



Universidad Miguel Hernández
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Biotecnología
2014-2015

**Caracterización de la estructura y el plegamiento
de módulo de unión a colina C-CbpF de
*Streptococcus pneumoniae***

Marina Bernabeu Cantó
Tutor: Jesús Miguel Sanz Morales

Instituto de Biología Molecular y Celular
Laboratorio del Prof. Jesús Sanz

ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Streptococcus pneumoniae	2
2.2. Estructura de la superficie del neumococo	3
2.3. Proteínas de unión a colina	4
2.4. CbpF	5
2.5. Módulo de unión a colina C-CbpF	6
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Métodos generales	8
4.1.1. Preparación de disoluciones y tampones	8
4.2. Purificación del módulo C-CbpF	8
4.2.1. Medida de la concentración de proteína	9
4.3. Dicroísmo circular	10
4.3.1. Titulación con cloruro de guanidinio	10
4.4. Ensayo de desnaturalización térmica	12
4.5. Efecto del pH	13
4.6. Fluorescencia	13
4.6.1. Titulación con cloruro de guanidinio	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Cálculo de la estabilidad frente a cloruro de guanidinio	15
5.1.1. Dicroísmo circular	15
5.1.1.1. Ensayo de reversibilidad	16
5.1.2. Fluorescencia	17
5.2. Cálculo de la estabilidad térmica	21
5.3. Cálculo de la estabilidad frente a pH	23
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	24
7. BIBLIOGRAFÍA	26

1. RESUMEN

La proteína CbpF presente en la pared celular de *Streptococcus pneumoniae* es una proteína de unión a colina (CBP) cuyo módulo de unión a colina (C-CbpF) se encuentra en el extremo C-terminal. Esta proteína podría ser un potencial antimicrobiano contra *S. pneumoniae*, el cual es aún una de las principales causas de mortalidad infantil en todo el mundo.

Se ha llevado a cabo una caracterización del módulo C-CbpF, realizando para ello diversos ensayos de estabilidad frente a desnaturalizantes químicos mediante el uso de espectroscopía de dicroísmo circular y de fluorescencia, además de efectuar ensayos para determinar el efecto del pH en el módulo y su estabilidad térmica.

Los resultados de los ensayos de estabilidad frente a desnaturalizantes químicos indican que C-CbpF posee una estabilidad química similar a la del módulo de unión a colina más estudiado (C-LytA), mientras los ensayos de estabilidad térmica muestran que su estabilidad en este caso es ligeramente inferior a la de C-LytA. Además se determinó el efecto del pH en C-CbpF y se observó gran estabilidad frente a variaciones en el pH del medio.

PALABRAS CLAVE

Neumococo, proteína de unión a colina, CbpF.

The CbpF protein present on the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* is a choline binding protein (CBP) which choline binding module (C-CbpF) is at the C-terminal end. This protein could be a potential antimicrobial against *S. pneumoniae*, which is still one of the main causes of child mortality in the world.

A characterization of the C-CbpF module has been done by carrying out several assays, including stability assays against chemical denaturants using circular dichroism and fluorescence spectroscopy and assays to determine the pH effect in the module and its thermic stability.

The results of the stability assays against chemical denaturants show that the chemical stability of C-CbpF is similar to that of the most studied choline binding module (C-LytA), while thermic stability assays indicate that C-CbpF stability in this case is slightly lower than that of C-LytA. The effect of pH was also determined and great stability against pH changes was observed.

KEYWORDS

Pneumococcus, choline binding proteins, CbpF.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram-positiva que normalmente se encuentra en individuos sanos sin producir problemas, pero cuando se activa su patogenicidad puede producir graves infecciones, especialmente en el caso de niños y ancianos. Las enfermedades producidas por esta bacteria constituyen la 4ª causa de muerte a nivel mundial, además de presentar la mayor tasa de mortalidad dentro de las enfermedades prevenibles por vacunas en Europa y EEUU (Gamez y Hammerschmidt, 2012).

Las infecciones del tracto respiratorio inferior, y en particular la neumonía, siguen siendo la mayor causa de mortalidad y morbilidad en el mundo, liderando el ranking de mortalidad de las enfermedades infecciosas (Fauci y Morens, 2012). *Streptococcus pneumoniae* es el agente etiológico más común en la neumonía adquirida en comunidad, así como en la meningitis bacteriana, la otitis media y la sepsis (McCullers y Tuomanen, 2001).

El tratamiento de las infecciones neumocócicas está potencialmente comprometido debido a al aumento de la resistencia de este patógeno a los antibióticos comúnmente usados para tratar estas infecciones (Feldman y Anderson, 2014). La resistencia antibiótica se desarrolla globalmente y es más frecuente en los serotipos de neumococo con más prevalencia en niños. Cabe destacar que la incidencia de las enfermedades producidas por neumococo es la más alta en niños menores de 2 años y en adultos mayores de 65 años (Örtqvist y cols., 2005)

En Europa y Estados Unidos las enfermedades neumocócicas conllevan una alta carga económica y clínica, además la mortalidad debida a infecciones por neumococo se ha mantenido invariable en el 12% desde 1950 a pesar de los avances en terapia antibiótica y la introducción de la vacuna (Ludwig y cols., 2012)

Debido a la anteriormente mencionada resistencia a antibióticos es de especial interés la producción de nuevos antibióticos capaces de tratar enfermedades provocadas por *S. pneumoniae*. En la búsqueda de estos nuevos antimicrobianos se les está prestando especial atención a las proteínas asociadas a la superficie de esta bacteria dado que son sintetizadas por la mayoría de las cepas de neumococo y juegan un papel importante en la virulencia de éste (Maestro y Sanz, 2007).

2.2 Estructura de la superficie del neumococo

Las proteínas presentes en la superficie de las bacterias patógenas contribuyen a la interacción del patógeno con el huésped de forma que son consideradas como potenciales factores de virulencia. *Streptococcus pneumoniae* posee un total de cuatro familias de proteínas superficiales (**Figura 1**), entre otras funciones estas proteínas se encargan de la adhesión de la bacteria al huésped y la regulación de enzimas necesarias en la división celular. Por tanto, estas proteínas presentes en la superficie de *S. pneumoniae* componen una buena diana para nuevos antimicrobianos (Pérez-Dorado y cols., 2012).

Una de esas familias de proteínas de superficie es la familia de las proteínas de unión a colina (choline binding proteins, CBPs). *S. pneumoniae* sintetiza de 13 a 16 CBPs, todas las proteínas de esta familia comparten módulos de unión a colina (choline binding modules, CBMs) presentes en la región carboxi-terminal que presentan homología entre ellos. Estos dominios son los encargados de anclar las proteínas CBPs a la superficie de la bacteria, pues ésta presenta fosforilcolina en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos superficiales a la que se une el CBD mediante enlaces no covalentes (Hammerschmidt, 2006). Muchas proteínas de unión a colina están implicadas en la virulencia de *S. pneumoniae* (Vollmer, 2007).

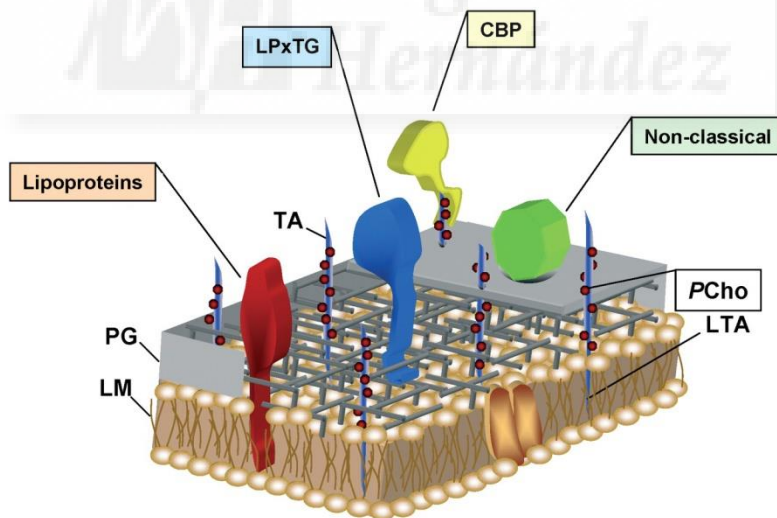


Figura 1 – Esquema de las proteínas de superficie presentes en la pared celular de *S. pneumoniae*. La pared celular está formada por una membrana lipídica (LM), peptidoglicano (PG) y ácidos teicoico (TA) y lipoteicoico (LTA). La fosforilcolina (PCho) está unida a estos ácidos y sirve de anclaje a las CBPs. Además de las CBPs se muestran las otras tres familias de proteínas (LPxTG, lipoproteínas y las no clásicas). Imagen obtenida de (Bergmann and Hammerschmidt, 2006) y posteriormente modificada.

