución madre de fosfato monosódico y otra de disódico 1M en las proporciones de 39% y 61%, respectivamente.

En todos los ensayos realizados con BioF-GFP se utilizó la disolución anterior con cloruro sódico a 300mM (Fosfato sódico 20 mM, 300 mM NaCl, pH 7,0). En el caso, de F-LytA se utilizó este mismo tampón de fosfato sódico, pero con 100 mM de cloruro sódico (Fosfato sódico 20 mM, 100 mM NaCl, pH 7,0). Mientras que, para los ensayos realizados con BioF-GST se utilizó un tampón de Tris 20 mM a pH 7.5.

##### 3.1.2. Medida de la concentración de proteínas

Para poder determinar la concentración de proteína utilizamos su capacidad de absorber a una longitud de onda de 280 nm. Dicha absorbancia se midió en el espectrofotómetro Evolution 201 (Thermo Scientific), depositando la muestra en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico. A partir del valor obtenido se aplica la ley de Lamber-Beer:

$$A_{280nm} = C * \epsilon_{280nm} * l$$

Siendo  $C$  la concentración de la proteína,  $l$  el paso óptico de la cubeta y  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar que en el caso de BioF-GFP es  $42.974 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , y el de F-LytA es  $109.320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Estos coeficientes se han obtenido a través del programa ProtParam de ExPASy, el cual los calcula a partir de la secuencia primaria de cada proteína (<http://web.expasy.org/protparam>).

##### 3.1.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para poder confirmar la presencia las proteínas en las distintas etapas de su purificación se realizan electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) utilizando el sistema Mini-Protean (Bio-Rad). Estos geles consisten en un gel concentrador al 4 % (p/v) y un gel separador al 15 % (p/v). Además, se utiliza EZBlue™ (Sigma-Aldrich) para su tinción.

### 3.1.4. Preparación del medio de *S. pneumoniae*

Para los cultivos líquidos de *S. pneumoniae* se utiliza el medio C+Y que está formado por los compuestos que se muestran en la siguiente tabla, los cuales se esterilizaron previamente mediante autoclave.

Compuesto	Cantidad	Composición
<b>Medio Pre-C</b>	40 mL	Sodio Acetato 3H <sub>2</sub> O (2 g); casaminoácidos DIFCO (5 g); L-Trp (5 mg); L-Cys (50 mg); H <sub>2</sub> O (1000 mL)
<b>Suplemento B</b>	1,3 mL	10 mL Sales 3 en 1 (MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O, MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O); glucosa 20% (20 ml); sacarosa 50% (1 mL); adenosina 2 mg/mL (20 mL); uridina 2 mg/mL (20 mL)
<b>L-glutamina (1 mg/ml)</b>	1 mL	
<b>Adams III</b>	1 mL	64 mL Adams I (Biotina, Ac. nicotínico, Piridoxina, Pantotenato de Ca, Tiamina-HCl, Riboflavina, H <sub>2</sub> O); 16 ml Adams II (SO <sub>4</sub> Fe*7H <sub>2</sub> O, SO <sub>4</sub> Cu*5H <sub>2</sub> O, SO <sub>4</sub> Zn*7H <sub>2</sub> O, Cl <sub>2</sub> Mn <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O, HCl, H <sub>2</sub> O); L-asparagina (800 mg); colina (80 mg); Cl <sub>2</sub> Ca 1% (0,64 ml); H <sub>2</sub> O (400 mL)
<b>Piruvato 2%</b>	0,5 mL	
<b>Tampón fosfato potásico pH=8</b>	1,5 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M (2,65 mL); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M (47,35 mL)
<b>Extracto de levadura</b>	0,9 ml	Extracto de levadura (4 g); H <sub>2</sub> O (100 mL)

### 3.2. Obtención de la proteína F-Lyt

Tal y como se ha mencionado en el apartado introductorio la proteína F-Lyt es una fusión formada por el módulo de unión a colina C-LytA y el dominio N-terminal de la fasina PhaF (BioF). Además, entre ambos dominios se encuentra un conector formado por nueve aminoácidos.

```
MAGKKNTEKEGSSWVGGIEKYSRKIWL AGLGIYSKIDQDGPKLFDSL VKDGEKA EKQAKKT  
AEDVAETA KSSTTSRVSGVKDRALGK WSELEEA FDKRLNSAISRLG VPSRNEIKALHQQVDSL  
TKQIEKLTGASVTPISSRD DPYPYLAKW GISREQFKHDIENGLTIETGWQKNDTGYWYVHSDG  
SYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKH TDGNWYWF DNSGEMATGWK KIADKWYYF  
NEEGAMKTGWKYKDTWYYLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWYYLKP DGLADRPEFTVE  
PDGLITVK
```

**Figura 4. Secuencia de F-Lyt:** En azul se encuentra la secuencia de BioF, en verde la correspondiente a C-LytA y en gris la secuencia del conector.

Para purificar la proteína F-Lyt se siguen como indicaciones recogidas en las Tesis Doctoral de Daniel Bello Gil (UMH, 2013). En primer lugar, se prepara un pre-inóculo de la cepa de *E. coli* C118 con el plásmido pNAF2 con 50 mL de LB líquido, conteniendo 100 µL/mL de ampicilina. Este pre-inóculo se deja incubar toda la noche a 37 °C con agitación suave. Una vez obtenido el pre-inóculo, se preparan tres litros de LB líquido conteniendo 100 µg/mL de ampicilina. Estos cultivos se dejan incubar a 37 °C con agitación de 200 rpm hasta que alcancen una densidad óptica de 0,6 determinada mediante espectroscopia de absorción a 600 nm (Evolution 201, Thermo Scientific). Una vez alcanzada esta densidad óptica se añade a cada cultivo IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se dejan incubar durante toda la noche a 30 °C con agitación suave.

Tras el periodo de incubación los cultivos se centrifugan durante diez minutos a 5000xg a 4°C; para obtener las células en el precipitado. Seguidamente se resuspenden en fosfato sódico 20 mM pH 7,0, 100 mM NaCl (50 mL de tampón/L de cultivo) y el resultado obtenido se lisa mediante sonicación (Branson 250), 10 ciclos de 15 segundos a 4°C. El lisado resultante se vuelve a centrifugar a 10000xg veinte minutos a 4 °C. De esta manera, se consigue que la proteína F-Lyt que se encuentra formando cuerpos de inclusión en las células, se vaya al precipitado. Seguidamente, dicho precipitado se resuspende en 30 mL de urea a 8 M (10 mL/L de cultivo) y se centrifuga de nuevo a 10000xg durante veinte minutos y a 4°C. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se utilizará en los sucesivos pasos para la purificación de F-Lyt.

Una vez que la proteína F-Lyt se encuentra completamente soluble en presencia de urea se debe replegar mediante la eliminación de este agente desnaturizante. Para ello, utilizamos una columna de Sephadex G-100 (50 x 1cm Bio-Rad) equilibrada en el mismo tampón en el que se encuentra la proteína. De esta manera, se consigue que a lo largo de su paso por la columna de filtración en gel la proteína F-Lyt se repliegue debido a la separación de la urea.

