

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Caracterización estructural y funcional de la glucosaminidasa LytB de
*Streptococcus pneumoniae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Palma Rico Lastres

Directora
Margarita Menéndez Fernández

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Caracterización estructural y funcional de la
glucosaminidasa LytB de *Streptococcus pneumoniae***

TESIS DOCTORAL

Palma Rico Lastres

Madrid, 2015

Instituto de Química-Física Rocasolano
Departamento de Química Física Biológica
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**Caracterización estructural y funcional de la glucosaminidasa
LytB de *Streptococcus pneumoniae***

Tesis doctoral presentada por Palma Rico Lastres para optar al
grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directora: Dra. Margarita Menéndez Fernández

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto de Química-Física Rocasolano

Madrid, 2015

ABREVIATURAS

AATGal, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactosa.
Amp, ampicilina.
Amp^r, resistencia a ampicilina.
BSA, albúmina de suero bovino.
CBM, módulo de unión a colina o *choline binding module*.
CBPs, proteínas de unión a colina o *choline binding proteins*.
CBRs, repeticiones de unión a colina o *choline-binding repeats*.
CM, módulo catalítico o *catalytic module*.
C_p, capacidad calorífica.
cpm, cuentas por minuto.
C-t, extremo C-terminal.
DC, dicroísmo circular.
DEAE-celulosa, dietilaminoetanol-celulosa.
ΔH_T, entalpía calorimétrica de desnaturalización.
DNA, ácido desoxirribonucleico.
dNTPs, desoxinucleótidos trifosfato.
DO, densidad óptica.
DSC, calorimetría diferencial de barrido o *differential scanning calorimetry*.
ε₂₈₀, coeficiente de extinción molar a 280 nm.
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético.
ESI-MS/MS, espectrometría de masas en tándem con ionización por electroespray o *electrospray ionization-tandem mass spectrometry*.
FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*.
GalNAc, N-acetilgalactosamina.
GEWL, lisozima de huevo de ganso.
Glc, glucosa.
GlcNAc, N-acetilglucosamina.
GMDP, GlcNAc-MurNAc(-L-Ala-γ-D-Gln)
GMPP, GlcNAc-MurNAc(-OCH₃)(-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)
(GM)₂, GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc(OCH₃)
G-P-colina, glicerofosforilcolina.
HEWL, lisozima de huevo de gallina.
HF, ácido fluorhídrico.
HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*.
IPTG, isopropil-β-D-tiogalactósido.
ITC, calorimetría de valoración isoterma o *isothermal titration calorimetry*.
LB, medio lisogénico.
LC/MS y LC/MS/MS, espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos.
LTAs, ácidos lipoteicoicos (unidos a la membrana celular) o *lipoteichoic acids*.

LytB_{CAT}, región de que engloba toda la secuencia excepto el CBM.

LytB_{CBM}, módulo CBM de LytB.

LytB_{SH3b}, módulo SH3b de LytB.

LytB_{WW}, módulo de tipo WW de LytB.

MALDI-TOF, espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización y desorción por láser asistida por matriz o *matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*.

MurNAc, ácido N-acetilmurámico.

m/z, relación masa carga.

N-t, Extremo N-terminal.

P-col, fosforilcolina.

PCR, reacción en cadena de la DNA polimerasa o *polymerase chain reaction*.

PDB, *protein data bank*.

Pen, penicilina.

PG, peptidoglicano.

Pi, fosfato sódico 20 mM.

p/v, relación peso/volumen.

s, coeficiente de sedimentación.

SDS, dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

T4L, lisozima del fago T4.

TEMED, N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina.

T_m, temperatura de fusión de los oligonucleótidos o *melting temperature*.

T_m, temperatura del máximo de la función Cp.

TFA, ácido trifluoroacético.

U, unidad(es) de actividad enzimática.

u.a., unidades arbitrarias.

UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*.

v/v, relación volumen/volumen.

UV, ultravioleta visible.

WTAs, ácidos teicoicos unidos a la pared celular o *wall teichoic acids*.

ÍNDICE

RESUMEN-SUMMARY	i-vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>. Aspectos históricos	1
1.2. Importancia clínica de neumococo: prevención y tratamiento	1
1.3. Características morfológicas y estructurales de la bacteria	3
1.3.1. La cápsula	4
1.3.2. La pared celular	5
<u>1.3.2.1. El peptidoglicano</u>	6
<u>1.3.2.2. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos</u>	10
<u>1.3.2.3. La fosforilcolina</u>	14
1.4. Proteínas de unión a colina	16
1.5. Hidrolasas de la pared celular de neumococo	20
1.6. LytB	23
1.7. Familia GH73 de las glicosil hidrolasas	25
1.7.1. Estructuras conocidas de la familia GH73	26
1.7.2. Mecanismo catalítico	27
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	34
3.2. Plásmidos y oligonucleótidos	35
3.3. Técnicas de DNA	35
3.3.1. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	35
3.3.2. Transformación de células de <i>E. coli</i>	35
3.3.3. Aislamiento de DNA plasmídico	37
3.3.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	37
3.3.5. Protocolo de purificación de oligonucleótidos	38
3.3.6. Construcción de mutantes de LytB	38
<u>3.3.6.1. Construcción de los mutantes E585A y D618A</u>	38
<u>3.3.6.2. Construcción de los mutantes D596A, D607A, D619A, D621A, E633A, D637A, E653A, D657A, E662A y E673A</u>	41
3.4. Expresión y purificación de LytB	43

3.5. Técnicas de análisis de proteínas	44
3.5.1. Determinación de la concentración de proteína	44
3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	44
3.5.3. Cromatografía analítica de exclusión molecular	45
3.5.4. Espectrometría de masas	45
3.5.5. Ultracentrifugación analítica	45
3.5.6. Dicroísmo circular (DC)	46
<u>3.5.6.1. Recogida de espectros</u>	46
<u>3.5.6.2. Experimentos de desnaturalización térmica</u>	46
3.5.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	47
3.5.8. Calorimetría de valoración isoterma (ITC)	48
3.6. Ensayos de actividad enzimática	48
3.6.1. Aislamiento y purificación de paredes celulares	48
3.6.2. Aislamiento y purificación del PG	49
3.6.3. Caracterización de los productos de hidrólisis de la pared celular	50
<u>3.6.3.1. Reducción de los muropéptidos</u>	50
<u>3.6.3.2. Separación e identificación de los muropéptidos por HPLC y</u> <u>espectrometría de masas</u>	50
3.6.4. Actividad sobre análogos estructurales del PG	51
3.6.5. Actividad dispersora sobre cadenas de neumococo	52
3.6.6. Ensayo sobre paredes marcadas radiactivamente	52
3.7. Modelización del módulo GH73 de LytB	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Purificación y caracterización de LytB	54
4.2. Estabilidad térmica, organización modular y reconocimiento de ligandos	57
4.2.1. Estudio de la estabilidad térmica de LytB	58
4.2.2. Afinidad de LytB por colina, P-colina y G-P-colina. Influencia del grupo fosfato	64
4.2.3. Búsqueda de posibles ligandos responsables de la localización de LytB ...	65
4.3. Especificidad de sustrato	66
4.3.1. Degradación in vitro de la pared celular: análisis de los productos de reacción	66
4.3.2. Hidrólisis de análogos estructurales del PG	76

4.3.2.1. Actividad quitinasa	76
4.3.2.2. Actividad sobre compuestos miméticos del PG bacteriano	80
4.4. Identificación de los residuos implicados en la catálisis enzimática	82
5. DISCUSIÓN	93
5.1. Estabilidad, organización modular y reconocimiento de ligandos	93
5.2. Identificación de los residuos catalíticos	95
5.3. Selectividad de sustrato	96
5.4. Similitudes y diferencias con otras glucosaminidasas de la familia GH73	98
5.5. Factores que determinan la actividad de LytB <i>in vivo</i>	99
6. CONCLUSIONES	101
7. BIBLIOGRAFÍA	103

I. RESUMEN-SUMMARY

RESUMEN

LytB, una enzima codificada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, es una murein hidrolasa no lítica, localizada en los polos de la célula, responsable de la separación de las células hijas durante el proceso de división celular (García *et al.*, 1999; De Las Rivas *et al.*, 2002). Consta de un módulo de unión a colina (CBM) (LytB_{CBM}), situado en el extremo N-terminal, formado por 18 repeticiones de secuencia dispuestas en tándem que reconocen de forma específica los motivos de fosforilcolina (P-col) presentes en los ácidos teicoicos de la envuelta celular de neumococo y que es esencial para la catálisis. Además contiene un módulo SH3b (LytB_{SH3b}) y uno de tipo WW (LytB_{WW}), ambos importantes para el reconocimiento del sustrato y la adhesión a las células del hospedador (Bai *et al.*, 2014), y un módulo perteneciente a la familia GH73 de las glicosil hidrolasas (LytB_{GH73}) en la región C-terminal, responsable de su actividad catalítica.

A pesar de que LytB es un factor de virulencia implicado en la colonización de la nasofaringe, la evasión de la respuesta inmune (Gosink *et al.*, 2000; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011) y la formación de biofilms (Moscoso *et al.*, 2006), y que por tanto podría considerarse como una diana potencial en el desarrollo de nuevas vacunas o antibióticos, su actividad catalítica o su especificidad por el sustrato no han sido hasta ahora estudiadas. De este modo, el objetivo de esta tesis ha sido la purificación de formas estructuralmente homogéneas de LytB y la caracterización de su estabilidad y de su organización estructural, en presencia y ausencia de posibles ligandos, así como analizar los determinantes estructurales de la especificidad de sustrato de la proteína e identificar los residuos relevantes para la catálisis.

La caracterización de las muestras de LytB purificadas por cromatografía de afinidad y ultracentrifugación analítica puso de manifiesto la coexistencia de monómeros y formas de mayor tamaño molecular que se separaron por cromatografía de exclusión molecular y, mediante ensayos de dispersión de células de neumococo de la cepa R6B (en la que el gen *lytB* está inactivado y por tanto crece formando largas cadenas de células), se verificó que ambas formas eran funcionales.

Los estudios de estabilidad térmica (por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y dicroísmo circular (DC)), pusieron de relieve que la moderada estabilidad de la proteína se veía considerablemente incrementada tras el reconocimiento y la unión de colina por LytB_{CBM} y que este efecto estabilizador era transmitido también al módulo catalítico. Estos resultados, en combinación con la valoración por calorimetría de valoración isoterma (ITC) de la unión de LytB a análogos de colina, permitieron descartar la participación del grupo fosfato y el anillo de galactosa de los residuos de GalNAc-6-fosfato en la estabilización del CBM a la pared celular y cuantificar la

desestabilización que introduce la carga negativa del grupo fosfato. El hecho de que LytB no reconozca como ligandos ninguno de los componentes de los ácidos teicoicos, parece excluir este tipo de estructuras como responsables de la localización celular de la proteína y plantea la posibilidad de que ésta estuviese determinada por el reconociendo del peptidoglicano (PG) o proteínas de superficie de la bacteria.

Por otro lado, el modelado por homología de LytB_{GH73} junto con el alineamiento de secuencias de la familia GH73, permitió identificar el Glu585 como el residuo donador de protones en la reacción de hidrólisis. Con el fin de encontrar el segundo residuo ácido que actuase potencialmente como nucleófilo o base general en la catálisis, todos los aspárticos y glutámicos del módulo LytB_{GH73} localizados en el sitio de unión del sustrato o alrededor del mismo, así como el Glu585, fueron individualmente reemplazados por alanina mediante mutagénesis dirigida. La actividad dispersora de células de todos los mutantes purificados se evaluó sobre cultivos de la cepa R6B. Sólo E585A se mostró inactivo y la longitud de las cadenas de células permaneció invariante, en concordancia con su papel esencial en la catálisis (Bai *et al.*, 2014). El resto de los mutantes, a excepción del D657A, se comportaron como la proteína silvestre. Sin embargo, la adición de D657A al cultivo resultó en una reducción significativa en la velocidad de dispersión. El hecho de que este residuo no sea esencial para la catálisis en otras glicosidasas de la familia GH73, abre la posibilidad de un mecanismo catalítico asistido por el sustrato como ha sido propuesto para las familias GH23, GH103 y GH104 (Reid *et al.*, 2004) o, alternativamente, la no conservación estructural del segundo grupo catalítico (base general/nucleófilo).

El estudio de la especificidad de sustrato de LytB se llevó a cabo analizando, mediante HPLC y espectrometría de masas (ESI-MS/MS o MALDI-TOF), los productos liberados tras la degradación de paredes celulares purificadas de diferentes cepas de neumococo con modificaciones conocidas en su composición (R6, R36A, Pen6, Pen6*adr*, R6B, R36A::*pgdA* y CS1). Curiosamente no se detectó ninguna especie *N*-desacetilada entre los productos liberados por la enzima, que mostró preferencia por muropéptidos con bajo grado de entrecruzamiento (monómeros) y posibles cadenas glicánicas sin sustituir, mientras que era menos activa sobre sitios con puentes peptídicos. Los resultados confirmaron así mismo que LytB es, efectivamente, una *N*-acetilglucosaminidasa. Además, la degradación *in vitro* de paredes celulares marcadas radiactivamente con [metil-³H]colina mostró que la liberación previa de los segmentos peptídicos a través de la acción de la amidasa LytA, aumentaba la actividad específica de LytB en unas 4 veces (de 600 ± 60 U/mg a 2500 ± 600 U/mg), indicando que la eliminación de los péptidos o el aumento del tamaño de los poros de la pared celular facilita la acción de LytB.

El estudio del mecanismo de reacción se llevó a cabo analizando la capacidad de LytB para hidrolizar pequeños compuestos relacionados con los componentes de PG. En

primer lugar los oligómeros de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc)₄ y (GlcNAc)₅ debido a la relación estructural entre LytB y las quitinasas y lisozimas que presentan actividad quitino-hidrolítica (Charlemagne y Jollès, 1972). LytB cortó ambos oligosacáridos pero los productos se detectaron tras varias horas de incubación, indicando que la formación de un complejo productivo requiere de una reorganización lenta de la proteína libre o del complejo no productivo previamente formado (Hirakawa *et al.*, 2008). A continuación, la reacción avanza relativamente rápido y todos los posibles productos de degradación fueron identificados mediante HPLC y MALDI-TOF. Se observaron nuevos picos que eluían a tiempos de retención superiores a los del sustrato inicial y sus masas moleculares eran compatibles con la incorporación de una o dos unidades de GlcNAc al sustrato inicial, sugiriendo que LytB también actúa como una glicosil transferasa, actividad sólo observada en enzimas que actúan con retención de la configuración (Fukamizo, 2000). La hidrólisis de pequeños muropéptidos se llevó a cabo utilizando como sustratos GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-γ-Gln (GMDP), GlcNAc-MurNAc(OCH₃)-L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (GMPP) y GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc(OCH₃) (GM)₂. El análisis de las mezclas de reacción (HPLC y MALDI-TOF o LC/MS y LC/MS/MS) reveló que sólo (GM)₂ es reconocido como sustrato, obteniéndose como productos GlcNAc-MurNAc-GlcNAc y MurNAc(OCH₃) exclusivamente. Además se corroboró que LytB es una glucosaminidasa.

SUMMARY

LytB, encoded by *Streptococcus pneumoniae*, is a non-lytic murein hydrolase, located at the cell poles, and responsible for daughter cell separation during division (García *et al.*, 1999; De Las Rivas *et al.*, 2002). It comprises an N-terminal choline-binding module (CBM) (LytB_{CBM}) made of 18 tandemly-arranged repeats that specifically recognize the phosphocholine (P-col) moieties present in pneumococcal teichoic acids that is essential for catalysis. Besides it contains an SH3b module (LytB_{SH3b}) and a WW-like domain (LytB_{WW}), both relevant for substrate recognition and LytB-mediated host-cell adhesion (Bai *et al.*, 2014), and a C-terminal module (LytB_{GH73}) belonging to the GH73 family of glycoside hydrolases, responsible for its glucosaminidase activity.

LytB is a virulence factor involved in nasopharyngeal colonization, evasion of host immunity (Gosink *et al.*, 2000; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011) and biofilm formation (Moscoso *et al.*, 2006), therefore, LytB is a putative vaccine/drug target. But none of its catalytic activity neither its substrate specificity have been studied yet. So the aim of this thesis is the purification of structurally homogeneous forms of LytB in order to characterize its stability and structural organization in presence and absence of possible ligands, to analyze the structural determinants of LytB substrate specificity, and to identify the relevant residues for the catalysis.

Purified samples characterization by using affinity chromatography and analytic ultracentrifugation, showed the coexistence of monomeric and multimeric forms of the protein. These forms were purified by size exclusion chromatography and revealed both active in cell-dispersing activity analysis using cultures of R6B (a LytB-deficient strain that forms long chains of cells).

Thermic stability studies (differential scanning calorimetry (DSC) and circular dichroism (DC)) showed that the moderate stability of free LytB drastically increases upon choline recognition by the CBM module and interestingly this stabilization effect is transmitted to the catalytic module. These results in combination with the analysis of LytB interaction with choline analogs by using isothermal titration calorimetry (ITC), allowed us to discard the participation of the phosphate group and the galactose ring from GalNAc-6-phosphate residues in the cell wall-CBM union, and the quantification introduced by the negative charge of the phosphate group. Besides, LytB doesn't recognize any of the teichoic acids components, so the polar localization of the enzymes may be due to the peptidoglycan (PG) recognition or surface proteins of the bacteria.

In the other hand, homology model of LytB_{GH73} and GH73 family sequence alignment, showed Glu585 residue as the catalytic proton-donor. To identify the acidic residue potentially acting either as a nucleophile or a general base during catalysis, all

aspartic and glutamic acids of LytB_{GH73} located in the substrate-binding groove or within its vicinity together with Glu585 were individually replaced by alanine using site-directed mutagenesis. The purified mutants were examined for cell-dispersing activity using cultures of R6B. Only the E585A mutant was inactive and cell-chain length remained invariant, in agreement with its essential role in catalysis in the wild-type enzyme (Bai *et al.*, 2014). All the other mutants, except D657A, behaved like the wild-type protein. Addition of the D657A mutant resulted in a significant reduction of the chain dispersion rate. The fact that Asp657 is not essential for catalysis in other GH73 family glycosidases indicate the absence of conservation of the nucleophile/base catalyst in the family or, alternatively, the existence of a substrate-assisted mechanism, as has been proposed for the GH23, GH103 and GH104 families (Reid *et al.*, 2004).

LytB substrate specificity was investigated by analyzing the products released by digestion of purified cell walls from pneumococcal strains (R36A, R36A::pgdA, R6B, Pen6, Pen6*adr* and CS1), by using HPLC and mass spectrometry (ESI-MS/MS or MALDI-TOF). Interestingly *N*-deacetylated species were not detected in the LytB products, and the protein showed a preference for uncross-linked muropeptides (monomers), and putative non-substituted glycan chains, being less active at sites with peptide cross-links. The results also confirmed that LytB is an *N*-acetylglucosaminidase. Moreover, *in vitro* degradation of cell walls labelled with [methyl-³H]choline showed that prior cleavage of peptide stems by the LytA amidase increased the specific activity of LytB by around 4-fold (from 600 ± 60 U/mg to 2,500 ± 600 U/mg), indicating that removal of the stem peptides, or the resulting increase in size of the cell wall pores, facilitated the catalytic action of LytB.

To study the reaction mechanism we tested the capacity of LytB to cleave small compounds surrogates of PG components. First, the *N*-acetylglucosamine oligomers (GlcNAc)₄ and (GlcNAc)₅ because of LytB structural relationship with chitinases and lysozymes with chitin hydrolase activity (Charlemagne y Jollès, 1972). LytB cleaved both oligosaccharides but products were only detected after several hours of incubation, indicating that productive-complex formation required a slow rearrangement of either the free protein or previously formed non-productive complexes (Hirakawa *et al.*, 2008). Subsequently, the reaction advanced relatively rapidly and all possible degradation products were identified using HPLC and MALDI-TOF. Several new peaks eluting after that of the initial substrate were observed in the presence of LytB, their molecular masses being compatible with the incorporation of one or two GlcNAc units to the initial substrate. These results suggest that LytB can also catalyze the glycosyltransfer reaction. This activity has only been observed in retaining enzymes (Fukamizo, 2000). The cleavage of small muropeptides was also tested using GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-γ-Gln (GMDP), GlcNAc-MurNAc(OCH₃)-L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (GMPP) and GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc(OCH₃) (GM)₂ as substrates. The analysis

of the reaction mixtures (HPLC and MALDI-TOF or LC/MS and LC/MS/MS) revealed that only (GM)₂ is recognized as substrate by LytB, yielding GlcNAc-MurNAc-GlcNAc and MurNAc(OCH₃) as the sole reaction products. These results indicated that cleavage correspond to an glucosaminidase reaction.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

Bai XH, Chen HJ, Jiang YL, Wen Z, Huang Y, Cheng W, Li Q, Qi L, Zhang JR, Chen Y, Zhou CZ. Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J. Biol. Chem.*, 289, 23403-23416, 2014.

Charlemagne D y Jollès P. The action of various lysozymes on chitopentaose. *FEBS LETTERS*, 23(2): 275-278, 1972.

De Las Rivas B, García JL, López R, García P. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.*, 184: 4988-5000, 2002.

Fukamizo T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 1: 105-124, 2000.

García P, González MP, García E, López R, García JL. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* 31: 1275-1277, 1999.

Gosink K, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 68(10): 5690-5695, 2000.

Hirakawa H, Ochi A, Kawahara Y, Kawamura S, Torikata T, Kuhara S. Catalytic reaction mechanism of goose egg-white lysozyme by molecular modelling of enzyme-substrate complex. *J. Biochem.*, 144(6): 753-761, 2008.

Moscoso M, García E, López R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.*, 188(22): 7785-7795, 2006.

Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 6(8): e23626, 2011.

Reid CW, Blackburn NT, Legaree BA, Auzanneau FI, Clarke AJ. Inhibition of membrane-bound lytic transglycosylase B by NAG-thiazoline. *FEBS Lett.*, 574: 73-79, 2004.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Streptococcus pneumoniae*. Aspectos históricos

Streptococcus pneumoniae, o neumococo, es uno de los microorganismos más estudiados desde que fue aislado por primera vez en 1881, cuando George M. Sternberg en Estados Unidos y Louis Pasteur en Francia describieron, de manera independiente, una bacteria presente en la saliva humana, que tenía forma lanceolada y crecía formando diplococos. La bacteria ya había sido identificada con anterioridad pero sólo Sternberg y Pasteur demostraron su potencial patogénico en animales y la llamaron *Micrococcus pasteurii* y *Microbe septicémique du salive*, respectivamente (Watson *et al.*, 1993). Tras ser descrita como *Micrococcus pneumoniae*, *Pneumococcus* o *Diplococcus pneumoniae*, se le dió el nombre de *Streptococcus pneumoniae*, utilizado por primera vez en “*A Manual of Determinative Bacteriology*” (Chester, 1901), y finalmente aprobado en 1980 (Skerman *et al.*, 1980).

Neumococo ha desempeñado un papel fundamental en el inicio de la biología molecular. En el año 1928, Griffith obtuvo la primera evidencia de transformación genética bacteriana trabajando con neumococo. El investigador demostró que al inyectar en ratón bacterias capsuladas muertas por calor, junto con células no capsuladas vivas (carentes de virulencia por sí mismas), se producía la muerte de algunos de los animales y que las bacterias recuperadas de éstos eran del tipo capsulado (Griffith, 1928). La sustancia responsable de este cambio recibió el nombre de “principio transformante” y fue posteriormente identificada a nivel molecular por Oswald T. Avery y sus colaboradores del Instituto Rockefeller de Nueva York, en una serie de estudios llevados a cabo en los años 30 que culminaron en 1944 con la propuesta de que la molécula responsable de la transformación y de la herencia genética era el DNA (Avery *et al.*, 1944; McCarty y Avery, 1946).

1.2. Importancia clínica de neumococo: prevención y tratamiento

S. pneumoniae es, con pocas excepciones, un patógeno exclusivamente humano y puede formar parte de la microbiota del tracto respiratorio superior (Bogaert *et al.*, 2004). Aunque la colonización es asintomática (estado de portador), si la bacteria accede a regiones normalmente estériles de las vías aéreas, puede diseminarse, colonizar e invadir el oído medio (produciendo otitis media), los pulmones (neumonía), el sistema nervioso central (meningitis) o el torrente sanguíneo (septicemia). El desencadenamiento de una enfermedad invasiva está influenciado tanto por factores

bacterianos, como el tipo capsular (serotipo), como por características del propio hospedador como la edad, el estado inmunológico o la existencia de infecciones previas del sistema respiratorio (Weinberger *et al.*, 2010). Las poblaciones más afectadas son los niños menores de 5 años, los ancianos (mayores de 65 años) y los pacientes inmunodeprimidos, en los que los procesos invasivos cursan con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad. Se estima así que el número de casos graves de enfermedad neumocócica en niños menores de cinco años es de 14,5 millones al año, ocasionando entre 700.000 y 1.000.000 de fallecimientos anuales en todo el mundo (O'Brien *et al.*, 2009). Además, la tasa de mortalidad por neumonía neumocócica, la forma más común de neumonía adquirida en la comunidad, varía entre el 6,4% en pacientes hospitalizados o en tratamiento ambulatorio y el 40% para los tratados en unidades de cuidados intensivos (Lode, 2009) y, según la organización mundial de la salud, alrededor de 1,2 millones de niños menores de 5 años mueren cada año a causa de la neumonía (<http://www.who.int/wer/2013/wer8811/en/>).

Históricamente, el tratamiento más habitual de la enfermedad neumocócica se ha basado en la utilización de la penicilina, antibiótico perteneciente al grupo de los β -lactámicos, debido a la susceptibilidad de la bacteria frente al mismo. Sin embargo, la aparición de resistencias frente a penicilina, cefalosporinas, macrólidos e incluso quinolonas, cuyo patrón varía considerablemente entre países y evoluciona con el tiempo — en España en concreto es muy elevada (Alfayate-Miguélez *et al.*, 2014) — marcó la necesidad de buscar una vacuna eficaz frente al microorganismo. El desarrollo de las primeras vacunas se basó en el hecho de que los anticuerpos generados por el hospedador frente al serotipo capsular de la bacteria protegían de una infección posterior causada por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentasen alguna reacción cruzada con aquél (Welch *et al.*, 1939; Heidelberger, 1983). Teniendo en cuenta que algunos serotipos tienen mayor incidencia que otros, durante el desarrollo de las vacunas compuestas por combinación de polisacáridos capsulares (CPSs), se han considerado los más frecuentes. La vacuna 23-valente (PPSV23) contiene una mezcla de los 23 CPSs de los serotipos responsables de la mayoría de las infecciones neumocócicas, pero los CPSs activan únicamente los linfocitos B, por lo que inducen una respuesta inmune independiente de linfocitos T, es decir, no generan memoria inmunológica (Plezt *et al.*, 2008; Pitsiou *et al.*, 2011). Para aumentar la inmunogenicidad de los polisacáridos, se desarrolló en 2001 la vacuna conjugada 7-valente (PCV7), en la que se conjugaron los CPSs de los serotipos responsables de la mayoría de los casos de enfermedad neumocócica infantil invasiva en EE. UU., con un componente proteico (toxoides diftérico) capaz de estimular la respuesta mediada por linfocitos T y generar así memoria inmunológica (American Academy of Pediatrics, 2000). En la actualidad se está administrando, tanto a la población infantil como a la adulta, la vacuna conjugada 13-valente (PCV13) (Paradiso, 2011 y 2012). Sin embargo,

el número limitado de serotipos frente a los que protegen las vacunas conjugadas, junto con el elevado coste de cada dosis y el fenómeno de “reemplazo de serotipo” por otros no presentes en las mismas (Weinberger *et al.*, 2011), hace necesaria la búsqueda de tratamientos y métodos preventivos alternativos. Uno de ellos se fundamenta en el desarrollo de vacunas basadas en proteínas de neumococo que contribuyen a la patogenicidad de la bacteria y que son comunes a todos los serotipos (Ogunniyi *et al.*, 2007; Lebon *et al.*, 2011).

1.3. Características morfológicas y estructurales de la bacteria

S. pneumoniae es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, inmóvil, con forma ovalada, que mide de 1,2 a 1,8 μm de longitud y de 0,5 a 1 μm de diámetro. La bacteria, incluida en la clase de los cocos y clasificada como “ovococo”, se divide en sucesivos planos paralelos, perpendiculares a su eje mayor, y crece como células aisladas o formando diplococos o pequeñas cadenas, dependiendo del grado de separación (Zapun *et al.*, 2008) (Figura 1.1).

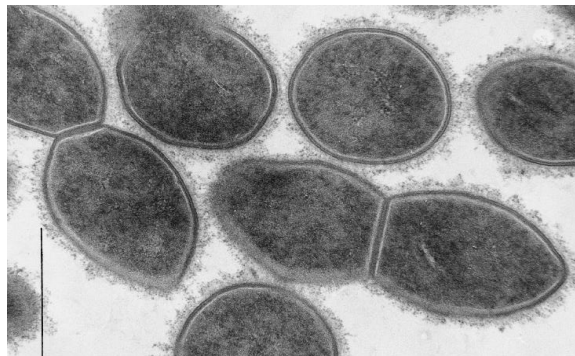


Figura 1.1. Micrografía electrónica de una sección longitudinal de diplococos de *S. pneumoniae* (cepa R6) en división (Alonso De Velasco *et al.*, 1995).

Al igual que todas las bacterias Gram-positivas, la superficie celular de *S. pneumoniae* está formada por una pared celular que contiene varias capas de peptidoglicano (PG), también conocido como mureína, a las que se unen los ácidos teicoicos (WTAs), y la membrana plasmática en la que se anclan los ácidos lipoteicoicos (LTAs). Rodeando y protegiendo la membrana y la pared bacteriana se encuentra la cápsula polisacáridica, que dificulta el reconocimiento de la bacteria por el sistema inmune del hospedador.

1.3.1. La cápsula

La superficie externa de la bacteria está cubierta por una cápsula polisacáridica (Figura 1.2) constituida por cadenas de polisacáridos complejos (Hyams *et al.*, 2010) que, en la mayoría de las estirpes estudiadas, están unidas covalentemente a los residuos de *N*-acetilmurámico del peptidoglicano a través de enlaces fosfodiéster, o a componentes de la membrana, aunque en otros casos pueden liberarse de la célula (Eberhardt *et al.*, 2012; Yother, 2011). En 1925 Avery y colaboradores clasificaron neumococo en tres tipos (I, II y III) basándose en las diferencias químicas de una sustancia soluble y de naturaleza polisacáridica que rodeaba la bacteria del neumococo (Avery y Morgan, 1925). Actualmente esas diferencias estructurales y químicas de las unidades monosacáridicas que forman el CPS y las diferencias en el tamaño de las ramificaciones han permitido clasificar *S. pneumoniae* en 95 serotipos inmunológicamente diferentes, 90 de los cuales estaban ya descritos en 1995 (Henrichsen, 1995).

La presencia de una cápsula polisacáridica es una característica muy común entre patógenos, en particular de aquéllos que producen infecciones invasivas. En neumococo, todos los aislados clínicos que causan enfermedad invasiva están capsulados y la pérdida de esta estructura, ya sea por una mutación genética o por degradación enzimática, reduce enormemente la virulencia de la bacteria en modelos animales (Hyams *et al.*, 2010). Además, distintos serotipos capsulares poseen diferentes capacidades para producir la enfermedad invasiva y el intercambio del serotipo capsular entre cepas afecta a la virulencia en modelos animales (Hyams *et al.*, 2010). Por todo ello la cápsula polisacáridica está considerada, en neumococo, como el factor de virulencia más importante, ya que protege a la bacteria de la fagocitosis y puede inhibir la actividad del complemento (Hardy *et al.*, 2001; Hyams *et al.*, 2010).