Las funciones más importantes que desempeñan las CBPs intervienen en procesos como la adhesión a las células del huésped, la separación de las células hija tras la división celular, la formación de biopelículas (López y cols., 2004).

2.3 Proteínas de unión a colina

Las proteínas de unión a colina poseen dos módulos claramente diferenciados, uno funcional y uno de reconocimiento de colina (choline binding module, CBM) (**Figura 2**). El módulo funcional se suele localizar en el extremo N-terminal de la proteína y es específico de cada CBP. El módulo de reconocimiento de colina está formado por secuencias de 20 aminoácidos denominadas repeticiones de unión a colina (coline binding repeats, CBRs), éstas poseen ciertos aminoácidos muy conservados (Hakenbeck y cols., 2009; Hammerschmidt, 2006).

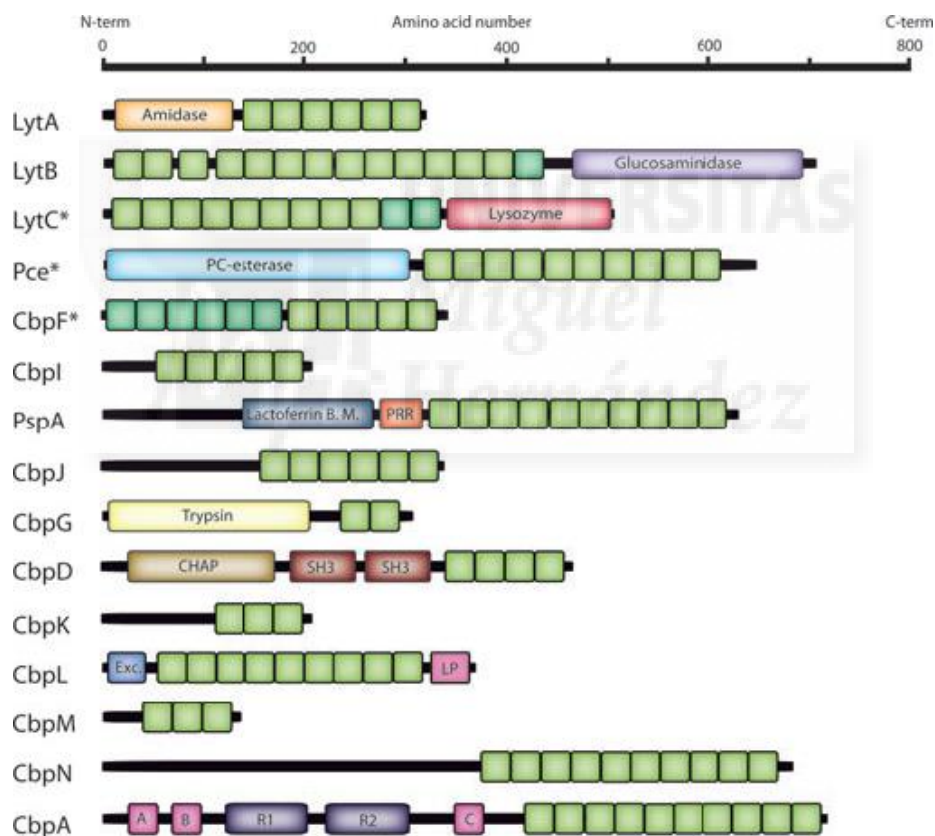


Figura 2 – Estructura modular de las proteínas de unión a colina (CBPs) de *S. pneumoniae*. Las repeticiones de unión a colina se muestran en verde.

Cada CBR se estructura como un bucle y una horquilla- β , y cada sitio de unión a colina está formado por dos CBR. Los aminoácidos aromáticos presentes en las CBRs son indispensables para la interacción con la colina puesto que la carga positiva de ésta es la que interacciona con los anillos aromáticos de estos aminoácidos mediante interacciones catión- π y fuerzas de van der Waals (Fernández-Tornero y cols., 2001; Pérez-Dorado y cols., 2012).

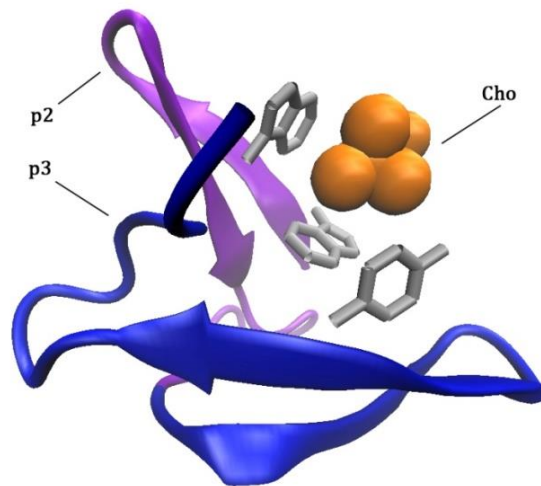


Figura 3 – Representación de dos CBR de la proteína CbpF (p2 y p3). Los aminoácidos aromáticos triptófano de p2 junto a la tirosina de p3 conforman el sitio de unión de la colina (Cho). Cada CBR está formado por una horquilla- β y un bucle (coiled-coil) a través del cual se unen entre sí.

El CBM más ampliamente estudiado es el de la enzima LytA, una amidasa de *S. pneumoniae* implicada en los procesos de lisis de la pared bacteriana. Posee 6 repeticiones de unión a colina a diferencia de C-CbpF que tiene 7. Por otra parte, el porcentaje de identidad de las secuencias de ambos módulos es únicamente de un 37%, difiriendo gran parte de la secuencia entre ambos y también a nivel estructural.

El uso de módulos de unión a colina aislados como antibióticos se basa en la competición de éstos con las CBPs por la unión a la colina, al unirse los CBMs a la fosforilcolina presente en la pared del neumococo las CBPs de la bacteria son desplazadas y ya no son capaces de ejercer correctamente sus funciones (Sánchez-Puelles, 1990). Dado el potencial como nuevos agentes antimicrobianos de estos módulos es importante su estudio y caracterización.

2.4 CbpF

La proteína CbpF de *Streptococcus pneumoniae* se encuentra en la pared celular de esta bacteria y se encarga de regular la actividad enzimática de las murein-hidrolasas neumocócicas. Estas enzimas están implicadas en la biosíntesis de la pared bacteriana y tienen función lítica, la cual permite la integración del nuevo peptidoglicano tras la eliminación de un enlace peptídico.

CbpF contiene dos dominios bien diferenciados, un dominio funcional en el extremo amino terminal y un módulo de unión a colina (C-CbpF) en el extremo carboxilo terminal. Cabe destacar que la composición estructural de la proteína CbpF está generada enteramente a partir de repeticiones de unión a colina.

El dominio N-terminal está compuesto por repeticiones de unión a colina muy modificadas, de manera que ya no reconocen el ligando. El módulo C-CbpF posee dos regiones diferenciadas denominadas CI y CII. CI presenta dos repeticiones de unión a colina no canónicas y se encarga de la unión entre dominio N-terminal y el C-terminal mientras que CII presenta cinco repeticiones de unión a colina y una cola terminal (**Figura 4**) (Molina y cols., 2009).

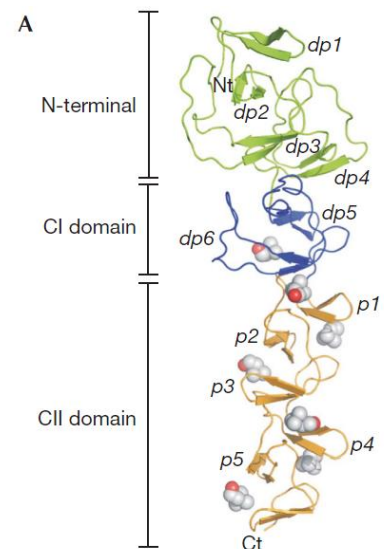


Figura 4 – Dominios estructurales de la proteína CbpF. Las repeticiones de unión a colina canónicas están marcadas como *p* y las modificadas como *dp*, se muestra las moléculas de colina unidas a los sitios de unión a colina funcionales. Imagen obtenida de Molina y cols, 2009.

2.5 Módulo de unión a colina C-CbpF

La proteína CbpF presente en la pared celular, así como las demás CBPs, necesitan la presencia de colina en la superficie bacteriana para poder mantenerse en contacto con esta y ejercer su función.

Como se ha mencionado previamente, el módulo de unión a colina está dividido en dos regiones, CI y CII, además de poseer una cola terminal. A continuación se muestra la secuencia del módulo C-CbpF señalando las distintas partes que la conforman (**Figura 5**).