### **3.3. Ensayos de cultivos líquidos de *S. pneumoniae***

La cepa de *S. pneumoniae* utilizada para determinar el posible efecto de F-Lyt y BioF-GFP es R6 que no es virulenta ya que no presenta capsula, si bien es la cepa de elección en todos los laboratorios internacionales para la búsqueda inicial de antimicrobianos. Para ello, se realizaron tres tipos de ensayos: seguimiento de la curva de crecimiento, ensayo de viabilidad a determinados tiempos del crecimiento y la obtención de imágenes en el microscopio óptico.

Para los tres ensayos, a partir de un pre-inóculo que haya alcanzado una densidad óptica de 0,3 a 550 nm se realiza una dilución 1:20 en medio C+Y líquido y se incuba a 37°C. Además, se prepara otro cultivo en las mismas condiciones al que no se le añade nada y que servirá de control en los distintos ensayos con *S. pneumoniae*.

Para el ensayo de crecimiento se van tomando mediadas de la densidad óptica del cultivo anterior mediante espectroscopia de absorción a 550 nm (Evolution 201, Thermo Scientific) cada veinte minutos y cuando sea igual a 0,1 se añade BioF-GFP o F-Lyt a una concentración final de 200 nM y se siguen determinando los valores de densidad óptica del cultivo.

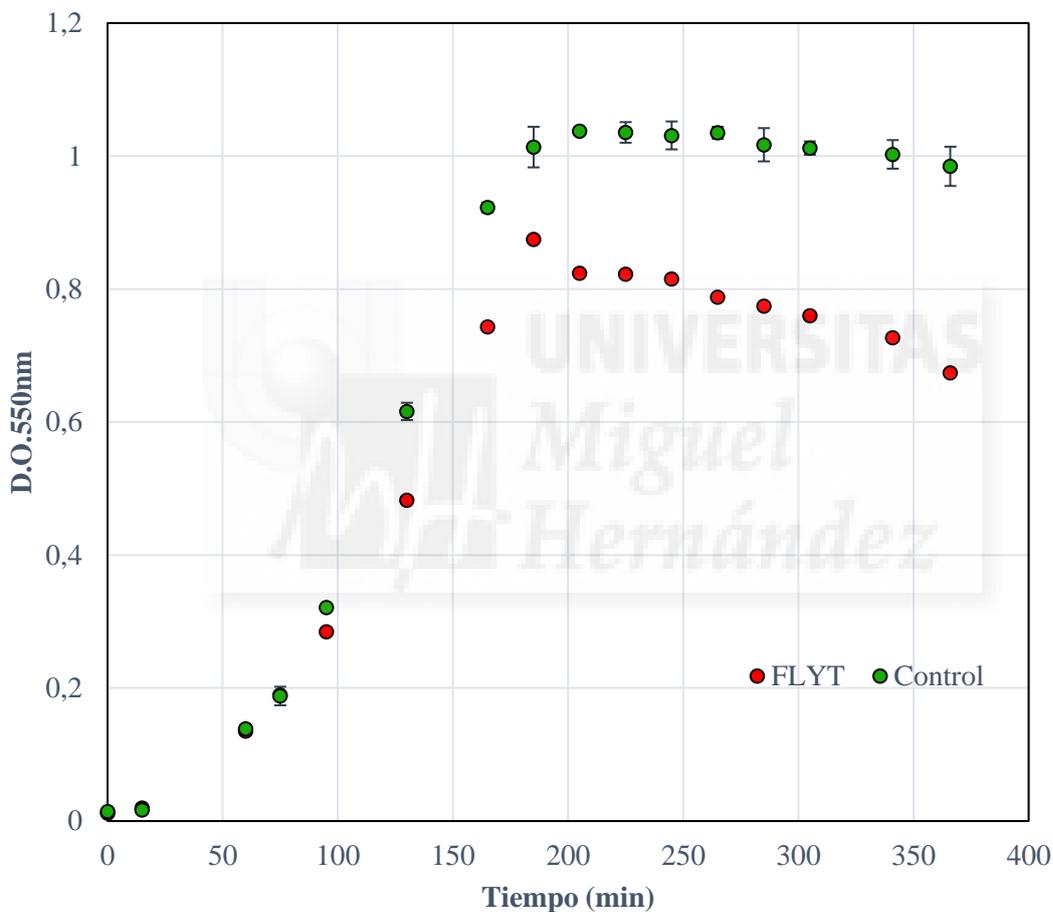
En el caso del ensayo de viabilidad, a un tiempo determinado y en condiciones de esterilidad, se toman muestras de 10 µL de cada cultivo con las que se realizan diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en suero fisiológico. Estas tres últimas diluciones se siembran por triplicado en placas de agar sangre. Por último, para obtener imágenes en el microscopio óptico con contraste de fases Bx50 (Olympus) únicamente es necesario el uso muestra directa de cada cultivo.

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto de la proteína F-Lyt sobre cultivos líquidos de *S. pneumoniae*

Una vez determinada la concentración de la proteína F-LytA pura mediante espectroscopia se añade a una concentración de 200 nM sobre el cultivo líquido de *S. pneumoniae* cuando la densidad óptica a 550 nm es 0,1.

La gráfica de los valores de densidad óptica obtenida es la siguiente:



Gráfica 1. Efecto de la proteína F-Lyt sobre el crecimiento de un cultivo líquido de *S. pneumoniae*.

La adición de la proteína F-Lyt provoca una disminución de la densidad óptica del cultivo con respecto al control. Por lo tanto, este descenso en la densidad óptica supone una disminución en el crecimiento de *S. pneumoniae* inducida por F-Lyt. Al observarse que la proteína F-Lyt provoca un efecto sobre cultivos líquidos de *S. pneumoniae* se decide comprobar en qué grado contribuye de alguna manera la región BioF. Para ello, se crean las proteínas de BioF-GFP y BioF-GST, ya que, el módulo BioF es muy insoluble y no se puede expresar solo.

## 4.2. Obtención de las proteínas BioF-GFP y BioF-GST

Las proteínas BioF-GFP y BioF-GST son proteínas recombinantes formadas por el módulo N-terminal de la fasina PhaF, BioF, y por la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) y la glutatión-S-transferasa (GST), respectivamente. Estas proteínas son completamente nuevas; por ello, en este apartado se recogen los resultados obtenidos de la puesta a punto del sistema de expresión.

MGSSHHHHHSSG **MAGKKNSEKEGSSWVGGIEKYSRKIWL AGLGIYSKIDQDGP KLFDSL VK**  
**DGEKAEKQAKKTAEDVAETA KSSTTSRVSGVKDRALGKWSELEEAFDKRLNSAISRLG VPSR**  
**NEIKALHQQVDSLTKQIEKLTGASVTPISSR RKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGE**  
**GDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQE**  
**RTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGGTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQ**  
**KNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMV**  
**LLEFVTAAGITHGMDEL YKRPAANDENYALVA**

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína BioF-GFP. En azul la secuencia de BioF y en verde la de GFP.

MAGKKNSEKEGSSWVGGIEKYSRKIWL AGLGIYSKIDQDGP KLFDSL VKDGEKAEKQAKK T  
AEDVAETA KSSTTSRVSGVKDRALGKWSELEEAFDKRLNSAISRLG VPSRNEIKALHQQVDSL  
TKQIEKLTGASVTPISSR **MSPILGYWKIKGLVOPTRLLLEYLEEKYEEHL YERDEGDKWRNKK**  
**FELGLEFPNLPYYIDGDV KLTQSMAIRYIADKH NMLGGCPKERA EISMLEGAVLDIRYGVSR I**  
**AYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFM L YDALDVVLYMDPMC**  
**LDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPK**

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la proteína BioF-GST. En azul la secuencia de BioF y en verde la de la GST.