La capacidad que tiene la bacteria de regular los niveles de expresión de la cápsula es importante también para su supervivencia en los diferentes ambientes que habita en el hospedador, y una máxima expresión de la misma es esencial para la virulencia sistémica debido a sus propiedades antifagocíticas (Morona *et al.*, 2004). El desarrollo de la enfermedad invasiva siempre va precedido de la colonización asintomática de la nasofaringe y el grosor de la cápsula puede influir sobre el grado de exposición de otras estructuras de la superficie de la bacteria como las adhesinas, que son requeridas durante la fase de colonización inicial (Morona *et al.*, 2004), es decir, la cápsula tiene un papel importante en el proceso de la colonización (Magee y Yother, 2001). Se ha comprobado que cepas con niveles sustancialmente reducidos de cápsula colonizan más eficientemente que sus cepas parentales, lo que indica, bien que la cantidad de cápsula producida *in vitro* no refleja la producida *in vivo*, o bien que no existe ninguna ventaja en producir cantidades mayores de cápsula (Magee y Yother, 2001). De hecho, la reducción en la cantidad de cápsula puede ser necesario para una colonización

eficiente, ya que se permitiría una mayor exposición de moléculas de superficie importantes para la adherencia (Magee y Yother, 2001).

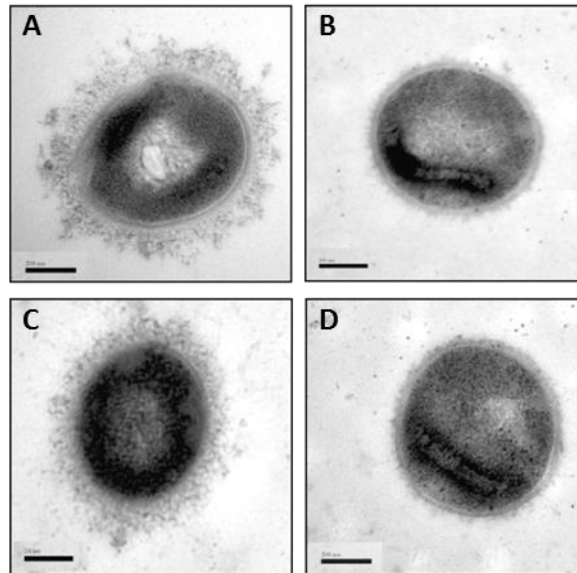


Figura 1.2. Comparación del espesor de la capsula por microscopía electrónica: (A) cepa TIGR4 capsulada y (B) mutante no capsulado; (C) cepa D39 capsulada y (D) no capsulada. Barras 200 nm. Reproducido de Hyams *et al.*, 2010.

1.3.2. La pared celular

Las bacterias han desarrollado una pared celular, a modo de exoesqueleto, como mecanismo de protección frente al medio externo. Esta estructura, que rodea la membrana citoplasmática, proporciona la rigidez necesaria para proteger a la bacteria de la lisis mecánica u osmótica, pero al mismo tiempo tiene la flexibilidad necesaria para la adaptación de la célula a los cambios morfológicos que experimenta durante las fases de crecimiento, división e infección. El mantenimiento de la integridad de la pared celular, cuya estructura está en continua biosíntesis y remodelación, es por tanto esencial para la viabilidad de las bacterias, por lo que, además, la pared celular, es una de las principales dianas en el diseño de antibióticos (Lovering *et al.*, 2012). Además de ser un medio de intercambio de solutos entre el interior y el exterior celular, en bacterias Gram-positivas la pared celular es el punto de anclaje para toda una serie de proteínas implicadas en el crecimiento y la división celular, así como en las interacciones con el medio exterior. De hecho, la pared bacteriana desempeña un papel importante en los procesos de colonización, adherencia, inflamación e invasión bacteriana (Tuomanen *et al.*, 1985; Tuomanen *et al.*, 1987; McCullers y Tuomanen, 2001).

1.3.2.1. El peptidoglicano

El peptidoglicano (PG) o mureína, un heteropolímero tridimensional de naturaleza glicopeptídica, es uno de los componentes esenciales de la pared celular. Se encuentra rodeando la membrana citoplasmática de la mayoría de las bacterias y es el responsable del mantenimiento de la estructura de la célula; de hecho, la inhibición de su biosíntesis, o su degradación, durante la fase de crecimiento bacteriano produciría la lisis celular (Vollmer *et al.*, 2008; Fisher y Mobashery, 2010).

El PG está constituido por cadenas glicánicas lineales que están compuestas, tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, por la repetición alternada de unidades de *N*-acetilglucosamina (2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranososa; GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (2-acetamido-3-*O*-[(1*R*)-1-carboxietil]-2-deoxi-D-glucopiranososa; MurNAc), unidas mediante enlaces glicosídicos de tipo β -(1 \rightarrow 4), y sintetizadas a través de la actividad transglicosilasa de enzimas bifuncionales. El grupo D-lactilo en posición 3 de cada residuo de MurNAc se encuentra sustituido por un segmento peptídico cuya composición más habitual en el PG naciente de neumococo es L-Ala-D- γ -Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala, y el último o los dos últimos residuos de D-Ala desaparecen en la macromolécula madura tras la acción de las carboxipeptidasas (García-Bustos *et al.*, 1987; Severin *et al.*, 1992). Estos segmentos peptídicos conectan entre sí las cadenas glicánicas a través de la unión entre el grupo carboxilo de la D-Ala en posición 4 de la cadena peptídica y el grupo amino de la cadena lateral de la L-Lys en posición 3, bien directamente, o bien a través de pequeños puentes peptídicos cuya composición más frecuente es L-Ser-L-Ala o L-Ala-L-Ala (Fischer y Tomasz, 1985) (Figura 1.3). Este entrecruzamiento de las cadenas glicánicas mediante péptidos crea el entramado tridimensional que es la macromolécula del PG y tiene lugar mediante una reacción de transpeptidación, que está catalizada por las mismas enzimas bifuncionales que llevan a cabo la síntesis de las cadenas glicánicas (Fisher y Mobashery, 2010). En las cepas de neumococo resistentes a los antibióticos β -lactámicos, como por ejemplo Pen6, el patrón de las cadenas peptídicas cambia, habiéndose encontrado un aumento importante en el contenido de péptidos ramificados (García-Bustos y Tomasz, 1990; Zigelboim y Tomasz, 1980).

La longitud de las cadenas glicánicas, así como el nivel de entrecruzamiento, varía entre especies, cepas, condiciones de crecimiento y/o estadio celular, factores ambientales y es independiente del grosor del PG (Vollmer *et al.*, 2008; Vollmer y Seligman, 2010; Moynihan *et al.*, 2014). Mientras que en bacterias Gram-negativas la longitud media es de entre 20 y 40 unidades disacarídicas, en la mayoría de las Gram-positivas no supera las 26; aunque en *S. pneumoniae* todas las cadenas superan las 25 repeticiones (Bui *et al.*, 2012).

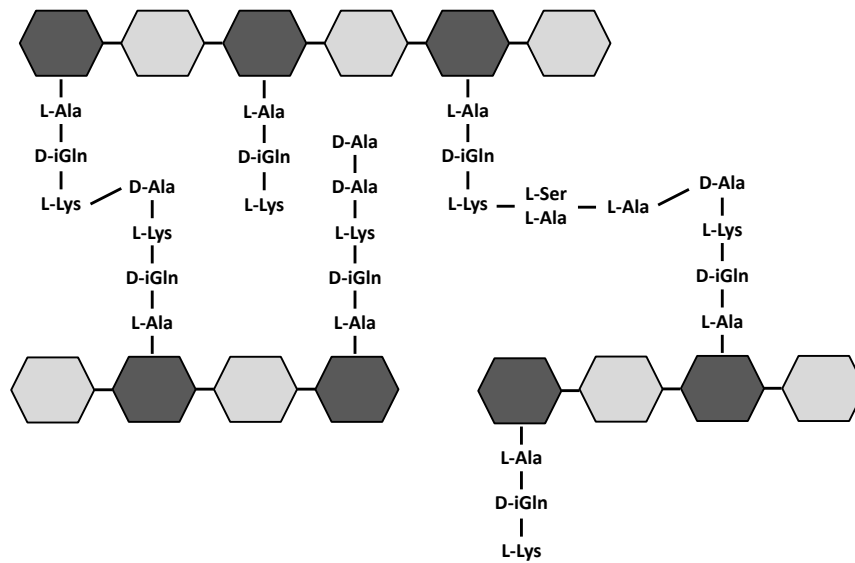


Figura 1.3. Representación esquemática de la estructura del PG de neumococo formado por cadenas glicánicas de residuos alternantes de GlcNAc (hexágonos gris claro) y MurNAc (hexágonos gris oscuro) que se entrecruzan mediante segmentos peptídicos lineares o ramificados.

La orientación de las cadenas glicánicas y de los péptidos respecto a la superficie y al eje celular de la bacteria está aún por determinar. Por un lado, el gran tamaño del PG, su heterogeneidad estructural (la pared se encuentra en estado permanente de biosíntesis, ensamblaje, desensamblaje y renovación) y flexibilidad, impiden su cristalización. Por otro lado, las dimensiones de las cadenas glicánicas y los péptidos coinciden con las de los artefactos necesarios para teñir y fijar las muestras en microscopía electrónica convencional (Dmitriev *et al.*, 2005; Vollmer y Seligman, 2010). Basándose en datos químicos y biofísicos se han propuesto, hasta ahora, dos modelos diferentes para la arquitectura del PG. En el primero de ellos (modelo clásico en capas) tanto las cadenas glicánicas como los segmentos peptídicos se disponen en paralelo a la membrana plasmática de la célula, adoptando una estructura helicoidal en la que cada giro de la hélice está compuesto por cuatro unidades disacáridicas y los segmentos peptídicos quedan dispuestos hacia el exterior de la misma (Burge *et al.*, 1977; Labischinski *et al.*, 1979; Vollmer y Höltje, 2004). Por el contrario, en el segundo modelo ("scaffold") las cadenas glicánicas se orientarían de manera perpendicular a la membrana y cada cadena quedaría unida con otras cuatro a través de las cadenas peptídicas (Dmitriev *et al.*, 1999). Posteriormente y mediante resonancia magnética nuclear en solución de un fragmento sintético del PG (tetrasacárido dipentapéptido) se ha observado que el ángulo entre dos péptidos consecutivos es de unos 120 grados, lo que implicaría tres unidades disacáridicas por cada vuelta y no cuatro, en concordancia con este último modelo (Meroueh *et al.*, 2006). La disposición perpendicular a la membrana de las cadenas glicánicas y paralela de los péptidos crearía una estructura

“en panal de abeja”, cuyos poros tendrían un tamaño mínimo de 70 Å (Figura 1.4), que podría funcionar como un citoesqueleto externo elástico (Meroueh *et al.*, 2006). En este estudio el péptido contenía D-γ-glutámico, en vez de D-γ-glutamina como sucede en neumococo, y también difiere de la composición en Gram-negativas en las que la L-lisina es sustituida por ácido mesodiaminopimérico, de modo que no es posible establecer, de forma inequívoca, el número de unidades disacarídicas que componen cada giro de la hélice (Vollmer y Seligman, 2010). Además, el modelo “en panal de abeja” no parece posible en las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que la mayor parte de sus cadenas glicánicas tiene una longitud mucho mayor que el grosor del PG, por lo que no parece viable una disposición vertical de las mismas. Sin embargo, se ha comprobado, mediante microscopía de fuerza atómica, que en el caso de *Bacillus subtilis* las cadenas glicánicas, compuestas por más de 500 unidades disacarídicas de media, pueden doblarse (Vollmer y Seligman, 2010).

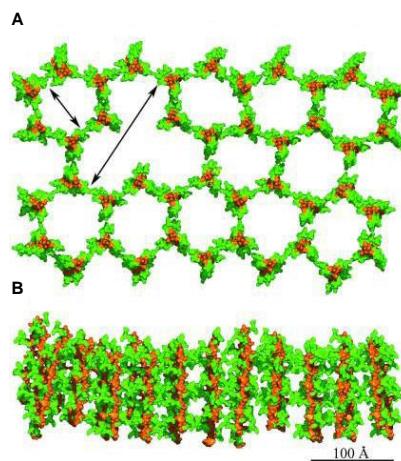


Figura 1.4. (A) Vista superior y (B) lateral del modelo tridimensional de la arquitectura del PG, basado en la estructura en solución del tetrasacárido dipentapéptido (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)₂ (Meroueh *et al.*, 2006). En naranja se muestran las cadenas glicánicas y en verde las peptídicas. Las flechas indican la dimensión variable de los poros (dependiente del grado de entrecruzamiento de las cadenas peptídicas y de la ausencia de cadenas glicánicas) cuyo tamaño mínimo sería ≈ 70 Å.

Las cadenas glicánicas sufren modificaciones estructurales secundarias que pueden alterar tanto la hidrólisis como la síntesis del PG durante el crecimiento celular. Estas modificaciones post-sintéticas afectan principalmente al grupo amino del C2 (*N*-desacetilación) o al hidroxilo del C6 (*O*-acetilación) de los amino azúcares (Figura 1.5). La *N*-desacetilación del PG es una modificación secundaria (las cadenas glicánicas recién sintetizadas se encuentran totalmente acetiladas) que tiene lugar mayoritariamente en bacterias Gram-positivas (Moynihan *et al.*, 2014) y puede afectar a los residuos de MurNAc y GlcNAc. La enzima responsable de esta modificación en neumococo es la *N*-acetilglucosamina desacetilasa A, codificada por el gen *pgdA* (Vollmer y Tomasz, 2000).

Su acción puede dar lugar a la desacetilación de entre un 40% y un 80% de los residuos de GlcNAc y de un 10% de los de MurNAc, lo que da lugar a un aumento de la resistencia de neumococo frente a la acción de la lisozima humana, un factor importante del sistema inmune innato que se encuentra a elevadas concentraciones en los sitios de infección (Ohno *et al.*, 1982; Vollmer y Tomasz, 2000; Vollmer, 2008). La hipersensibilidad de los mutantes *pgdA* a la lisozima exógena y la reducción observada en la virulencia del mutante con respecto a la cepa parental sugiere que *pgdA* es determinante en la virulencia de neumococo (Vollmer y Tomasz, 2002). Por otro lado la desacetilación introduce cargas positivas en la pared celular, lo que podría afectar a proteínas específicas de la pared o al CPS, que como ya se indicó es el mayor factor de virulencia de neumococo (Vollmer, 2008). Por otro lado, el aumento de la carga positiva del PG aumentaría la resistencia de la bacteria frente a los péptidos catiónicos antimicrobianos, otros elementos importantes del sistema inmune innato que inducen la rotura de la membrana plasmática de la bacteria (Peschel, 2002).

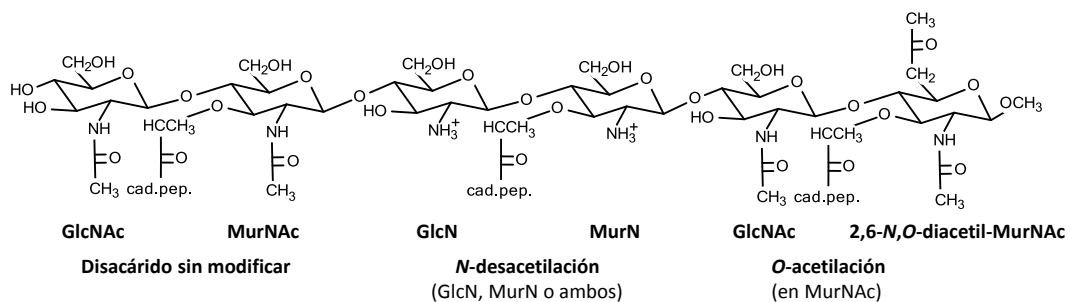


Figura 1.5. Representación de una cadena glicánica con unidades disacarídicas sin modificar (GlcNAc-MurNAc), desacetiladas (GlcN-MurN) o con acetilación extra en los residuos de MurNAc. Modificado de Vollmer, 2008.

La *O*-acetilación de los residuos de MurNAc (hasta ahora no se ha observado en los de GlcNAc), que tiene lugar a través de la acción de las *O*-acetiltransferasas, también aumenta la resistencia de la bacteria a la lisozima del hospedador (Crisóstomo *et al.*, 2006; Vollmer 2008). Este grupo acetilo extra, unido al C6-OH del MurNAc, aparece tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. Aunque en *S. pneumoniae* no se ha determinado el porcentaje de residuos de MurNAc *O*-acetilados, sí se ha identificado la enzima responsable de la modificación, una *O*-acetilasa codificada por el gen *adr* el cual, además, es requerido para la expresión de un nivel elevado de resistencia a la penicilina en la cepa resistente de neumococo Pen6 (Crisostomo *et al.*, 2006). El enlace éster que une este grupo acetilo extra es bastante débil, por lo que el tratamiento ácido y las altas temperaturas que se emplean para la purificación y el análisis de la composición del PG no han permitido determinar la abundancia de esta modificación (Vollmer 2008).

Otra modificación que presenta el PG es la unión de los ácidos teicoicos, polímeros de superficie que, al igual que el CPS, se unen a los residuos de MurNAc a través del grupo hidroxilo del C6 del azúcar. Estos componentes son parte fundamental de la pared celular de la bacteria, por lo que en el siguiente apartado se describen más detalladamente.

Todas estas modificaciones del PG lo protegen de la lisis celular que pueden ocasionar agentes exógenos de la defensa del hospedador, como las lisozimas del sistema inmune, las autolisinas endógenas implicadas en el propio metabolismo del PG (Moynihan *et al.*, 2014) o la acción de los antibióticos, en este caso debido a la adquisición de proteínas de unión a penicilina (PBPs) con baja afinidad, la sobre-expresión de PBPs endógenas de baja afinidad o la modificación de PBPs endógenas (Zigheboim y Tomasz, 1980; Zapun *et al.*, 2008).

1.3.2.2. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos

La envuelta celular de las bacterias Gram-positivas contiene otros dos glicopolímeros de naturaleza zwitteriónica, que juegan también un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de la célula, su crecimiento y patogenicidad. Se trata de los ácidos teicoicos (WTAs, del inglés *Wall Teichoic Acids*), unidos covalentemente a la pared celular a través de los residuos de MurNAc del PG, y los ácidos lipoteicoicos (LTAs del inglés *Lipoteichoic Acids*), enlazados de manera no covalente a la membrana plasmática. Ambos glicopolímeros, inicialmente conocidos como polisacárido C (WTA) y antígeno de Forssman (LTA), forman una barrera polianiónica que se extiende desde la superficie bacteriana hacia el PG, ofreciendo protección frente a péptidos antimicrobianos (Seo *et al.*, 2008). Probablemente debido a la falta de una membrana externa protectora, estos polímeros desempeñan una función similar en bacterias Gram-positivas, ya que influyen en la permeabilidad y proporcionan estabilidad a la membrana plasmática, median interacciones extracelulares y, junto con el PG, actúan como punto de unión de enzimas extra-citoplasmáticas requeridas para el crecimiento y la degradación de la pared celular (Swoboda *et al.*, 2010); por ello, las enzimas implicadas en su biosíntesis están en el punto de mira para el diseño de nuevos antibióticos (Fischer, 1997; Swoboda *et al.*, 2010).

Entre un 15 y un 30% de los residuos de MurNAc del PG de *S. pneumoniae* son portadores de cadenas de WTAs (Fischer 2000), las cuales suponen hasta un 50% de la masa de la pared bacteriana (Vollmer *et al.*, 2008) y presentan una complejidad estructural mucho mayor que en el resto de Gram-positivas, además de poseer la misma composición química que los LTAs (Fischer, 1997).

La estructura "clásica" de los LTAs consta de una cadena de poli(glicerofosfato) unida, mediante un enlace fosfodiéster, a un glicolípido que funciona como unidad de

anclaje a la membrana. Este tipo de LTA lo comparten un grupo muy amplio de bacterias como bacilos, lactobacilos, enterococos, lactococos, listerias, estafilococos y algunos estreptococos, entre los que puede variar la estructura glicolípídica, la longitud de la cadena de poli(glicerofosfato) o la abundancia de las sustituciones de ésteres cargados positivamente de D-alanina, en posición 2 de los residuos de glicerofosfato (Fischer, 1997; Fischer, 1994; Fischer y Rösel, 1980; Fischer *et al.*, 1980). Sin embargo, los LTAs y WTAs de neumococo están formados por una unidad repetitiva pentasacáridica, constituida por dos moléculas de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), una de ribitol-5-fosfato, una de glucosa (Glc) y una del amino azúcar, cargado positivamente, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactosa (AATGal) (Figuras 1.6 y 1.7). Además, dependiendo de la cepa de neumococo, uno o los dos residuos de GalNAc están sustituidos en la posición O6 por una molécula del fosforilcolina (P-col), otra de las particularidades de los WTAs y LTAs de *S. pneumoniae*, considerada como una huella dactilar de la bacteria (Behr *et al.*, 1992; Fischer, 1997).

Los últimos modelos propuestos sobre la estructura de los LTAs de neumococo se diferencian entre sí, fundamentalmente, en el comienzo de la unidad repetitiva, así como en el anclaje de la cadena a la membrana celular.

En el modelo propuesto por Fischer en 1997 a partir del aislamiento de los LTAs y WTAs de la cepa R6 de *S. pneumoniae*, la longitud de las cadenas varía entre dos y ocho unidades repetitivas, cada una de las cuales comienza con la molécula de ribitol-fosfato y termina con la de glucosa. La unión entre las repeticiones tiene lugar mediante un enlace fosfodiéster entre el O5 del ribitol y el O6 de la molécula de glucosa de la repetición adyacente y, concretamente en la cepa R6, el 78% de las repeticiones se encuentran sustituidas por dos residuos de P-col y el 22% sólo por una. Según Fischer la composición del anclaje glicolípídico a la capa externa de la membrana citoplasmática era Glc- β -(1 \rightarrow 3)-AATGal- β -(1 \rightarrow 3)-Glc- α -(1 \rightarrow 3)-acil₂-glicerol aunque, a diferencia de los LTAs de otras bacterias, dicho anclaje no se detectó en su forma libre entre los lípidos de la membrana de neumococo.

En el año 2006, Draing y colaboradores confirmaron la estructura propuesta por Fischer, pero con ciertas modificaciones. La utilización de nuevos métodos de análisis sugirió la presencia de GalNAc y D-Alanina como sustituyentes del ribitol en los LTAs de las cepas R6 y Fp23 (mutante no capsulado de la cepa TIGR4), respectivamente. Por otro lado, la cadena de LTA constaría sólo de dos unidades repetitivas en lugar de variar de dos a ocho (Draing *et al.*, 2006).

En el año 2008, Seo y colaboradores propusieron otro modelo basado en el análisis por espectrometría de masas de los LTAs de diferentes cepas de neumococo, según el cual la secuencia de la unidad repetitiva sería AATGal-Glc-Ribitol-5-P-GalNAc-GalNAc y la del anclaje lipídico Glc- α -(1 \rightarrow 3)-acil₂-glicerol (Figura 1.6). Las diferencias observadas entre los espectros de las diferentes cepas analizadas se deberían exclusivamente al

número de residuos de fosforilcolina presentes en cada unidad repetitiva (siempre dos o uno). Su estructura explica que los LTAs presenten propiedades de antígeno de Forssman (es necesario encontrar el disacárido de Forssman (GalNAc- α -(1 \rightarrow 3)-GalNAc- β -(1 \rightarrow) en la parte terminal de la estructura), condición que se cumple en la propuesta por Seo pero no en la de Fischer, y resuelve el problema de la biosíntesis del anclaje a la membrana celular, ya que ésta requiere la acción de una transferasa inicial que transfiera el primer azúcar a un aceptor de la membrana, y no se conoce ningún polisacárido bacteriano cuyas unidades repetitivas se inicien con la adición de ribitol-fosfato (Seo *et al.*, 2008).

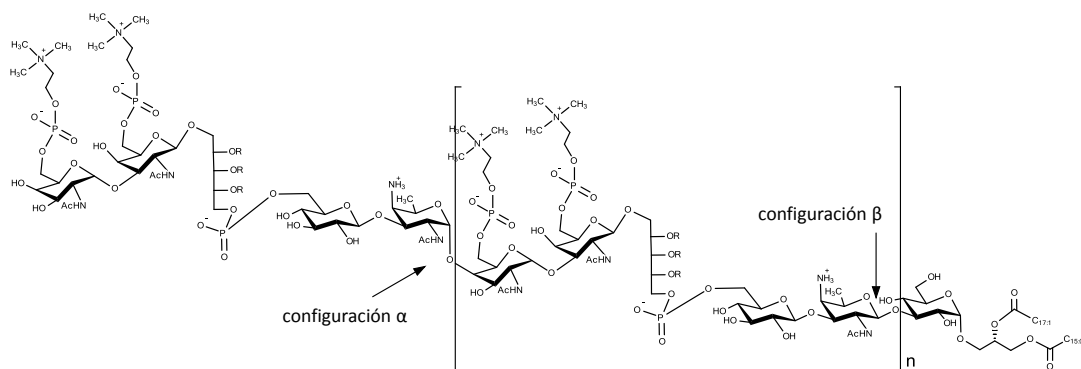


Figura 1.6. Modelo de la estructura de los LTAs de *S. pneumoniae* según Seo *et al.*, 2008. La unidad repetitiva (n) contiene, de derecha a izquierda, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactosa (AATGal), glucosa (Glc), ribitol-5-fosfato y dos residuos de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), cada uno de los cuales puede llevar en posición 6 un residuo de P-col. Los grupos hidroxilo del ribitol-5-P pueden estar sustituidos en cantidades no estequiométricas por D-Ala y α -D-GalNAc (R = H, D-Ala o α -D-GalNAc) y todas las repeticiones de los LTAs están unidas mediante enlaces β , excepto la terminal que presenta configuración α .

El análisis reciente de los LTAs de las cepas D39 Δ *cps* y TIGR4 Δ *cps* (mutantes de las cepas D39 y TIGR4, respectivamente, desprovistos de las cápsulas) por distintos métodos tras eliminar la *O*-desacetilación ha confirmado el modelo propuesto Seo y colaboradores en 2008, estableciendo además que las cadenas de los LTAs están formadas por 4-8 unidades repetitivas (predominantemente 6 o 7) y que la infravaloración de Draing y colaboradores (2006) era consecuencia de la formación de micelas por los LTAs *O*-acetilados (Gisch *et al.*, 2013). Sin embargo, la configuración β descrita en el anterior modelo para los residuos de AATGal, sólo aparecería en la primera de las unidades repetitivas, es decir, en la unida al anclaje lipídico (Figura 1.7). Como se explica en el trabajo, esto es fundamental en la investigación de las enzimas implicadas en la biosíntesis y la transferencia del precursor de los ácidos teicoicos, bien al anclaje lipídico formándose el LTA, o bien al PG constituyéndose entonces el WTA. Comprobaron además que la variabilidad en el número de residuos de P-col

(predominantemente en la última de las unidades repetitivas) no influye sobre la reacción de los anticuerpos anti-Forsman y demostraron que la señal de RMN asociada a un residuo de GalNAc sustituyente del ribitol correspondía, en realidad, a residuos de GalNAc portadores de P-col, concluyendo que los grupos hidroxilo del ribitol-5-P sólo podrían estar sustituidos, potencialmente, por D-Ala.

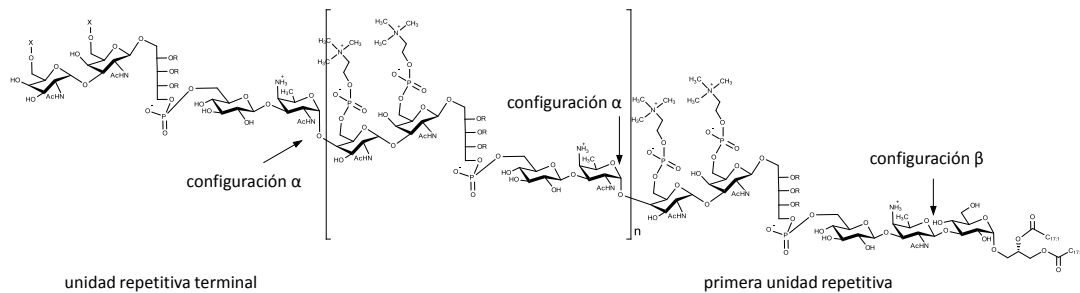


Figura 1.7. Estructura de los LTAs de *S. pneumoniae* según el modelo propuesto Gisch *et al.*, 2013. La unidad repetitiva (n) presenta la misma estructura que la del modelo de Seo y colaboradores (2008), aunque el ribitol-5-P sólo puede tener sustituciones D-Ala (R = H o D-Ala). Únicamente la primera repetición, unida al anclaje lipídico (glucosa-diacilglicerol), presenta la forma β de AATGal (todas las demás contienen el anómero α) y, en determinadas condiciones y cepas, la última repetición puede carecer de los dos residuos de P-col.

Al igual que para los LTAs, inicialmente se propuso que las unidades repetitivas de los WTAs estaban unidas entre sí mediante enlaces fosfodiéster y ancladas, en este caso en posición 6 a los residuos de MurNAc de la pared celular, a través de la unión del ribitol a un oligosacárido de composición desconocida mediante enlace fosfodiéster (Severin y Tomasz, 2000). Según Seo y colaboradores esta visión de la estructura de los WTAs no tenía en cuenta los pasos implicados en la síntesis y polimerización de las unidades repetitivas, por lo que propusieron que estas debían comenzar, al igual que en los LTAs, con la molécula de AATGal y finalizar con la de GalNAc, y que la unión al PG podría tener lugar a través de un residuo de AATGal (Seo *et al.*, 2008).

Conocer la composición exacta de los WTAs y LTAs de neumococo es fundamental, ya que pequeños cambios en la misma, como por ejemplo la presencia o ausencia de alanina como sustituyente del ribitol, la variabilidad en el número de residuos de P-col presentes en cada unidad repetitiva, o la sustitución de la glucosa por galactosa (Vialle *et al.*, 2005), tienen un gran impacto sobre la influencia de los LTAs en la patogenicidad de la bacteria, la protección frente a muchos péptidos antimicrobianos, o en la adhesión bacteriana a las células del hospedador iniciando cascadas inflamatorias a través de la activación del sistema del complemento (Draing *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2008).

1.3.2.3. La fosforilcolina

Neumococo es auxótrofo para la colina (Rane y Subbarow, 1940a, b), un aminoalcohol cuya presencia, abundante en eucariotas, es muy rara entre las bacterias, siendo *S. pneumoniae* la única especie cuyo crecimiento depende de la adquisición de este aminoalcohol del medio de crecimiento, que es metabolizado exclusivamente para incorporarse a las cadenas de WTAs y LTAs en forma de P-col (Tomasz 1967; Brundish y Baddiley, 1968; Briles y Tomasz, 1973).