CI	dp5	GW YI Y EDG	_____	NW Y Y LNK LGN F G DD S Y N P L P I G EV A K
	dp6	GW T Q D F H V T I D I D R S K P A	_____	PW Y Y L D AS G K M L T
CII	p1	DW Q K V N G	_____	KW Y Y F G SS G S M A T
	p2	GW K Y V R G	_____	KW Y Y L D N K N G D M K T
	p3	GW Q Y L G N	_____	KW Y Y L R SS G A M V T
	p4	GW Y Q D G L	_____	TW Y Y L N A G N G D M K T
	p5	GW F Q V N G	_____	KW Y Y A Y SS G A L A V
	p6	GW F Q V N G	_____	KW Y Y A Y SS G A L A V
C-t	NT T V D G	_____	Y S V N Y N G E W V Q	

Figura 5 – Secuencia de aminoácidos del módulo C-CbpF. Se muestra la secuencia de las CBRs de las regiones CI y CII, además se ha coloreado de azul la secuencia correspondiente a la cola carboxi-terminal. En negrita se resaltan los aminoácidos plegados en forma de hebras-β. En total son 183 aminoácidos con un peso molecular de 21411 Da.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los módulos de unión a colina poseen un gran potencial como antimicrobianos dada su capacidad para competir con las proteínas neumocócicas, por tanto es de gran interés el estudio y la caracterización estructural de estos módulos. El módulo de unión a colina C-LytA ha sido el más estudiado hasta la fecha (Fernández-Tornero y cols., 2001; Hernández-Rocamora y cols., 2008; Maestro y Sanz, 2005) pero existen otras proteínas de unión a colina con potencial antimicrobiano apenas estudiadas, como la objeto de este trabajo (Molina y cols., 2009).

OBJETIVOS

Se ha llevado a cabo un estudio de las propiedades termodinámicas y estructurales del módulo de unión a colina de la proteína de unión a colina F (CbpF) de *S. pneumoniae* mediante el empleo de técnicas espectroscópicas con los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Cálculo de la estabilidad frente a desnaturalizantes químicos
- **Objetivo 2:** Cálculo de la estabilidad térmica
- **Objetivo 3:** Cálculo de la estabilidad frente a diferentes pH

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Métodos generales

4.1.1 Preparación de disoluciones y tampones

La preparación de todas las disoluciones se hizo empleando tampón fosfato sódico 20 mM al 143 mM de colina y pH 7.5, pudiendo contener además diferentes concentraciones de NaCl.

Para la obtención de este stock de tampón se partió de dos disoluciones madre 1 M de fosfato monosódico y disódico que se mezclaron de acuerdo a las proporciones 16% PNa y 84% PNa₂ con el objetivo de obtener un pH final de 7,5.

4.2 Purificación del módulo C-CbpF

En la purificación se empleó una estirpe de *Escherichia coli* transformada con el plásmido que contiene la secuencia del módulo C-CbpF. El gen que codifica la proteína está bajo el control de un promotor *lac*.

Utilizando la cepa de bacterias transformadas se sembró una placa con un medio de LB-agar y 125 µL/L de ampicilina 100x, obteniéndose un césped tras la incubación durante toda la noche a 37°C. A partir de esta placa se sembró de nuevo una placa usando la estría escocesa con el objetivo de obtener colonias aisladas.

Un pre-inóculo se preparó empleando la última placa: se utilizó un medio LB-Ap50, para obtener este medio se usaron 20 mL de medio LB al que se añadieron 10 µL de ampicilina 100x. Este pre-inóculo se dejó incubar a 30°C durante toda la noche.

El pre-inóculo se empleó para inocular dos matraces con 1 L de medio de LB-Ap50, obtenido tras añadir 500 µL de ampicilina 100x a un l L de LB. En cada matraz se diluyó el pre-inóculo por 100, es decir, se añadieron 10 mL del pre-inóculo. Se dejaron incubando los cultivos a 30°C y agitación a 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,5 a 300 nm. Entonces se añadió IPTG a razón de 0,5 mM por matraz y se dejó expresar por 3 horas. El IPTG se emplea como inductor del promotor *lac*.

Tras el tiempo de expresión se centrifugaron los cultivos durante 15 minutos a 5000 rpm usando una centrífuga *Beckman L8-70* y un rotor *JA-10*. El precipitado obtenido se

resuspendió empleando 50 mL de tampón fosfato sódico 20 mM por litro de cultivo. Después se sonicó el resuspendido mediante un sonicador *Branson 250* empleando 15 ciclos de 10 segundos cada uno.

Tras el sonicado de las células se centrifugó a 9000 rpm por 15 minutos utilizando la misma centrífuga antes mencionada con un rotor *JA-20*. El precipitado que se obtuvo fue resuspendido en 10 mL de cloruro de guanidinio a concentración 6 M.

El resuspendido se centrifugó por 15 minutos a 9000 rpm usando la misma centrífuga con un rotor *JA-20*. Se recogió el sobrenadante y se le añadió colina a concentración 143 mM. Finalmente se realizan dos diálisis empleando este sobrenadante con el objetivo de eliminar el cloruro de guanidinio. El tampón de diálisis está compuesto por fosfato sódico 20 mM, 143 mM de colina y 100 mM de NaCl.

4.2.1 Medida de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteína en las disoluciones se realizó mediante espectroscopía de absorción a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro *Evolution 201* utilizando una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico. A partir de la medida de absorbancia obtenida y mediante la ecuación de Lambert-Beer (**Ecuación 1**) se obtuvo la concentración de proteína en disolución.

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

Ecuación 1

Donde C es la concentración, ϵ_{280} el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm y l el paso óptico de la cubeta.

El coeficiente de extinción molar de C-CbpF a 280 nm es de $115280\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A lo largo de todo el trabajo se han empleado las unidades de concentración “mg/mL”, con el objetivo de facilitar la obtención de las medidas de concentración a partir de las de absorbancia se ha usado la absorbancia de la proteína a 1 mg/mL como factor de conversión teniendo en cuenta que:

$$A_{280\text{ nm}}(1\text{ mg/mL}) = 5,384$$

Todas las medidas de absorbancia realizadas fueron inferiores a una unidad para mantener los valores dentro del límite de linealidad de la ley de Lambert-Beer, realizando en caso necesario las diluciones precisas.

4.3 Dicroísmo circular

Se empleó la técnica de dicroísmo circular para estudiar los cambios en la estructura secundaria y terciaria de C-CbpF. Los diversos experimentos se realizaron usando dos espectropolarímetros, por un lado un *Jasco J-815* junto a un termostato *Peltier (PTC-423S/15)* y por otro un *Jasco J-810* en las mismas condiciones.

Los espectros se registraron entre las longitudes de onda 210 a 260 nm, a 20°C y utilizando una cubeta de cuarzo de 2 mm de paso óptico. Cada espectro final es el resultado del promedio de 4 medidas distintas y en todos los experimentos se usó como blanco tampón fosfato sódico 20mM y 143 mM de colina, obteniéndose un espectro que más tarde se substrajo a los datos obtenidos durante su procesado.

El procesado final de los datos obtenidos se hizo utilizando el programa de análisis científico *SigmaPlot 10.0*. Durante el procesado se procede a la conversión de las unidades a elipticidad molar, la representación gráfica de los datos y el ajuste mediante ecuaciones de éstos. La conversión a unidades de elipticidad molar se realiza con el objetivo de normalizar las mediciones frente a la concentración empleada y el paso óptico de la cubeta (**Ecuación 2**).

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda}}{[P] \cdot n^{\circ}aa \cdot d \cdot 10}$$

Ecuación 2

Donde θ_{λ} es la elipticidad experimental en miligrados, [P] es la concentración molar de la proteína, $n^{\circ}aa$ es el número de aminoácidos de la proteína (183 para C-CbpF) y d es el paso óptico de la cubeta. La unidades de $[\theta]_{\lambda}$ serían $\text{grados cm}^2\text{dmol}^{-1}$.

4.3.1 Titulación con cloruro de guanidinio

Con el objetivo de estudiar el proceso de desnaturalización estructural de C-CbpF se realizaron varios experimentos usando cloruro de guanidinio (GdmCl) como agente desnaturalizante a concentraciones crecientes.

Las concentraciones de proteína empleada fue de 0,1 mg/mL, las diluciones a partir del stock inicial de proteína (1,9 mg/mL) se hicieron usando tampón fosfato sódico 20 mM y 143 mM de colina.

Los espectros se obtuvieron añadiendo alícuotas de cloruro de guanidinio 8 M en tampón fosfato 20 mM con colina 143 mM entre las mediciones y se empleó una cubeta de 2 mm de paso óptico.

Tras la obtención de los datos, se procesaron y se representó la elipticidad molar para determinadas longitudes de onda (224, 222 y 227 nm) frente a la concentración de cloruro de guanidinio usado.

El procesado de los datos y la obtención de los valores termodinámicos se realizó mediante el software *SigmaPlot 10.0*, los datos de interés son el valor de la energía libre de Gibbs para la proteína y el punto medio de la transición en la desnaturalización. Para el cálculo de estos valores es necesario ajustar la representación gráfica de la elipticidad molar frente a la concentración de cloruro guanidinio a una curva.