Para obtener las proteínas BioF-GFP y BioF-GST, se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) las cuales se transformaron mediante choque térmico con los plásmidos derivados de pET15b que contienen la secuencia codificante de cada proteína entre los sitios *Bam*HI y *Nco*I.

Una vez transformadas, se sembraron en una placa de medio LB-agar y ampicilina a una concentración de 125 µL/L de cultivo y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Tras la incubación, se seleccionaron tres colonias de cada placa y se sembraron mediante estría. Además, se realizó un pre-inóculo a partir de cada una de estas colonias seleccionadas en medio LB líquido conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y además

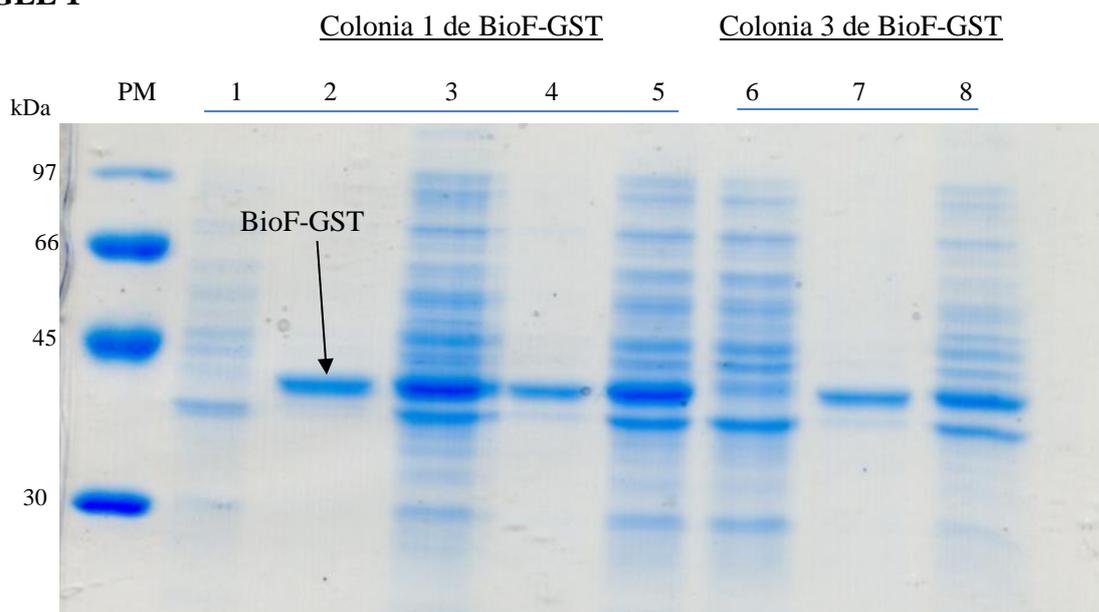
se preparó un control que contenía únicamente LB líquido y ampicilina 100 µg/mL. De nuevo se dejaron incubar a 37 °C y con agitación durante toda la noche. Tras ese tiempo se realizó una dilución 1/100 del cultivo de cada colonia en medio LB con ampicilina a 100 µg/mL y se dejaron crecer a 37°C con agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm fue 0,6 momento en el cual se sometieron a distintas condiciones de expresión para determinar qué colonias y qué condiciones son las más idóneas.

- ❖ Condición 1: 37 °C durante toda la noche (control negativo, sin IPTG).
- ❖ Condición 2: 0,5 mM IPTG, a 30 °C durante 3h
- ❖ Condición 3: 0,5 mM IPTG, a 30 °C durante toda la noche
- ❖ Condición 4: 0,5 mM IPTG, a 37 °C durante 3h
- ❖ Condición 5: 0,5 mM IPTG, a 37 °C durante toda la noche

*\*IPTG: isopropilo-β-D-tiogalactopiranosido,*

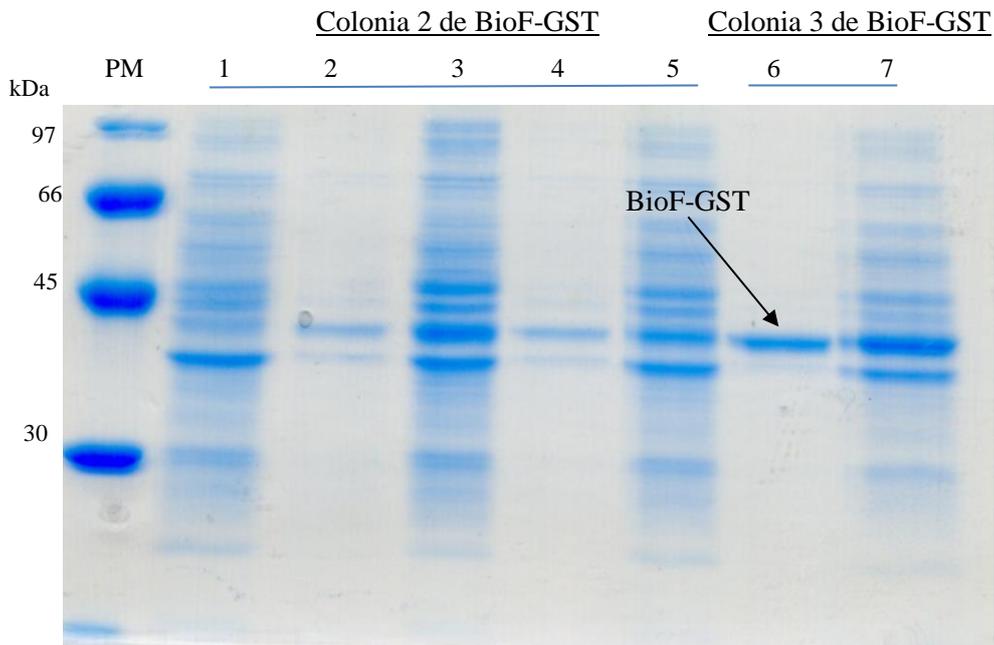
Tras ese periodo, las células se lisaron las células mediante el uso de un agitador vórtex Heidolph y la adición de Cl<sub>2</sub>Mg a 0,1M; y se cargó un gel de poliacrilamida. De esta manera, se puede determinar en qué colonias y en qué condiciones se ha expresado una mayor cantidad de proteína.