La P-col tiene un papel importante en la internalización de neumococo a través de su interacción con los receptores celulares del factor de activación plaquetaria (PAFr) (Cundell *et al.*, 1995). *S. pneumoniae*, al igual que sucede en otros patógenos, sufre un proceso de variación de fase, reversible y espontáneo, entre colonias opacas y transparentes, que es independiente de las condiciones del medio de cultivo y de si la cepa presenta o no cápsula, pero que está asociado con el contenido en WTAs (Figura 1.8) (Weiser *et al.*, 1994). La variante transparente, que presenta menos cantidad de CPS y más WTAs (y por tanto más P-col), no es virulenta, siendo sin embargo más eficiente en la colonización de la nasofaringe (primera etapa de la interacción con el hospedador) debido a una mayor adhesión al epitelio pulmonar. Esta adhesión se ve aumentada debido a la estimulación de citoquinas y está mediada por la interacción con los receptores celulares del PAF (factor de activación plaquetaria), expuestos en la superficie de las células epiteliales activadas. El ligando natural del PAFr contiene P-col, lo que sugiere que neumococo podría estar imitando la estructura del PAF para utilizar el receptor. De modo que la unión de los residuos de P-col de neumococo al PAFr promueve la adhesión de la bacteriana a las células del hospedador, lo que a su vez favorece la colonización de las células del endotelio (Cundell *et al.*, 1995; Kim y Weiser, 1998). Por otro lado, un aumento en los WTAs puede ser necesario para la colonización, ya que esta estructura, como se verá más adelante, sirve de punto de anclaje para múltiples proteínas que pueden estar implicadas en la unión a los receptores de las células epiteliales a través de la estructura de la P-col (Kim y Weiser, 1998). Las variantes opacas sin embargo, no son capaces de colonizar la nasofaringe y presentan un fenotipo más virulento debido, no sólo a una mayor expresión del CPS, sino también a una reducción en la de los WTAs (y por tanto también de P-col), lo que es crítico para desencadenar la enfermedad sistémica (Kim y Weiser, 1998). Permanece sin aclarar por qué un organismo que reside en la superficie mucosa de la nasofaringe, sin desencadenar normalmente enfermedad, cambiaría de un fenotipo menos virulento a otro mayor, ya que sería potencialmente fatal para su hospedador. Es posible que la variación de fenotipo contribuya a la habilidad de la bacteria para sobrevivir largos periodos en la nasofaringe. De este modo, un mayor contenido en CPS y una disminución de WTAs en los neumococos opacos, podría proteger a la bacteria de la deposición del complemento y la fagocitosis, aunque una expresión constitutiva de

estas características podría no ser óptima para su mantenimiento en la nasofaringe (Kim y Weiser, 1998).

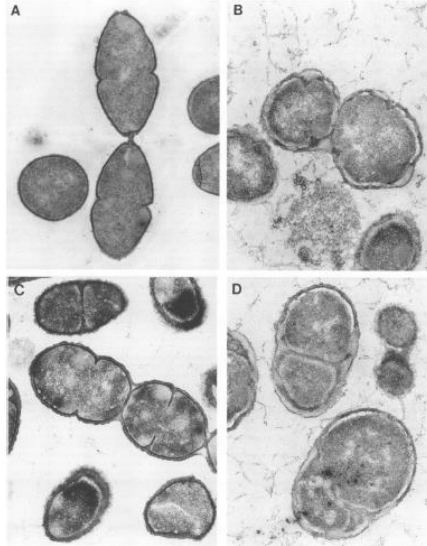


Figura 1.8. Imágenes de microscopía electrónica de variantes opacas (A y C) y transparentes (B y D) de las cepas de *S. pneumoniae* P6 y P68. Tomada de Weiser *et al.*, 1994.

Los residuos de P-col expuestos en la superficie de neumococo están implicados también en la respuesta del sistema inmune del hospedador. La P-col es reconocida y unida por la proteína C-reactiva humana (CRP), un componente presente en el suero durante la fase de respuesta aguda. De este modo la bacteria queda marcada por CRP para ser fagocitada, primero a través de su unión y segundo activando la vía clásica del complemento. Ambos efectos protegen frente a las infecciones letales por neumococo (Mold *et al.*, 1982; Fischer, 2000). A pesar de que la colina es un factor de crecimiento esencial en neumococo, ésta puede ser sustituida por ciertos análogos estructurales como etanolamina, *N*-metilamino-etanolamina o *N,N*-dimetilamino-etanolamina. Sin embargo, cuando los ácidos teicoicos no incorporan colina sino alguno de estos amino alcoholes, o si se añaden concentraciones elevadas de colina en el medio de cultivo (20 µg/ml), la bacteria sufre diversas alteraciones fisiológicas (Tomasz, 1968); entre ellas, la inhibición del proceso de separación de las células hijas durante la división celular (dando lugar a la formación de largas cadenas; Badger, 1944; Tomasz, 1968), la ausencia de autólisis (Tomasz, 1968), incapacidad para la adquisición del estado de competencia, mediante el cual neumococo absorbe moléculas de DNA presentes en el medio extracelular (Tomasz, 1968), y resistencia a la lisis inducida por deoxicolato (DOC) a concentraciones relativamente bajas (Tomasz, 1968). Todas estas alteraciones pueden ser revertidas añadiendo de nuevo colina al medio de crecimiento (Tomasz, 1968). Estudios posteriores han permitido la obtención de mutantes de neumococo

(cepas JY2190 y R6Cho⁻) que no muestran este requerimiento por colina y que son capaces de multiplicarse en ausencia del aminoalcohol (Yother *et al.*, 1998; Severin *et al.*, 1997).

El motivo por el cual se producen algunas de estas alteraciones fisiológicas al sustituir la colina de los ácidos teicoicos por alguno de los análogos recae sobre una familia de proteínas de neumococo cuya función depende de su unión específica a los motivos de P-col de los WTAs o LTAs, se trata de las denominadas proteínas de unión a colina (CBPs, del inglés *Choline Binding Proteins*) (Figura 1.9), implicadas en el metabolismo del PG y la virulencia bacteriana. La presencia de los residuos de P-col en los ácidos teicoicos es también fundamental en el desarrollo del biofilm neumocócico (comunidad microbiana sésil muy estructurada que se caracteriza por la presencia de células bacterianas unidas a una superficie o interfase y embebidas en una matriz extracelular de sustancias producidas por ellas; Costerton *et al.*, 1995), debido a la implicación de algunas CBPs en la formación del mismo, entre ellas, la amidasa LytA, la lisozima LytC, la posible glucosaminidasa LytB, las adhesinas CbpA y PcpA y la proteína A de superficie PspA (Moscoso *et al.*, 2006).

1.4. Proteínas de unión a colina

La superficie de *S. pneumoniae* está decorada con proteínas unidas de manera covalente, o no covalente, a la pared, o a la membrana celular (Figura 1.9). Entre ellas se encuentra el grupo de las CBPs que reconocen y se unen de forma específica a los residuos de P-col de los WTAs y LTAs a través de interacciones reversibles no covalentes. Estas proteínas de superficie, presentes en casi todos los aislados neumocócicos, están implicadas en diversas funciones biológicas como la adhesión y división celular (García *et al.*, 1999), promueven la colonización de la nasofaringe (CbpA, CbpD, CbpE, CbpG, LytB, y LytC) y, algunas de ellas (PspA y CbpG), contribuyen de manera directa en la virulencia bacteriana (Gosink *et al.*, 2000).

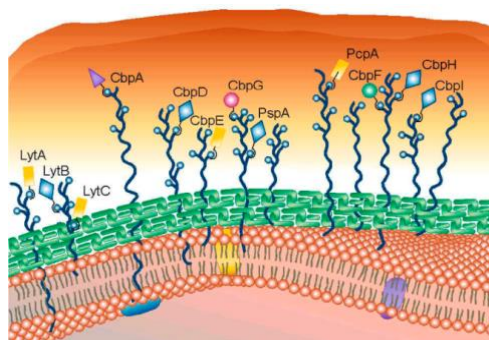


Figura 1.9. Representación de CBPs unidas a los motivos de P-col presentes en los WTAs y LTAs (círculos azules sobre estructuras azul oscuro) asociados al PG (verde) o a la membrana plasmática de *S. pneumoniae*. Tomado de McCullers y Tuomanen, 2001.

Todas las CBPs presentan una organización modular, con uno o varios módulos biológicamente activos y el módulo de unión a colina (CBM, del inglés *Choline Binding Module*; código Pfam PF1473), que es el responsable del reconocimiento de los residuos de P-col y es esencial para el desarrollo de la función (López y García, 2004). El CBM posee una estructura repetitiva y está formado por la disposición en 'tandem' de un motivo conservado de secuencia que contiene alrededor de 20 aminoácidos (García *et al.*, 1999). Como se muestra en la Figura 1.10, en la que se representan algunos miembros de la familia, el número de repeticiones (CBRs, del inglés *Choline Binding Repeats*) y su localización en la cadena polipeptídica varía de unas proteínas a otras. Cada repetición se pliega formando una horquilla beta seguida de un bucle que contiene un giro y una zona de conformación extendida que enlaza con la siguiente horquilla (Figura 1.11 A). Las horquillas beta están constituidas por unos 5 aminoácidos por hebra y se disponen formando una superhélice a izquierdas (solenoides beta) en el que cada horquilla está girada 120° con respecto a la anterior, de tal forma que las horquillas β_i y β_{i+3} adoptan una posición paralela (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2009; Pérez-Dorado *et al.*, 2010).

Los sitios de unión a los residuos de P-col están localizados en las interfaces hidrofóbicas creadas entre dos CBRs consecutivas y están formados por tres residuos aromáticos situados en las horquillas beta y un aminoácido hidrofóbico localizado en el bucle que las une (Figura 1.11 B). Las interacciones que se establecen en la cavidad son, por un lado, de tipo hidrofóbico con los grupos metilo de la colina y, por otro, de tipo catión- π entre los anillos ricos en electrones de los aminoácidos aromáticos y la carga positiva de la colina. Además de estos sitios de unión a colina, se han identificado sitios de unión no canónicos en diversas CBPs (Hermoso *et al.*, 2005; Pérez-Dorado *et al.*, 2010; Mellroth *et al.*, 2014). Tanto Pce (Hermoso *et al.*, 2005) como LytA (Mellroth *et al.*, 2014) tienen un sitio adicional de unión formado por tres aminoácidos aromáticos de la primera CBR (Figura 1.11 C), mientras que en LytC aparece un nuevo tipo de sitio de unión constituido por seis aminoácidos aromáticos procedentes de tres CBRs consecutivas; los tres residuos presentes en los sitios canónicos de colina más otros tres residuos (un triptófano y dos tirosinas) que se extienden hacia el solvente, aumentando el tamaño de la cavidad de unión a colina (Figura 1.11 D). Este nuevo tipo de sitio presenta una secuencia característica Gly-Tyr-Met-Ala (GYMA) al final de la tercera repetición y se ha propuesto que los tres residuos aromáticos adicionales podrían interactuar con el grupo fosfato de la P-col o los anillos de *N*-GalNAc a los que se unen (Pérez-Dorado *et al.*, 2010).

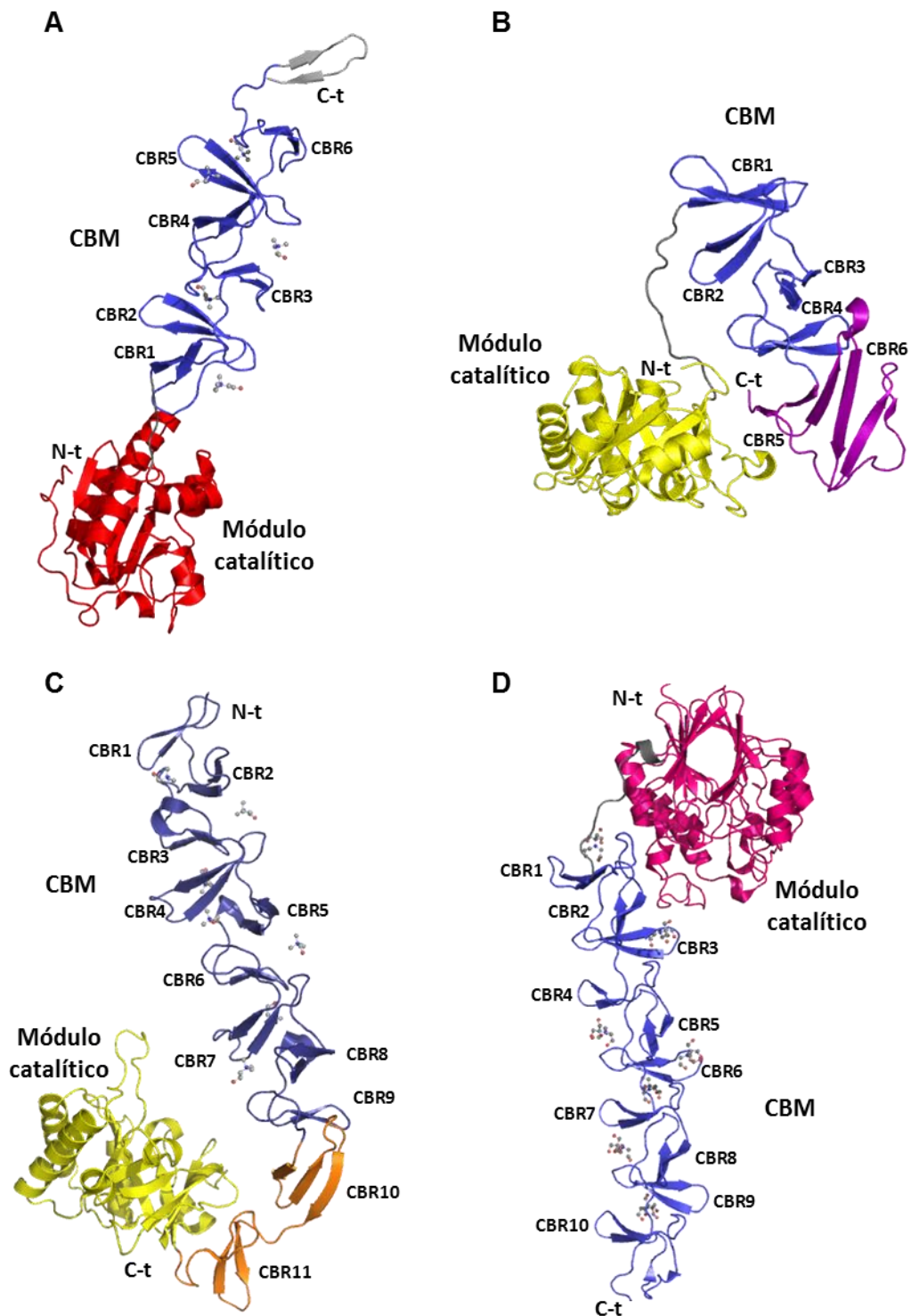


Figura 1.10. Estructuras tridimensionales de CBPs codificadas por neumococo y sus bacteriófagos en las que se identifican el módulo catalítico, el CBM y la disposición de las CBRs. (A) Estructura cristalográfica de LytA con cinco moléculas de colina unidas a las CBRs (Li *et al.*, 2015; código PDB 4X36). (B) Estructura cristalográfica de Cpl-1 (Hermoso *et al.*, 2003; código PDB 1H09). (C) Estructura cristalográfica de LytC con siete moléculas de colina unidas a las CBRs (Pérez-Dorado *et al.*, 2005; código PDB 2WW5). (D) Estructura cristalográfica de Pce con los sitios de unión de colina ocupados por moléculas de Bis-Tris (tampón de cristalización) que son reconocidas como análogos estructurales de la molécula de colina (Hermoso *et al.*, 2005; código PDB 2B1B).

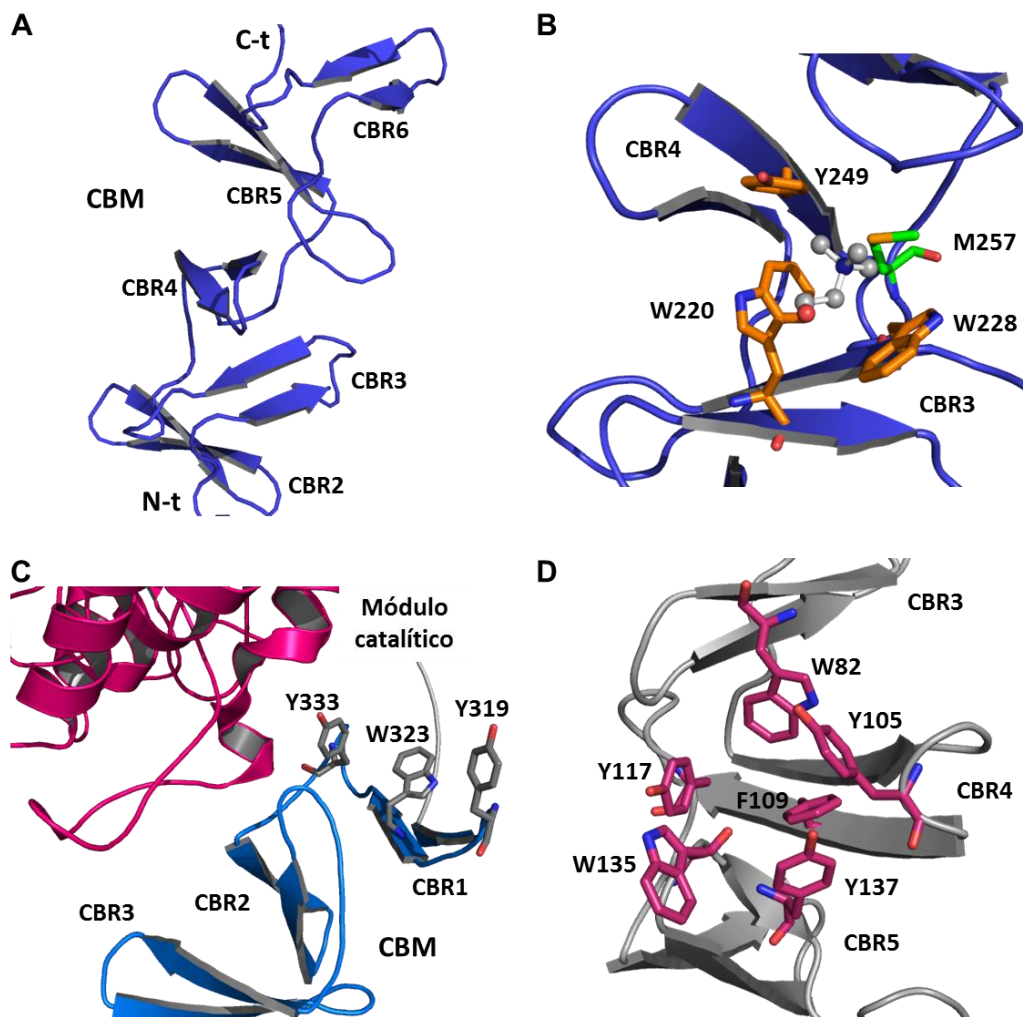


Figura 1.11. Estructura de sitios de unión a colina en distintas CBPs. (A) Región del CBM de LytA donde se muestra la estructura y disposición de las CBRs. (B) Sitio de unión a colina de LytA generado entre las repeticiones CBR3 y CBR4 donde se muestran los residuos de las hebras β implicados en la unión de una molécula de ligando. (C) Sitio no canónico de unión a colina de Pce localizado entre la parte posterior del módulo catalítico y la primera CBR del CBM. (D) Estructura tridimensional de un sitio de unión a colina de LytC formado por seis residuos aromáticos de tres repeticiones consecutivas (secuencias GYMA).

Aunque los CBMs y las CBRs fueron descritos por primera vez en neumococo, ya han sido identificados en proteínas de otras bacterias que contienen colina en su pared celular, así como en las de los bacteriófagos que las infectan (López *et al.*, 1982; García *et al.*, 1987; Sánchez-Beato *et al.*, 1995; Llull *et al.*, 2006). Dado que el grado de similitud de secuencia entre las CBRs de los CBMs presentes en diferentes microorganismos es elevado, es muy posible que hayan evolucionado a partir de una proteína ancestral (Sánchez-Beato *et al.*, 1995), reforzando así la teoría modular para la evolución de proteínas (Botstein, 1980). La adquisición del CBM supondría así una

ventaja evolutiva para estas enzimas que interaccionan con un sustrato polimérico, como es la pared celular, permitiéndoles alcanzar una mayor eficiencia catalítica (Croux *et al.*, 1993; Hermoso *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2005). Debido a ello, se ha sugerido, que la presencia de colina en las paredes de neumococo podría explicarse a través de su función como elemento de presión selectiva para las CBPs, preservando así, la existencia de este módulo tan característico (Sánchez-Beato *et al.*, 1995; Sheenan *et al.*, 1997).

1.5. Hidrolasas de la pared celular de neumococo

Entre las CBPs se encuentra un grupo de enzimas endógenas, las PG hidrolasas (o mureín hidrolasas), que cortan de manera específica ciertos enlaces del PG de neumococo. Eventualmente pueden ocasionar la lisis y la muerte de la célula (actividad “suicida”), en cuyo caso se las denomina autolisinas, y se encuentran altamente reguladas (Giesbrecht *et al.*, 1976; López y García, 2004).

Las PG hidrolasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y la mayoría de las especies bacterianas contienen una o más de estas enzimas, por lo que se postula que están implicadas en funciones biológicas fundamentales como la síntesis/degradación de la pared celular, la separación de las células hijas al final del proceso de división celular, la movilidad celular, etc. (López *et al.*, 1992; Shockman *et al.*, 1996; López y García, 2004; Vollmer *et al.*, 2008) y han sido asociadas a la lisis celular inducida por los antibióticos β -lactámicos (Sanchez-Puelles *et al.*, 1986). Son, además, responsables de la liberación de los productos generados durante la renovación del PG (Goodell y Schwarz, 1985) que actúan como factores de señalización para el reconocimiento de la bacteria por otros organismos y, en algunos casos, para la inducción de las β -lactamasas (Jacobs *et al.*, 1997).

Todos los bacteriófagos de DNA de doble cadena codifican al menos para una PG hidrolasa utilizada para inducir la lisis de la pared celular y así liberar la progenie fágica al final del ciclo lítico (endolisina) (Borysowski *et al.*, 2006). La actividad de estas PG hidrolasas está regulada únicamente por un gen tardío que codifica para una pequeña proteína hidrofóbica denominada holina, la cual facilita el acceso de la enzima a la pared de la bacteria mediante la creación de poros en la membrana (Young, 1992).

La especificidad de sustrato que muestran las PG hidrolasas está relacionada con su interacción con el sustrato insoluble que es la pared celular, mientras que la especificidad de enlace determina su punto de acción dentro del PG (Figura 1.12).

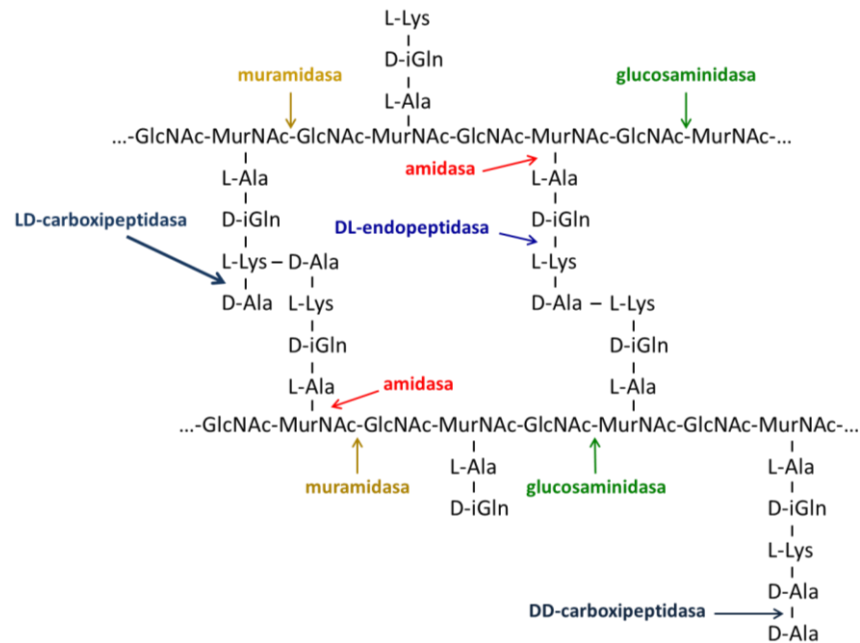


Figura 1.12. Representación de la composición del PG de *S. pneumoniae* en la que se indican algunos de los enlaces potencialmente hidrolizables por los diferentes tipos de mureín hidrolasas descritas hasta ahora para la bacteria.

En función de esta especificidad de enlace las PG hidrolasas se clasifican en los siguientes grupos:

- **Amidasas:** hidrolizan el enlace amida entre el grupo lactilo del MurNAc y el grupo amino de la L-Alanina, el primer aminoácido del segmento peptídico del PG. A este grupo pertenecen LytA, la autolisina mayoritaria de neumococo, y las endolisinas Hbl, Ejl y Pal, codificadas por los fagos Hb-3, Ej-1 y Dp-1, respectivamente. CbpD, codificada por neumococo, contiene un dominio CHAP (del inglés, *Cysteine Histidine-dependent Amidohydrolase/Peptidase*), por lo que podría ser también una amidasa, o una endopeptidasa, aunque, por el momento, sólo se puede afirmar que es una PG hidrolasa (Eldholm *et al.*, 2010).
- **Muramidasa** o **lizozimas:** rompen los enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) entre los residuos de MurNAc y GlcNAc de las cadenas glicánicas del PG. Dentro de este grupo se encuentran LytC, la lizozima codificada por neumococo, y las endolisinas Cpl-1, Cpl-7 y Cpl-9, codificadas por los bacteriófagos de neumococo Cp-1, Cp-7 y Cp-9, respectivamente.
- **Glucosaminidasas:** hidrolizan los enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) entre los residuos de GlcNAc y MurNAc de las cadenas glicánicas. A este grupo ha sido asignada LytB (sintetizada por neumococo).
- **Transglicosilasas:** cortan el mismo enlace que las lizozimas pero generan 1,6-anhidroMurNAc, bloqueando de este modo el extremo reductor de la

cadena glicánica. Hasta el momento no se ha caracterizado ninguna transglucosilasa lítica codificada por neumococo.

- Endopeptidasas y carboxipeptidasas: hidrolizan los enlaces peptídicos. Las carboxipeptidasas cortan solamente el aminoácido C-terminal. PBP3 es una DD-carboxipeptidasa codificada por *S. pneumoniae* (Morlot *et al.*, 2005). CbpD, como se ha dicho antes, podría ser una endopeptidasa (Eldholm *et al.*, 2010).

- Fosforilcolín esterasas: dentro de las mureín hidrolasas también se incluye la fosforilcolín esterasa de neumococo (Pce) que libera residuos de P-col de los TAs y LTAs.

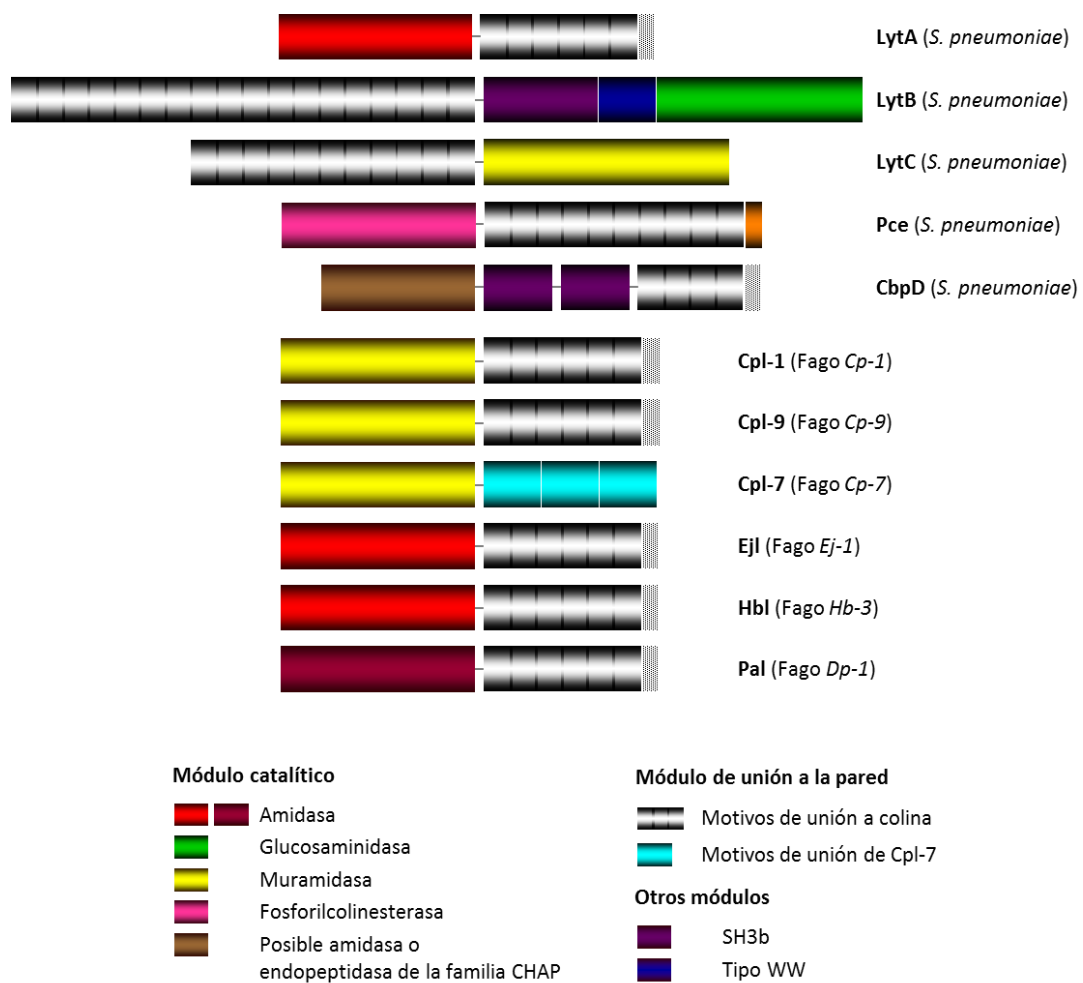


Figura 1.13. Esquema de la organización modular de las PG hidrolasas (maduras) codificadas por *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos que actúan sobre la pared de neumococo. Entre paréntesis se indica el organismo de procedencia. Los módulos catalíticos se identifican, según su función, en rojo o granate (amidasa), verde (glucosaminidasa), amarillo (lizosimas), fucsia (fosforilcolín esterasa) y marrón (amidasa o endopeptidasa de la familia CHAP). Las CBRs se muestran en gris y los motivos CW_7 de Cpl-7 en azul cian. Los módulos SH3b y del tipo WW se representan en color morado y azul oscuro, respectivamente.

En la Figura 1.13 se representa, de forma esquemática, la organización modular de las PG hidrolasas codificadas por *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos, constituidas por el CBM y el módulo catalítico, este último responsable de la especificidad de enlace (López y García, 2004). Todas ellas están estructural y funcionalmente relacionadas, habiéndose postulado un mecanismo de intercambio modular a lo largo de la evolución entre los genes que las codifican (Patthy, 1991; Díaz *et al.*, 1991 a y b; García *et al.*, 1990). Un caso especial es el de la endolisina Cpl-7, codificada por el fago Cp-7. Además del módulo catalítico con actividad muramidasa, contiene un módulo C-terminal responsable de la unión a la pared celular (esencial para la actividad de Cpl-7) que está formado por tres repeticiones idénticas (motivos CW_7; familia Cpl-7; código Pfam PF08230) de 42 aminoácidos cada una, conectados por segmentos de seis aminoácidos (García *et al.*, 1990; Sanz *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 2012). Este módulo, a diferencia del CBM del resto de las PG hidrolasas de neumococo o de sus bacteriófagos, confiere a la enzima la capacidad de degradar paredes de *S. pneumoniae* que contengan tanto colina como etanolamina, además de mantener intacta su actividad en presencia de altas concentraciones de colina.

1.6. LytB

LytB es una PG hidrolasa no lítica, identificada como la presunta *N*-acetilglucosaminidasa que hidroliza los enlaces glicosídicos de tipo β -(1→4) entre los residuos de GlcNAc y MurNAc del PG. Localizada en los polos de la bacteria (Figura 1.14), LytB es responsable de la separación de las células hijas al final de proceso de división celular (García *et al.*, 1999; De Las Rivas *et al.*, 2002). Además, está implicada en la adhesión y la colonización de la nasofaringe, así como en el desarrollo de la enfermedad neumocócica invasiva al contribuir a evadir la respuesta inmune del hospedador (Gosink *et al.*, 2000; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011), y su inactivación disminuye la formación de biofilms (Moscoso *et al.*, 2006). Como consecuencia, LytB es un factor de virulencia y una diana en el desarrollo de nuevas vacunas o antimicrobianos.