Para la obtención de la ecuación que ajuste a dicha curva se ha usado la ecuación de la energía libre de Gibbs y la energía libre de reacción:

$$\Delta G_{UF} = \Delta G_{UF}^{\circ} - m[D]$$

Ecuación 3

$$\Delta G_{UF} = -RT \ln(K_{eq})$$

Ecuación 4

Donde m es la pendiente que indica cuán abrupta es la transición, $[D]$ es la concentración de desnaturalizante, K_{eq} es la constante de equilibrio. R es la constante universal de los gases ideales con valor de $1,987 \cdot 10^{-3}$ Kcal/mol·K; T es la temperatura en grados Kelvin.

Dado que en el punto medio de la transición la cantidad de proteína plegada y desplegada es la misma, la constante de equilibrio en ese punto será igual a uno y sustituyendo en la ecuación 4 ésta quedará como:

$$\Delta G_{UF} = 0$$

Ecuación 5

Sustituyendo en la ecuación 3 se obtiene:

$$\Delta G_{UF}^{\circ} = m[D]_{1/2}$$

Ecuación 6

Finalmente se igualan las ecuaciones 3 y 4, se sustituye la anterior en la ecuación 3 y la fórmula de la constante de equilibrio (**Ecuación 7**) en la ecuación 4. Se reordenan los factores y se obtiene finalmente la ecuación usada para el ajuste (**Ecuación 8**).

$$K_{eq} = \frac{\theta_f - \theta}{\theta - \theta_u}$$

Ecuación 7

$$\theta = \frac{\theta_f + \theta_u \left[\exp\left(\frac{-m([D]_{1/2} - [D])}{RT}\right) \right]}{1 + \exp\left(\frac{-m([D]_{1/2} - [D])}{RT}\right)}$$

Ecuación 8

Donde θ es la elipticidad molar obtenida a partir de los datos experimentales mediante la ecuación 2; θ_f es la elipticidad molar correspondiente al estado plegado (la primera línea base de la curva) y θ_u es la elipticidad molar correspondiente al estado desplegado (la segunda línea base de la curva), en ambos casos el valor es obtenido extrapolando al punto 0 en el eje X; $[D]_{1/2}$ es la concentración de desnaturalizante en el punto medio; R es la constante universal de los gases ideales con valor de $1,987 \cdot 10^{-3}$ Kcal/mol·K; T es la temperatura en grados Kelvin.

4.4 Ensayo de desnaturalización térmica

Se realizaron ensayos mediante dicróismo circular para observar la estabilidad térmica de la proteína así como determinar su temperatura de desnaturalización y el punto medio en la curva.

La concentración de colina se mantuvo constante a 143 mM debido a la precipitación de C-CbpF en caso de usar concentraciones inferiores y la concentración de proteína empleada fue de 0,1 mg/mL. El barrido térmico se realizó siguiendo la elipticidad de la muestra a una longitud de onda de 224 nm en un rango de temperaturas entre 5°C a 95°C, las medida se tomaron cada 0,2°C a una velocidad de 60°C por hora.

Además se registraron los espectros a 5°C y 95°C de la proteína entre las longitudes de onda 210 a 260 nm para observar el efecto de la desnaturalización térmica en la elipticidad de la proteína en un espectro completo y no solo a la longitud de onda de 224 nm. Por otra parte tras registrar el espectro a 95°C al final del barrido térmico se reducía la temperatura de nuevo a 5°C y se registraba también el espectro completo para las longitudes de onda antes mencionadas con el objetivo de observar si se producía reversibilidad.

Mediante el programa *SigmaPlot 10.0* se analizaron los datos y se obtuvo el punto medio empleando la misma ecuación que en el apartado 4.3.1.

4.5 Efecto del pH

El efecto del pH sobre la estructura de la proteína C-CbpF se estudió usando 17 tampones de distinto pH. En todas las disoluciones se empleó la misma concentración de proteína y la concentración de colina se mantuvo a 143 mM.

Para la obtención de los tampones a 250 mM comprendidos entre el pH 1.6 a 2.2 se usaron dos disoluciones madre a 1 M de cloruro potásico y de ácido clorhídrico. Los tampones a 1 M comprendidos entre el pH 2.4 a 3.6 se hicieron a partir de una cantidad constante de 1,5 g de glicina a la que se adicionó la cantidad correspondiente de ácido clorhídrico y agua destilada. Los tampones a 1 M en el rango de pH de 4.0 a 5.6 se obtuvieron a partir de dos disoluciones madre 1 M de ácido acético y acetato sódico. Finalmente los tampones 1 M para el pH 6.0 a 8.0 se hicieron usando dos disoluciones madre 1 M de fosfato monosódico y fosfato disódico.

A partir de los tampones anteriores se extrajeron las alícuotas necesarias para obtener las muestras a medir con una concentración 20 mM de cada tampón, 143 mM de colina y 0,1 mg/mL de proteína.

Mediante dicroísmo circular se observaron los cambios que los diferentes pH producían en la estructura secundaria y terciaria de C-CbpF.

4.6 Fluorescencia

Se utilizaron técnicas de fluorescencia para estudiar los cambios en la estructura de C-CbpF. Para realizar los experimentos se usó un fluorímetro *PTI-Quanta Master* (Birmingham, NJ, EE.UU.), modelo *QM-62003SE*.

Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 280 nm y los espectros de emisión se recogieron entre las longitudes de onda 300 a 400 nm. La temperatura se mantuvo a 20°C y se empleó una cubeta de cuarzo de 5x5 mm de paso óptico.

El procesado de los datos se realizó utilizando el programa de análisis científico *SigmaPlot 10.0* mediante el cual se efectuó la representación gráfica de los datos obtenidos y el ajuste de curvas de éstos.

4.6.1 Titulación con cloruro de guanidinio

Se usó cloruro de guanidinio (GdmCl) en cantidades crecientes como agente desnaturizante para observar el proceso de desnaturización estructural de C-CbpF.

La titulación se realizó por duplicado a una concentración de C-CbpF de 0,1 μM (0,002 mg/mL) y la dilución se hizo usando tampón fosfato sódico 20 mM y 143 mM de colina. Los espectros de emisión se registraron adicionando alícuotas de cloruro de guanidinio 8 M entre cada medición y se empleó una cubeta de 5x5 mm de paso óptico.

Los espectros obtenidos se procesaron y se representó la fluorescencia para determinadas longitudes de onda (325, 341 y 360) frente a la concentración de cloruro de guanidinio empleado.

5. Resultados y discusión

5.1 Cálculo de la estabilidad frente a cloruro de guanidinio

5.1.1 Dicroísmo circular

Las titulaciones mediante dicroísmo circular se hicieron para determinar el perfil de desnaturalización del módulo C-CbpF frente a cloruro de guanidinio. El perfil obtenido se muestra en la **Figura 6**, no se observan variaciones en función de la longitud de onda. Al comparar con el perfil de desnaturalización del módulo de unión a colina C-LytA (Maestro y Sanz, 2005) se observa similar estabilidad química en C-CbpF a pesar de tener ésta más repeticiones de unión a colina.

Se comparan también los espectros obtenidos tras la desnaturalización térmica y la desnaturalización empleando cloruro de guanidinio (**Figura 7**). La desnaturalización térmica produce el completo desplegamiento de la proteína mientras que al usar cloruro de guanidinio queda una estructura residual al igual que en C-LytA (Maestro y Sanz, 2005).