### GEL 1



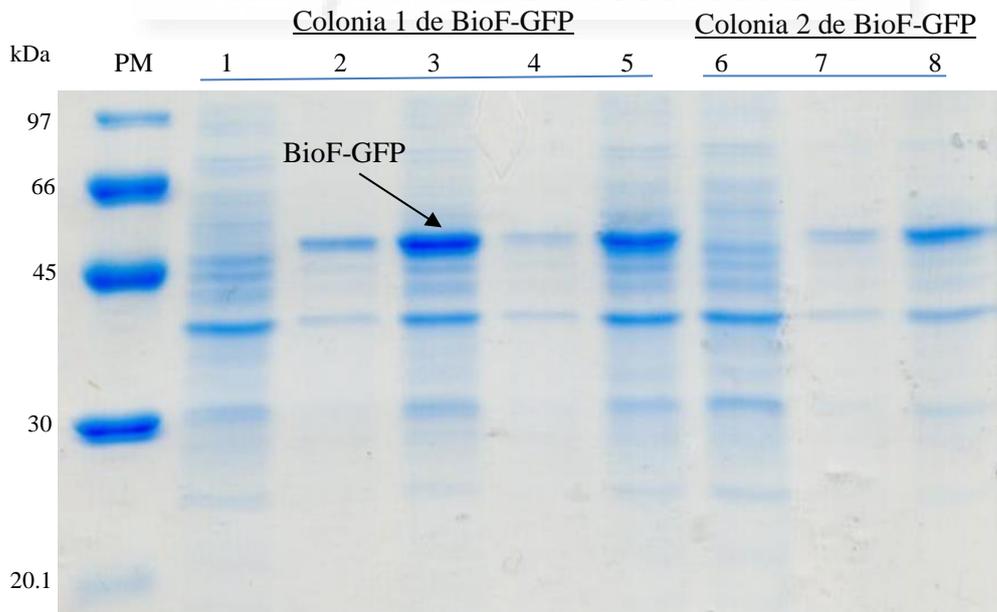
**Figura 7: Análisis condiciones de expresión de BioF-GST.** PM: Marcador de peso molecular, **1:** Control negativo colonia 1, **2:** Colonia 1, 30°C, 3h, **3:** Colonia 1, 30°C, O/N, **4:** Colonia 1, 37°C, 3h, **5:** Colonia 1, 37°C, O/N, **6:** Control negativo colonia 3, **7:** Colonia 3, 30°C, 3h, **8:** Colonia 3, 30°C, O/N.

## GEL 2



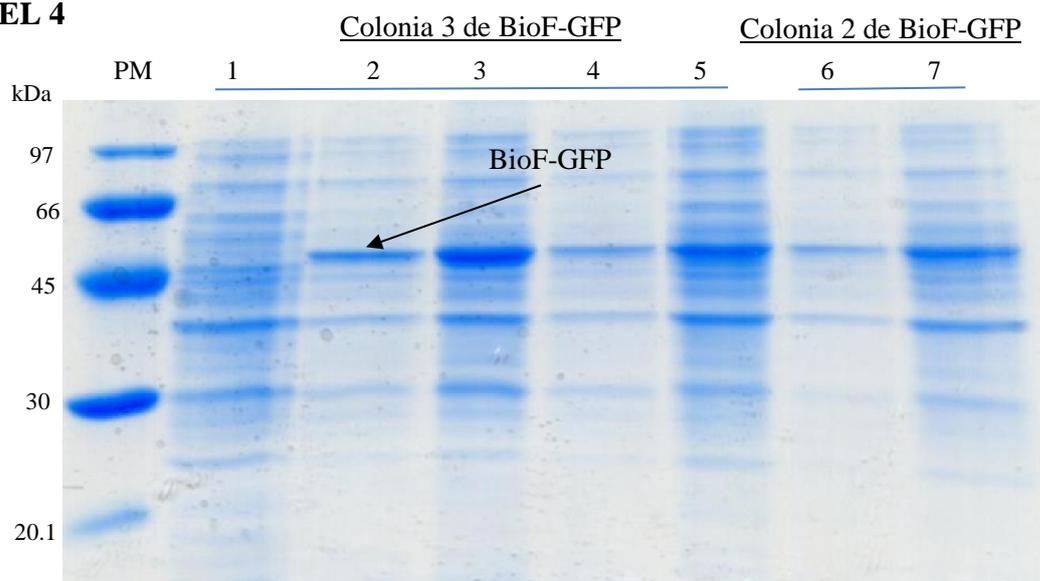
**Figura 8: Análisis condiciones de expresión de BioF-GST.** PM: Marcador de peso molecular, 1: Control negativo colonia 2, 2: Colonia 2, 30°C, 3h, 3: Colonia 2, 30°C, O/N, 4: Colonia 2, 37°C, 3h, 5: Colonia 2, 37°C, O/N, 6: Colonia 3, 37°C, 3h 7: Colonia 3, 37°C, O/N.

## GEL 3



**Figura 9: Análisis condiciones de expresión de BioF-GFP.** PM: Marcador de peso molecular, 1: Control negativo colonia 1, 2: Colonia 1, 30°C, 3h, 3: Colonia 1, 30°C, O/N, 4: Colonia 1, 37°C, 3h, 5: Colonia 1, 37°C, O/N, 6: Control negativo colonia 2, 7: Colonia 2, 30°C, 3h, 8: Colonia 2, 30°C, O/N.

#### GEL 4

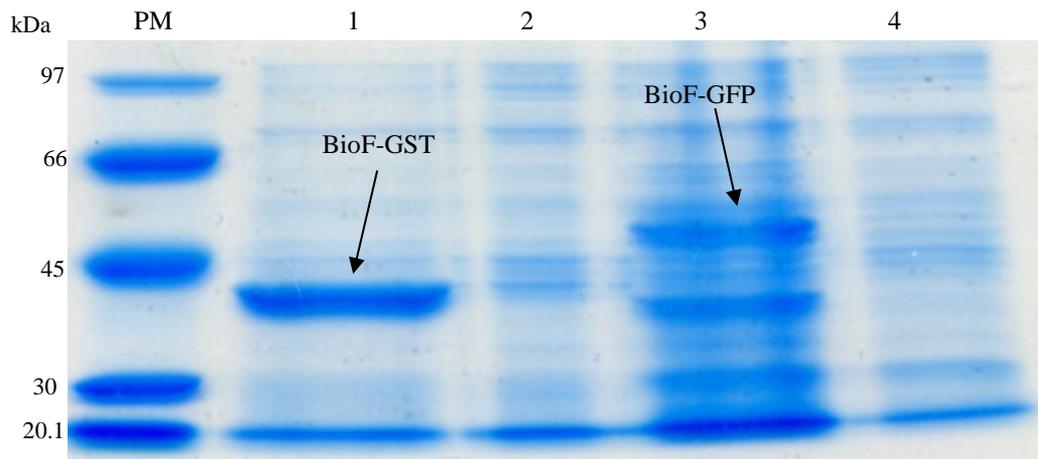


**Figura 10: Análisis condiciones de expresión de BioF-GFP.** PM: Marcador de peso molecular, **1:** Control negativo colonia 3, **2:** Colonia 3, 30°C, 3h, **3:** Colonia 3, 30°C, O/N, **4:** Colonia 3, 37°C, 3h, **5:** Colonia 3, 37°C, O/N, **6:** Colonia 2, 37°C, 3h, **7:** Colonia 2, 37°C, 3h.

A la vista de estos resultados se puede concluir que las colonias 1 son las más idóneas para la expresión tanto de BioF-GFP como de BioF-GST; ambas se expresan en mayor cantidad cuando se incuban a 30 °C durante 3 horas en el caso de BioF-GST y durante toda la noche en el caso de BioF-GST.

Una vez determinadas las condiciones de expresión y las colonias idóneas para la expresión de BioF-GST y BioF-GFP, se crecen dichas colonias en un total de dos litros para cada cultivo. Tras la adición de IPTG, el cultivo se incubaba a 30 °C durante tres horas o toda la noche, según el caso, y se centrifugan a 5000xg durante 10 minutos. De esta manera se recolectan las bacterias en el precipitado, que se resuspenden en 50 mL/L de cultivo del tampón correspondiente a cada proteína. Para lisar las células se tratan con el sonicador Branson 250 durante 15 ciclos de 15 segundos cada uno a 4 °C (para evitar que se degraden las proteínas de interés). Tras haber lisado las células se toma una muestra de 100 µL y se centrifugan a 12400xg durante 40 minutos a 4 °C.