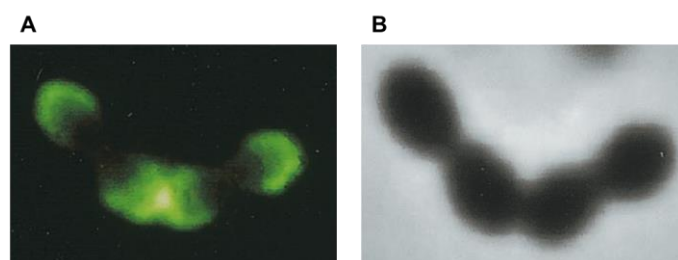


Figura 1.14. Localización de LytB fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) sobre la superficie de *S. pneumoniae* R6B (cepa mutante para el gen *lytB*). Imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia (A) y por contraste de fases (B). Tomado de De las Rivas *et al.*, 2002.

La estructura de LytB, al igual que la del resto de las PG hidrolasas de neumococo, presenta una organización modular y está constituida por un péptido señal de 23 aminoácidos (forma inmadura de la proteína), seguido de cuatro módulos independientes (Figura 1.15); el CBM, situado en el extremo N-terminal de la proteína (LytB_{CBM}), un módulo SH3b (LytB_{SH3b}) y otro de tipo WW (LytB_{WW}), ambos importantes para el reconocimiento del sustrato y la adhesión a las células del hospedador (Bai *et al.*, 2014), y un módulo perteneciente a la familia GH73 de las glicosil hidrolasas (LytB_{GH73}; código Pfam PF0183) en posición C-terminal, responsable de su actividad catalítica. Entre los módulos LytB_{CBM} y LytB_{SH3b} existe un conector formado por 12 residuos. Recientemente se ha resuelto la estructura cristalina de un fragmento de la proteína (LytB_{CAT}) que engloba toda la secuencia de la proteína madura excepto el CBM (Bai *et al.*, 2014; código PDB 4Q2W).

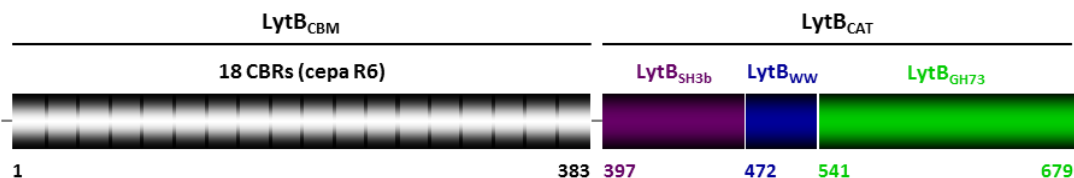


Figura 1.15. Representación de la organización modular de la proteína LytB madura codificada por la cepa *S. pneumoniae* R6 (código Uniprot P59206). LytB_{CBM} está compuesto por 383 aminoácidos y 18 CBRs. La región LytB_{CAT} la forman los módulos LytB_{SH3b} (residuos 397 a 471), LytB_{WW} (residuos 472 a 540) y LytB_{GH73} (residuos 541 a 679).

El módulo LytB_{CBM} es responsable del reconocimiento y la unión de los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos de la envuelta celular de neumococo, que es esencial para la actividad dispersora de las células hijas (De Las Rivas *et al.*, 2002). El número de repeticiones que componen LytB_{CBM} oscila entre 18 y 12 dependiendo de la cepa bacteriana (Moscoso *et al.*, 2005) y la longitud de las CBRs varía entre 17 y 23 residuos (De Las Rivas *et al.*, 2002). La enzima codificada por la cepa R6, con la se ha trabajado en esta tesis, contiene 18 repeticiones (383 aminoácidos), de las cuales las últimas ocho presentan una alternancia de secuencia casi perfecta (Figura 1.16). La similitud de secuencia con las CBRs de otras CBPs de estructura conocida sugiere que el módulo LytB_{CBM} muy probablemente conserve la estructura de tipo β -solenoide con giro a izquierdas característica de estos módulos (Figura 1.9), aunque podrían faltar algunos de los residuos aromáticos implicados en la unión de colina en los sitios canónicos y aparecen, sin embargo, los motivos GYMA, y otros relacionados, que en LytC daban lugar a sitios no canónicos formados por mayor número de residuos aromáticos.

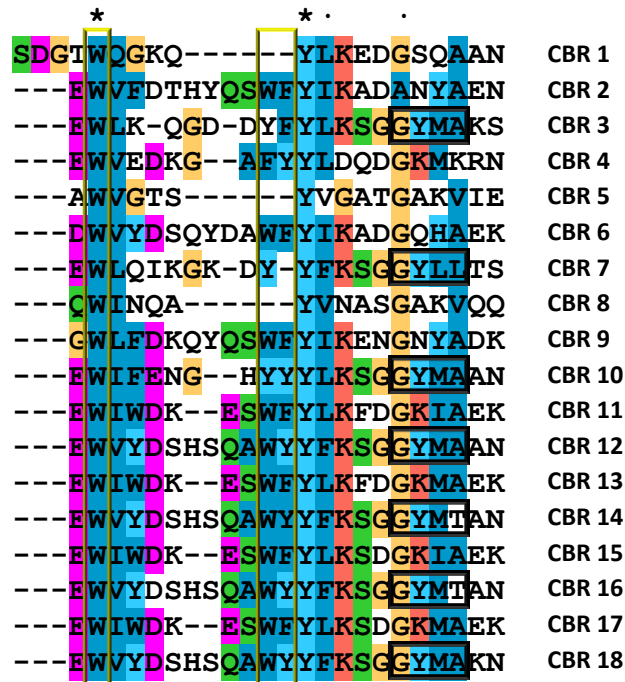


Figura 1.16. Alineamiento de secuencia de las CBRs de LytB_{CBM} (cepa R6). Los asteriscos y los puntos marcan los residuos estrictamente y parcialmente conservados, respectivamente (naranja, glicinas; verde, residuos polares neutros; rojo, aminoácidos básicos; magenta, aminoácidos ácidos; cian, tirosinas e histidinas; azul oscuro, residuos hidrofóbicos). Los recuadros amarillos indican los residuos implicados en la unión de colina de los sitios canónicos y los negros los motivos GYMA y otros relacionados.

Como ya se ha mencionado, LytB no es una enzima lítica. Curiosamente su actividad sobre paredes purificadas de neumococo es muy inferior a la observada para las autolisinas LytA y LytC, solubilizando sólo un 25% de los residuos de colina o L-Lisina (De las Rivas *et al.*, 2002). Esta hidrólisis parcial de las paredes junto con su carácter no autolítico podría reflejar la existencia de restricciones en la unión y/o la degradación del sustrato por el sitio activo. Por otro lado, su actividad sobre las células de neumococo requiere de la presencia de colina en los ácidos teicoicos de las paredes de la bacteria y su sustitución por etanolamina inhibe dicha actividad, dando lugar a la formación de largas cadenas de células. Sin embargo la localización de LytB en los polos de la bacteria permanece inalterada (De Las Rivas *et al.*, 2002).

1.7. Familia GH73 de las glicosil hidrolasas

La familia GH73 de las glicosil hidrolasas (código Pfam PF01832) está formada por más de 5100 enzimas en su mayoría de bacterias (CAZY GH_73; Cantarel *et al.*, 2009), entre las cuales se encuentran *N*-acetilglucosaminidasas que hidrolizan los enlaces β -(1 \rightarrow 4) que unen los residuos de GlcNAc y MurNAc del PG y otras endo- β -N-

acetilglucosaminidasas que actúan sobre glicopéptidos y glicoproteínas ricas en manosa (<http://www.cazy.org/GH73.html>). Se trata, en su mayoría, de proteínas de superficie, o bien de unión a la membrana, que presentan a menudo una estructura modular (Lipski *et al.*, 2015). Algunas son enzimas bifuncionales portadoras de un módulo adicional de tipo amidasa, como las autolisinas Atl o Atl_{WM} codificadas, respectivamente, por las bacterias *Staphylococcus aureus* y *S. warneri* M (Oshida *et al.*, 1995; Yokoi *et al.*, 2008); otras presentan repeticiones de secuencia que podrían estar implicadas en la unión a la pared celular bacteriana, como los dominios LysM (Buist *et al.*, 2008) presentes por ejemplo en las autolisinas AtIA de *Enterococcus faecalis* (Eckert *et al.*, 2006) y AcmA de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (Inagaki *et al.*, 2009); y algunas contienen dominios con funciones de momento desconocidas, como los descritos para la murein hidrolasa AcmB de *Lactococcus lactis* (Huard *et al.*, 2003) o la autolisina Auto de *Listeria monocytogenes* (Bublitz *et al.*, 2009). En bacterias, las enzimas de la familia GH73 están implicadas fundamentalmente en la separación de las células hijas durante el crecimiento vegetativo, a menudo hidrolizando el septo tras la división celular como sucede con la N-acetilglucosaminidasa Acp de *Clostridium perfringens* (Camiade *et al.*, 2010) y, de manera ocasional, son activas durante la invasión del hospedador, como ocurre en el caso de las PG hidrolasas Auto e IspC de *L. monocytogenes* (Bublitz *et al.*, 2009; Ronholm *et al.*, 2012).

1.7.1. Estructuras conocidas de la familia GH73

Las estructuras de los cuatro módulos pertenecientes a la familia GH73 que han sido resueltas (Lmo1076, código PDB 3FI7, Bublitz *et al.*, 2009; SPH1045-C, código PDB 2ZYC; Hashimoto *et al.*, 2009; LytB_{GH73}, código PDB 4Q2W; Bai *et al.*, 2014; TM0633, código PDB 4QDN; Lipski *et al.*, 2015) muestran un plegamiento relacionado con el de quitinasas de plantas y estreptomicetos de la familia GH19 y con el de lisozimas de las familias GH22 y GH23 (Bublitz *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2009; Maruyama *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2014; Lipski *et al.*, 2015). Todas ellas muestran un plegamiento de tipo lisozima (α/β) con dos regiones diferenciadas que consisten en un lóbulo α y otro β , entre los cuales se crea un sitio de unión para el sustrato (Figura 1.17). Debido a la flexibilidad de la región en la que se sitúa la horquilla β , cuya longitud es muy variable dentro la familia GH73, no siempre es visible en la estructura cristalográfica (Figura 1.17).

A pesar de que todas estas enzimas presentan el mismo tipo de plegamiento, no comparten la misma función enzimática. Así, las enzimas de la familia GH23 hidrolizan, preferentemente, los enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre los residuos de MurNAc y GlcNAc, las quitinasas los enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre residuos de GlcNAc y la autolisina Auto de *L. monocytogenes* es una glucosaminidasa que hidroliza los enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre las unidades de GlcNAc y MurNAc (Bublitz *et al.*, 2009).

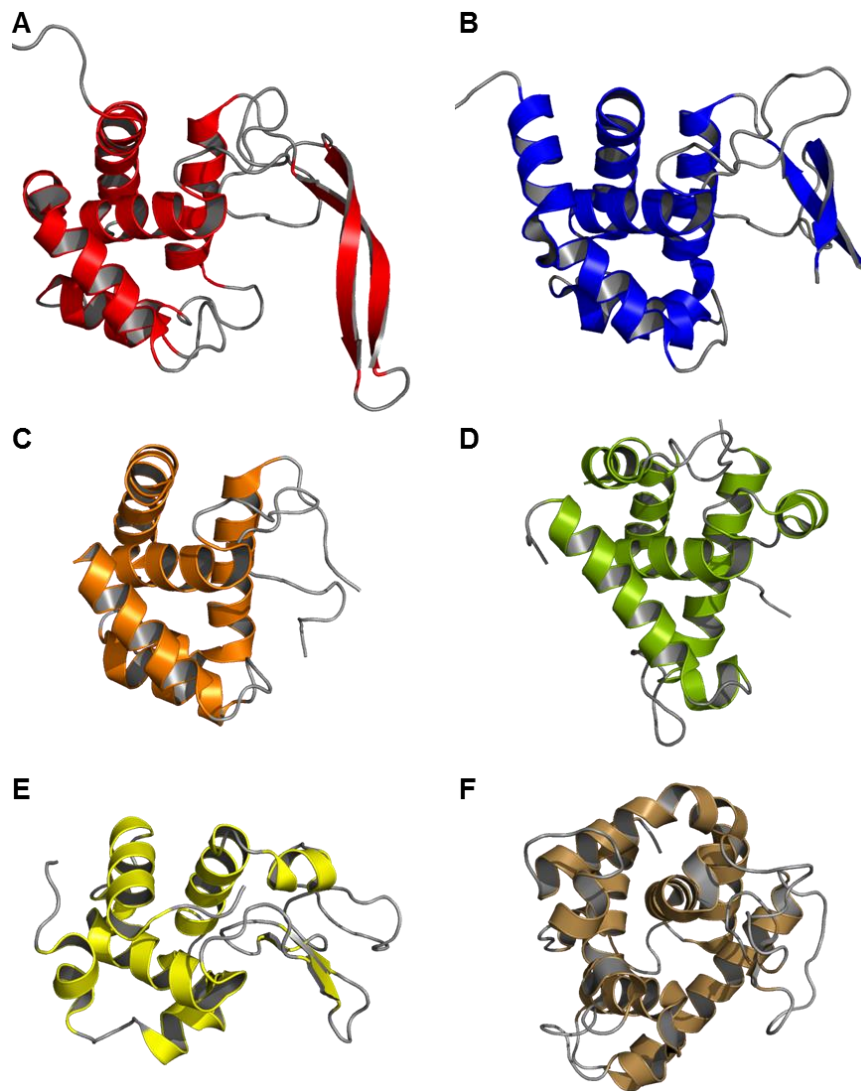


Figura 1.17. Comparación de las cuatro estructuras publicadas de módulos GH73 con las de las familias GH22 y GH23. (A) Autolisina de *L. monocytogenes* Auto (Lmo1076, código PDB 3F17), (B) proteína flagelar bacteriana FlgJ de la cepa A1 de la bacteria Gram-negativa *Sphingomonas* sp. (SPH1045-C, código PDB 2ZYC), (C) glucosaminidasa TM0633 codificada por la bacteria Gram-negativa *Thermotoga marítima* (código PDB 4QDN), (D) LytB (LytB_{GH73}, código PDB 4Q2W), (E) lisozima de huevo de gallina (HEWL, código PDB 3OK0) y (F) lisozima de huevo de ganso (GEWL, código PDB 154L).

1.7.2. Mecanismo catalítico

Las glicosil hidrolasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un motivo diferente. Antes de hablar sobre los diferentes mecanismos catalíticos es conveniente explicar la nomenclatura empleada para describir la unión del sustrato que va a ser hidrolizado por la glicosil hidrolasa. Davies y colaboradores (1997) propusieron emplear en biología estructural la nomenclatura usada en enzimología, según la cual los subsitios de unión

se nombran desde $-n$ a $+m$ (donde n y m son números enteros). Así, $-n$ y $+m$ representan, respectivamente, los extremos no reductor y reductor de la cadena glicánica y el corte tiene lugar entre los subsitios -1 y $+1$ (Figura 1.18).

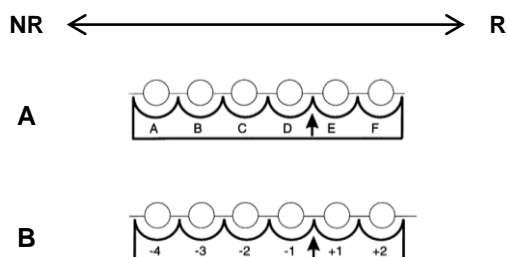


Figura 1.18. Representación esquemática de los subsitios de unión de las glicosil hidrolasas. Por convenio, el extremo no reductor (NR) del sustrato se sitúa a la izquierda y el reductor (R) a la derecha. El punto de corte se indica con una flecha. (A) Nomenclatura originariamente empleada para la lisozima HEWL; (B) Subsitios de HEWL según el esquema propuesto de $-n$ a $+m$.

En la mayoría de las glicosil hidrolasas, la hidrólisis del enlace glicosídico tiene lugar mediante la acción concertada de dos residuos amino acídicos de la enzima, uno que actúa como donador/aceptor de protones y otro que interviene como nucleófilo o como base general, dependiendo de si el mecanismo catalítico tiene lugar con retención (mecanismo de sustitución nucleofílica con doble desplazamiento o SN2) o con inversión (mecanismo de sustitución nucleofílica en una sola etapa o SN1) de la configuración del carbono anomérico, respectivamente (Davies y Henrissat, 1995). El tipo de mecanismo depende, a su vez, de la arquitectura del sitio catalítico. En las enzimas que actúan con retención de la configuración los residuos catalíticos se encuentran a una distancia promedio de 4-5 Å, mientras que en las inversoras es de 9-11 Å (Wang *et al.*, 1994).

En ambos mecanismos el residuo que actúa como ácido general está situado a distancia de enlace de hidrógeno del oxígeno del enlace glicosídico a hidrolizar. La configuración se retiene cuando la molécula de agua que produce el ataque nucleofílico actúa por la misma cara por la que se libera el grupo saliente (cara β) (Tews *et al.*, 1997), ya que la posición del residuo nucleófilo con respecto al sustrato impide el acceso del disolvente por la cara α del azúcar. Sin embargo, en el mecanismo con inversión de la configuración la molécula de agua reemplaza al grupo saliente actuando por la cara α del anillo, ya que el aumento de la distancia entre los residuos catalíticos con respecto a las enzimas no inversoras permite que se posicione entre el grupo básico que la activa (base general) y el carbono anomérico. Algunos ejemplos representativos de cada tipo de mecanismo son el de la lisozima de huevo de gallina HEWL, perteneciente a la familia GH22, para la retención (Dahlquist *et al.*, 1969; Vocadlo *et al.*, 2001), y para la inversión los de la lisozima T4L del fago T4 de la familia

GH24 o el de la quitinasa de la cebada de la familia GH19 (Kuroki *et al.*, 1999; Monzingo *et al.*, 1996; Iseli *et al.*, 1996; Brameld y Goddard, 1998) (Figura 1.19 A y B).

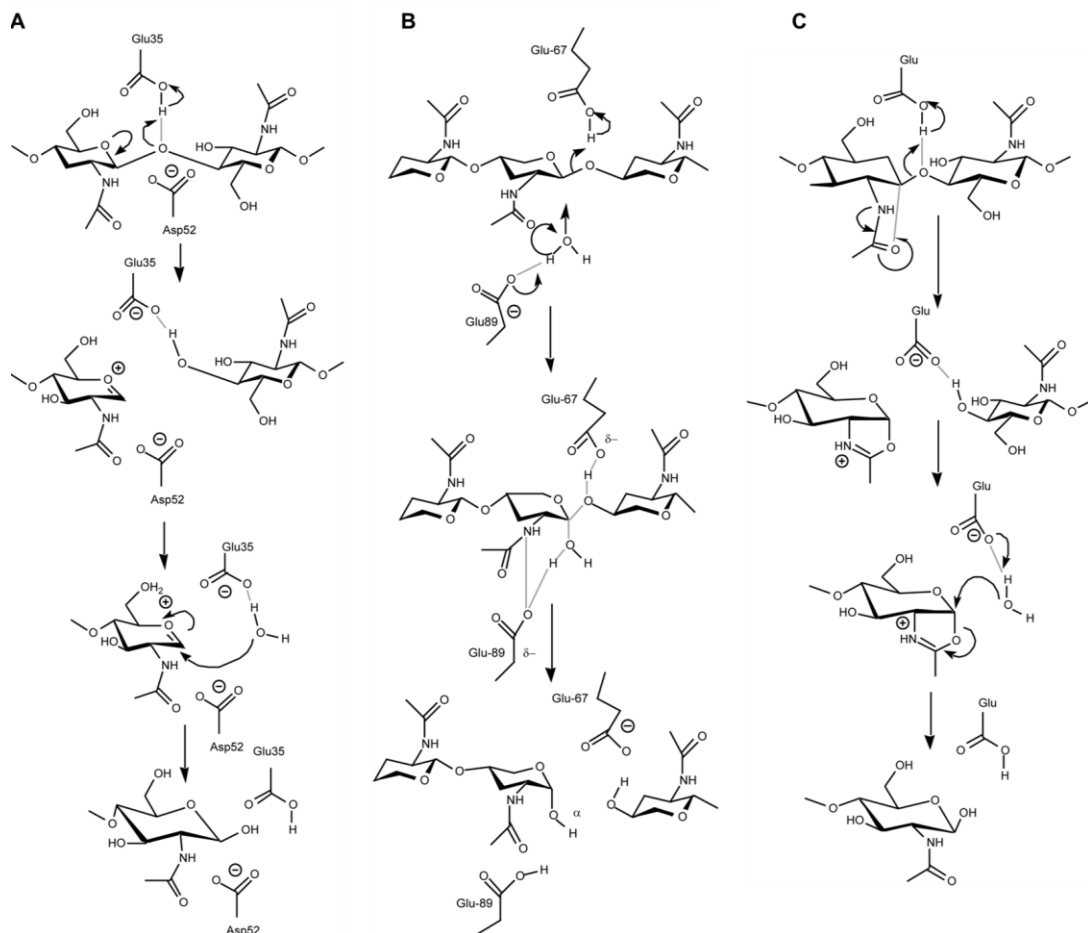


Figura 1.19. (A) Hidrólisis de un enlace glicosídico catalizado por la lisozima de huevo de gallina HEWL (familia GH22) mediante un mecanismo de retención de la configuración, donde el Glu35 es el donador/aceptor de protones y el Asp52 el nucleófilo. (B) Hidrólisis de un enlace glicosídico catalizado por la quitinasa de la cebada (familia GH19) mediante un mecanismo de inversión de la configuración; el Glu67 como ácido general actúa de donador de protones y el Glu89 como la base general que activa la molécula de agua. (C) Hidrólisis de un enlace glicosídico catalizado por quitinasas de la familia GH18 mediante un mecanismo catalítico asistido por el sustrato. Modificado de Fukamizo, 2000.

Existe, además, una variante del mecanismo con retención de la configuración en la que el intermedio de la reacción es estabilizado por el grupo acetamido en posición C2 del sustrato unido al subsitio -1 (mecanismo anquimérico asistido por el sustrato), tras la donación de un protón del carboxilato catalítico al grupo saliente. La reacción transcurre con retención de la configuración y puede tener lugar mediante la formación de un oxocarbanión o de un intermedio covalente entre el C1 y el oxígeno carbonílico. Este mecanismo no requiere la participación de un segundo carboxilato de la enzima y

ha sido propuesto, entre otras, para las familias GH18 (Figura 1.19 C) (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1995), GH20 (Mark *et al.*, 2001; Mark *et al.*, 2003), GH56 (Marković-Housley *et al.*, 2000) y GH84 (Dennis *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2006).

La comparación de los aminoácidos implicados en la catálisis de las enzimas de la familia GH73 con los de las familias GH22, GH23 y GH19 muestra total conservación del residuo catalítico que actúa como ácido general, un glutamato, y su función ha sido probada en FlgJ de *Sphingomonas* sp. (Glu185; Maruyama *et al.*, 2010), FlgJ de *Salmonella enterica* (Glu184; Herlihey *et al.*, 2014), Auto (Glu122; Bublitz *et al.*, 2009), TM0633 (Glu34; Lipski *et al.*, 2015), AcmA (Glu94; Inagaki *et al.*, 2009) y Atl_{WM} (Glu1238; Yokoi *et al.*, 2008). Sin embargo, no ha sido posible la identificación del residuo que actúa como base general o nucleófilo en todos los miembros de la familia, lo que sugiere la existencia de varios tipos de mecanismos dentro de la misma (Lipski *et al.*, 2015).

La posición de los aminoácidos Glu156 en Auto (Figura 1.20), Glu224 en FlgJ de *Sphingomonas* sp., Glu65 en TM0633 y Glu223 en FlgJ de *S. enterica*, situados en la región de la horquilla β a 11-13 Å de los respectivos donadores de protones, junto con la drástica disminución de la actividad catalítica observada tras su mutación a glutamina o alanina indicaría que la hidrólisis tiene lugar con inversión de la configuración (Bublitz *et al.*, 2009; Maruyama *et al.*, 2010; Lipski *et al.*, 2015; Herlihey *et al.*, 2014). Por el contrario, la mutación a glutamina o alanina del residuo equivalente en la glucosaminidasa Atl_{WM} (Glu1275) afecta de forma poco importante a la actividad y no se ha encontrado ningún otro residuo ácido (aparte del donador de protones) cuya mutación tenga un efecto importante sobre la misma, un resultado más compatible con un mecanismo de catálisis asistido por el sustrato (Yokoi *et al.*, 2008).

Como puede verse en la Figura 1.20 para Auto, el glutámico catalítico que actúa como ácido general durante la catálisis se encuentra localizado, en todos los miembros de la familia, en un entorno hidrofóbico debido a la presencia de dos residuos aromáticos cercanos altamente conservados (Tyr281 y Tyr287 en FlgJ de *Sphingomonas* sp.; Tyr220 y Tyr226 en Auto; Tyr118 y Tyr124 en TM0633; Tyr654 y W660 en LytB (cepa R6). El primero de ellos forma parte también de un motivo de secuencia (Tyr/Phe-Ala-Thr/Asn-Asp) muy conservado. Además, la formación de un enlace de hidrógeno entre una de las dos tirosinas (Tyr226 en Lmo1076 y Tyr281 en SPH1045-C) y el grupo carboxilo del glutamato, indica que dicho residuo desempeña un papel adicional orientando el glutamato catalítico dentro del sitio activo (Bublitz *et al.*, 2009).

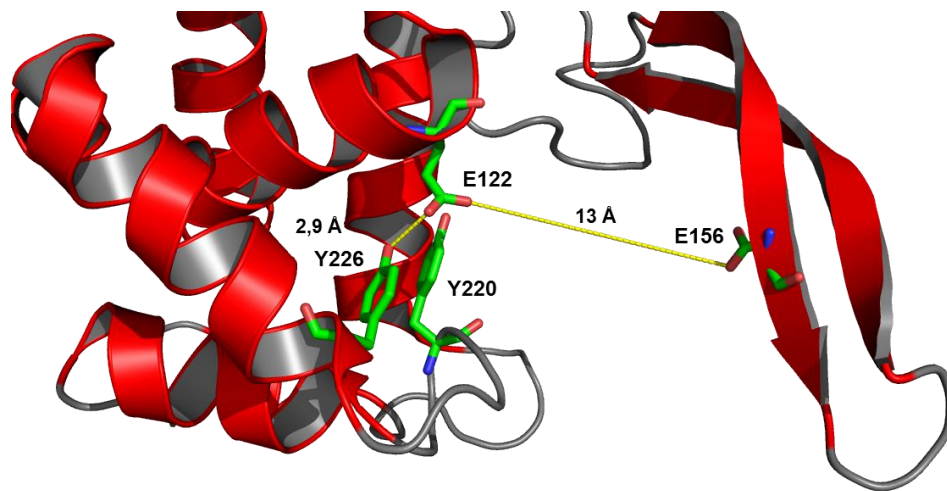


Figura 1.20. Vista del módulo GH73 de Auto (Lmo, código PDB3FI7). El residuo catalítico Glu156 (base general de la reacción de hidrólisis) se sitúa a 13 Å del Glu122. Los dos residuos aromáticos Tyr220 y Tyr226, conservados en la familia, crean un entorno hidrofóbico que favorece la protonación del grupo carboxílico del glutámico catalítico Glu122. La Tyr226, situada a distancia de enlace del Glu122, participa en la orientación de este residuo (Bublitz *et al.*, 2009).

Por otro lado, y a través de análisis bioinformáticos de más de 2800 secuencias GH73 (sólo de los módulos catalíticos), Lipski y colaboradores (2015) han construido un árbol filogenético en el que se diferencian cinco grupos que forman parte de tres filos (*Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*). El grupo 2 (filo *Firmicutes*), en el que se encuentran Auto e IspC de *L. monocytogenes*, AcmA de *L. lactis* y AtlA de *E. faecalis*, entre otras, lo constituyen enzimas altamente modulares con dominios LysM. El grupo 4 (filo *Firmicutes*) está formado por enzimas también modulares, pero que pueden llevar motivos SLH, dominios desconocidos, así como módulos muramoil-amidasa; a este grupo pertenecerían LytB y Atl_{WM}. Por el contrario, los grupos 1 y 5 (Filo *Proteobacteria*) están formados por enzimas constituidas, exclusivamente, por el módulo GH73. Al grupo 1 pertenecen, por ejemplo, FlgJ de *Sphingomonas* sp. y TM0633. Todas las secuencias del grupo 3 pertenecen al filo *Bacteroidetes*.

En cuanto al mecanismo catalítico, en el grupo 1, en el que se ha identificado un glutámico totalmente conservado que podría actuar como la base general en FlgJ (Glu224) y TM0633 (E65 en), se ha propuesto que la reacción tiene lugar con inversión de la configuración (Maruyama *et al.*, 2010; Lipski *et al.*, 2015). El grupo 2 contiene nueve enzimas caracterizadas, entre ellas Auto, en la que el residuo Glu156 ha sido identificado como base general (Bublitz *et al.*, 2009). Sin embargo, no en todas las enzimas existe dicho residuo, por lo que se ha sugerido que este grupo puede emplear dos mecanismos catalíticos diferentes (Lipski *et al.*, 2015). En el grupo 3 aparece un aspártico muy conservado al que no se ha asociado ninguna función en la catálisis,

aunque está localizado en la región de horquilla β donde se sitúa el residuo que actúa como base general en los grupos 1 y 2. Las secuencias del grupo 4 (entre las que aparece la de LytB_{GH73}) pertenecen al mismo filo que las del 2 pero no muestran ningún residuo conservado que pudiera actuar, en principio, como base general y la catálisis podría tener lugar mediante un mecanismo asistido por el sustrato (Lipski *et al.*, 2015). Por último, en el grupo 5, el segundo residuo ácido está ausente y no se ha identificado ningún otro residuo que pudiese actuar como base o nucleófilo. El modelado molecular de miembros representativos de cada uno de los grupos sugiere que la variabilidad presente en la longitud de la región de horquilla β del módulo GH73, proporcionaría la especificidad de unión al ligando y modularía el mecanismo catalítico de la familia GH73 (inversor o asistido por sustrato), aunque por el momento no hay evidencias directas del mecanismo de reacción dentro de la familia (Lipski *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A pesar de la importancia de LytB para la patogenicidad de la bacteria y su potencial como diana en el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas o profilácticas, su actividad catalítica o su especificidad de sustrato han sido poco investigadas.

El hecho de que su actividad dependa de la incorporación de P-col a los WTAs y LTAs pero su localización no, sugiere una especificidad de unión dual, mientras que el carácter no autolítico indicaría un acceso restringido a los posibles enlaces hidrolizables o una elevada especificidad de enlace.

Aunque hace poco se ha resuelto la estructura cristalográfica del módulo catalítico de la enzima (Bai *et al.*, 2014), sería fundamental conocer la relación entre dicha estructura y la función de LytB. La caracterización de esta relación nos ayudaría a comprender mejor la actividad biológica de la enzima y ello facilitaría el posible desarrollo de nuevas aproximaciones preventivas o avances terapéuticos.

Con este fin nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1. Obtención de formas estructuralmente homogéneas de LytB.**
- 2. Caracterización espectroscópica y calorimétrica de la estabilidad y organización estructural de LytB en ausencia y en presencia de posibles ligandos.**
- 3. Estudio de la especificidad de sustrato de LytB.**
- 4. Identificación de residuos relevantes para la catálisis.**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas de *Escherichia coli* DH5 α (F⁻, ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, (rk⁻, mk⁺), *poa*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* λ ⁻) (Invitrogen) y DH10B (CIB), para el clonaje de plásmidos, y la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (F⁻, *ompT*, *hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻), *gal*, *dcm*, (DE3)) (Novagen) para la expresión de proteínas. Además, se han utilizado las cepas de *S. pneumoniae* R36A (Avery *et al.*, 1944), R6 (Ottolenghi y Hotchkiss, 1962) y Pen6 (Zigheboim *et al.*, 1980), y las mutantes R36A::*pgdA* (Severin y Tomasz, 1996), R6B (García *et al.*, 1999), Pen6*adr* (Crisóstomo *et al.*, 2006) y CS1 (Severin *et al.*, 1992), no funcionales para el gen de la desacetilasa *pgdA*, el gen *lytB*, el gen de la O-acetilasa *adr* y el gen de la DD-carboxipeptidasa, respectivamente.