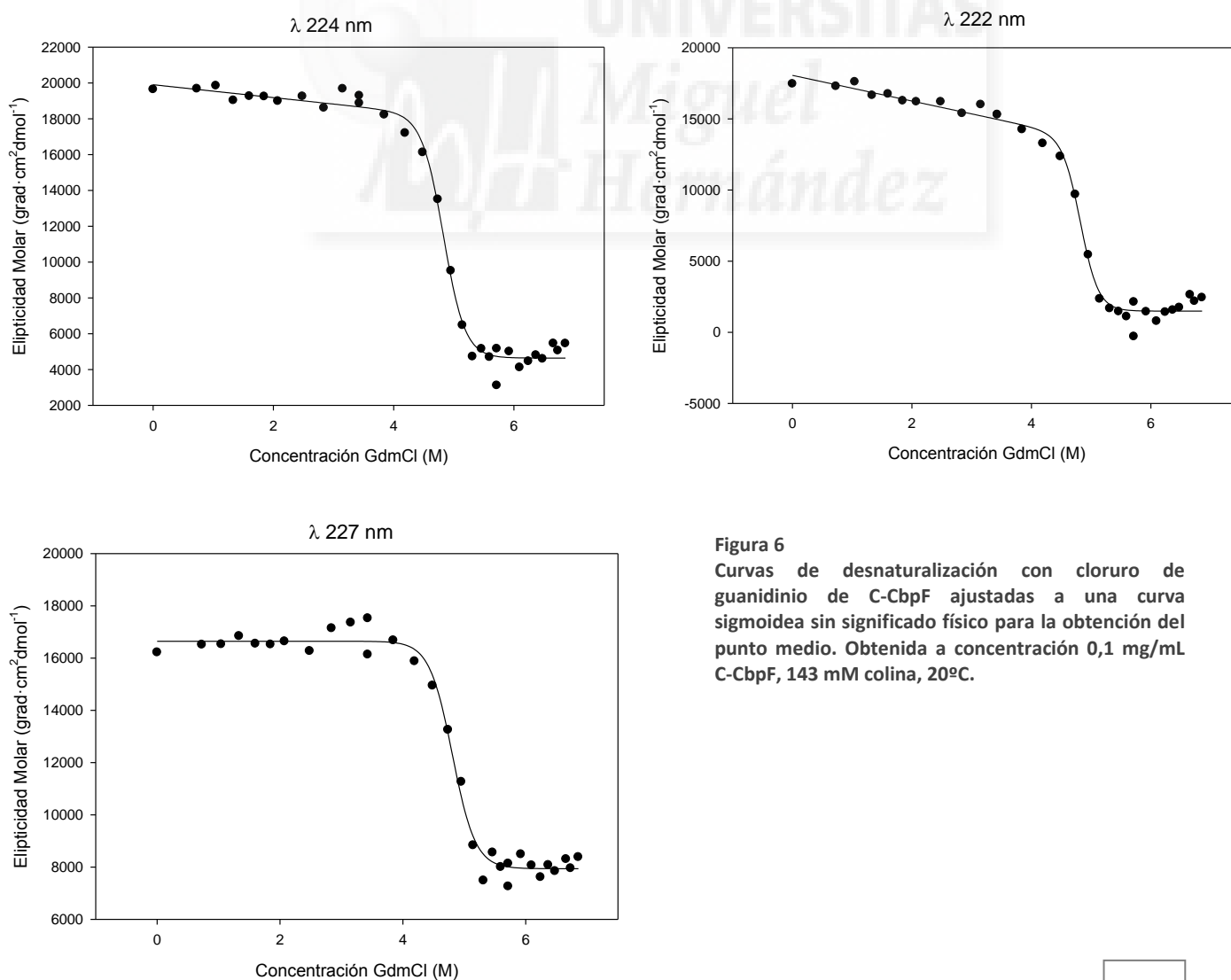


Figura 6
Curvas de desnaturalización con cloruro de guanidinio de C-CbpF ajustadas a una curva sigmoidea sin significado físico para la obtención del punto medio. Obtenida a concentración 0,1 mg/mL C-CbpF, 143 mM colina, 20°C.

Para obtener los datos termodinámicos de la estabilidad de la proteína se necesita por una parte determinar el estado oligomérico de ésta, y por otra parte asegurarse de la reversibilidad de la transición.

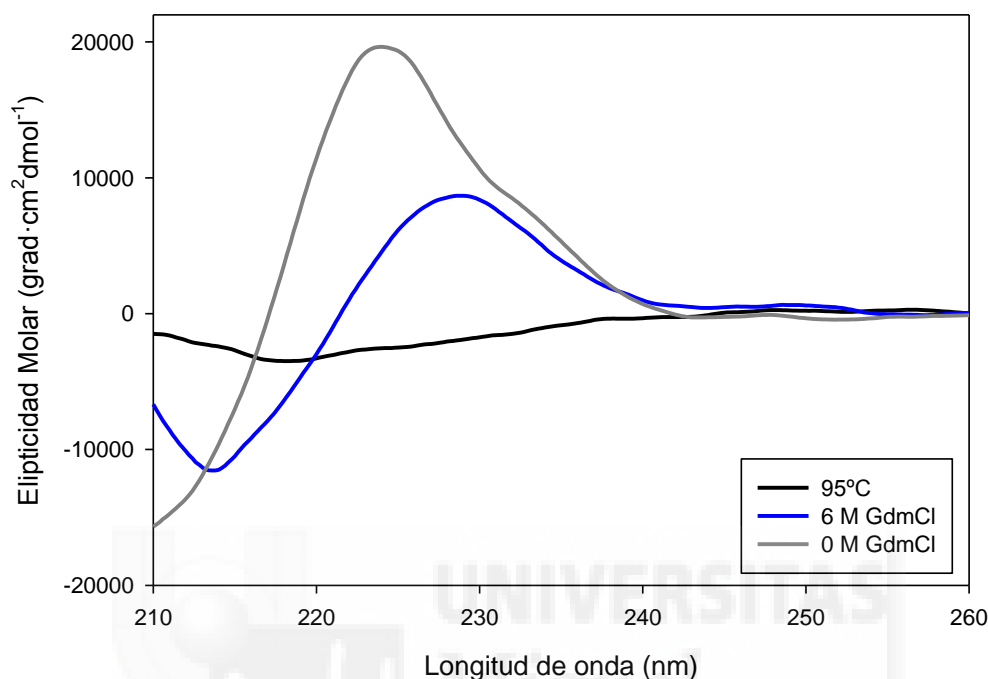


Figura 7 – Curvas de desnaturalización con cloruro de guanidinio y mediante temperatura de C-CbpF. Obtenidas a concentración de C-CbpF 0,1 mg/mL, 143 mM colina.

Los experimentos se hicieron siempre manteniendo una concentración de colina de 143 mM puesto que al eliminar o disminuir mucho la concentración se producía la precipitación de la proteína.

5.1.1.1 Ensayo de reversibilidad

Para el cálculo de los datos termodinámicos a partir del perfil de desnaturalización con cloruro de guanidinio es necesario que la desnaturalización de la proteína sea reversible. Por este motivo se realizó un ensayo simple de comprobación de la reversibilidad.

Se empleó dicroísmo circular para registrar el espectro de una muestra de la proteína sin guanidinio, una con cloruro de guanidinio 6 M y otra dializada para eliminar el cloruro de guanidinio 6 M inicial.

En la **Figura 8** están representados los espectros obtenidos para las tres muestras mediante dicroísmo circular.

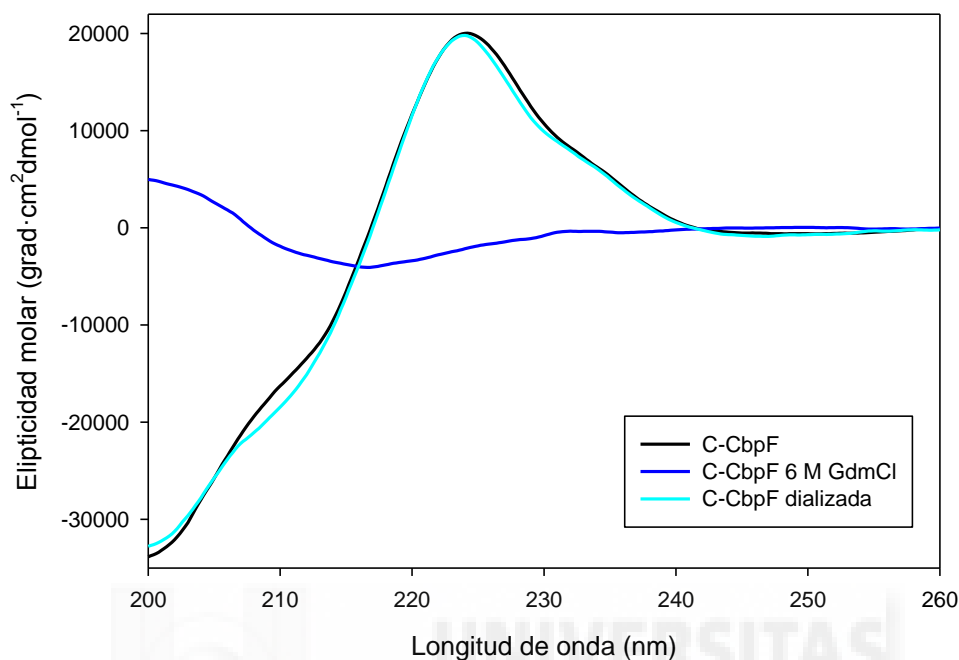


Figura 8 – Ensayo de reversibilidad de C-CbpF. Concentración de C-CbpF 0,1 mg/mL, 143 mM colina, 20°C.

Los resultados obtenidos permiten confirmar la reversibilidad del módulo C-CbpF tras su desnaturalización empleando cloruro de guanidinio como agente desnaturalizante. Por tanto es posible aplicar las ecuaciones termodinámicas que permiten el cálculo de los valores termodinámicos de interés como se verá más adelante.

5.1.2 Fluorescencia

Dada la presencia de gran cantidad de grupos aromáticos en C-CbpF, especialmente triptófano, se realizó también la titulación con cloruro de guanidinio empleando fluorescencia.