Para comprobar si las proteínas de interés se encuentran en forma de precipitados insolubles (cuerpos de inclusión) o bien solubles se corre un gel de poliacrilamida. En dicho gel se carga tanto el sobrenadante de la centrifugación anterior como la muestra que hemos obtenido justo después de la sonicación, donde se encuentran todas las fracciones del cultivo. A continuación, se muestra el gel obtenido:



**Figura 11. Análisis de expresión BioF-GST y BioF-GFP.** PM: peso molecular, **1:** Colonia 1 de BioF-GST sonicada, **2:** Colonia 1 de BioF-GST sonicada y centrifugada, **3:** Colonia 1 de BioF-GFP sonicada, **4:** Colonia 1 de BioF-GFP sonicada y centrifugada.

Tal y como se puede observar en el gel; tanto BioF-GFP como BioF-GST se encuentran en la fracción total de cada cultivo, pero no en la fracción soluble. Por lo tanto, estas proteínas se encuentran precipitadas en forma de cuerpos de inclusión.

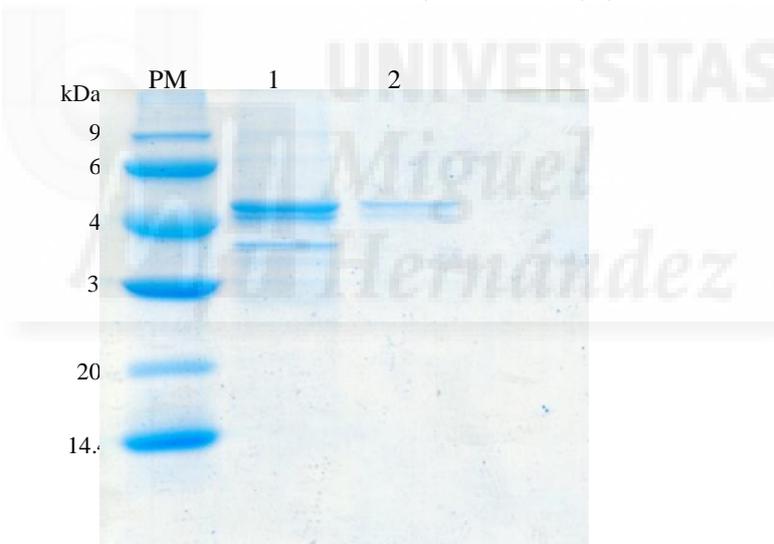
Para solubilizar el precipitado obtenido de la sonicación se emplean 10 mL de urea 8M (5 mL/L de cultivo) y el resultado obtenido se centrifuga a 17400xg durante 20 minutos a 4 °C; y se recoge el sobrenadante.

Llegados a este punto nos quedamos únicamente con BioF-GFP para purificarla completamente debido a que intentamos replegar la proteína BioF-GST, pero no se consiguió y además la presencia de GFP en la proteína BioF-GFP nos permitiría determinar su localización en un cultivo de *S. pneumoniae* de manera más sencilla. La purificación de esta proteína se intentó primero mediante dilución rápida para conseguir que se replegara eliminando la urea y seguido del pase por una columna de Ni para obtener BioF-GFP completamente pura. Sin embargo, este proceso no fue efectivo porque en el lavado se observa una segunda banda de menor tamaño que la correspondiente a BioF-GFP y con una misma intensidad, lo cual indica que o bien la proteína se ha degradado o se ha formado un multímero. Por ello, finalmente se llevó a cabo la purificación de BioF-GFP mediante el uso de una *Desalting Column* (General Electric), lo cual se explicará detalladamente en el siguiente apartado.

### 4.3. Purificación de BioF-GFP

Una vez que la proteína BioF-GFP se encuentra soluble en urea 8M es necesario separarla de este agente desnaturante para así conseguir que se repliegue completamente y se encuentre soluble. Para ello, se utilizó la columna Zeba Spin Desalting Columns (0,5 mL) (Thermo Fisher) que permite separar compuestos con un tamaño mayor de 7000 Da. El proceso para este tipo de columna consiste en tres pasos: la eliminación de la solución de almacenamiento mediante una centrifugación a 5.000 rpm durante un minuto en la centrifuga MiniSpin, el equilibrado de la columna con el tampón fosfato sódico 20 mM, 300 mM NaCl, pH 7,0 mediante tres centrifugaciones y descartando el sobrenadante tras cada una de ellas, y, por último, se cargan 130  $\mu$ L de la muestra de BioF-GFP en 8M de urea y se centrifuga durante dos minutos.

La pureza de la proteína BioF-GFP se comprobó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

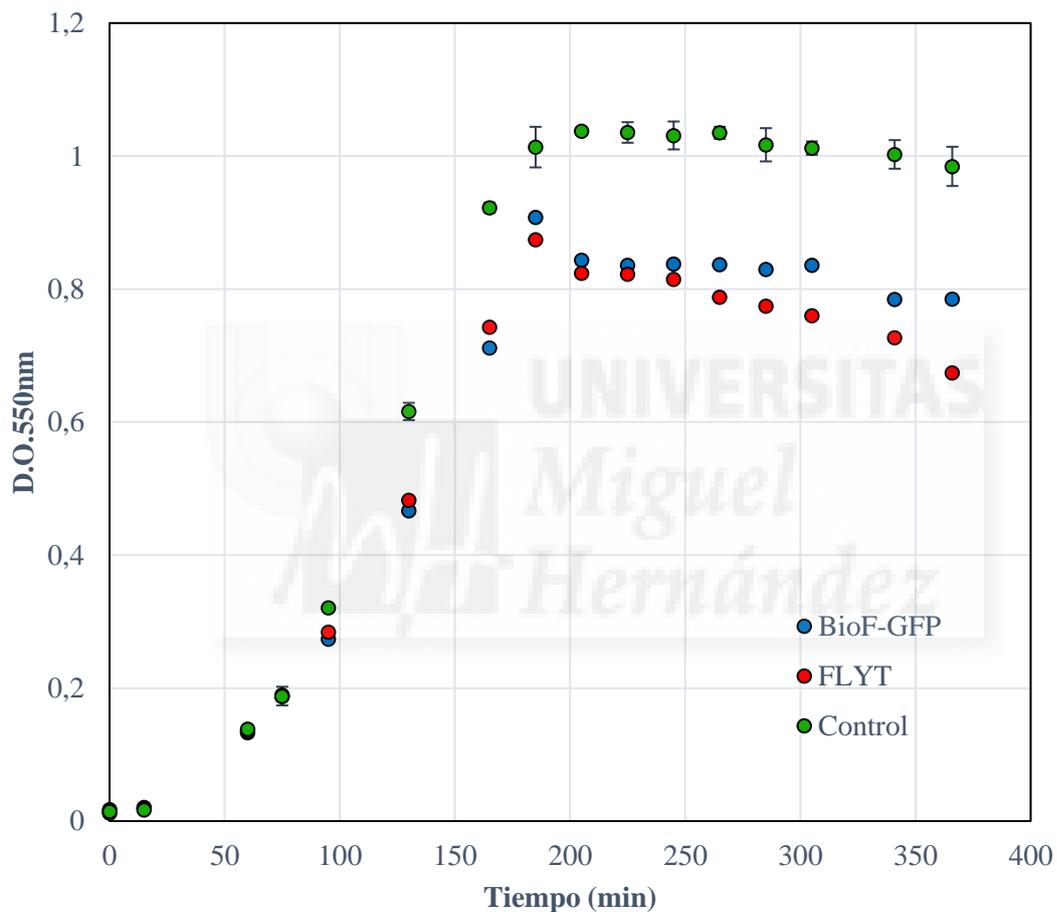


**Figura 12. Análisis de la purificación de la proteína BioF-GFP.** PM: patrón de peso molecular, 1: Proteína BioF-GFP en urea 8M, 2: Proteína BioF-GFP eluída