Las cepas se conservaron congeladas a -80°C en los diferentes medios de cultivo empleados, a los que se añadió glicerol a una concentración final del 10% (v/v). Las cepas de *S. pneumoniae* utilizadas para los ensayos de actividad enzimática se crecieron a 37°C en medio complejo C+Y suplementado con 1 mg/ml de extracto de levadura (Horne y Tomasz, 1993) y, en el caso de las cepas Pen6*adr* y CS1, con los antibióticos espectinomina (100 μ g/ml) y eritromicina (1 μ g/ml), respectivamente. Debido a que los cultivos de neumococo son micro-aerófilos su crecimiento se llevó a cabo sin agitación, en recipientes totalmente cerrados y sin apenas aire.

Los cultivos de *E. coli* utilizados para el clonaje de plásmidos y la producción de proteínas se crecieron a 37°C en medio lisogénico (LB) (Bertani, 1951), suplementado con el antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) y con agitación. Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar al 0,7-1,5% (p/v) al medio LB antes de su esterilización en el autoclave.

Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles de 0,2 μ m de diámetro de poro (Millipore). Los antibióticos se prepararon en soluciones concentradas en agua, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales Difco, Conda Pronadisa, Sigma-Aldrich, VWR Prolabo Chemicals o Melford.

3.2. Plásmidos y oligonucleótidos

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis se detallan en las Tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1. Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pGem®-T Easy Vector	Plásmido con promotores T7 y SP6 con resistencia a ampicilina (Amp ^r)	Promega
pT7-7	Plásmido de expresión con promotor T7 Amp ^r	(Tabor, 2001)
pRGR5	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB silvestre, Amp ^r	(De las Rivas et al., 2002)
pRGR5E585A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB E585, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D596A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D596A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D607A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D607A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D618A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D618A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D619A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D619A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D621A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D621A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5E633A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB E633A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D637A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D637A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5E653A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB E653A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5D657A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB D657A, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5E662A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB E662, Amp ^r	Esta Tesis
pRGR5E673A	Derivado de pT7-7 que codifica para LytB E673A, Amp ^r	Esta Tesis

3.3. Técnicas de DNA

3.3.1. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo en un equipo *Mastercycler gradient* de Eppendorf con las DNA polimerasas *Pfu* (Promega) y *Taq* (Biotools), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los productos amplificados se purificaron utilizando el “*High Pure™ PCR Product Purification Kit*” de Roche.

3.3.2. Transformación de células de *E. coli*

Las células de *E. coli* se transformaron por electroporación (cepa DH10B) o choque térmico (cepas DH5 α y BL21(DE3)). La transformación por electroporación (Wirth *et al.*, 1989) de las células de la cepa DH10B se realizó en un equipo *Gene Pulser/Pulse Controller* de Bio-Rad, según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, tras

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados para introducir las mutaciones puntuales en *lytB*

Cebador	Secuencia 5'-3'
LytB-N2	GGGTGCA CATATG AGTGATGGTACTTGGCAAGGAAAA
LytB-C	CC GAATTC TTACTAATCTTTGCCACCTAGC
E585A Fw	CCATAGTGCCTAGCGAGTAAGTGGGAAG
E585A Rv	CTTCCCCAGTTACTCGCTAGCGCACTATGG
D618A Fw	CTGCCAAGACATTTGCGGACGTGGATAAGGG
D618A Rv	CCCTTATCCACGTCCGCAAATGTCTTGGCAG
D607A Fw	TTTGGCATTACAGCCTATGCGACGACCCCTTACC
D607A Rv	GGTAAGGGGTCGTGCATAGGCTGTAATGCCAAA
D596A Fw	GGGAAGAAGTAAAATGCCAAAGCGAAGAATAATTTCTTTGG
D596A Rv	CCAAAGAAATTATTCTTCGCTTTGGCAATTTTACTTCTTCCCC
D619A Fw	CCTTCTGCCAAGACATTTGATGCGGTGGATAAGGGAATTTTAGG
D619A Rv	CCTAAAATTCCTTATCCACCGCATCAAATGTCTTGGCAGAAAGG
D621A Fw	CCAAGACATTTGATGATGTGGCGAAGGGAATTTTAGGTGCAACC
D621A Rv	GGTTGCACCTAAAATTCCTTCGCCACATCATCAAATGTCTTGG
D657A Fw	GGTATGAATGTGGAATATGCTTCAGCGCCTTATTGGGGC
D657A Rv	GCCCCAATAAGGCGCTGAAGCATATTCCACATTCATACC
E653A Fw	GGCTTCTGGTATGAATGTGGCGTATGCTTCAGACCCTTATTGGG
E653A Rv	CCCAATAAGGGTCTGAAGCATAACGCCACATTCATACCAGAAGCC
E662A Fw	GCTTCAGACCCTTATTGGGGCGCGAAAATTGCTAGTGTGATGATG
E662A Rv	CATCATCACACTAGCAATTTTCGCGCCCCAATAAGGGTCTGAAGC
E673A Fw	GTGTGATGATGAAAATCAATGCGAAGCTAGGTGGCAAAGATTAG
E673A Rv	CTAATCTTTGCCACCTAGCTTCGCATTGATTTTCATCATCACAC
D637A Fw	GGATTAAGGAAAATTATATCGCGAGGGGAAGAACTTTCCTTGG
D637A Rv	CCAAGGAAAGTTCTTCCCCTCGCGATATAATTTTCCTTAATCC
E633A Fw	GGTGCAACCAAGTGGATTAAGCGAATTATATCGATAGGGGAAG
E633A Rv	CTTCCCCTATCGATATAATTCGCCTTAATCCACTTGGTTGCACC

Las bases en **negrita** indican dianas de restricción y las subrayadas el triplete portador de la mutación. Las abreviaturas Fw y Rv (del inglés *Forward* y *Reverse*, respectivamente) que aparecen en el nombre de los oligonucleótidos utilizados como cebadores indican unión a la hebra de DNA 3'-5' o la 5'-3', respectivamente.

descongelar en hielo las células ($\approx 250 \mu\text{l}$) almacenadas a -80°C , se añadieron $10 \mu\text{l}$ de DNA plasmídico y se incubó 30 min en hielo antes de someterlas a la electroporación. A continuación se añadieron $800 \mu\text{l}$ de medio LB y, tras 1 hora de incubación a 37°C con agitación, las células se sembraron en una placa de LB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g/ml}$), $0,5 \text{ mM}$ IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido) (Calbiochem) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) al $0,004\%$ (p/v) (Roche) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Para la transformación por choque térmico, las células competentes de las cepas DH5 α o BL21(DE3) (normalmente 100 μ L) se descongelaron en hielo y se incubaron en frío durante 20 minutos con 1-5 μ L del plásmido purificado correspondiente. Tras el choque térmico (42°C durante 45 segundos), las células se mantuvieron unos 2 minutos en hielo, se añadieron \approx 300 μ L de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalmente las células se sembraron en placa de LB con ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche.

3.3.3. Aislamiento de DNA plasmídico

Para la extracción del DNA plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* se crecieron las células correspondientes en unos 5 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml), incubando a 37°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente se aisló y purificó el DNA plasmídico siguiendo el protocolo del kit comercial “AurumTM Plasmid Mini Kit” de Bio-Rad. La concentración de DNA en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (DO₂₆₀) en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando una absorbancia de 20 DO para una solución de DNA de 1 mg/ml y un paso óptico de 1 cm.

3.3.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 0,7-1,5% en tampón TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,5) y la electroforesis se llevó a cabo, en el mismo tampón, a 100-150 V durante 60 minutos, aproximadamente. Los componentes del tampón fueron suministrados por las casas comerciales Scharlau, Manuel Riesgo S.A. y Fluka.

La visualización de los fragmentos de DNA se realizó con radiación ultravioleta o por fluorescencia. En el primer caso se añadió a las muestras 1/4 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30%, azul de bromofenol al 0,2% y xilencianol al 0,2% (todas en p/v) en 40 mM EDTA (pH 8,0) y, tras finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron durante 20 minutos con GelRedTM NucleicAcid gel stain (VWR). Como patrón de tamaño molecular se utilizó el marcador de 1 kb de Biotools. Para la visualización de las bandas por fluorescencia se añadió una pequeña cantidad de GelStarTM (NucleicAcid Gel Stain, Lonza Rockland) a las muestras y se utilizó como patrón de peso molecular el DNA del fago λ digerido con *Eco91I* y *BstEII* (λ DNA/*Eco91I* (*BstEII*) de Fermentas Life Sciences).

3.3.5. Protocolo de purificación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos de DNA sintéticos (suministrados por Sigma o IDT Integrated DNA Technologies) se purificaron mediante precipitación con etanol, con el fin de eliminar el exceso de sal y otros contaminantes que pudieran estar presentes en las muestras. Para ello, los oligonucleótidos liofilizados se resuspendieron en 180 μ l de agua Milli-Q autoclavada y 20 μ l de 3 M acetato sódico (pH 5,2). Para precipitar totalmente el DNA, se añadieron a continuación 600 μ l de etanol al 99% enfriado a -20°C y la mezcla se incubó unos 30 minutos a esta temperatura. La solución resultante se centrifugó a 16000 x *g* durante 5 minutos (Eppendorf Centrifuge 5415 R), se lavó el precipitado a temperatura ambiente con 400 μ l de una solución de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 16000 x *g* durante 10 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar al aire el precipitado para eliminar los restos de etanol y se disolvió en 100 μ l de agua Milli-Q autoclavada. La concentración de oligonucleótido tras la purificación se determinó midiendo la DO_{260} en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu UV-2100), utilizando el coeficiente de extinción molar proporcionado por la casa comercial en cada caso.

3.3.6. Construcción de mutantes de *LytB*

3.3.6.1. Construcción de los mutantes E585A y D618A

La construcción de los mutantes puntuales E585A y D618A se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Pedro García (Dpto. de Genética Microbiana del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) mediante el método de extensión de cebadores solapantes (Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989), en el que se utilizan dos oligonucleótidos encargados de introducir la mutación deseada (E585A Fw y E585A Rv, para el mutante E585A, y D618A Fw y D618A Rv, para el D618A) y otros dos que flanquean el gen *lytB* en sus extremos 5' (LytB-N2) y 3' (LytB-C) (Figura 3.1 y Tabla 3.2).

El proceso de mutagénesis implica, inicialmente, dos reacciones de PCR independientes en las que se emplean, por un lado, los oligonucleótidos LytB-N2 y E585A Rv o D618A Rv y ,por otro lado, LytB-C con E585A Fw o D618A Fw, para generar dos fragmentos solapantes del gen que contendrán la mutación deseada. El primero de ellos incluye el codón de iniciación del gen y termina tras la introducción de la mutación, y el segundo abarca desde la región de la mutación hasta el codón stop. En una tercera reacción de PCR se produce la hibridación de ambos fragmentos, sirviendo el extremo 3' de la región solapante de cada hebra como cebador para la extensión de la hebra complementaria, y el producto resultante se amplifica, a continuación, tras añadir los oligonucleótidos que contienen los codones de iniciación y terminación (LytB-N2 y LytB-C, respectivamente).

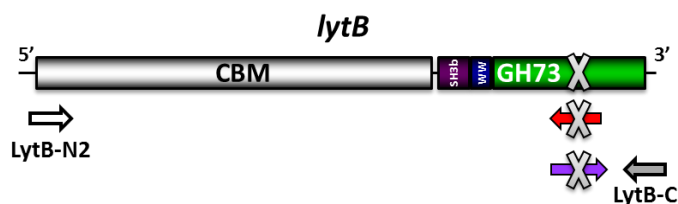


Figura 3.1. Esquema del gen *lytB* en el que se indica, mediante una cruz en color gris, el lugar donde se va a introducir la mutación deseada. Mediante los cebadores LytB-N2 (flecha blanca) y E585A Rv o D618A Rv (flecha roja), se generaría el primero de los fragmentos solapantes (primera reacción de PCR). Los cebadores LytB-C (flecha gris) y E585A Fw o D618A Fw (flecha morada) se emplearían para la obtención del segundo fragmento (segunda reacción de PCR).

En todas estas reacciones se empleó la DNA polimerasa *Pfu*, por su capacidad de amplificar grandes regiones de DNA con baja tasa de error, y como molde el DNA cromosómico de la cepa R6 de *S. pneumoniae*. Los cebadores utilizados, cuya secuencia se muestra en la Tabla 3.2, fueron suministrados por Sigma. Para las dos primeras reacciones de PCR se utilizaron 300 ng del DNA molde, 0,5 μ M de cada cebador, 250 μ M de dNTPs (Biotools), 3 μ l de la polimerasa *Pfu* (1 unidad/ μ l) y el correspondiente tampón comercial, en un volumen final de 100 μ l. Las condiciones utilizadas en las distintas etapas de cada PCR se indican en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Condiciones utilizadas en las dos primeras PCRs incluidas en el método de mutagénesis específica mediante PCRs solapantes

Etapa	Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación	1	95°C	5 min
Desnaturalización		95°C	30 seg
Hibridación	30	53-62°C ¹	40 seg
Extensión		72°C	0,7-5 min ²
Extensión final	1	72°C	5 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

¹La temperatura de hibridación se ajustó teniendo en cuenta la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos ($T = T_m - 5^\circ\text{C}$).

²2 min por cada kb a amplificar.

Para la tercera reacción de PCR se emplearon como moldes 100 ng de cada uno de los fragmentos de DNA generados en las dos reacciones anteriores, 250 μ M de dNTPs y 3 μ l de la polimerasa *Pfu*, con su correspondiente tampón comercial, en un volumen final de 80 μ l. Tras la hibridación y extensión de los fragmentos (dos ciclos de 3 min a 50°C y 5 min a 72°C), se añadieron los cebadores LytB-N2 y LytB-C a una concentración

final de 0,5 μM y la reacción de amplificación tuvo lugar en las condiciones indicadas en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Condiciones empleadas en la tercera PCR incluida en el método de mutagénesis específica mediante PCRs solapantes

Etapa	Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación	1	95°C	5 min
Desnaturalización		95°C	30 seg
Hibridación	30	50-55°C ¹	40 seg
Extensión		72°C	5 min
Extensión final	1	72°C	5 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

¹La temperatura de hibridación se ajustó teniendo en cuenta la T_m de los oligonucleótidos ($T = T_m - 5^\circ\text{C}$).

Los productos resultantes de las reacciones de PCR se purificaron (ver apartado 3.3.1) y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7 o 1,5%. Los fragmentos de interés se recuperaron del gel de agarosa con el mismo kit empleado para la purificación de los productos de PCR.

Una vez obtenido el gen mutado y antes de proceder a la ligación en el plásmido pGEM®-T Easy Vector, se añadieron adeninas a los extremos utilizando la DNA polimerasa *Taq*. La reacción tuvo lugar durante 30 min a 70°C y las concentraciones de los componentes fueron las siguientes: 120 ng de DNA, 200 μM dATP, 2,5 mM MgCl_2 y 5 μl de DNA polimerasa *Taq* con su correspondiente tampón comercial en un volumen final de 50 μl .

El plásmido pGEM®-T Easy Vector, empleado para obtener el inserto de interés con las dianas de restricción completas, contiene los promotores T7 y SP6 flanqueando una región de clonaje múltiple (MCS) localizada dentro de la zona codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa. La inactivación de dicho péptido, por inserción de un fragmento de DNA en la región codificante, permite la identificación de clones recombinantes mediante un cribado por color (blanco/azul) de las colonias crecidas en placa. La ligación con el plásmido pGEM®-T Easy Vector se realizó a temperatura ambiente mediante incubación con la ligasa del fago T4 (Takara) durante 2,5 horas en las siguientes condiciones: 1 μl de vector (50 ng/ μl), 6 μl de inserto, 1 μl de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% (p/v) (Takara) y 1 μl de la ligasa con su correspondiente tampón. A continuación se transformaron células electrocompetentes de la cepa DH10B de *E. coli* con 10 μl de DNA plasmídico (50 ng) (ver apartado 3.3.2) y las posibles

colonias portadoras del plásmido con el gen *lytB* mutado (positivos) se identificaron en placa por su coloración blanca.

La incorporación del plásmido portador del gen mutado se verificó mediante PCR tras la lisis térmica de las células seleccionadas. En la reacción se utilizaron 4 μ l del DNA molde, 0,5 μ M de cada cebador (LytB-N2 y LytB-C), 250 μ M dNTPs y 0,5 μ l de la polimerasa *Taq*, con su correspondiente tampón comercial, en un volumen final de 50 μ l. Mediante electroforesis en geles de agarosa se seleccionaron los posibles positivos, que se crecieron en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml). Tras purificar los plásmidos correspondientes (véase apartado 3.3.3) y comprobar por secuenciación la presencia de la mutación, se amplificó el gen completo, se cortó con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI* (Takara) y se clonó en el vector de expresión pT7-7 (Tabor, 1990), cortado con las mismas enzimas de restricción. En pT7-7 la expresión del gen *lytB* mutado está bajo el control del promotor T7, inducible por IPTG y la cepa receptora para su correcta expresión es la BL21(DE3) de *E. coli*. La secuenciación nucleotídica de todos los DNAs obtenidos por clonación se verificó mediante el envío de las muestras al Servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB (Secugen).

3.3.6.2. Construcción de los mutantes D596A, D607A, D619A, D621A, E633A, D637A, E653A, D657A, E662A y E673A

Para la construcción de estos mutantes se empleó el método de mutagénesis dirigida. Dicha técnica permite introducir mutaciones puntuales por modificación de uno o más nucleótidos del gen mediante una única reacción de amplificación del plásmido completo (Figura 3.2) (Wang y Wilkinson, 2000), a diferencia de otros métodos que incluyen varias reacciones de PCR; como por ejemplo el empleo para la obtención de los mutantes E585A y D618A de *LytB*.

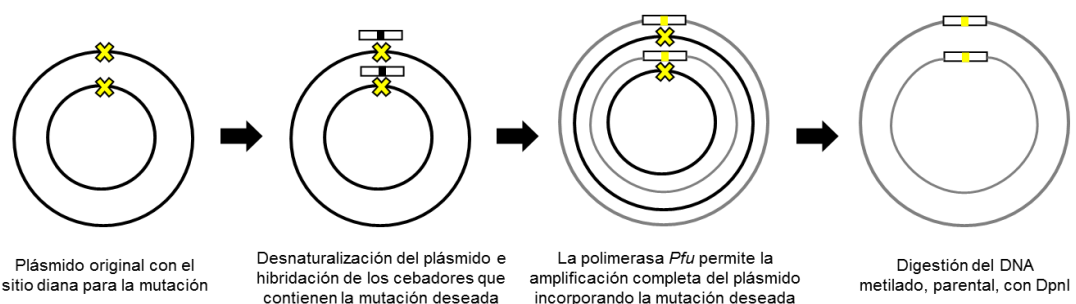


Figura 3.2. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida que ilustra la introducción de una mutación puntual. El plásmido original se representa en negro, el mutado en gris y la posición de la mutación mediante una cruz amarilla (adaptado del protocolo de QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene).

Los mutantes se construyeron utilizando el plásmido pRGR5 (De las Rivas *et al.*, 2002), cedido por el Dr. Pedro García. Este plásmido proviene de la ligación del vector pT7-7 y la región del gen de *lytB* que codifica para la proteína madura en la cepa M31 de *S. pneumoniae*; ambos previamente digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI* (Figura 3.3). La expresión de *LytB* en pRGR5 está bajo el control del promotor T7.

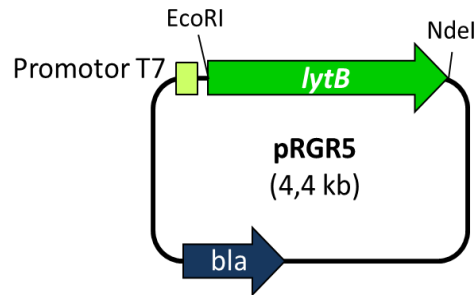


Figura 3.3. Representación esquemática del plásmido pT7-7 con el gen *lytB* clonado, sin péptido señal, entre las dianas de restricción de las enzimas *NdeI* y *EcoRI* (pRGR5). El gen *bla* codifica para una β -lactamasa que confiere la resistencia a la ampicilina.

Para la construcción de cada mutante se emplearon dos cebadores (Fw y Rv) de secuencia inversa y complementaria, con los que se introdujo el cambio del aminoácido deseado y cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3.2. Para el diseño de estos oligonucleótidos (encargados a IDT Integrated DNA Technologies) se deben tener en cuenta, en la medida de lo posible, los siguientes factores:

- i) Ambos deben hibridar con la misma secuencia del DNA molde pero en hebras opuestas.
- ii) Su longitud debe estar comprendida entre 25 y 45 pares bases y su T_m debe ser igual o superior a 78°C .
- iii) El contenido óptimo en citosinas y guaninas es del 40% y los extremos deben finalizar en una o más de estas bases. De este modo se aumenta la estabilidad de la unión entre el cebador y la hebra de DNA y, por tanto, el rendimiento de la reacción de PCR (el apareamiento entre citosinas y guaninas genera más puentes de hidrógeno que entre adeninas y timinas).

En la reacción de PCR se utilizaron 180-220 ng del DNA molde (plásmido pRGR5), 0,5 μM de cada cebador (Fw y Rv), 260 μM dNTPs y 1,5 μl de la DNA polimerasa *Pfu*, con su tampón comercial, en un volumen final de 50 μl . El procedimiento de “termociclado” se detalla en la Tabla 3.5. Finalizada la PCR se añadió la enzima de restricción *DpnI* (Thermo Scientific) para digerir el DNA metilado procedente de las células con el genotipo silvestre. La incubación tuvo lugar a 37°C durante 1 h, utilizando 1 μl de enzima y su correspondiente tampón. El resultado de la reacción se evaluó mediante

electroforesis en gel de agarosa al 0,7 o 1%. Tras transformar células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido obtenido (véase apartado 3.3.2), se crecieron cultivos en medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se comprobó, mediante secuenciación, la incorporación de la mutación y la correcta secuencia del resto del gen en los posibles positivos. Estos plásmidos se clonaron, para la posterior sobreproducción de la proteína mutada, en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*.

Tabla 3.5. Condiciones empleadas en la reacción de PCR utilizada para construir los mutantes D596A, D607A, D619A, D621A, E633A, D637A, E653A, D657A, E662A y E673A de LytB

Etapa	Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación	1	95°C	5 min
Desnaturalización		95°C	30 seg
Hibridación	30	58,8-61,5°C ¹	40 seg
Extensión		72°C	9,5 min
Extensión final	1	72°C	5 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

¹La temperatura de hibridación se ajustó teniendo en cuenta la T_m de los oligonucleótidos ($T = T_m - 5^\circ\text{C}$).

3.4. Expresión y purificación de LytB

Tanto la proteína silvestre como los mutantes se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Los cultivos (1-2 litros) se crecieron a 37°C en medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hasta alcanzar la densidad óptica óptima a 600 nm ($\text{DO}_{600} \approx 0,6-0,8$). En ese momento se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 0,5 mM y los cultivos permanecieron con agitación toda la noche a 24°C. Las células se recolectaron por centrifugación a 4°C (20 min a 10000 $\times g$) y el sedimento celular se resuspendió en 15 ml de tampón fosfato sódico 20 mM (sal monosódica de Sigma y sal disódica de Panreac; a partir de ahora tampón Pi), pH 7,0, por cada litro de cultivo y se almacenó a -20°C hasta su lisis. La rotura celular se llevó a cabo una prensa de French (French® Pressure Cell Press-Thermo) a 1200 psi. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (20 minutos a 20000 $\times g$) y los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante se precipitaron añadiendo sulfato de estreptomicina al 0,8% (p/v). Tras incubar la mezcla durante 30 minutos a 4°C con agitación suave, se separó el precipitado por centrifugación (30 min a 20000 $\times g$) y se añadió NaCl (1M final) al sobrenadante, donde se encuentra LytB.

La proteína se purificó a 4°C por cromatografía de afinidad utilizando como soporte DEAE-celulosa, cuyos grupos di-etilaminoetanol son reconocidos como análogos de

colina por los CBMs (Sanz *et al.*, 1988). Tras cargar el sobrenadante en la columna, previamente equilibrada con tampón Pi (pH 7,0), se procedió a lavar con el tampón de equilibrado suplementado con 1,5 M NaCl a un flujo de aproximadamente 1 ml/min, hasta eliminar todos los demás componentes retenidos en la columna. Se procedió entonces a eluir la proteína mediante lavado con tampón Pi (pH 7,0) con 100 mM NaCl y 280 mM cloruro de colina (Sigma) y las fracciones de proteína se almacenaron a -20°C en alícuotas de 1 ml y concentración no superior a $\approx 63 \mu\text{M}$, ya que se observó una mayor tendencia a formar agregados cuando se almacenaba a concentraciones elevadas.

El contenido de las fracciones de proteína se analizó por SDS-PAGE, espectrometría de masas (espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización y desorción por láser asistida por matriz) (MALDI-TOF) y cromatografía de exclusión molecular (véase apartado 3.5), observándose la formación de agregados y, en algunos casos, la aparición de fragmentos de menor masa molecular. Para obtener muestras molecularmente homogéneas, la proteína eluida de la columna de afinidad se purificó por cromatografía de exclusión molecular en una columna de dextrano-agarosa (Superdex 200 prep grade, de GE Healthcare), acoplada a un sistema de inyección FPLC AKTÄ Purifier (GE Healthcare) y refrigerada a 4°C. El tampón empleado para el equilibrado y la elución de las muestras fue Pi, pH 8,0, suplementado con 140 mM colina, y la velocidad de flujo 0,5-1 ml/min. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se monitorizó la absorbancia a 280 nm y 260 nm. Las muestras volvieron a analizarse por SDS-PAGE, juntando las fracciones homogéneas, que se almacenaron a -20°C para su conservación. Antes de ser utilizadas, todas las muestras de proteína se dializaron frente al correspondiente tampón de medida (5 x 500-700 ml) durante al menos 24 horas y se centrifugaron a $13000 \times g$ durante 5 min para eliminar posibles precipitados.

3.5. Técnicas de análisis de proteínas

3.5.1. Determinación de la concentración de proteína

Las concentraciones se determinaron espectrofotométricamente (Shimadzu UV-2100) utilizando, para todas las formas purificadas de LytB, un coeficiente de extinción molar (ϵ_{280}) de $265199 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinado experimentalmente con el método de Gill y von Hippel (1989).

3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La pureza de las muestras de proteína se analizó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando geles de poliacrilamida al 12%, salvo que se

indique lo contrario. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y voltaje constante (≈ 170 mV) según la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron en una solución al 0,25% (p/v) de azul de coomassie en metanol (45%; v/v) y ácido acético (5%; v/v) y se destiñeron en el mismo solvente. Los patrones de masa molecular, el azul de coomassie, la acrilamida (40% acrilamida/bis-acrilamida 29:1) y el SDS se adquirieron en Bio-Rad, el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) en Thermo Scientific y el APS (persulfato amónico) y los productos utilizados en los tampones de electroforesis en SIGMA.

3.5.3. Cromatografía analítica de exclusión molecular

El análisis de la homogeneidad de las fracciones de proteína eluidas de la columna de afinidad, se realizó en una columna analítica Superose[®] 12 HR 10/30 de Amersham Biosciences, acoplada a un sistema de inyección FPLC AKTÄ Purifier (GE Healthcare) y refrigerada a 4°C. El tampón empleado para el equilibrado y la elución de las muestras fue Pi (pH 8,0) suplementado con 140 mM colina y la velocidad de flujo 0,5-1 ml/min.

3.5.4. Espectrometría de masas

Los espectros de masas de las muestras de proteína se obtuvieron en el servicio de espectrometría de masas del Instituto de Química-Física "Rocasolano". Los experimentos se realizaron en modo positivo utilizando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo y desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), modelo Voyager DEPRO (Applied Biosystems), equipado con un láser de nitrógeno y una fuente iónica con extracción retardada. Los iones positivos generados por la desorción láser fueron introducidos en el tubo de vuelo (1,3 m de longitud) con un voltaje de aceleración de 25 kV, trabajándose en modo lineal. Los espectros se obtuvieron recogiendo una media de 600 disparos y la matriz utilizada fue ácido sinapínico (Fluka) a 10 mg/ml (0,3% TFA: acetonitrilo, 70:30). La calibración de los espectros se realizó de forma externa utilizando BSA.

3.5.5. Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación se realizaron a 20°C en una ultracentrífuga Optima XL-A (Beckman Coulter) equipada con un sistema óptico de detección (UV-visible) y se utilizó un rotor *An50Ti* (Beckman). Los experimentos de velocidad de sedimentación se efectuaron a 45000 rpm (200000 x g) en células de doble sector con un paso óptico de 12 mm y un volumen de muestra de 400 μ l, utilizando una concentración de $\approx 1,6$ μ M de LytB. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó a partir del ajuste de la variación de los perfiles de

sedimentación con el tiempo utilizando el programa SEDFIT (Schuck y Rossmannith, 2000), con el que se calcularon también los coeficientes de sedimentación en agua a 20°C ($s_{20,w}$). Los experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron en células de doble sector con un cuerpo central de seis agujeros y un paso óptico de 12 mm. Las medidas se realizaron a 15000 rpm (18000 x g), 2,3 μ M de proteína y, con el volumen de muestra utilizado (80 μ l), el equilibrio se alcanzó en menos de 12 horas. La masa molecular aparente promedio se calculó utilizando el modelo correspondiente a una especie ideal para ajustar los datos experimentales (Minton 1994) con el programa Hetero Analysis (www.biotech.uconn.edu). El volumen específico de LytB (0,727 ml g^{-1}) se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos con el programa Sednterp, empleado asimismo para calcular la viscosidad y la densidad de los tampones empleados a partir de la composición (Laue *et al.*, 1992).

3.5.6. Dicroísmo circular (DC)

3.5.6.1. Recogida de espectros

Los experimentos de DC se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-810 (Jasco-España) equipado con un sistema Peltier para el control de temperatura. Los espectros se registraron a 20 nm/min, con un tiempo de respuesta de 4 segundos y se recogieron datos cada 0,2 nm. Todos los espectros se registraron al menos por duplicado y cada réplica es el promedio de 3 o 4 acumulaciones con el fin de mejorar la relación señal/ruido. Para las medidas en el UV-lejano se utilizaron concentraciones de proteína en torno a 2 μ M y cubetas de cuarzo con paso óptico de 0,1 cm, mientras que en el UV-cercano se trabajó a una concentración de 10 μ M y con cubetas de 1 cm de paso óptico. Tras sustraer la contribución del tampón, los espectros experimentales de la proteína se transformaron en elipticidades molares por residuo, $[\Theta]_{MR}$, utilizando la ecuación 3.1, donde θ es el valor experimental de la elipticidad, C_{MR} la concentración molar por residuo (calculada a partir de la masa molecular (M_w), el número de aminoácidos de la proteína (n° aa) y la concentración en mg/ml (C_{prot})), y l es el paso óptico de la cubeta en metros (0,001 m):

$$\text{Ec. 3.1.} \quad [\Theta]_{MR} = \theta / (C_{MR} \cdot l) \quad C_{MR} = C_{prot} / (M_w \cdot n^\circ \text{ aa})$$

3.5.6.2. Experimentos de desnaturalización térmica

La estabilidad térmica de LytB se caracterizó por DC registrando las variaciones inducidas por el aumento de la temperatura en la elipticidad de la proteína a longitud de onda fija. En algunos experimentos se recogió también el espectro en el UV-lejano a determinadas temperaturas. Las medidas se realizaron a velocidad de calentamiento

constante (60°C/h o 45°C/h) y se adquirieron datos cada 0,2°C. En todos los casos se realizaron barridos en paralelo con el tampón, o se recogieron espectros, para sustraer su contribución de las curvas experimentales obtenidas con la proteína. El grado de reversibilidad de las transiciones térmicas se verificó comparando el espectro a 20°C de la proteína previamente desnaturalizada con el de la forma nativa.