En un primer experimento, y aprovechando la mayor sensibilidad de la técnica de fluorescencia, el perfil de desnaturalización se obtuvo empleando una cantidad de proteína muy inferior respecto a la usada anteriormente en dicroísmo circular: 0,002 mg/mL de C-CbpF. En la **Figura 9** se representa el perfil obtenido. Se usa un cociente entre longitudes de onda para evitar errores debido a diferencias de concentración entre las muestras.

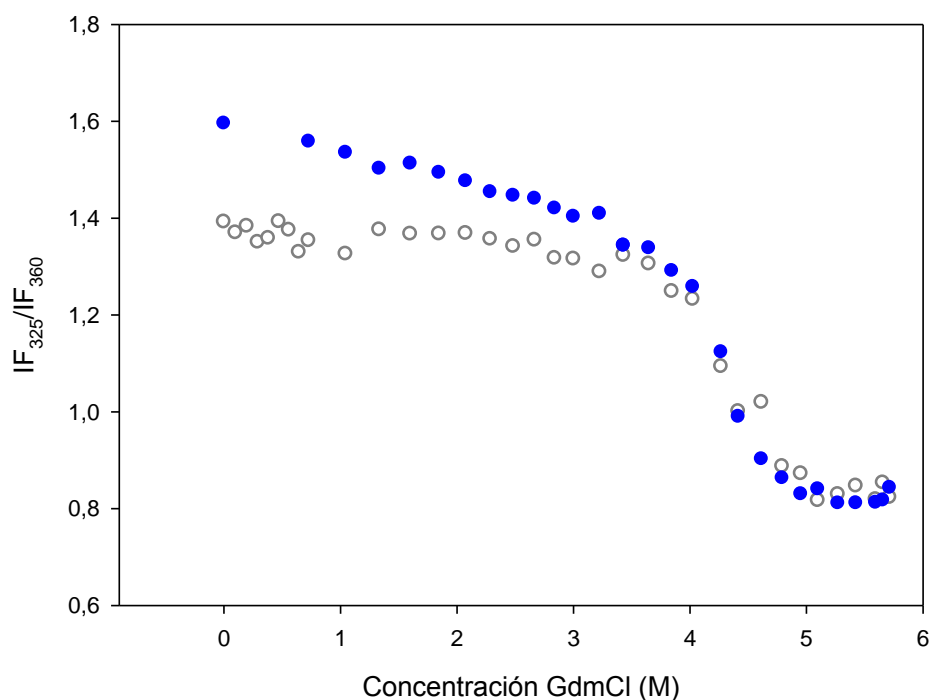


Figura 9 – Curvas de desnaturalización de la titulación con cloruro de guanidinio empleando fluorescencia, se realizó un duplicado. La concentración de C-CbpF fue de 0,002 mg/mL.

Además de la transición principal se observa una pre-transición que varía entre los distintos experimentos que todavía se está investigando. En cualquier caso, la transición principal se reproduce siempre sin ningún problema.

El perfil mediante fluorescencia varía significativamente respecto al obtenido por dicroísmo circular (**Figura 10**), observándose un desplazamiento del punto medio hacia concentraciones menores de cloruro de guanidinio. Esto puede deberse a la formación de oligómeros a concentraciones superiores, para confirmarlo se realizó una segunda titulación empleando la misma concentración de proteína que en los ensayos de dicroísmo circular.

En caso de que la proteína se presentara en estado oligomérico la curva obtenida en este segundo ensayo presentaría un punto medio de cloruro de guanidinio desplazado hacia valores mayores, esto es debido a la mayor concentración de proteína, pues habría mayor oligomerización y por tanto la proteína sería más estable, se desnaturalizaría a mayores concentraciones de cloruro de guanidinio.

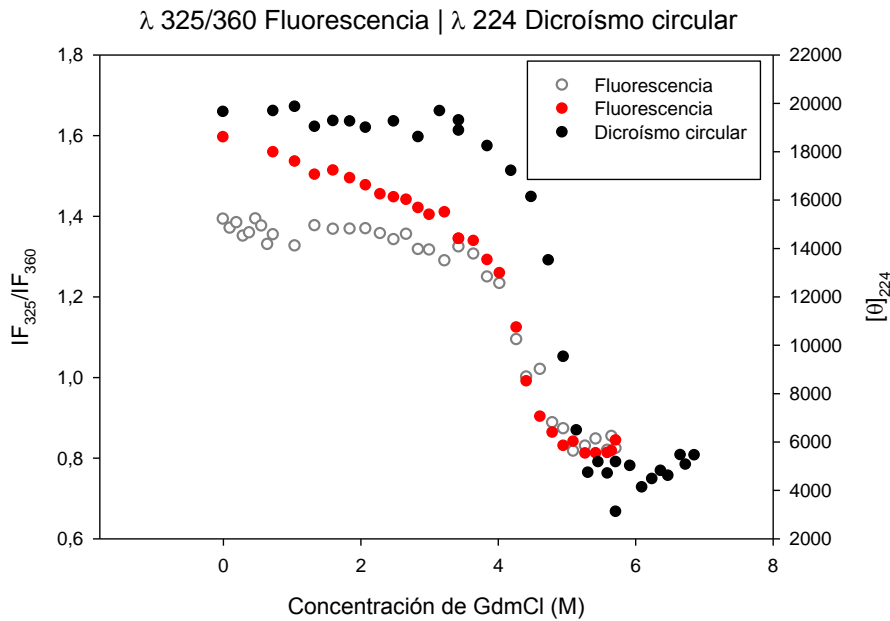


Figura 10 – Comparación de los perfiles de desnaturalización con cloruro de guanidinio obtenidos mediante fluorescencia y mediante dicroísmo circular. Se observa un desplazamiento de la transición. Las concentraciones de C-CbpF para fluorescencia fueron de 0,002 mg/mL y para dicroísmo circular de 0,1 mg/mL, además se mantuvo una concentración 143 mM de colina, 20°C.

Por tanto, se realizó una segunda titulación mediante fluorescencia que se llevó a cabo usando la misma concentración de C-CbpF que en la titulación mediante dicroísmo circular: 0,1 mg/mL.

Los resultados obtenidos en esta titulación a mayor concentración muestran cómo se produce un desplazamiento al comparar con la titulación anterior a menor concentración que parece indicar que la proteína forma oligómeros, para obviar la pre-transición se observa la región a partir de 3,5 M de cloruro de guanidinio (Figura 11).

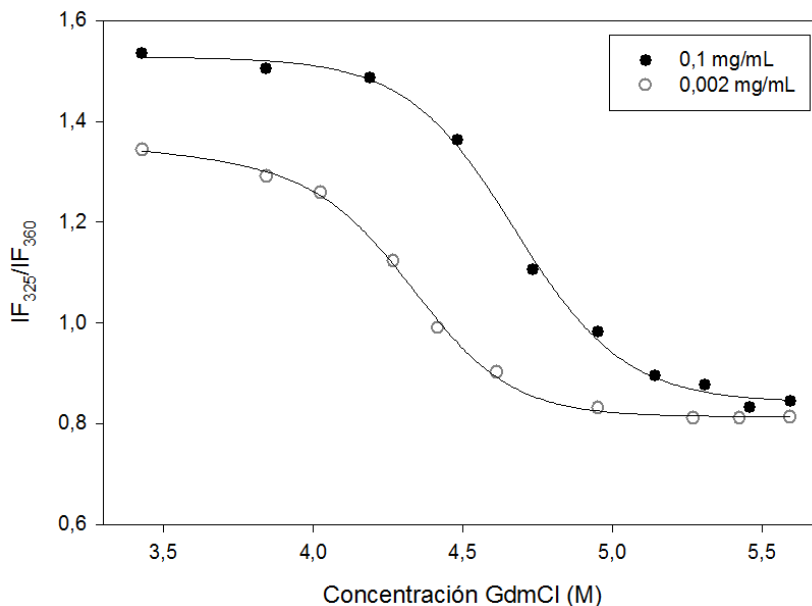


Figura 11 – Comparación de los perfiles de desnaturalización obtenidos mediante fluorescencia a distintas concentraciones ajustados a una curva sigmoidea sin significado físico para la obtención del punto medio. Se observa un desplazamiento en el eje de las X.

Los puntos medios extraídos a partir del ajuste, tanto en los ensayos de fluorescencia como de dicroísmo circular se recogen en la tabla siguiente:

	Concentración (mg/mL)	Punto medio (mg/mL)
Fluorescencia	0,002	4,3 ± 0,03
	0,100	4,7 ± 0,04
Dicroísmo circular	0,100	4,8 ± 0,02

Al superponer las representaciones gráficas del ensayo de fluorescencia y del ensayo de dicroísmo circular la transición entre el estado nativo y el estado intermedio (de estructura residual) se produce a la misma concentración de cloruro de guanidinio en ambos casos (**Figura 12**), esto significa que el desplegamiento ocurre a través de una transición entre dos estados, sin estados intermedios.