#### 4.4. Efecto de la proteína BioF-GFP sobre cultivos líquidos de *S. pneumoniae*

Tras determinar la concentración de la proteína BioF-GFP pura mediante espectroscopia se añaden a una concentración de 200 nM sobre el cultivo líquido de *S. pneumoniae* cuando la densidad óptica a 550 nm es 0,1.

En la siguiente gráfica se comparan los valores de densidad óptica obtenidos con BioF-GFP y los correspondiente a F-Lyt (Gráfica 1):



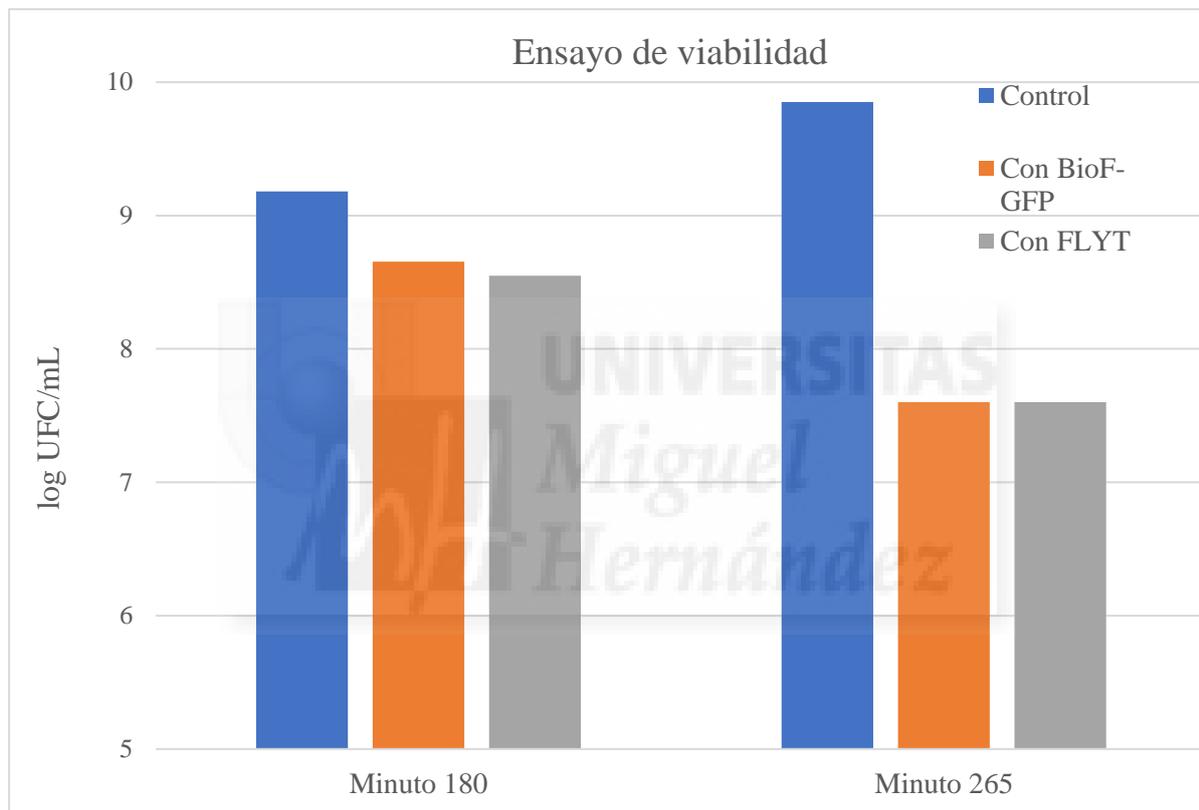
Gráfica 2. Efecto de las proteínas F-Lyt y BioF-GFP sobre el crecimiento de un cultivo líquido de *S. pneumoniae*.

La proteína BioF-GFP provoca una disminución en el crecimiento de *S. pneumoniae* muy similar al observado anteriormente con la proteína F-Lyt. Por lo tanto, se puede llegar a concluir que el causante de este efecto es el módulo BioF presente en la proteína F-Lyt.

#### 4.5. Efecto de BioF-GFP y F-LytA sobre la viabilidad de *S. pneumoniae*

En el minuto 180 y 250 de los cultivos líquidos de *S. pneumoniae* a los que se añadió 200 nM de F-LytA y Bio-GFP y de los controles; se realiza un ensayo de células viables con diluciones en suero fisiológico y medio agar-sangre, tal y como se indica en el apartado de *Materiales y Métodos*. La cantidad de células viables se ha expresado como el logaritmo en base diez de unidades formadoras de colonia en un mililitro (log UFC/mL).

En la siguiente tabla se observan los resultados del ensayo de viabilidad:



Gráfica 3. Efecto de BioF-GFP y F-LytA sobre la viabilidad de *S. pneumoniae*

La gráfica anterior nos permite observar cómo las proteínas BioF-GFP y F-LytA provocan una disminución drástica en la viabilidad de *S. pneumoniae* tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria. Este descenso es tal, que en el caso del minuto 265 las UFC/mL se reducen hasta dos órdenes de magnitud con respecto al control, lo que se corresponde a una disminución de viabilidad del 99% de las células.

#### 4.6. Efecto de las proteínas F-Lyt y BioF-GFP en la morfología de las células de *S. pneumoniae*

Cuando los cultivos de *S. pneumoniae* alcanzan los minutos 145, 210 y 270 se toman muestras de cada cultivo para el microscópico óptico de contraste de fases y se obtienen las imágenes que se muestran a continuación. De esta manera, se determina si las proteínas BioF-GFP y F-LytA han provocado algún efecto sobre la morfología de *S. pneumoniae*.