La adquisición y el tratamiento de los datos experimentales, tanto en el caso de los espectros como para los barridos de temperatura, se realizaron con el paquete informático Spectra Manager (Jasco-España). Los perfiles de desnaturalización térmica a longitud de onda fija se ajustaron a una o dos sigmoides, dependiendo del número de transiciones observadas, utilizando la ecuación 3.2:

$$\text{Ec. 3.2} \quad \Theta(T) = \Theta_N + \sum_{i=1}^n \Delta\Theta_i \left\{ \exp\left[-\frac{H_D^i(T_{1/2}^i - T)}{R \cdot T \cdot T_{1/2}^i}\right] \right\} / \left\{ 1 + \exp\left[-\frac{H_D^i(T_{1/2}^i - T)}{R \cdot T \cdot T_{1/2}^i}\right] \right\}$$

siendo $\Theta(T)$ la elipticidad a la temperatura T (grados Kelvin), Θ_N la elipticidad de la proteína nativa, n el número de transiciones, R la constante de los gases, y $\Delta\Theta_i$, $T_{1/2}^i$ y H_D^i el incremento de la elipticidad, la temperatura media de transición y el parámetro que describe la cooperatividad (pendiente) para la transición i .

3.5.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La estabilidad térmica y la organización modular de LytB se estudiaron también por DSC. Los experimentos se llevaron a cabo en un microcalorímetro diferencial de barrido (modelos MCS-DSC y VP-DSC de MicroCal Inc.) a velocidad de calentamiento constante. Para evitar distorsiones de la señal debidas a la formación de burbujas, los experimentos se realizaron a una presión de aproximadamente 2 atmósferas y tanto las muestras de LytB (3,8-10,0 μM) como el tampón de diálisis, cargado en la celda de referencia, se desgasificaron previamente. La reversibilidad de la desnaturalización de LytB se verificó realizando barridos consecutivos con la misma muestra. La adquisición de datos se realizó con los programas MCS- o VP-Observer para DSC y el análisis de los termogramas con Origin-DSC. Tras restar la línea de base instrumental (obtenida antes de realizar los experimentos con el tampón de diálisis cargado en ambas células), las curvas experimentales de la proteína se transformaron en capacidades caloríficas molares (dividiendo por el nº de moles de proteína en la celda de medida) y la variación de capacidad calorífica entre el estado nativo y el desnaturalizado en la región de la transición se aproximó, habitualmente, mediante una función cúbica.

3.5.8. Calorimetría de valoración isoterma (ITC)

La valoración de LytB con colina, fosforilcolina (P-colina) y glicerofosforilcolina (G-P-colina) (suministradas por Sigma) se llevó a cabo por ITC utilizando un microcalorímetro VP-ITC (GE-Healthcare). Las medidas se realizaron a 25°C en tampón Pi (pH 8,0) y se inyectó, de forma controlada y progresiva, una solución concentrada (0,1 M) del ligando, preparada en el tampón de diálisis de la proteína, en la célula de reacción (\approx 1,4 ml), previamente cargada con la solución de proteína (\approx 52 μ M). La contribución del calor de dilución del ligando se determinó en experimentos independientes cargando la celda de reacción con el tampón de diálisis y se sustrajo del calor experimental de reacción obtenido con la proteína. La recogida y el tratamiento de los datos experimentales se realizaron con los programas VP-Observer y Origin-ITC, respectivamente.

3.6. Ensayos de actividad enzimática

3.6.1. Aislamiento y purificación de paredes celulares

La obtención de paredes celulares de *S. pneumoniae* se llevó a cabo en el laboratorio del Prof. Dr Waldemar Vollmer, en el “Centre For Bacterial Cell Biology” de la Escuela de Medicina de la Universidad de Newcastle upon Tyne (Gran Bretaña), según el protocolo descrito por Bui *et al.* (2012). Se crecieron cultivos de las cepas R6B, R36A, R36A::pgdA, Pen6, Pen6adr y CS1 a 37°C en medio complejo C+Y conteniendo 1 mg/ml de extracto de levadura y, al alcanzar una $DO_{620} \approx 0,5-0,6$, se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 4°C durante 20 min a 10000 $\times g$. Los precipitados se resuspendieron en frío en 30 ml de 50 mM Tris/HCl (pH 7,0) (Trizma® Base Sigma) por cada litro de cultivo crecido y se fue añadiendo la mezcla, gota a gota, sobre una solución de SDS (Fluka) al 5% ligeramente hirviendo y en agitación, para inactivar las enzimas degradativas (Fischer, 1997). La solución se mantuvo en estas condiciones durante 15 min y se centrifugó a 25°C (30 min a 12000 $\times g$). Para eliminar el SDS, los precipitados se lavaron dos veces con 1 M NaCl a 60°C y, a continuación, con agua Milli-Q a la misma temperatura (resuspensión y centrifugación en las condiciones arriba indicadas). Para comprobar la eliminación del SDS de las muestras se realizó el test de “Hayashi”, en el cual se mezclan 335 μ l del sobrenadante obtenido en la última centrifugación con 7 μ l de azul de metileno al 0,5%, 170 μ l de fosfato sódico 0,7 M (pH 7,2) y 1 ml de cloroformo. Si la fase inferior de la mezcla aparece transparente o de color rosado significa que las muestras están libres de SDS; en caso contrario toma un color azulado y se debe continuar con el proceso de lavado.

La rotura celular se realizó con bolas de vidrio utilizando el homogenizador “Precellys 24” de Bertin Technologies. Las muestras, compuestas en una tercera parte

por bolas de vidrio (Glass beads, acid-washed, Sigma) y en dos terceras partes por los precipitados celulares resuspendidos en agua Milli-Q, se distribuyeron en tubos de 2 ml y se sometieron a 12 ciclos (velocidad máxima) con la siguiente secuencia: pulso de 40 seg, descanso de 60 seg, pulso de 40 seg, descanso de 5 min en hielo. Tras eliminar las bolas de vidrio por filtración, los lisados celulares se centrifugaron durante 5 min a $2000 \times g$ y 4°C , y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de ultracentrifugación. Los restos celulares se resuspendieron en 15 ml de agua Milli-Q y se centrifugaron de nuevo y, una vez juntos, todos los sobrenadantes se centrifugaron a temperatura ambiente durante 30 min a $25000 \times g$. El precipitado de cada tubo se resuspendió en 10 ml de 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) y 20 mM MgSO_4 (Sigma) y se trató a 37°C con DNasa y RNasa (Sigma) a concentraciones finales de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente, durante 2 h con agitación. A continuación, se añadió CaCl_2 (10 mM) (Sigma) y tripsina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Novagen) y la muestra se incubó con agitación a 37°C durante 18 h. Las enzimas se inactivaron añadiendo SDS (1% final) y agua Milli-Q, hasta alcanzar un volumen final de 20-30 ml y, tras incubar la mezcla a 80°C durante 15 min, se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 min a $25000 \times g$. El precipitado de cada tubo se resuspendió en 10 ml de 8 M LiCl (Sigma) y la mezcla se incubó a 37°C 15 min. Tras centrifugar y resuspender el precipitado en 10 ml de 100 mM EDTA (Fluka) a pH 7,0, se volvió a incubar, otros 15 min a 37°C , y a centrifugar, lavando los precipitados resultantes con 20 ml de agua Milli-Q, acetona (Sigma) y agua Milli-Q de nuevo. Tras la última centrifugación se resuspendieron las paredes en 1-3 ml de agua Milli-Q, se congelaron a -80°C y, finalmente, se liofilizaron (Christ Alpha 1-2 LDplus Freeze-drier) y se almacenaron a -80°C .

3.6.2. Aislamiento y purificación del PG

Para aislar el PG se trataron las paredes celulares purificadas según el procedimiento descrito en el apartado anterior con ácido fluorhídrico (HF), que hidroliza los enlaces fosfodiéster que unen los WTAs a las cadenas de mureína. Para ello, a 5 mg de paredes liofilizadas se añadieron 3 ml de una solución de HF al 48% (Sigma) y la mezcla, cubierta con parafilm, se incubó con agitación a 4°C durante 48 h. Las muestras se centrifugaron después a 4°C (60 min a $2651 \times g$) y los precipitados de PG obtenidos se lavaron, en frío, dos veces con agua Milli-Q, dos veces con 100 mM Tris/HCl (pH 7,0) y una vez más con agua Milli-Q (3 ml cada vez). Tras la última centrifugación, el precipitado de PG se resuspendió en 500 μl de agua Milli-Q con un 0,05% de NaN_3 (Sigma) y las muestras se almacenaron a 4°C .

3.6.3. Caracterización de los productos de hidrólisis de la pared celular

Para identificar los muropéptidos liberados durante la hidrólisis de las paredes celulares de neumococo por LytB, se incubaron paredes ($\approx 0,40$ mg) aisladas de diferentes cepas de neumococo con la enzima ($1,26 \mu\text{M}$), en tampón Pi (pH 7,0) suplementado con 100 mM NaCl , en un volumen total de $200 \mu\text{l}$. Las muestras se mantuvieron a 37°C con agitación y, tras 24 h , se volvió a añadir la misma cantidad de enzima. La reacción se paró poniendo las muestras en hielo y, para aislar los muropéptidos solubilizados, se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 min a $16000 \times g$ y los sobrenadantes se guardaron a -20°C . El mismo procedimiento se siguió para la caracterización de los muropéptidos liberados con la lisozima cellosyl (proporcionada por Hoechst. Frankfurt, Germany). En este caso el sustrato utilizado fue el PG de neumococo y la reacción se llevó a cabo con $50 \mu\text{l}$ de la solución de PG ($\approx 0,25 \text{ mg}$) y cellosyl a una concentración final de $2,2 \mu\text{M}$. El volumen final se ajustó a $200 \mu\text{l}$ con 80 mM fosfato sódico (pH 4,8) y la reacción se paró hirviendo las muestras durante 10 min a 100°C . Como se describe en los apartados siguientes, los muropéptidos se redujeron con borohidruro sódico (NaBH_4) (MERCK) antes de ser analizados por HPLC y espectrometría de masas.

3.6.3.1. Reducción de los muropéptidos

Antes de proceder al análisis por HPLC, las muestras de los muropéptidos solubilizados por la acción de LytB o cellosyl se descongelaron, se llevaron a sequedad en un "speed vac" (Scanlaf. Scanvac. Centrifuge for vacuum concentrator) y se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de agua Milli-Q y $100 \mu\text{l}$ de $0,5 \text{ M}$ borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) (Sigma) a pH 9,0. Las tapas de los tubos se perforaron y se añadió una pequeña cantidad en polvo de NaBH_4 , tras lo cual las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente durante 30 min a $16000 \times g$ y se paró la reacción ajustando el pH a 4-5 con ácido fosfórico al 20% (H_3PO_4) (Fluka). Por último, las muestras se centrifugaron 15 min a $16000 \times g$ y los sobrenadantes, conteniendo los muropéptidos reducidos, se almacenaron a 4°C hasta su análisis por HPLC.

3.6.3.2. Separación e identificación de los muropéptidos por HPLC y espectrometría de masas

Los muropéptidos se separaron por HPLC en una columna de fase reversa (Prontosil 120-3-C18-AQ, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, partículas de $3 \mu\text{M}$, Bischoff, Germany) utilizando un equipo Agilent 1100 operado con el paquete de programas ChemStation. La elución se llevó a cabo a 55°C aplicando un gradiente lineal de 135 min desde el 100% de tampón A (10 mM Pi (pH 6,0) y $10 \mu\text{M NaN}_3$) al 100% de tampón B (10 mM Pi (pH 6,0) y 30% metanol (Sigma)), utilizando un flujo de $0,5 \text{ ml/min}$. La detección de los muropéptidos se llevó a cabo midiendo la DO_{205} y el área relativa de los picos se calculó por

integración tomando como 100% el área del cromatograma (excluyendo las fracciones de sal que eluyen antes de los 8 minutos). Las fracciones con DO_{205} de al menos 20 unidades sobre la línea de base se recogieron para su posterior identificación por espectrometría de masas en tándem con ionización por electroespray (ESI-MS/MS) en el servicio de masas de la Universidad de Newcastle en un espectrómetro Finnigan LTQ-FT. En las réplicas de los experimentos realizadas en el Instituto de Química-Física "Rocasolano" se empleó una columna *Excel 120 ODS-B* (250 x 4 mm; partículas de 5 μ m) de fase reversa (*Teknokroma*) acoplada a un equipo de HPLC *Shimadzu LC-10AV VP* para separar los productos de reacción y la técnica de MALDI-TOF para los análisis de masas.

3.6.4. Actividad sobre análogos estructurales del PG

La capacidad de LytB para hidrolizar oligosacáridos de GlcNAc (actividad quitinasa), muropéptidos de pequeño tamaño como el disacárido dipéptido GlcNAc-MurNAc(-L-Ala- γ -D-Gln) (GMDP), el disacárido pentapéptido GlcNAc-MurNAc(-OCH₃)(-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) (GMPP), o el tetrasacárido GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc(OCH₃)(GM)₂ se analizó siguiendo, mediante HPLC o UPLC y espectrometría de masas, la evolución en el tiempo de dichos compuestos al ser incubados a 37°C en presencia de la enzima. Los ensayos se realizaron en tampón Pi (pH 7,0) utilizando relaciones sustrato/proteína de 20:1 y 375:1 (\approx 4 μ M LytB) y se tomaron alícuotas (\approx 40 μ l) a distintos tiempos de incubación para analizar la composición de la mezcla de reacción. Ésta se paró poniendo las alícuotas en hielo y cuando no se analizaron inmediatamente se mantuvieron congeladas a -20°C. En todos los casos se realizaron controles en paralelo sin añadir la enzima a la mezcla de incubación.

La hidrólisis de (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅ (Toronto Research Chemicals), GMDP (Calbiochem) y GMPP (proporcionado por el Prof. Dr Shahriar Mobashery) se analizó por HPLC (*Shimadzu LC-10AV VP*) en una columna *Excel 120 ODS-B* (25 x 0,4 cm; partículas de 5 μ m) de fase reversa (*Teknokroma*), a una temperatura constante de 20°C. Para la elución de los oligosacáridos se aplicó un gradiente lineal de 30 minutos desde el tampón A (50 mM Pi, 15 μ M azida sódica, pH 4,2) al tampón B (75 mM Pi, 15% metanol, pH 4,92), mientras que para los muropéptidos sintéticos se aplicó un gradiente lineal de 40 minutos de acetonitrilo (2-15%) en TFA al 0,1%. En ambos casos se utilizó un flujo de 0,5 ml/min y la detección se realizó siguiendo la DO_{205} . El análisis por espectrometría de masas se realizó en el Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química-Física "Rocasolano". Los experimentos se realizaron en un espectrómetro de masas utilizando la técnica de MALDI-TOF (véase apartado 3.5.4). Los iones positivos generados por la desorción fueron introducidos en el tubo de vuelo con un voltaje de aceleración de 20 kV, trabajándose en modo reflector. Los espectros se obtuvieron recogiendo una media de 600 disparos y la matriz utilizada fue ácido 2,5-

dihidroxibenzoico (DHB, >98% Fluka), con una concentración de 10 mg/ml en agua. Como calibración externa se usaron los valores de los iones monoisotópicos protonados $[M+H]^+$ del DHB.

La hidrólisis de $(GM)_2$ y su posterior análisis se realizó en el laboratorio del Prof. Dr Shahriar Mobashery del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Notre Dame (Indiana, EE.UU.). Para ello se empleó una columna de fase reversa (Acquity UPLC HSS T3, 150 × 2,1 mm, 1,8 μ m, Waters) y un sistema de UPLC (Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation UPLC) con un detector de fotodiodo (Dionex Ultimate 3000 photodiode array) acoplado a un espectrómetro de masas Bruker MicrOTOF-Q II quadrupole time-of-flight hybrid (UPLC/MS y UPLC/MS/MS). Las muestras se eluyeron a 40°C mediante un gradiente lineal de 15 minutos de acetonitrilo (0-5%) en ácido fórmico al 0,1% con un flujo de 0,5 ml/min y la detección se realizó siguiendo la DO_{205} .

3.6.5. Actividad dispersora sobre cadenas de neumococo

La capacidad de LytB (silvestre y mutantes) para dispersar las células hijas se analizó sobre cultivos de *S. pneumoniae* R6B, una cepa no funcional para el gen *lytB* y crece formando largas cadenas. Las células se cultivaron a 37°C en medio C+Y y el crecimiento del cultivo se siguió por turbidimetría midiendo la DO_{550} con un espectrofotómetro Thermo Scientific Helios Epsilon. Al llegar a la fase de crecimiento exponencial ($DO_{550} \approx 0,2$), se añadió LytB a una concentración final de 0,13 μ M manteniendo el cultivo a 37°C. La actividad dispersora se evaluó por microscopía de contraste de fase (microscopio Leica DM4000B; Microsystems) recogiendo muestras a distintos tiempos de incubación (30 min, 1, 2, 4 y 5 horas), en presencia y en ausencia de LytB, y se contó también el número promedio de células por cadena. Los controles se realizaron en paralelo añadiendo tampón Pi (pH 7,0) al cultivo, en vez de la enzima.

3.6.6. Ensayo sobre paredes marcadas radiactivamente

El ensayo cuantitativo de la actividad catalítica de LytB sobre paredes purificadas de neumococo (cepa R6) se realizó siguiendo el procedimiento de Mosser y Tomasz (1970). La mezcla de reacción constaba de 240 μ l de tampón Pi (pH 6,9), 10 μ l de paredes marcadas radiactivamente con $[metil-^3H]$ -colina (60 Ci/mmol; Amersham) y 10 μ l de enzima a la dilución adecuada. Tras incubar la mezcla a 37°C durante 15 min se detuvo la reacción añadiendo 10 μ l de BSA al 4% (p/v) y 10 μ l de formaldehído al 35% (v/v). Las muestras se centrifugaron a 12000 x *g* durante 10 min y se recogieron 200 μ l de sobrenadante, al que se añadió líquido de centelleo (Beckman-Coulter) para medir la cantidad de radiactividad (cpm) solubilizada. Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la solubilización de 1 μ g de pared en 10 min (Höltje y

Tomasz, 1976), lo que equivale a aproximadamente 715 cpm netas en las condiciones experimentales utilizadas (Lull *et al.*, 2006).

En los experimentos sobre muestras pre-tratadas con LytA, las paredes (20 μ l) se incubaron durante 15 min a 37°C en presencia de concentraciones muy bajas de amidasa (0,27-1,7 nM) en un volumen total de 260 μ l. Seguidamente la muestra se calentó durante 5 min a 100°C para inactivar LytA y, tras centrifugar a 10000 x g durante 2 minutos a 4°C, se añadió LytB (0,29 μ M final) y se incubó durante 15 min más. La actividad específica de LytB se determinó, en este caso, a partir de la diferencia entre la radioactividad liberada en las muestras tratadas sucesivamente con LytA y LytB y los controles realizados en paralelo, en los que sólo se añadió la amidasa o la glucosaminidasa. Los ensayos se realizaron en el laboratorio del Dr. P. García (CIB-CSIC), quien también suministró las paredes marcadas radiactivamente.

3.7. Modelización del módulo GH73 de LytB

El modelo estructural del módulo GH73 de LytB (LytB_{GH73}) se construyó mediante modelado por homología utilizando como molde la estructura cristalográfica del dominio C-terminal de la proteína flagelar FlgJ (endo- β -N-acetilglucosaminidasa) de *Sphingomonas* sp. (código UniProtKB B7XH69; código PDB 2zyc), perteneciente también a la familia GH73 de las glicosil hidrolasas (acceso Pfam PF01832).

La búsqueda de posibles patrones estructurales se llevó a cabo mediante los servidores basados en el reconocimiento del plegamiento, FUGUE (Shi *et al.*, 2001) (<http://tardis.nibio.go.jp/fugue/>), PHYRE (Kelley y Sternberg, 2009) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), SPARKS-X (Yang *et al.*, 2011) (<http://sparks-lab.org/yueyang/server/SPARKS-X/>) e I-TASSER (Zhang, 2008) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

Los modelos construidos a partir de los alineamientos generados por los distintos servidores se evaluaron tanto estereoquímica como energéticamente con los programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) y VERIFY3D (Lüthy *et al.*, 1992), respectivamente. El modelo mejor evaluado se construyó con SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>) utilizando el alineamiento generado por FUGUE. Las estructuras obtenidas fueron representadas utilizando el programa informático PyMOL (www.pymol.org/).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Purificación y caracterización de LytB

LytB se expresó en la cepa transformada de *E. coli* BL21(DE3). Los cultivos celulares se incubaron en medio LB, suplementado con ampicilina, hasta la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} \approx 0,7$) y la inducción de la expresión de la proteína se realizó a $24^{\circ}C$ durante toda la noche, tras añadir IPTG (0,5 mM). Después del lisado de las células y la eliminación de la mayor parte de los ácidos nucleicos, la proteína se purificó, al igual que otras CBPs, mediante cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa. Como puede verse en la Figura 4.1 A y B, la caracterización por SDS-PAGE de las muestras eluidas de la columna mostraba la presencia de bandas de menor tamaño molecular, particularmente en las últimas fracciones del pico de elución. Como ya se mencionaba en el artículo de De Las Rivas *et al.*, 2002, la proteína muestra una movilidad electroforética de unos 66 kDa, a pesar de que su masa molecular sea de 79,3 kDa. El análisis mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superosa® 12HR 10/30 puso de manifiesto también, la existencia de especies con distinto grado de asociación dentro de la banda correspondiente a la proteína completa en SDS-PAGE (Figura 4.1 C).

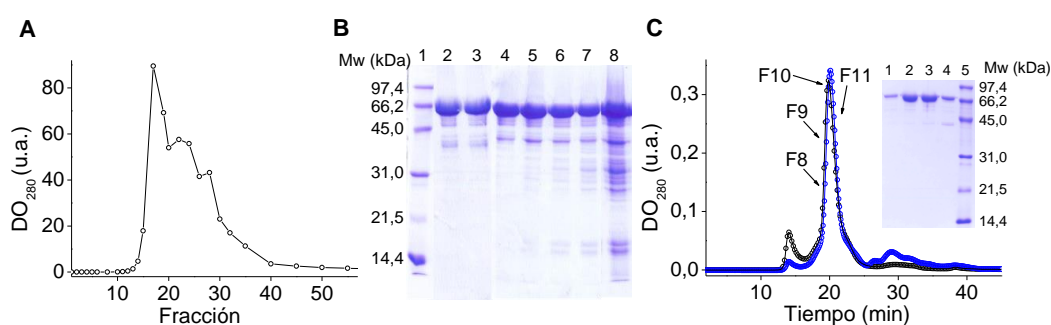


Figura 4.1. Caracterización de la proteína LytB aislada por cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa. (A) Perfil de elución de LytB con tampón Pi, pH 7,0, 100 mM NaCl, 280 mM colina. (B) Análisis por SDS-PAGE (12%) de las fracciones 19, 20, 22, 24, 26, 28 y 32 del cromatograma anterior (vías 2-8). La masa molecular de los patrones (vía 1) se indica a la izquierda. (C) Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones 17 (traza en negro) y 28 (traza azul) del perfil mostrado en (A) (tampón Pi, pH 8,0, 140 mM colina); el inserto muestra el análisis por SDS-PAGE (12%) de las fracciones 8-11 del pico mayoritario del cromatograma en negro (vías 1-4).

Con el objetivo de eliminar las especies de menor masa molecular y separar las formas con distinto estado de asociación, la proteína eluida de la columna de DEAE-

celulosa se sometió a una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200 prep grade (GE Healthcare). La muestra se eluyó con tampón Pi, pH 8,0 y 140 mM colina utilizando un flujo de 1 ml/min y se monitorizó la DO_{280} . El perfil de elución mostraba dos picos mayoritarios centrados en los minutos 43 y 70 (Figura 4.2 A), cuyas intensidades relativas variaban con la concentración y el tiempo de almacenamiento de la muestra a -20°C (datos no mostrados). Las masas moleculares obtenidas por MALDI-TOF para las especies presentes en los picos 1 y 3 eran comparables (79396 Da y 79425 Da, respectivamente) y concordaban con el valor teórico esperado para la forma madura de LytB (79317 Da), al igual que la movilidad electroforética (Figura 4.2 B). Como se muestra en la Figura 4.2 C, el análisis mediante velocidad de sedimentación de las formas de LytB presentes en ambos picos puso de manifiesto que, aproximadamente un 88% de las moléculas presentes en el pico 3 sedimentaban con un coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) de 3,9 S, mientras que en el pico 1 coexistían al menos cuatro especies distintas con valores de $s_{20,w}$ de 3,7 S, 6,4 S, 9,3 S y 14,4 S. La masa molecular promedio obtenida por equilibrio de sedimentación para la forma aislada en el pico 3 (Figura 4.2 D) fue de 80,6 kDa (media de cuatro experimentos), lo que corresponde a 1,02 veces la masa del monómero.

Como puede verse en la Figura 4.3, la formación de agregados, o los procesos que dan lugar a los mismos, alteran la estructura de la proteína, ya que no sólo afectan al espectro de DC en la región del UV-cercano, sensible a las estructuras terciaria y cuaternaria, sino que además modifican el espectro recogido en la región del UV-lejano, donde las contribuciones mayoritarias son debidas a la configuración del enlace peptídico. Cabe destacar que en el caso de las proteínas de unión a colina el espectro en la región del UV-lejano presenta un máximo centrado en torno a los 224 nm que se debe a la contribución de las cadenas laterales de los residuos aromáticos (Figura 4.3 A) (Medrano *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2004) (LytB contiene 64 tirosinas, 38 triptófanos y 31 fenilalaninas).

Ambas formas de la proteína, monómeros y agregados, fueron evaluadas a nivel funcional mediante ensayos de actividad sobre cultivos de la cepa R6B de *S. pneumoniae* (*lytB*⁻) que, al no ser funcional para el gen *lytB*, crece formando largas cadenas celulares. Como puede verse en la Figura 4.4, todas las formas de la proteína son activas o evolucionan hacia la forma/s activa de LytB en presencia del sustrato, ya que tanto la adición exógena del monómero como de los oligómeros aislados por cromatografía de exclusión molecular, o la mezcla de los mismos procedente de la purificación por cromatografía de afinidad, hace desaparecer las largas cadenas de bacterias observadas en ausencia de LytB. No obstante, los resultados obtenidos parecen indicar que la separación de las células hijas podría ser algo más lenta cuando LytB está parcial o totalmente agregada (Figura 4.4 D).

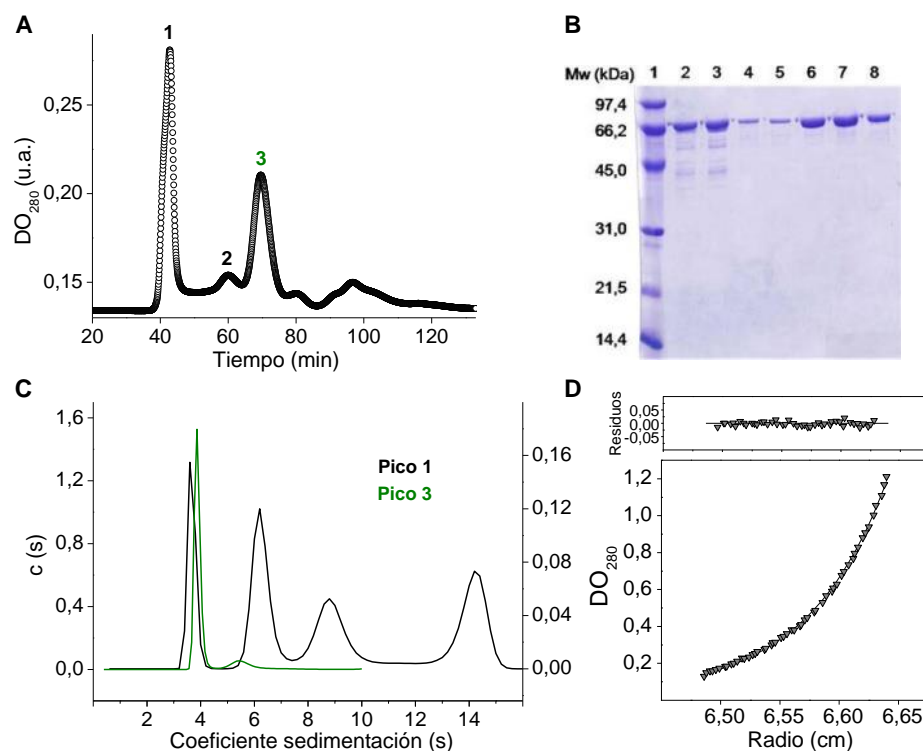


Figura 4.2. Caracterización de las diferentes formas de LytB aisladas por cromatografía de exclusión molecular. (A) Perfil cromatográfico de una fracción de proteína procedente de la columna de DEAE-celulosa. (B) Análisis por SDS-PAGE (12%) de las fracciones 4, 6 (pico 1), 21, 23 (pico 2), 31, 33 y 35 (pico 3) (vías 2-8) del cromatograma mostrado en A. (C) Distribución de coeficientes de sedimentación a 20°C de LytB en las muestras correspondientes a los picos 1 y 3 (medidas realizadas a 20°C en tampón Pi, 140 mM colina, pH 8,0). Las escalas en el eje derecho e izquierdo de las ordenadas corresponden a las muestras de los picos 1 y 3, respectivamente. (D) Perfil de sedimentación en el equilibrio de la forma de LytB presente en el pico 3 obtenido a 15000 rpm y 2,3 μM de proteína (tampón Pi, pH 8,0, 140 mM colina). La curva continua corresponde al perfil de sedimentación teórico para una especie única con una Mw aparente de 81,6 KDa.

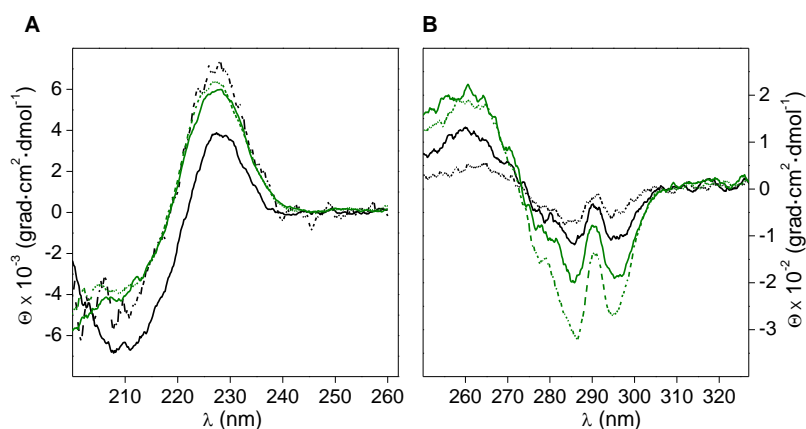


Figura 4.3. Comparación de los espectros de DC en el UV lejano (A) y cercano (B) del monómero (verde) y los oligómeros de LytB (negro), en ausencia (línea continua) y en presencia (línea discontinua) de 140 mM colina (medidas realizadas en tampón Pi, pH 8,0, a 20°C).