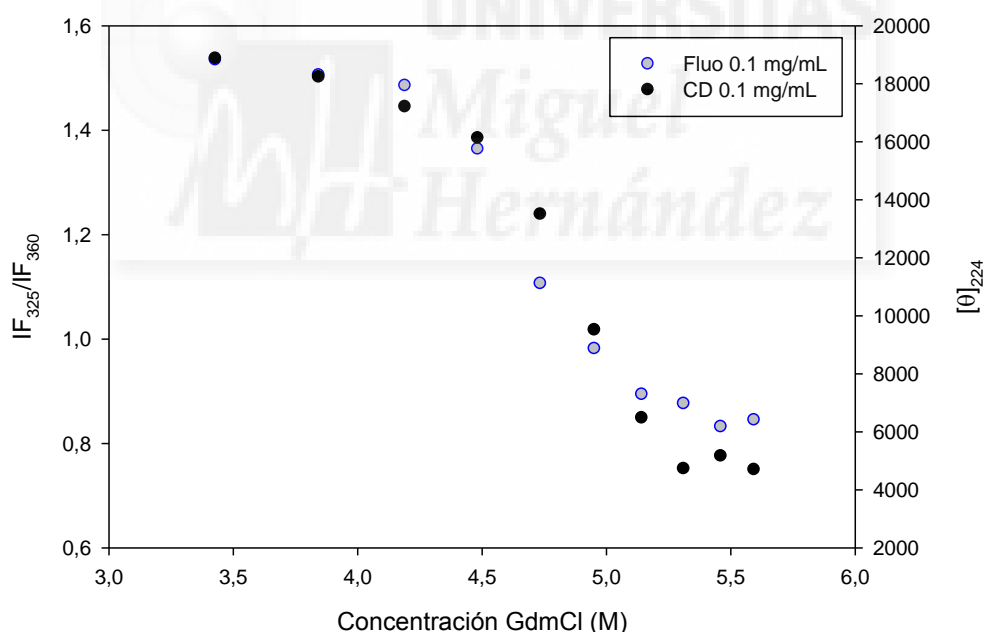


Figura 12 – Comparación de los perfiles de desnaturalización obtenidos mediante fluorescencia y dicroísmo circular para la misma concentración.

En base a los resultados se concluye que la proteína oligomeriza, aunque no es posible saber que oligómero forma y por tanto no es posible calcular su energía libre pues no se puede elegir el modelo físico a usar.

Lo más probable, puesto que en el cristal no aparece como oligómero (Molina y cols., 2009), es que la proteína forme agregados solubles inespecíficos, porque además tiende siempre a la precipitación. La pre-transición antes mencionada, que era tan variable, podría suponer simplemente la separación de las proteínas agregadas, las cuales al añadir el cloruro de guanidinio se estarían solubilizando.

5.2 Cálculo de la estabilidad térmica

El ensayo de desnaturalización térmica ha permitido obtener datos sobre la estabilidad de la proteína. A partir de la representación gráfica y mediante el ajuste de la curva a una sigmoide se calculó la temperatura en el punto medio.

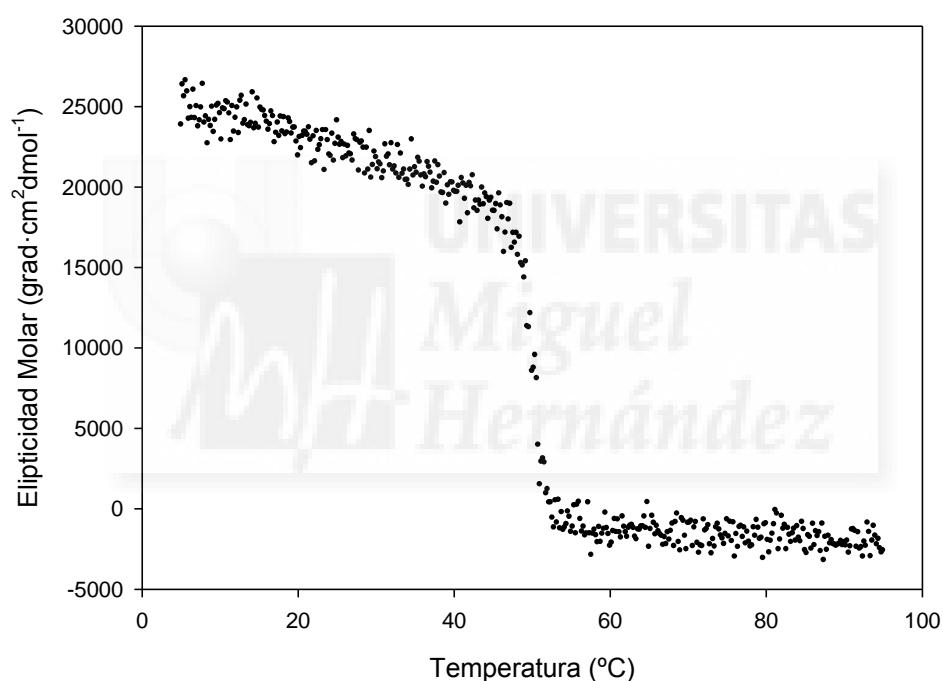


Figura 13 – Curva de desnaturalización térmica de C-CbpF. Obtenida a concentración de C-CbpF 0,1 mg/mL, 143 mM colina.

Se registró un primer espectro a 5°C antes de comenzar el barrido térmico, un segundo espectro completo a 95°C tras la finalización del barrido y un tercer espectro a 5°C tras disminuir la temperatura para conocer si la desnaturalización térmica era reversible para C-CbpF. La **Figura 14** muestra los tres espectros antes mencionados.

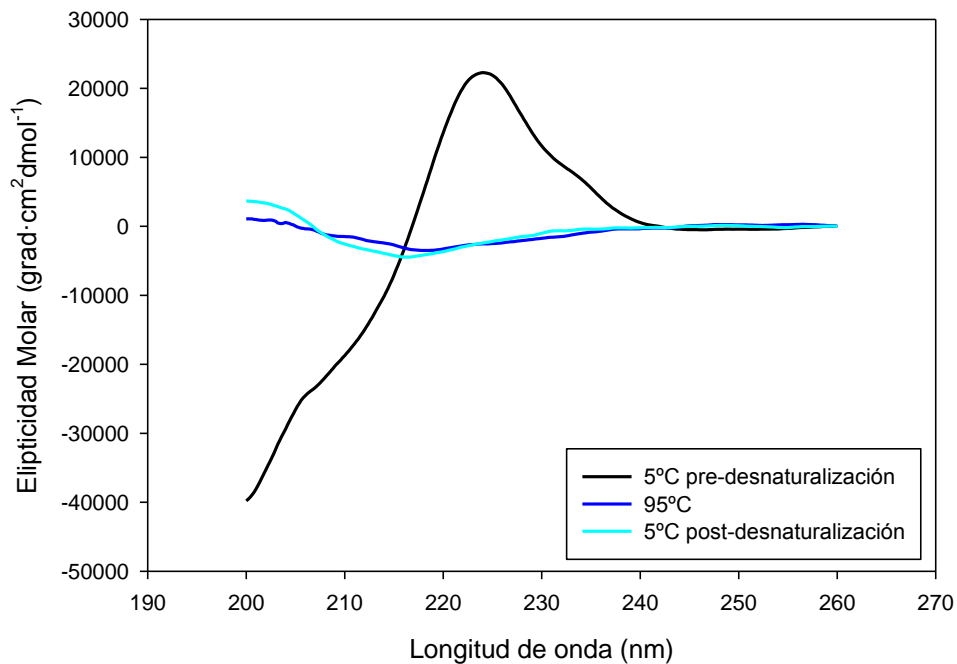


Figura 14 – Espectros de dicroísmo circular de C-CbpF a diferentes temperaturas, antes y después de la desnaturalización. Obtenidos a concentración de C-CbpF 0,1 mg/mL, 143 mM colina.

Tal como muestra la figura, no se produce reversibilidad tras el enfriamiento de la proteína, por tanto no es posible aplicar ecuaciones termodinámicas. El valor de la temperatura en el punto medio sí es posible determinarlo tras el ajuste de la curva, su valor fue de $50,15 \pm 0,05$ °C para una concentración de proteína de 0,1 mg/mL.

En comparación con el módulo C-LytA (Maestro y cols., 2007), la temperatura del punto medio es inferior para C-CbpF, lo cual indica una menor estabilidad térmica. Además, si se compara con otro de los módulos de unión a colina más estudiados, C-CPL1 del bacteriófago Cp-1 que infecta a *S. pneumoniae*, se observa que la temperatura del punto medio de C-CbpF manteniendo una concentración de colina de 143 mM es la misma que la de C-CPL1 con una concentración de colina de 10 mM (Sanz y cols., 1993), lo que indica que C-CbpF es más inestable a pesar de poseer más repeticiones de unión a colina. Esto sería debido a la dimerización tanto de C-LytA como de C-CPL1 cuando están en presencia de colina, el dímero formado se hace muy estable y por ello la temperatura del punto medio es superior en ambos casos a la de C-CbpF.