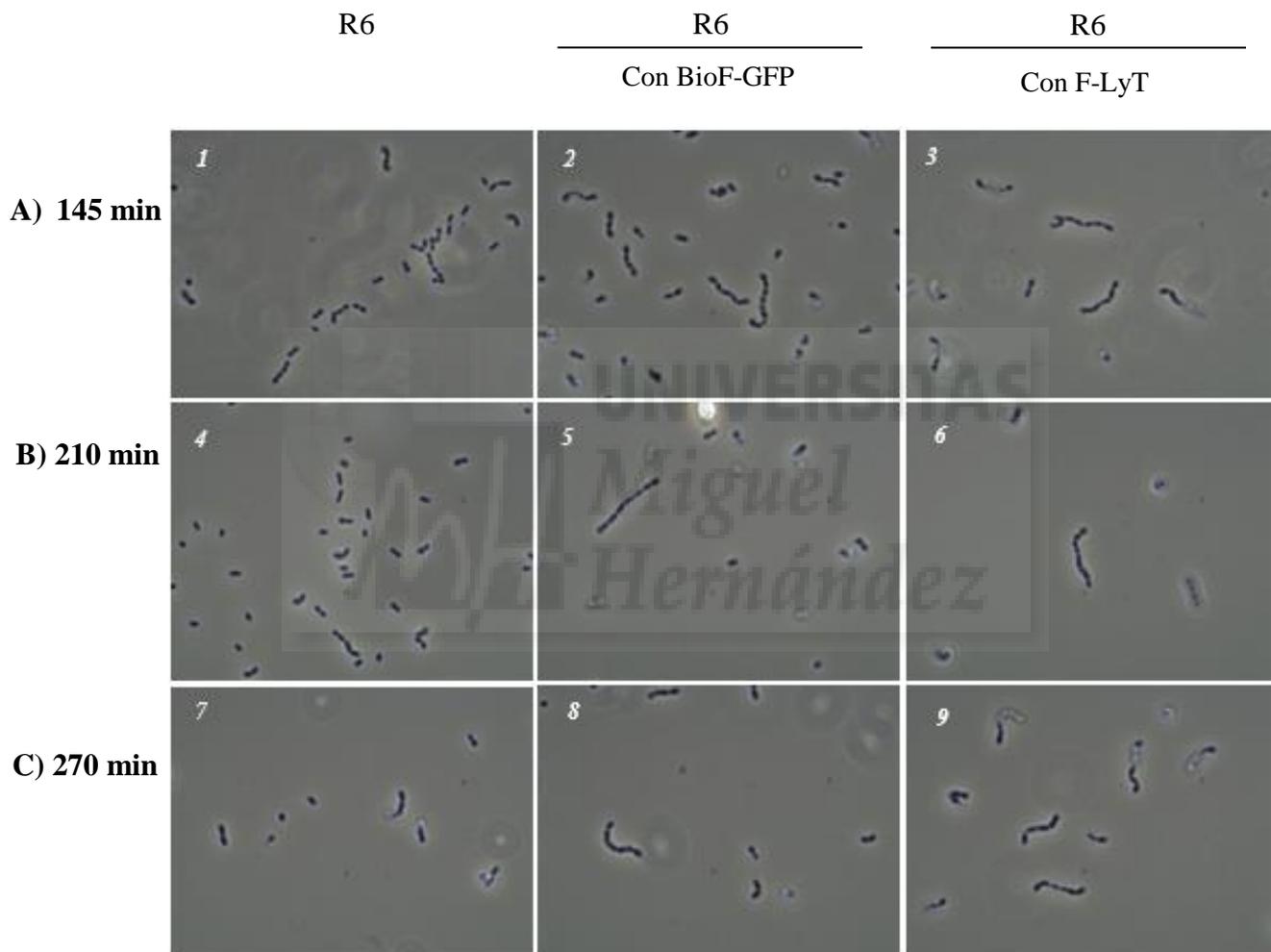


Figura 13. Efecto de BioF-GFP y F-LytA sobre la morfología de un cultivo de *S. pneumoniae*.

El cultivo líquido de *S. pneumoniae* mantiene su morfología aparente tanto en presencia de la proteína F-LytA como de la proteína BioF-GFP, si bien se observa un mayor número de células encadenadas. Por lo tanto, el posible efecto antimicrobiano observado en los ensayos anteriores no afecta drásticamente a la morfología de este microorganismo en el medio de cultivo líquido C+Y.

## 5. Discusión

### 5.1. Efecto de BioF-GFP y F-LytA sobre cultivos líquidos de *S. pneumoniae*

La adición de F-LytA provoca una disminución en el crecimiento de cultivos líquidos de *S. pneumoniae* (Gráfica 1). A la vista de este efecto, se decide determinar la contribución de la región BioF mediante el uso de las proteínas BioF-GST y BioF-GFP. Para ello, fue necesario la puesta a punto del sistema de expresión y purificación de ambas proteínas, ya que son completamente nuevas. Por un lado, para la máxima expresión de BioF-GST es necesario incubar el cultivo a 30 °C durante toda la noche (Figura 7) mientras que, para la proteína BioF-GFP las condiciones de expresión son 30 °C durante 3 horas (Figura 9). Por otro lado, el sistema de purificación de BioF-GST no se pudo determinar, pero sí el de la proteína BioF-GFP que consiste en el uso de la columna Zeba Spin Desalting Columns (0,5 mL) (Thermo Fisher) (Figura 12).

Una vez, purificada la proteína BioF-GFP se determinó que su efecto sobre cultivo líquidos de *S. pneumoniae* era una disminución en su crecimiento prácticamente igual que la observada con F-LytA (Gráfica 2). Este retraso en el crecimiento se puede observar a partir del minuto 95 (Gráfica 1) cuando la bacteria aún se encuentra en la fase exponencial de su crecimiento y se mantiene durante la fase estacionaria.

Además, aunque las dos imágenes obtenidas con el microscopio óptico de las distintas muestras de cultivos (Figura 13) nos permiten determinar que ni BioF-GFP ni F-LytA provocan ningún tipo de alteración sobre la morfología de *S. pneumoniae* a excepción de un pequeño encadenamiento, las dos proteínas provocan una disminución similar y muy apreciable en el número de células viables con respecto al control (Gráfica 3). Por un lado, estos ensayos nos permiten ratificar que en la proteína F-LytA el único módulo que parece presentar capacidad antimicrobiana es BioF-GFP, ya que el módulo C-LytA aislado no provoca ningún efecto sobre la viabilidad. Por otro lado, la disminución de la viabilidad de *S. pneumoniae* junto con la observada en su crecimiento en medio líquido C+Y nos permite suponer que el módulo BioF actúe como un compuesto bacteriolítico en esta bacteria.

Por lo tanto, esto nos lleva a descartar la posibilidad de que el módulo BioF esté simplemente inhibiendo la actividad autolisina de las proteínas CBPs, sino que también sea capaz de provocar la lisis celular por sus propiedades biosurfactantes.

## 6. Conclusiones y perspectivas futuras

### 6.1. Conclusiones

Se ha observado que el módulo BioF es capaz de provocar una disminución del crecimiento como de la viabilidad del patógeno *S. pneumoniae*, lo cual demuestra que presenta capacidad antimicrobiana frente a este patógeno. Es probable que la presencia de BioF provoque una desestabilización de las CBPs del tipo amidasa que las induzca a llevar a cabo una autólisis completa del cultivo de *S. pneumoniae*, o bien que se provoque de alguna manera la desestabilización de la membrana por las propiedades anfipáticas de BioF. En todo caso, estos resultados demuestran que el polipéptido BioF tiene una indudable capacidad de constituir la base una nueva familia de péptidos antimicrobianos frente a este patógeno.

### 6.2. Perspectivas futuras

Las perspectivas futuras que se deberían desarrollar en el futuro se orientarían a averiguar el mecanismo antibacteriano de BioF:

1. Determinación de la localización de BioF-GFP en el cultivo de *S. pneumoniae*.
2. La confirmación de la capacidad lítica de BioF mediante el uso de microscopía confocal que nos permita determinar las células con membrana dañada.
3. Caracterización mediante técnicas espectroscópicas del efecto de BioF sobre C-LytA sin que se encuentre fusionadas en una misma proteína.
4. Comprobación de la capacidad antimicrobiana de otras proteínas que presenten el módulo BioF y sean más sencillas de purificar.