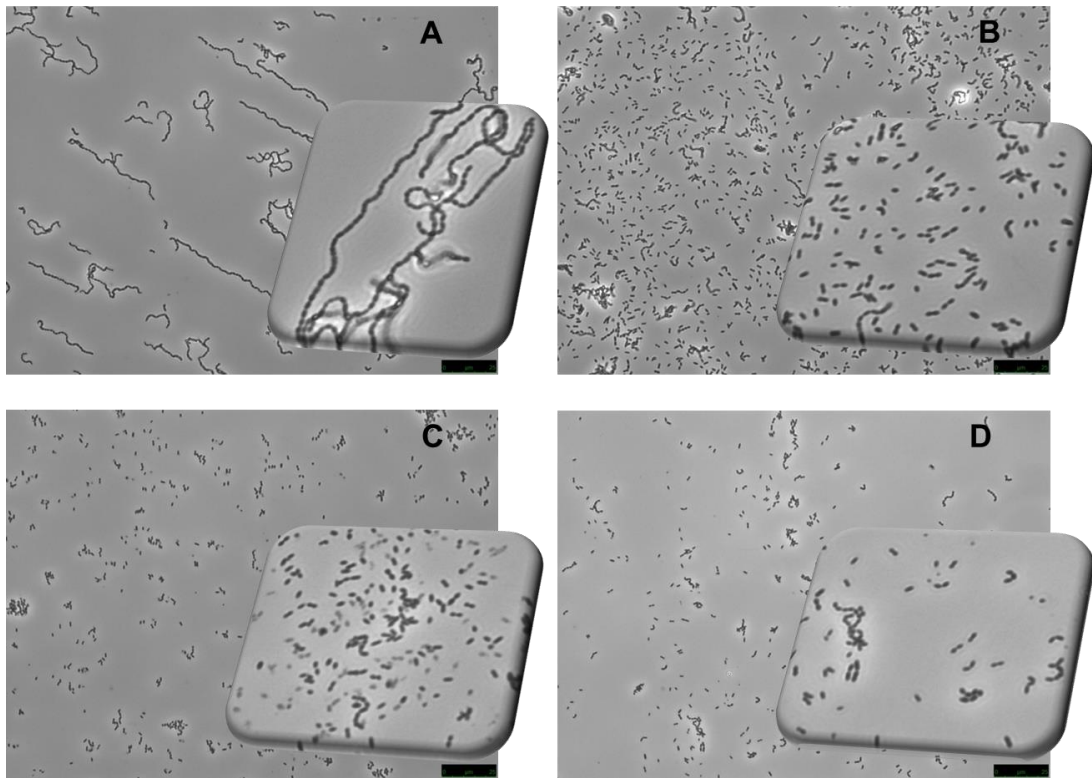


Figura 4.4. Actividad dispersora de LytB sobre cultivos de la cepa R6B de *S. pneumoniae*. Imágenes de los cultivos tomadas por microscopía de contraste de fase, tras crecer a 37°C e incubar durante 1h en ausencia (A) y en presencia (B) de LytB procedente de la columna DEAE-celulosa, (C) monómero de LytB y (D) oligómeros de LytB. La barra situada en el margen inferior derecho de cada imagen es de 25 µm.

4.2. Estabilidad térmica, organización modular y reconocimiento de ligandos

LytB muestra la organización modular más compleja de todas las PG hidrolasas de neumococo al haber adquirido dos módulos adicionales (LytB_{WW} y LytB_{SH3b}) que conectan LytB_{GH73} con el módulo de unión a colina LytB_{CBM}. Este último, situado en posición N-terminal, excede además en número de repeticiones a otras CBPs, con valores que van desde 18 en la cepa R6, hasta 12 en ciertas cepas atípicas (Moscoso *et al.*, 2005). Se desconoce asimismo la región implicada en la localización celular de LytB y la naturaleza de los posibles receptores responsables de la misma. Por ello hemos estudiado la organización y estabilidad frente a la temperatura de LytB mediante DSC y DC, en ausencia y en presencia de compuestos relacionados estructuralmente con varios de los componentes de los WTAs y LTAs asociados a la envuelta celular de neumococo. Los estudios se realizaron con la forma monomérica de LytB con el fin de evitar la complejidad que supone la presencia de distintos estados de asociación para el análisis de los resultados.

4.2.1. Estudio de la estabilidad térmica de LytB

En primer lugar se estudió el comportamiento de la proteína frente al aumento de la temperatura y el efecto de la unión de colina, fosforilcolina (P-colina) o glicerofosforilcolina (G-P-colina) (Figura 4.5), utilizados como análogos del ligando natural de la proteína, sobre la estabilidad de LytB, así como la influencia del grupo fosfato y su carga sobre el reconocimiento de los residuos de fosforilcolina por LytB_{CBM}. Las medidas se realizaron en tampón Pi a pH 8,0 para minimizar la precipitación observada por DC tras la desnaturalización de LytB a pH neutro o ligeramente ácido (Figura 4.6).

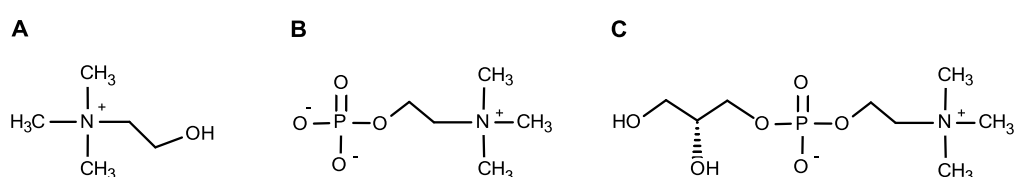


Figura 4.5. Estructura de los análogos de los residuos de P-colina de los ácidos teicoicos utilizados en este trabajo: (A) colina, (B) P-colina y (C) G-P-colina.

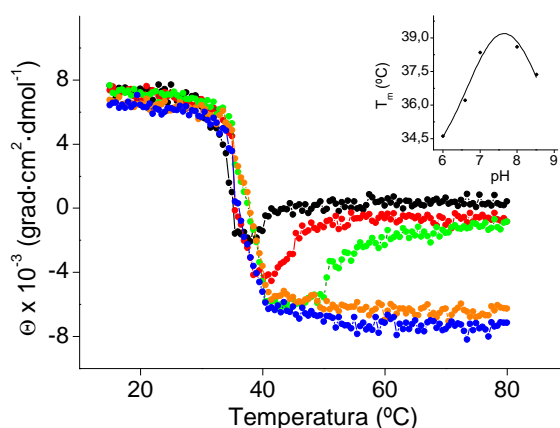


Figura 4.6. Variación del perfil de desnaturalización térmica de LytB con el pH. La dependencia de Θ_{225} con la temperatura muestra una estabilización de la estructura a pH ligeramente básico. La precipitación de la forma desnaturalizada a valores de pH inferiores a 7,0 da lugar a una pérdida de la señal tras la caída inicial de Θ_{225} hacia valores negativos. Los datos se muestran con el siguiente código de colores: negro, pH 6,0; rojo, 6,5; verde, 7,0; naranja, 8,0; azul, 8,5.

En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestran las curvas de desnaturalización térmica obtenidas por DSC a concentraciones crecientes de cada uno los ligandos. En la Tabla 4.1 se resumen los valores estimados para las temperaturas de desnaturalización (T_m) y las entalpías de desnaturalización (ΔH_T). En ausencia de ligando, el perfil calorimétrico de LytB mostró una estabilidad moderada-baja de la estructura de la proteína, cuya desnaturalización da lugar a un único pico centrado en torno a los 39 $^{\circ}\text{C}$ y tiene lugar

con una variación de entalpía de 260 kcal/mol. El proceso de desnaturalización es irreversible en todas las condiciones ensayadas, por lo que la forma del termograma y la posición de los máximos depende de la velocidad de barrido, sobre todo en ausencia de los ligandos.

La adición de colina incrementa de forma notable la estabilidad de toda la proteína y, a concentraciones superiores o iguales a 10 mM, la desnaturalización tiene lugar en tres transiciones bien resueltas, según muestran los perfiles de DSC representados en la Figura 4.7. El incremento de la temperatura de desnaturalización de la primera transición (T_{m1}) con el aumento de la concentración de colina tiene carácter saturante, alcanzando un valor máximo de aproximadamente 6°C a partir de 80 mM colina (Tabla 4.1). Por el contrario, las otras dos temperaturas de transición, T_{m2} y T_{m3} , lo hacen de forma no saturante, un comportamiento característico de la estabilización mediada por la unión de un ligando al módulo portador del sitio de unión (Brandts *et al.*, 1989), lo que indica que ambas transiciones corresponderían a la desnaturalización de LytB_{CBM} . La dependencia de T_{m1} con la concentración de colina es, por el contrario, típica de la estabilización indirecta de módulos y refleja la existencia de una fuerte interacción entre los mismos y el módulo que actúa como receptor del ligando, en este caso el CBM de LytB (Brandts *et al.*, 1989). Por lo tanto, la primera transición podría corresponder a la desnaturalización de LytB_{CAT} y reflejaría su estabilidad cuando LytB_{CBM} está todavía plegado. Que el proceso de desnaturalización de LytB_{CBM} suceda en dos etapas indica, por otro lado, bien la formación de un estado intermedio durante la desnaturalización, o bien la existencia de dos sub-dominios con diferente afinidad y/o diferente número de sitios de unión a colina.

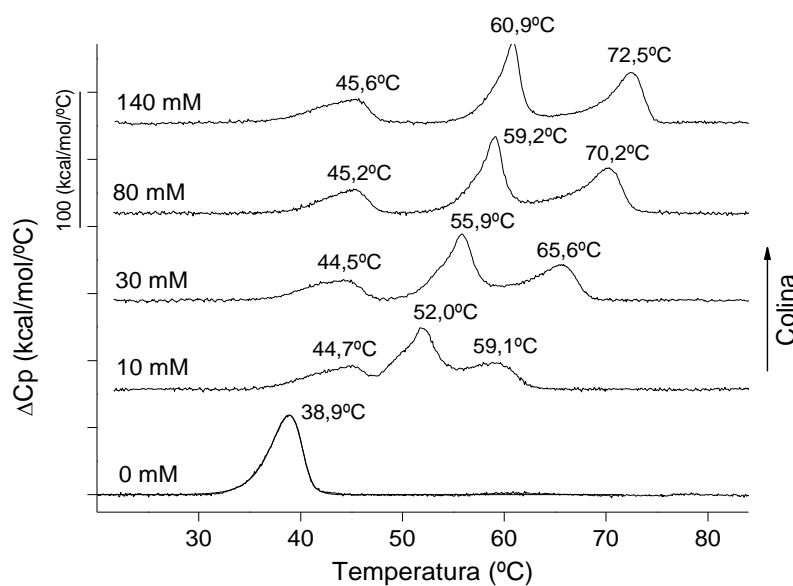


Figura 4.7. Perfiles de DSC de LytB en presencia de concentraciones crecientes de colina ($[\text{LytB}] = 4,1 \mu\text{M}$; medidas realizadas en tampón Pi (pH 8,0) con una velocidad de barrido de $20^\circ\text{C}/\text{h}$).

En las condiciones experimentales utilizadas, el grupo fosfato de la P-colina introduce casi dos cargas netas negativas en la molécula y reduce de forma significativa la estabilización inducida por colina (Figura 4.8 A y Tabla 4.1), observándose además una única transición a la concentración más alta de ligando ensayada. Por otro lado, la caída de la señal que se produce a altas temperaturas en presencia de P-colina, probablemente debida a la precipitación de LytB tras la desnaturalización (Figura 4.8 A), dificulta el análisis de las curvas experimentales y la realización de medidas a concentraciones más elevadas de P-colina.

La G-P-colina, con carga neta cero, sería el compuesto más similar al ligando natural de LytB, ya que el grupo glicerol podría simular la parte de la *N*-acetilgalactosamina unida a los residuos de P-colina de los ácidos teicoicos de neumococo. En presencia de concentraciones crecientes de G-P-colina el termograma se desdobra en dos transiciones y, al igual que ocurría en presencia de colina, el valor de la T_{m1} aumenta hasta un determinado valor para luego permanecer constante, mientras que el aumento de la temperatura de desnaturalización asociada a la segunda transición (T_{m2}) tiene lugar de forma no saturante (Figura 4.8 B; Tabla 4.1).

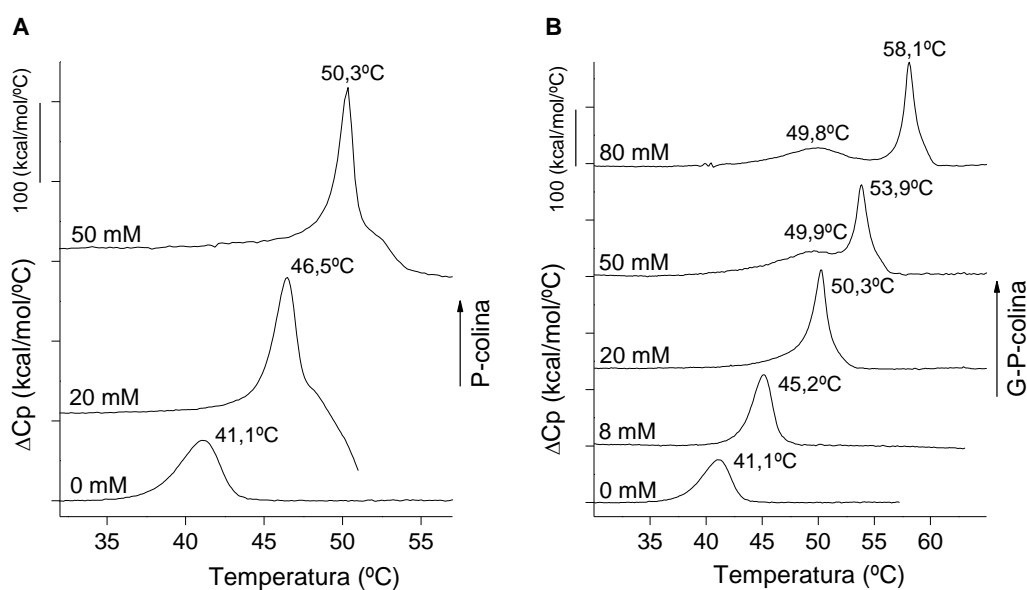


Figura 4.8. Perfiles de DSC de LytB en presencia de concentraciones crecientes de (A) P-colina y (B) G-P-colina. Medidas realizadas en tampón Pi (pH 8,0) con una velocidad de barrido 45°C/h; [LytB] = 4,1 μ M.

Como muestran los valores de las Tms recogidos en la Tabla 4.1, a igual concentración de ligando la estabilización de LytB_{CBM} decrece en el orden colina > G-P-colina > P-colina, lo que sugiere que la afinidad de la proteína hacia estos tres ligandos disminuye en el mismo sentido. Este comportamiento es probablemente debido a la

repulsión electrostática entre la carga negativa del grupo fosfato y la elevada carga neta negativa que presenta LytB_{CBM} ($\approx -14,71$ a pH 8,0).

Tabla 4.1. Influencia de la unión de análogos de colina sobre la estabilidad térmica de LytB. Efecto de la velocidad de barrido

[Ligando] (mM)	Velocidad (°C/h)	Tm ₁ ^a (°C)	Tm ₂ ^a (°C)	Tm ₃ ^a (°C)	ΔH_T ^b (kcal/mol)
-	10	38,4	-	-	260
-	20	39,4	-	-	250
-	45	40,8	-	-	260
Colina					
2,6	20	46,1	-	-	310
10	20	44,7	52,0	59,2	430
20	20	44,3	54,6	63,5	365
30	20	44,5	55,9	65,6	430
41	20	44,0	57,0	67,6	380
80,5	20	45,2	59,2	70,2	480
140	10	44,7	60,7	72,0	510
140	20	45,6	60,9	72,5	490
140	45,5	46,4	61,1	73,4	520
20	45	46,2	55,2	64,5	507
80	45	46,5	59,8	71,3	520
P-colina					
20	45	46,5	-	-	n.d. ^c
80	45	50,3	-	-	n.d.
G-P-colina					
8	45	45,2	-	-	321
20	45	50,3	-	-	430
50	45	49,9	53,9	-	520
80	45	49,8	58,1	-	540

^aTemperaturas de los máximos de la función de capacidad calorífica (Cp).

^bEntalpía total de desnaturalización obtenida por integración del área bajo la curva calorimétrica.

^cn.d. (no determinado).

El efecto de la unión de estos tres ligandos sobre la estabilidad y organización en dominios de LytB se analizó, así mismo, mediante DC, monitorizando las variaciones inducidas por el aumento de la temperatura en la elipticidad a 225 nm (Θ_{225}), cuyo valor viene determinado, en gran medida, por las contribuciones de las cadenas

laterales de los residuos aromáticos de LytB_{CBM} (Medrano *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2000; Varea *et al.* 2004; Monterroso *et al.* 2008).

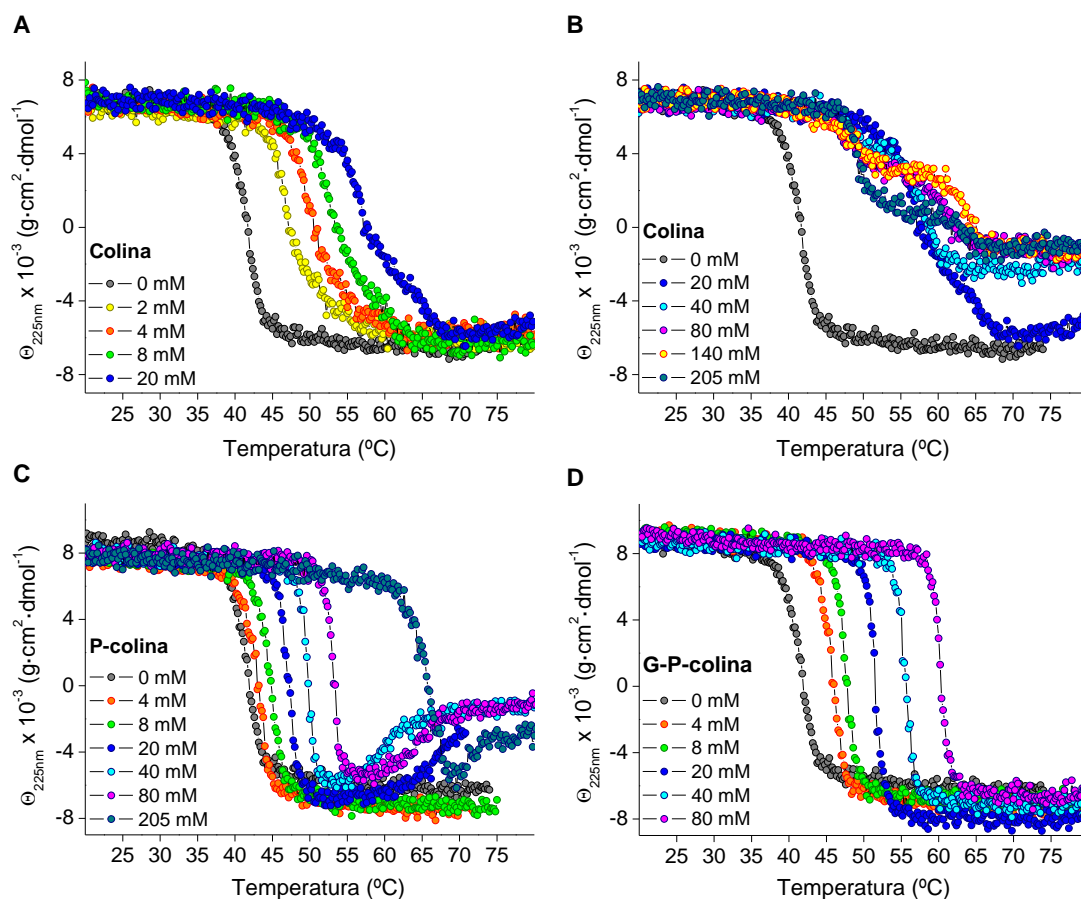


Figura 4.9. Perfiles de desnaturalización térmica de LytB seguidos por DC a velocidad de barrido constante, en presencia de concentraciones crecientes de (A y B) colina, (C) P-colina y (D) G-P-colina. Las medidas se realizaron a 225 nm en tampón Pi (pH 8,0) a las concentraciones de ligando indicadas en los paneles respectivos. ($[\text{LytB}] = 2 \mu\text{M}$; velocidad barrido 60°C/h).

Como en DSC, en ausencia de colina el perfil de desnaturalización de DC muestra una única transición con una temperatura media ($T_{1/2}$) de desnaturalización de $39,2^\circ\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de 45°C/h (Figura 4.9; Tabla 4.2), comparable a la obtenida por DSC. En presencia de colina el perfil de desnaturalización presenta un cierto carácter bifásico, incluso a las concentraciones más bajas de ligando ensayadas (Figura 4.9 A). El análisis fenomenológico de los perfiles obtenidos a concentraciones inferiores a 20 mM colina como la suma de dos sigmoides muestra una buena correlación entre ambos procesos y las transiciones de DSC asignadas a LytB_{CBM} , teniendo en cuenta el efecto de la velocidad sobre la posición de las mismas (Tablas 4.1 y 4.2). A concentraciones más altas de colina la desnaturalización da lugar a una agregación parcial de la proteína, lo que distorsiona los perfiles y dificulta el análisis

comparativo de los mismos. No obstante la forma de las curvas sugiere que, por encima de 20 mM colina, la primera transición podría tener lugar en dos etapas (Tabla 4.2), y que la precipitación de LytB estaría asociada a la última transición observada por DSC. El valor estimado para la $T_{1/2}$ de la primera etapa es comparable, por otro lado, al de la transición atribuida a la región catalítica en los perfiles de DSC a concentración saturante de colina. Esta observación sugiere la existencia de un posible acoplamiento entre la pérdida de estructura secundaria de la región catalítica y la desnaturalización de LytB_{CBM} que se pierde por encima de 20 mM colina.

Tabla 4.2. Dependencia con la concentración de ligando de las temperaturas medias de transición ($T_{1/2}$), determinadas a partir de la variación de Θ_{225} con la temperatura

[Ligando] (mM)	G-P-colina		P-colina		Colina		
	$T_{1/2}$ (°C)		$T_{1/2}$ (°C)		$T_{1/2}$ (1) (°C)		$T_{1/2}$ (2) (°C)
	45°C/h	60°C/h	45°C/h	60°C/h	45°C/h	60°C/h	60°C/h
-	39,2	41,5	39,2	41,5	39,2	41,5	-
2	-	-	-	-	-	46,5	49,6
4	-	45,7	-	43,0	-	49,8	56,8
8	-	47,6	-	44,7	-	52,9	60,9
15	-	-	-	-	-	55,8	64,2
20	48,2	51,6	44,8 ^a	47,2 ^a	45,0/55,3	56,8	65,6
40	52,4	55,5	≈ 47,7 ^a	≈ 49,8 ^a	46,2/55,1 ^b	48,5/58,2 ^b	-
80	56,6	60,3	≈ 51,4 ^a	≈ 53,2 ^a	46,6/57,3 ^b	48,7/60,6 ^b	-
140	-	-	-	-	46,2/59,2 ^b	48,4/62,5 ^b	-
205	-	-	-	≈ 66 ^a	47,2/60,0 ^b	49,3/62,7 ^b	-

^aValores estimados excluyendo la región de la curva afectada por la agregación.

^bEstimación de $T_{1/2}$ aparente para cada una de las fases en que aparentemente se desdobra la transición.

En presencia de G-P-colina se detecta una única transición cuya $T_{1/2}$ es ligeramente inferior a la T_m del pico asignado en DSC a LytB_{CBM} a las concentraciones de ligando en que la desnaturalización de LytB tiene lugar en dos transiciones claramente resueltas (véanse Figuras 4.8 B y 4.9 D; y Tablas 4.1 y 4.2). El comportamiento en presencia de P-colina es similar (Figura 4.9 C), aunque la estabilización es menor y el análisis de las curvas queda limitado a una estimación de la $T_{1/2}$ por encima de 20 mM P-colina, debido a la pérdida de la señal que provoca la precipitación de LytB a altas temperaturas. Como en DSC, debido a la irreversibilidad del proceso, la variación de Θ_{225} con la temperatura depende de la velocidad de calentamiento utilizada (Tabla 4.2).

4.2.2. Afinidad de LytB por colina, P-colina y G-P-colina. Influencia del grupo fosfato

La influencia del grupo fosfato y su carga sobre la afinidad de LytB por los residuos de P-colina de los ácidos teicoicos se cuantificó valorando la proteína con colina, P-colina y G-P-colina mediante ITC. En la Figura 4.10 se muestra la dependencia del calor de reacción por mol de ligando inyectado frente a la relación ligando/proteína.

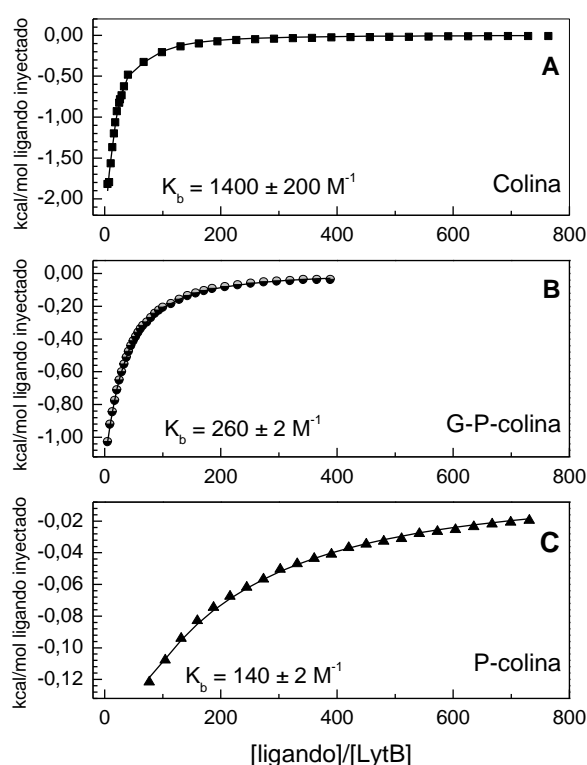


Figura 4.10. Valoración calorimétrica mediante ITC de LytB con (A) colina, (B) G-P-colina y (C) P-colina. Medidas realizadas en tampón Pi (pH 8,0) a 25°C por inyección progresiva de la solución de ligando (0,1 M) sobre la solución de proteína (52 μM). Los trazos continuos corresponden al ajuste teórico de los datos experimentales (símbolos) al modelo de una sola clase de sitios de unión con los parámetros indicados en el texto.

Las curvas calorimétricas pueden describirse en términos de una sola clase de sitios de unión con constantes de disociación de 0,71 mM para el complejo LytB-colina, 3,8 mM para LytB-G-P-colina y 7,1 mM en el caso de LytB-P-colina. La baja afinidad de la proteína hacia los tres ligandos impidió determinar la estequiometría de los complejos formados y los valores de la entalpía de unión, ΔH_b , calculados por mol de complejo formado, fueron: -65 kcal/mol (colina), -85 kcal/mol (G-P-colina) y -65 kcal/mol (P-colina). Estos resultados confirman *i)* la desestabilización que introduce el grupo fosfato en el reconocimiento de los residuos de P-colina de los ácidos teicoicos por LytB_{CBM}, inferida a partir de los estudios de desnaturalización y *ii)* que la reducción de su carga

negativa tras la unión al residuo de glicerol — o a la *N*-acetilgalactosamina en el caso de los ácidos teicoicos — y/o el establecimiento de interacciones favorables con esta parte de la molécula compensan parcialmente la penalización energética asociada a la presencia del grupo fosfato.

4.2.3. Búsqueda de posibles ligandos responsables de la localización de LytB

La localización de LytB en los polos de la célula, incluso en bacterias crecidas en presencia de etanolamina (células EA) en lugar de colina (De Las Rivas *et al.*, 2002), nos llevó a investigar la posibilidad de que la proteína pudiese reconocer los residuos de etanolamina que sustituyen a la colina, u otros componentes de los ácidos teicoicos (glucosa, ribitol, *N*-acetilgalactosamina y galactosa-6-P), como receptores para su localización celular. Los ensayos se realizaron estudiando la capacidad de dichos compuestos (Figura 4.11) para estabilizar térmicamente la estructura de LytB, cuya desnaturalización se siguió por DC (Θ_{225}) o DSC.

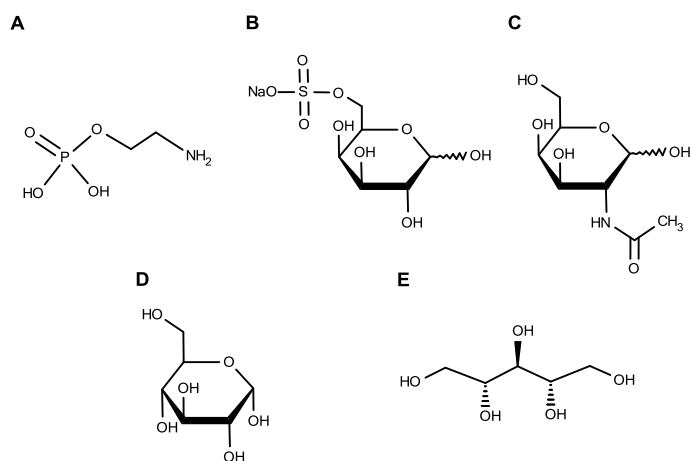


Figura 4.11. Estructuras de los componentes de los ácidos teicoicos ensayados como posibles ligandos de LytB: (A) fosforetanolamina, (B) galactosa-6-sulfato, (C) *N*-acetilgalactosamina, (D) glucosa y (E) ribitol.

Como muestran los datos de la Tabla 4.3, ninguno de los compuestos ensayados modifica de forma significativa la estabilidad de LytB, lo que en principio permite descartarlos como determinantes únicos de su distribución polar en la superficie celular bacteriana, fenómeno que podría deberse entonces a la interacción de la proteína bien con el único componente de los ácidos teicoicos no ensayado (AATGal), o bien con algún elemento del PG o proteínas de la superficie celular, o al reconocimiento simultáneo de más de un componente de la unidad repetitiva de los ácidos teicoicos.

Tabla 4.3. Temperaturas medias de transición ($T_{1/2}$) de los perfiles de desnaturalización de LytB en presencia de análogos de los componentes de los WTAs de neumococo

Compuesto	Técnica	Velocidad de barrido	$T_{1/2}$ (°C) ^a
40 mM Fosforiletanolamina	DC	20°C/h	37,0 (37,4)
20 mM D-Galactosa-6-sulfato	DC	60°C/h	41,1 (41,4)
100 mM D-Galactosa-6-sulfato	DC	60°C/h	40,6 (41,4)
100 mM N-acetil-D-galactosamina	DSC	35°C/h	40,1 (39,4)
100 mM D-glucosa	DC	60°C/h	42,0 (41,4)
100 mM Ribitol	DC	60°C/h	39,2 (40,0)

^aEl valor entre paréntesis corresponde al control de la proteína (2 μ M LytB) sin ligando. Las medidas se realizaron en tampón Pi, pH 8,0, excepto para la fosforiletanolamina que se ensayó a pH 7,4.

4.3. Especificidad de sustrato

LytB ha sido clasificada como una posible glucosaminidasa que hidrolizaría los enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre los residuos de GlcNAc y MurNAc del PG de neumococo. Su actividad *in vitro* sobre paredes purificadas de neumococo ha sido demostrada con anterioridad (De Las Rivas *et al.*, 2002), observándose que la velocidad con la que LytB libera fragmentos de la pared es muy inferior a la de la amidasa LytA o la lisozima LytC, las dos autolisinas de neumococo. Así mismo se observó que LytB no degradaba todo el sustrato susceptible de ser hidrolizado (De Las Rivas *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren bien un acceso restringido de la proteína a su sustrato natural en la célula, o bien una elevada especificidad de sustrato que limitaría su actividad a determinados enlaces glicosídicos del PG. Los determinantes de este comportamiento no han sido sin embargo investigados.

Con el fin de analizar el origen de la especificidad de sustrato de LytB, se han realizado ensayos de actividad utilizando un amplio abanico de sustratos, entre los que se incluyen las paredes celulares aisladas de diferentes cepas de neumococo (el sustrato natural de la enzima) y compuestos de pequeño tamaño estructuralmente relacionados con los componentes de las cadenas proteoglicánicas.