5.3 Cálculo de la estabilidad frente a pH

Mediante dicroísmo circular y usando diferentes tampones se observó el efecto del pH en el módulo C-CbpF. Los resultados fueron representados y se muestran a continuación (**Figura 15**):

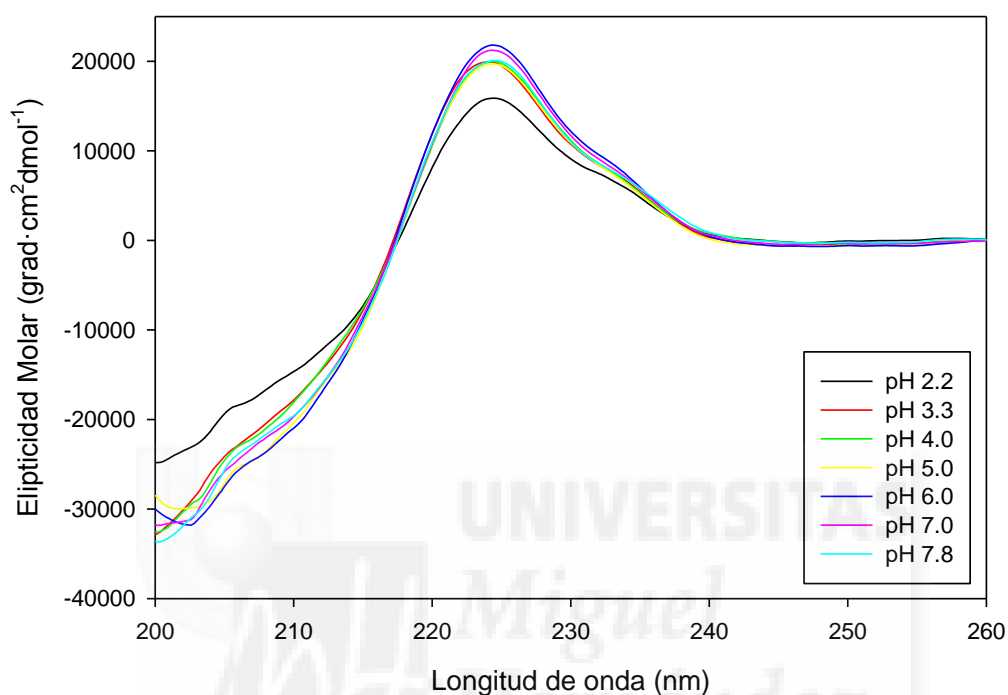


Figura 15 – Representación del efecto del pH en C-CbpF. Concentración de C-CbpF 0,1 mg/mL, 143 mM de colina.

Se observa que los valores de elipticidad molar no varían significativamente entre unas medidas y otras de forma que es posible concluir que la proteína es bastante estable frente a variaciones de pH, si bien se observa una pequeña disminución de elipticidad al pH más ácido probado (2.2).

6. Conclusiones y proyección futura

A continuación se exponen las conclusiones extraídas de los resultados de la caracterización de la estructura y del plegamiento de C-CbpF y se comparan con los resultados de C-LytA, finalmente en cada caso se prevé también la posible proyección futura.

- I. El módulo de unión a colina C-CbpF presenta una estabilidad frente a desnaturalizantes químicos muy similar a la de C-LytA, por tanto a pesar de que C-CbpF contiene más repeticiones de unión a colina que C-LytA esto no parece indicar una mayor estabilidad. Cabe destacar además la estructura residual que queda tras el desplegamiento usando muy altas concentraciones de agente desnaturalizante, no siendo posible la completa desnaturalización de C-CbpF, esto también se daba en C-LytA.

Por otro lado, los ensayos para determinar la posible oligomerización de la proteína concluyen que forma agregados solubles, y éstos serían inespecíficos pues no siguen ningún patrón en su formación. Además se produce una pre-transición muy variable que podría ser debida a la separación de las proteínas agregadas. El ensayo de reversibilidad concluyó que C-CbpF es reversible tras ser sometido a altas concentraciones de desnaturalizante, pero para el cálculo de la energía libre también es necesario conocer con certeza el estado de oligomerización, por lo tanto se requiere la realización de más experimentos en un futuro con este fin.

- II. El ensayo de estabilidad térmica concluye que la C-CbpF no es reversible térmicamente y por tanto las ecuaciones para calcular datos termodinámicos no son aplicables. El valor de la temperatura en el punto medio es menor en comparación con el de C-LytA, así pues la estabilidad a nivel térmico de C-CbpF es menor que la de C-LytA, aunque C-CbpF contenga más cantidad de repeticiones de unión a colina y puede afirmarse entonces que una mayor cantidad de repeticiones de unión a colina no implica una mayor estabilidad.

Los experimentos fueron realizados siempre a una concentración de colina de 143 mM pues a concentraciones menores se producía la precipitación la proteína. Es interesante el desarrollo de más experimentos para evaluar el papel de la colina en la estabilidad

de C-CbpF, para ello pueden realizarse ensayos a diferentes concentraciones de colina, aunque siempre dentro del rango en el que se impide la precipitación de la proteína.

- III. El estado oligomérico de la proteína es un factor a tener en cuenta pues proteínas como C-LytA y C-CPL1 que dimerizan en presencia de colina son más estables térmicamente que C-CbpF, la cual no oligomeriza aunque sí forma agregados estables, a pesar de ser ésta mantenida a una concentración de colina superior y de contar con un número mayor de repeticiones de unión a colina. Se confirma por tanto que la dimerización hace más estable a las proteínas.

- IV. Las variaciones en el pH no producen la desnaturalización de ésta, para el rango de pH estudiado no se producen cambios significativos en la estructura de la proteína. Es posible concluir que C-CbpF es estable ante cambios en el pH del medio.

En un futuro sería interesante la realización de un ensayo empleando pH más extremos, muy ácidos y muy básicos, para obtener más información acerca de la estabilidad de C-CbpF frente a variaciones en el pH.

7. Bibliografía

1. Gamez, G. & Hammerschmidt, S. (2012). Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development. *Curr Drug Targets*, **13**, 323-337.
2. Fauci, A.S. & Morens D.M. (2012). The perpetual challenge of infectious diseases. *New N Engl J Med*, **366**, 454-61.
3. McCullers, J.A. & Tuomanen, E.I. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci*, **6**, 877-89.
4. Feldman, C. & Anderson, R. (2014). Recent advances in our understanding of *Streptococcus pneumoniae* infection. *F1000Prime Rep*, **6**, 82.
5. Örtqvist, Å., Hedlund, J. & Kalin, Mats. (2005). *Streptococcus Pneumoniae*: Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Features. *Semin Respir Crit Care Med*, **26**, 563-574.
6. Ludwig, E., Bonanni, P., Rohde, G., Sayiner, A. & Torres, A. (2012). The remaining challenges of pneumococcal disease in adults. *Eur Respir Rev*, **21**, 57-65.
7. Maestro, B. & Sanz, J. M. (2007). Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, **2**, 188-196.
8. 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.
9. Hammerschmidt, S. (2006). Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 12-20.
10. Vollmer, W. (2007). Structure and biosynthesis of the pneumococcal cell wall. *Molecular Biology of Streptococci* (Hakenbeck R & Chhatwal GS, eds), 83–117. Horizon Press, Wymondham, Norfolk UK.
11. López, R. & García, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 553-580.
12. Hermoso, J. A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J. L. & Menéndez, M. (2003). Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure*, **11**, 1239-1249.
13. Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D. & Brückner, R. (2009). Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev*, **33**, 572-86.

14. Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G. & Romero, A. (2001). A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Mol Biol*, **8**, 1020-1024.
15. Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L. & García, E. (1990). Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene*, **89**, 69-75.
16. Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M., Moscoso, M., Campuzano, S., Campillo, N.E., Mobashery, S., García, J.L., García, P. & Hermoso, J.A. (2009). Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep*, **10**, 246-51.
17. Hernández-Rocamora, V. M., Maestro, B., Mollá-Morales, A. & Sanz, J. M. (2008). Rational stabilization of the C-LytA affinity tag by protein engineering. *Protein Eng Des Sel*, **21**, 709-720.
18. Maestro, B. & Sanz, J.M. (2005). Accumulation of partly folded states in the equilibrium unfolding of the pneumococcal choline-binding module C-LytA. *Biochem J*, **387**, 479-488.
19. 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 J*, **274**, 364-76.
20. Sanz, J.M., García, J.L., Laynez, J., Usobiaga, P. & Menendez, M. (1993). Thermal stability and cooperative domains of CPL1 lysozyme and its NH₂- and COOH-terminal modules. *J Biol Chem*, **268**, 6125-6130.