## 7. Bibliografía

1. 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.
2. Anderson, A.J.; & Dawes, E.A. (1990). *Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. *Microbiol Rev* **54**: 450-472.
3. Bresan, S.; Sznajder, A.; Hauf, W.; Forchhammer, K.; Pfeiffer, D.; & Jendrossek, D. (2016). *Polyhydroxyalkanoates (PHA) Granules have no Phospholipids*. *Sci Rep* **6**: 26612.
4. Bush, K.; Courvalin, P.; Dantas, G.; Davies, J.; Eisenstein, B.; Huovinen, P.; Jacoby, G.A.; Kishony, R.; Kreiswirth, B.N.; Kutter, E.; Lerner, S.A.; Levy, S.; Lewis K.; Lomovskaya, O.; Miller, J.H.; Mobashery, S.; Piddock, L.J.; Projan, S.; Thomas, C.M.; Tomasz, A.; Tulkens, P.M.; Walsh, T.R.; Watson, J.D.; Witkowski, J.; Witte, W.; Wright, G.; Yeh, P & Zgurskaya, H. I. (2011). *Tackling antibiotic resistance*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 894-896.
5. Eldholm, V.; Johnsborg, O.; Haugen, K.; Ohnstad, H.S.; & Havarstein, L.S. (2009). *Fratricide in Streptococcus pneumoniae: Contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC*. *Microbiology*. **155**, 2223-2234.
6. Fernandez-Tornero, C.; Lopez, R.; Garcia, E.; Gimenez-Gallego, G.; & Romero, A. (2001). *A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA*. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1020–1024.
7. Galan, B.; Dinjaski, N.; Maestro, B.; de Eugenio, L.I.; Escapa, I.F.; Sanz, J.M.; et al. (2011) *Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in Pseudomonas putida KT2442*. *Mol Microbiol* **79**: 402-418.
8. Gamez, G & Hammerschmidt, S. (2012). *Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development*. *Curr Drug Targets*, **13**, 323-337.
9. García, P.; García, J.L.; García, E.; & López, R. (1986). *Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in Escherichia coli*. *Gene*. **43** (3): 265-72.
10. Hernández-Rocamora, V.M.; Maestro, B.; de Waal, B.; Morales, M.; García, P.; Meijer, E.W.; Merckx, M. & Sanz, J.M (2009). *Multivalent choline dendrimers as potent inhibitors of pneumococcal cell-wall hydrolysis*. *Angew Chem Int Ed Engl*.**48**(5): 948-51.
11. Howard, L.V.; & Gooder, H. (1974) *Specificity of the autolysin of Streptococcus (diplococcus) pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **117**, 796–804.

12. Jendrossek, D.; & Pfeiffer, D. (2014) *New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)*. *Environ Microbiol* **16**: 2357-2373.
13. Lee, S.Y. (1996). *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. *Biotechnol Bioeng* **49**: 1-14.
14. Li, Q.; Cheng, W.; Morlot, C.; Bai, X.H.; Jiang, Y.L.; Wang, W.; Roper, D.I.; Vernet, T.; Dong, Y.H.; Chen, Y.; & Zhou, C.Z. (2015). *Full-length structure of the major autolysin LytA*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 1373–1381.
15. Maestro, B., & Sanz, J. M. (2016). *Choline Binding Proteins from Streptococcus pneumoniae: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Designs of New Antimicrobials*. *Antibiotics (Basel)*. **5(2)**: 21.
16. Maestro, B.; Velasco, I.; Castillejo, I.; Arévalo-Rodríguez, M.; Cebolla, A.; & Sanz, J.M. (2008). *Affinity partitioning of proteins tagged with choline-binding modules in aqueous two-phase systems*. *J. Chromatogr A*. **1208(1-2)**: 189-96.
17. Maestro, B. & Sanz, J.M. (2017). *Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins*. En prensa (doi: 10.1111/1751-7915.12718).
18. Maestro, B.; Galan, B.; Alfonso, C.; Rivas, G.; Prieto, M.A.; & Sanz, J.M. (2013) *A new family of intrinsically disordered proteins: structural characterization of the major phasin PhaF from Pseudomonas putida KT2440*. *PLoS One* **8**: e56904.
19. Martner, A.; Dahlgren, C.; Paton, J.C.; & Wold, A.E. (2008). *Pneumolysin released during Streptococcus pneumoniae autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils*. *Infect. Immun.* **76**, 4079-4087.
20. Mayer, F.; Madkour, M.H.; Pieper-Fürst, U.; Wieczorek, R.; Liebergesell, M.; & Steinbüchel, A. (1996.) *Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies*. *J Gen Appl Microbiol* **42**: 445-455.
21. McCullers, J.A. & Tuomanen, E.I. (2001). *Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia*. *Front Biosci*, **6**, 877-89.
22. Medrano, F. J.; Gasset, M.; Lopez-Zumel, C.; Usobiaga, P.; Garcia, J.L.; & Menéndez, M. (1996). *Structural Characterization of the Unligated and Choline-bound Forms of the Major Pneumococcal Autolysin LytA Amidase. Conformational transitions induced by temperature*. *J. Biol. Chem.* **271(46)**: 29152-61.
23. Moldes, C.; Garcia, P.; Garcia, J.L.; & Prieto, M.A. (2004) *In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3205-3212.

24. Moldes, C.; Farinos, G.P.; de Eugenio, L.I.; Garcia, P.; Garcia, J.L.; Ortego, F.; et al. (2006) *New tool for spreading proteins to the environment: CryIAb toxin immobilized to bioplastics.* Appl Microbiol Biotechnol **72**: 88-93.
25. OMS (2007). *Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization.* Wkly. Epidemiol. Rec. **82**, 93-104.
26. 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.
27. Potter, M.; & Steinbuchel, A. (2005) *Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation.* Biomacromolecules **6**: 552-560.
28. Prieto, M.A.; Buhler, B.; Jung, K.; Witholt, B.; & Kessler, B. (1999) *PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of Pseudomonas oleovorans GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes.* J Bacteriol **181**: 858-868.
29. Sánchez-Puelles, J.; Sanz, J.M.; Garcia, J.; & Garcia, E. (1992). *Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases.* Gene, **89**, 69-75.
30. Sanz, J.M.; Lopez, R.; & Garcia, J.L. (1988) *Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase. A new single-step procedure for purification of this autolysin.* Volume 232, number 2, 308-312 FEB 05878 May.
31. 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.
32. Steinbuchel, A.; Aerts, K.; Babel, W.; Follner, C.; Lievergesell, M.; Madkour, M.H.; et al. (1995). *Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions.* Can J. Microbiol **41 Suppl 1**: 94-105.
33. Sznajder, A.; Pfeiffer, D.; & Jendrossek, D. (2015) *Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in Ralstonia eutropha H16.* Appl Environ Microbiol **81**: 1847-1858.
34. Tacconelli E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Kattula, D.; Burkert, F. (2017) *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* WHO.

35. Usobiaga, P.; Medrano, F. J.; Gasset, M.; Garcí'a, J. L.; Saiz, J. L. Rivas, G.; Laynez, J.; & Menéndez, M. (1996). *Structural organization of the major autolysin from Streptococcus pneumoniae*. J. Biol. Chem. **271**, 6832–6838.