4.3.1. Degradación *in vitro* de la pared celular: análisis de los productos de reacción

La especificidad de sustrato de LytB se investigó analizando, en primer lugar, los productos liberados por la acción de la enzima durante la degradación de paredes celulares aisladas de diferentes cepas de neumococo (R36A, R36A::*pgdA*, R6B, Pen6, Pen6*adr* y CS1), cuyas características particulares se detallan en la Tabla 4.4. Los ensayos se realizaron en paralelo con la degradación del PG correspondiente por la

lisozima cellosyl, que hidroliza los enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre los residuos de MurNAc y GlcNAc del PG de neumococo de forma cuantitativa, por lo que ha sido previamente utilizada para analizar su composición (Bui *et al.*, 2012).

Las paredes celulares y el PG de las distintas cepas de neumococo utilizados como sustrato se aislaron siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 3.6.1 y 3.6.2 de Materiales y Métodos, con un rendimiento muy variable: 32 mg para R6B, 8 mg para R36A, 8 mg para R36A::*pgdA*, 12 mg para Pen6, 23 mg para Pen6*adr* y 9 mg para CS1 por cada litro de cultivo crecido.

Los ensayos de actividad se realizaron incubando las paredes celulares o el PG a 37°C en continua agitación, en presencia de LytB o cellosyl. Tras 24 horas de incubación, se añadió de nuevo la enzima correspondiente y se incubó otras 24 horas en las mismas condiciones. Después de parar la reacción el material solubilizado se redujo con NaBH₄ para evitar la aparición de los anómeros β y α de cada producto que, al eluir separadamente, complicarían los cromatogramas. Los productos de la reacción se analizaron por HPLC, registrando la DO₂₀₅, y espectrometría de masas (ESI-MS/MS o MALDI-TOF). En todos los casos se realizaron controles en paralelo, sin la correspondiente enzima, para verificar que los productos formados se debían a la hidrólisis enzimática y no a la degradación *per se* del sustrato.

Tabla 4.4. Características de las cepas de neumococo utilizadas para la purificación de las paredes celulares y el PG utilizados como sustrato en los ensayos de degradación con LytB y cellosyl

Cepa	Características o modificaciones
R6B	Cepa R6 no funcional para el gen <i>lytB</i> (García <i>et al.</i> , 1999).
R36A	Cepa de laboratorio no capsulada (Avery <i>et al.</i> , 1944).
R36A::<i>pgdA</i>	Cepa mutante derivada de R36A, en la que el gen que codifica la desacetilasa de los residuos de GlcNAc y MurNAc del PG (<i>pgdA</i>) está inactivado. Ausencia, por tanto, de muropéptidos <i>N</i> -desacetilados (Vollmer y Tomasz, 2000).
Pen6	Cepa altamente resistente a la penicilina (β -lactámicos), cuya pared celular está enriquecida en muropéptidos con segmentos peptídicos ramificados (Zigheboim <i>et al.</i> , 1980).
Pen6<i>adr</i>	Cepa Pen6 mutante en el gen <i>adr</i> . Esta inactivación produce 3 cambios en el fenotipo: eliminación de los grupos <i>O</i> -acetilo de los residuos de MurNAc, hipersensibilidad a la lisozima y reducción del valor MIC para la penicilina. Su pared celular también está enriquecida en muropéptidos ramificados (Crisóstomo <i>et al.</i> , 2006).
CS1	Cepa mutante en el gen de la DD-carboxipeptidasa con alto contenido de pentapéptidos en el PG (Severin <i>et al.</i> , 1992).

En primer lugar se ajustaron las concentraciones de sustrato y enzima en el ensayo con el fin de optimizar la detección por HPLC de los diferentes productos de degradación (muro péptidos) generados durante la reacción de hidrólisis. A continuación se analizó la influencia del carácter homogéneo o heterogéneo de LytB sobre la reacción, utilizando muestras procedentes de las columnas de DEAE-celulosa (oligómeros) o Superdex 200 (monómero), y la influencia de los WTAs, utilizando para ello como sustrato paredes celulares o PG. En todos estos ensayos se trabajó con sustratos aislados de la cepa R6B.

Como puede verse en la Figura 4.12, los perfiles muropéptidicos obtenidos tras la hidrólisis de las paredes celulares por LytB eran independientes del carácter homogéneo o heterogéneo de la proteína utilizada, aunque la intensidad de los picos era algo mayor en el caso del monómero, por lo que se decidió trabajar con esta forma de la enzima.

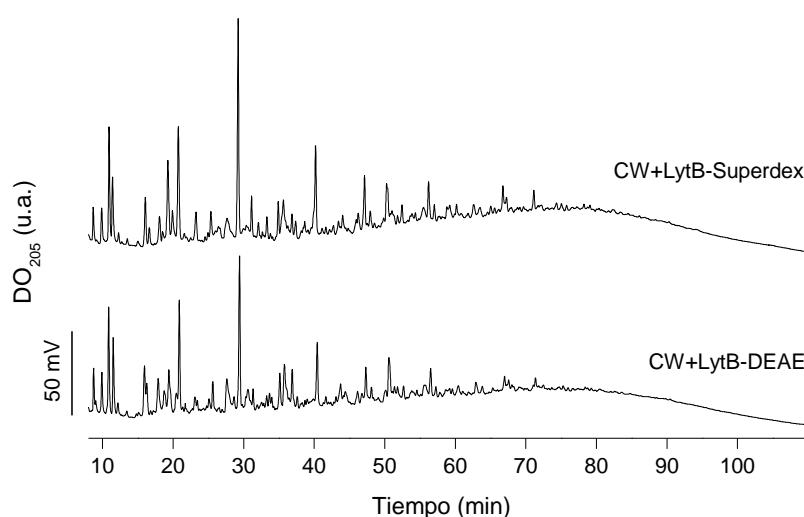


Figura 4.12. Análisis por HPLC de los productos de degradación generados tras la digestión de la pared celular (CW) de la cepa R6B con proteína monomérica (LytB-Superdex) u oligomérica (LytB-DEAE). La intensidad en la DO_{205} se expresa en unidades arbitrarias (u.a.).

Por el contrario, los muropéptidos predominantes en el perfil de degradación de las paredes celulares, variaban con respecto a los registrados tras la hidrólisis del PG (Figura 4.13). Además, el número de productos liberados y la intensidad de los picos aumentaban al emplear las paredes celulares como sustrato de LytB. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la actividad de LytB *in vivo* sea dependiente de la presencia de colina en los ácidos teicoicos (De Las Rivas *et al.*, 2002), si bien también muestran que LytB es capaz de hidrolizar, aunque con menor eficacia, fragmentos de PG (carentes de colina) *in vitro*.

RESULTADOS

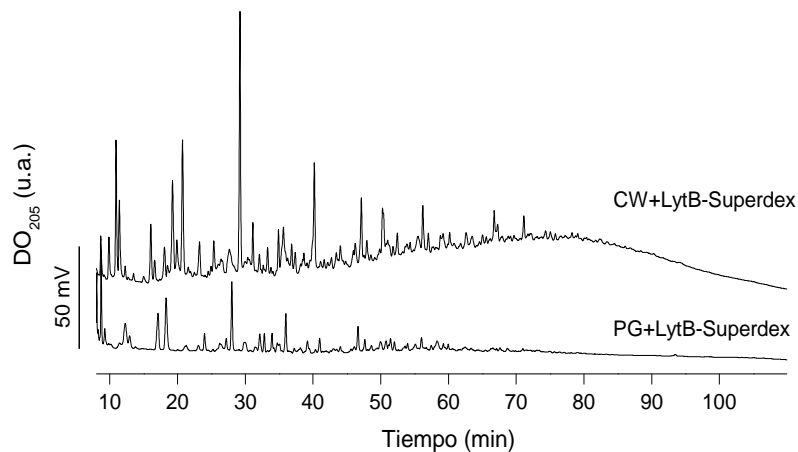


Figura 4.13. Comparación de los perfiles muropeptídicos obtenidos tras la hidrólisis de las paredes celulares (CW) o el PG de la cepa R6B de neumococo por LytB.

El PG de las cepas de neumococo seleccionadas presenta unas características o modificaciones estructurales propias (Tabla 4.4) y las posibles diferencias en los respectivos productos de hidrólisis liberados por LytB, pueden contribuir a establecer el origen de la especificidad que muestra la enzima por su sustrato. Como puede verse en la figura 4.14, la complejidad estructural de los perfiles muropeptídicos obtenidos tras la degradación de las paredes celulares (LytB) o el PG (cellosyl) es elevada, con diferencias notables según la enzima y la procedencia del sustrato utilizado. Los picos que aparecen en el perfil de elución se han numerado como en el trabajo de Bui *et al.* 2012, quienes caracterizaron la mayoría de los productos de degradación de varias cepas de *S. pneumoniae* tras la hidrólisis por cellosyl. Las estructuras de los muropeptidos identificados por HPLC se muestran en la Figura 4.15, y las masas obtenidas por ESI-MS/MS o MALDI-TOF pueden verse en la Tabla 4.5. El porcentaje que supone cada especie respecto al área total del perfil se muestra en la Tabla 4.6.

Los compuestos correspondientes a los picos comprendidos entre, aproximadamente, los 8 y los 24 minutos (fracciones C₁ a C₂) no se han podido identificar debido, probablemente, a la presencia de una elevada concentración de sales en las primeras fracciones del eluido, pero podría tratarse de pequeñas cadenas glicánicas no sustituidas, es decir oligómeros de GlcNAc y MurNAc (Bui *et al.*, 2012). En la siguiente región del perfil, comprendida entre los minutos 24 y 42 aproximadamente, eluyen muropeptidos monoméricos (fracciones 2 a 7/7'), en su mayoría con péptidos no ramificados, siendo las especies más abundantes el tripéptido y el pentapéptido (fracciones 3/3' y 7/7'). A continuación, entre los minutos 42 y 60, aparecen muropeptidos monoméricos ramificados (fracciones 10 a 16/16') y a tiempos más altos especies diméricas y triméricas directamente enlazadas o, en menor proporción, unidas a través pequeños puentes peptídicos del tipo L-Ser-L-Ala, o L-Ala-L-Ala (fracciones 17 a 31).

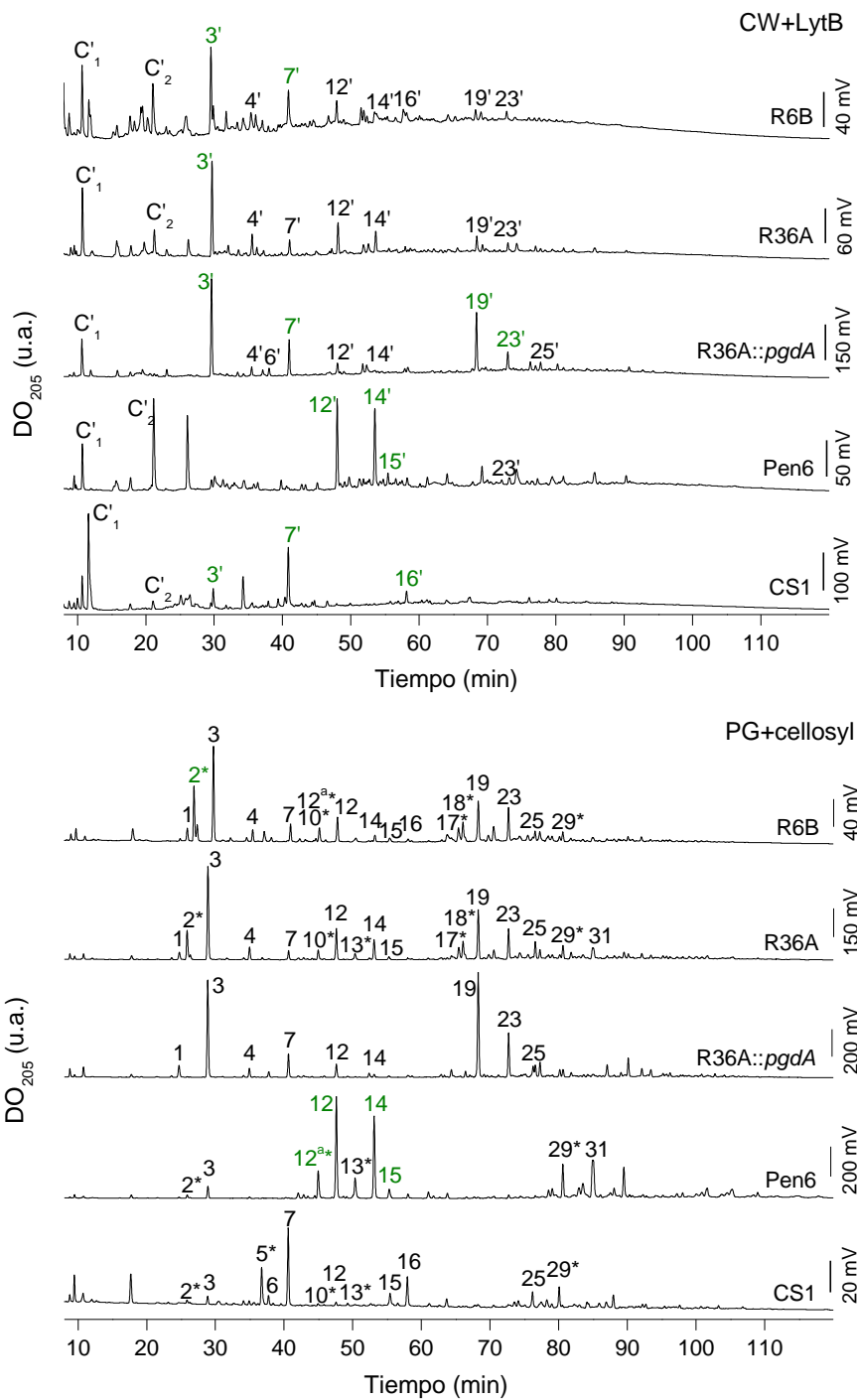


Figura 4.14. Comparación de los perfiles muropeptídicos correspondientes a los fragmentos liberados por la acción de LytB o cellosyl sobre paredes (CW) o el PG de distintas cepas de neumococo, registrados mediante HPLC. Los picos obtenidos para cellosyl se han numerado como en Bui *et al.*, 2012. Los muropeptidos equivalentes liberados por LytB (marcados con apóstrofes) tienen el mismo tiempo de retención pero difieren en el azúcar situado en la posición del extremo reductor (*N*-acetilglucosaminitol para LytB vs. *N*-acetilmuramitol para cellosyl). Las estructuras de los muropeptidos se muestran en la Figura 4.15. Los números en verde indican los picos analizados por ESI-MS/MS o MALDI-TOF (Tabla 4.5) y en negro los identificados por comparación con los perfiles de cellosyl y la asignación realizada por Bui *et al.*, (2012). Los asteriscos indican desacetilación de los anillos de azúcar.

RESULTADOS

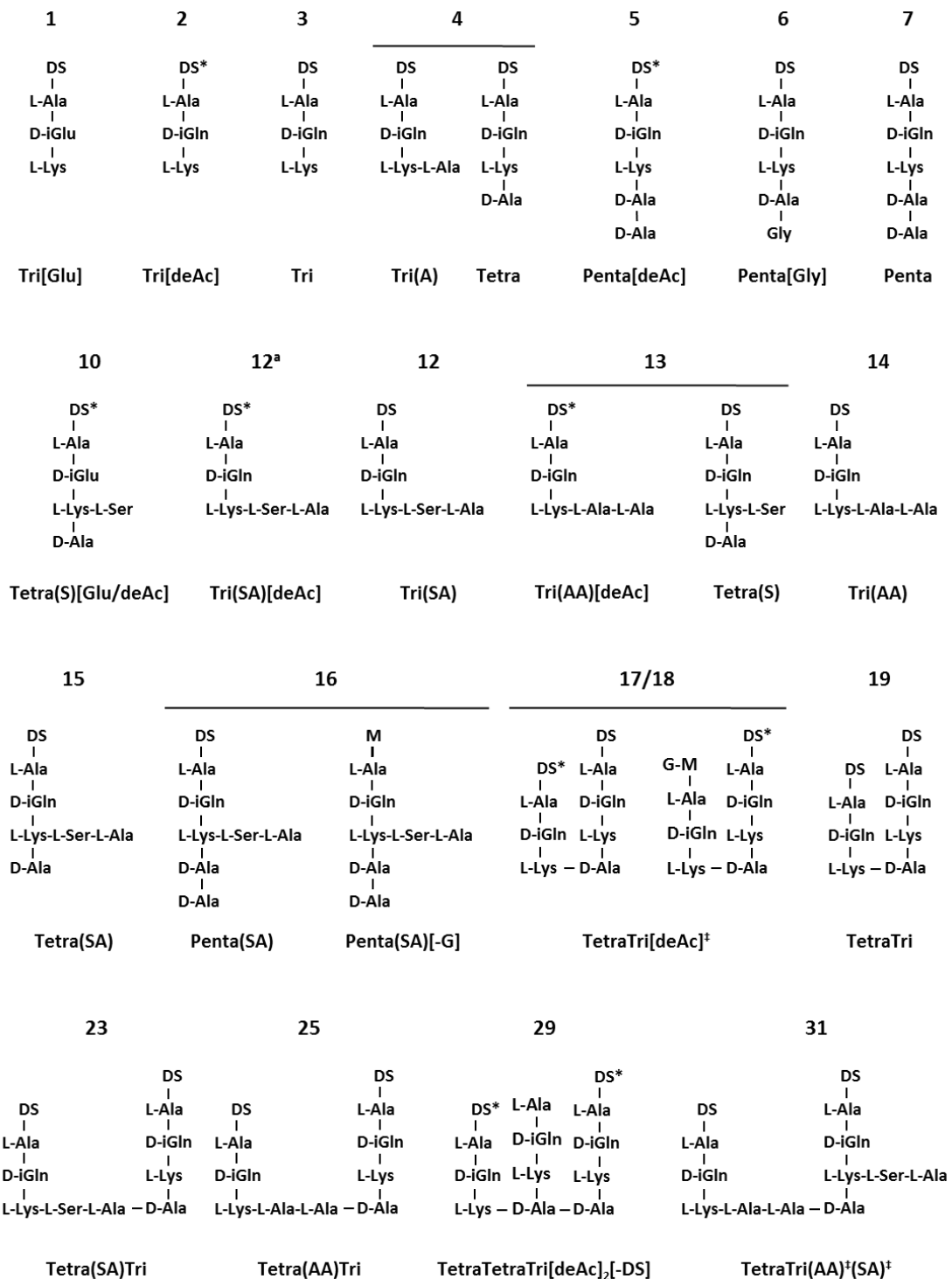


Figura 4.15. Estructuras de los muropéptidos solubilizados por el tratamiento de paredes celulares con LytB, o del PG con cellosyl, identificados por HPLC y espectrometría de masas. DS, disacárido (*N*-acetilmurámico-*N*-acetilglucosaminitol en los productos de LytB y *N*-acetilglucosamina-*N*-acetilmuramitol en los de cellosyl), DS*, disacárido con un residuo de GlcN en vez de GlcNAc.

Tabla 4.5. Muropéptidos reducidos aislados por HPLC tras la degradación del PG o las paredes celulares por cellosyl o LytB confirmados por espectrometría de masas

Pico (n ^o) ¹	Estructura propuesta ²	Masa teórica (Da)	Masa medida (Da)
2	Tri[deAc]	783,386	783,44
3	Tri	825,397	825,45
3'	Tri	825,397	825,41
7'	Penta	967,471	967,50
10	Tetra(S)[Glu/deAc]	942,435	942,47
12 ^a	Tri(SA)[deAc]	941,455	941,46
12	Tri(SA)	983,466	983,48
12'	Tri(SA)	983,466	983,49
13	Tri(AA)[deAc]	925,460	925,36
14	Tri(AA)	967,471	967,48
14'	Tri(AA)	967,471	967,59
15	Tetra(SA)	1054,503	1054,51
15'	Tetra(SA)	1054,503	1054,60
16'	Penta(SA)	1125,540	1125,60
19	TetraTri	1703,820	1703,96
19'	TetraTri	1703,820	1703,71
23	Tetra(SA)Tri	1861,889	1861,85
23'	Tetra(SA)Tri	1861,889	1861,70
29	TetraTri(SA) ₂	2019,958	2019,94
31	TetraTri(AA) [‡] (SA) [‡]	2003,963	2003,97

¹La numeración de los picos corresponde a la asignada a en los perfiles de HPLC.

²Modificaciones: [Glu], presencia de ácido glutámico en lugar de isoglutamina; [deAc], desacetilación del residuo GlcNAc; ‡, posición desconocida de las modificaciones.

La primera diferencia entre los muropéptidos liberados por LytB y cellosyl está en el residuo de azúcar situado en el extremo reductor del disacárido; identificado por ESI-MS/MS como *N*-acetilglucosaminitol (LytB) y *N*-acetilmuramitol (cellosyl) tras la reducción con NaBH₄, confirmándose así que LytB es una glucosaminidasa (Figura 4.16).

La comparación detallada de los distintos perfiles muropéptídicos muestra, además, otras tres diferencias importantes entre los productos generados por ambas enzimas:

i. No aparecen especies desacetiladas en los productos de reacción de LytB, aunque sí están presentes, como era de esperar, en los de cellosyl, que libera Tri[deAc], Tetra(S)[Glu/deAc], TetraTri[deAc][‡] y TetraTetraTri[deAc]₂[-GM] (fracciones 2, 10, 17/18 y 29, respectivamente), entre otros fragmentos desacetilados, tras la digestión del PG de la cepa R36A. En neumococo, la desacetilación de la cadena glicánica afecta fundamentalmente a los residuos de glucosamina y supone un mecanismo de defensa

frente a la lisozima del hospedador (Ohno *et al.*, 1982; Vollmer y Tomasz, 2000; Vollmer, 2008).

ii. LytB corta preferentemente muropéptidos no entrecruzados (monómeros) (fracciones 3'-16') y el dímero TetraTri (fracción 19'), mientras que los dímeros conectados a través de puentes peptídicos del tipo L-Ser-L-Ala o L-Ala-L-Ala, e incluso los trímeros (fracciones 23, 25 y 31, y fracción 29, respectivamente) suponen un porcentaje elevado ($\approx 37\%$) de los productos de reacción en la hidrólisis con cellosyl para la cepa R36A (Tabla 4.6).

iii. El material correspondiente a posibles cadenas glicánicas no sustituidas (fracciones C₁ a C₂) en los productos de LytB (17-26%) es aproximadamente 10 mayor que en los de cellosyl (Tabla 4.6) y aumenta de forma perceptible para la cepa R6B ($\approx 32\%$).

Tabla 4.6. Porcentajes de los diferentes tipos de productos solubilizados durante la hidrólisis de la pared celular o el PG por LytB o cellosyl, respectivamente, determinados por HPLC

Área relativa (%)	Cepa de <i>S. pneumoniae</i>					
	R6B	R36A	R36A:: <i>pgdA</i>	Pen6	Pen6adr	CS1
Posibles cadenas glicánicas (8-24 min)						
Cellosyl	8,4	4,1	5,3	2,6	3,1	14,5
LytB	31,6	25,9	16,9	17,0	23,5	26,5
Monómeros no ramificados (24-42 min)						
Cellosyl	34,1	25,7	26,0	4,5	10,9	29,7
LytB	33,5	29,1	29,4	22,5	22,6	38,7
Monómeros ramificados (42-60 min)						
Cellosyl	11,4	15,0	7,4	44,9	37,4	16,4
LytB	20,9	23,4	17,2	34,0	26,2	17,3
Dímeros directamente entrecruzados (60-69 min)						
Cellosyl	18,2	18,1	23,4	4,3	3,6	6,7
LytB	6,8	8,8	13,0	6,8	9,8	7,7
Dímeros con puentes peptídicos, ramificados y con puentes y ramificados (69-88 min)						
Cellosyl	25,6	32,2	28,9	37,2	42,4	31,6
LytB	7,0	11,9	19,5	17,8	16,6	9,2
Trímeros (88 min-final)						
Cellosyl	2,3	4,8	8,9	6,4	2,7	1,1
LytB	0,5	1,0	3,1	1,9	2,1	0,7

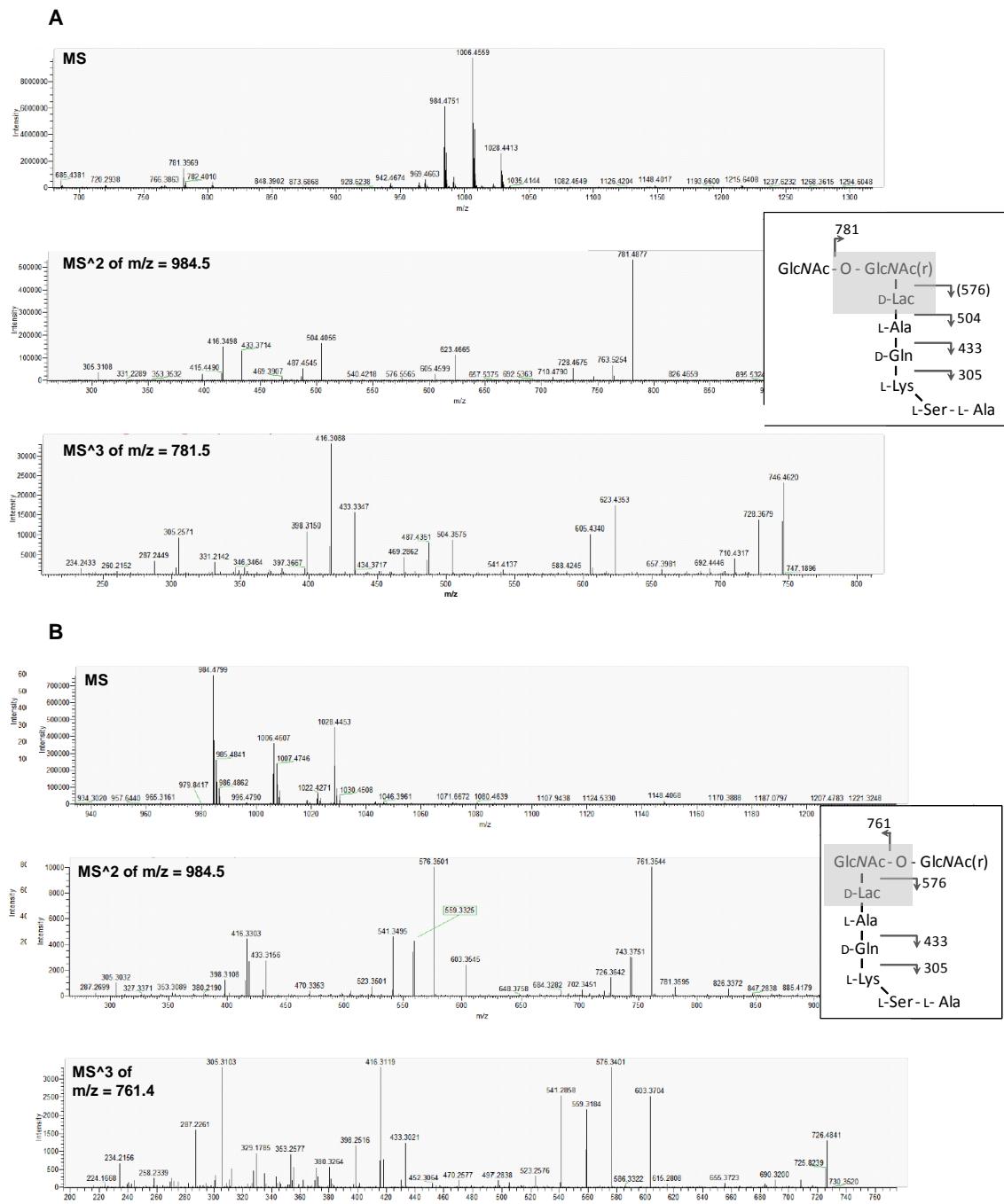


Figura 4.16. Análisis por ESI-MS/MS del muropéptido Tri(SA) aislado en las fracciones 12 (cellosyl) y 12' (LytB) reducido con NaBH₄. (A) Las especies con valores de *m/z* de 781, 576 y 504 obtenidas de la fragmentación del pico 12 son compatibles con la presencia de un residuo reducido de *N*-acetilmuramitol (MurNAc(r)); GlcNAc(r)-D-Lac en cuadro gris del inserto. (B) LytB libera un fragmento con idéntica masa pero diferente patrón de fragmentación. Las especies de alta intensidad con *m/z* = 761 y *m/z* = 576 (lactoil-péptido), provenientes sólo de fragmentos con residuos no reducidos de MurNAc (cuadro gris), son consistentes con la presencia de un residuo reducido de GlcNAc(r). Este análisis muestra que LytB es una *N*-acetilglucosaminidasa y cellosyl una *N*-acetilmuramidasa.

Debido a ello, la digestión de paredes celulares o el PG de la cepa R36A::*pgdA*, en la que todos los residuos glucosamina están acetilados debido a la inactivación del gen de la desacetilasa del PG (*pgdA*), da lugar a perfiles de elución más parecidos al aumentar la contribución relativa de los muropéptidos Tri, TetraTri y Tetra(SA)Tri (fracciones 3', 19' y 23', respectivamente) en los productos generados por LytB y el material solubilizado casi duplica el obtenido con la cepa R36A, lo que supone, aproximadamente, un 66% del material hidrolizado por cellosyl para la cepa R36A::*pgdA*.

Por otro lado, LytB y cellosyl hidrolizan de forma similar los monómeros ramificados Tri(SA), Tri(AA) y Tetra(SA) (fracciones 12/12'-15/15', respectivamente), que están enriquecidas en la cepas resistentes a la penicilina Pen6 y Pen6*adr*, pero LytB no es capaz de hidrolizar de forma eficaz los dímeros ramificados o los trímeros (fracciones 29 y 31). Los muropéptidos entrecruzados a través de puentes peptídicos o ramificados siguen siendo indetectables en los productos de LytB con la pared celular del mutante CS1 enriquecida en el pentapéptido (Figura 4.14; Tabla 4.6), pero no en los de cellosyl, y el monómero con un pentapéptido (fracción 7/7') es en ambos casos la especie predominante.

Todos estos resultados nos permiten concluir que LytB hidroliza el PG en sitios con los residuos de glucosamina acetilados y tiene una clara preferencia por los muropéptidos no entrecruzados (monómeros con y sin ramificaciones), siendo mucho menos activa sobre muropéptidos entrecruzados. De hecho, la degradación de paredes purificadas marcadas con [metil-³H]colina muestra que el tratamiento previo de las mismas con la amidasa LytA aumenta la actividad específica de LytB del orden de 4 veces (de 600 ± 60 U/mg a 2500 ± 600 U/mg; promedio de cinco experimentos) (Figura 4.17), lo que confirma que la hidrólisis de los segmentos peptídicos, o el aumento del tamaño de los poros de la pared que ello conlleva, facilitan la actividad de LytB.

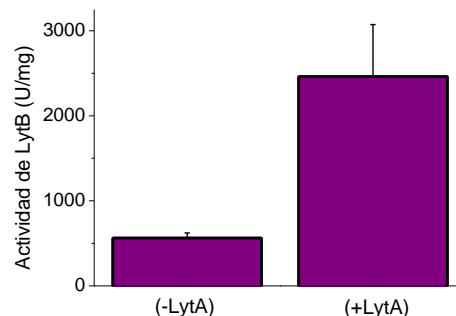


Figura 4.17. Actividad específica de LytB sobre paredes de neumococo (cepa R6) marcadas con colina tritiada tratadas (+LytA) y sin tratar (-LytA) previamente con LytA.

4.3.2. Hidrólisis de análogos estructurales del PG

La complejidad de la hidrólisis de las paredes celulares de neumococo con LytB dificulta su uso en la investigación del mecanismo de reacción de la proteína. Con este objetivo hemos examinado la capacidad de LytB para hidrolizar pequeños compuestos relacionados estructuralmente con los componentes del PG (véase Figura 4.18).

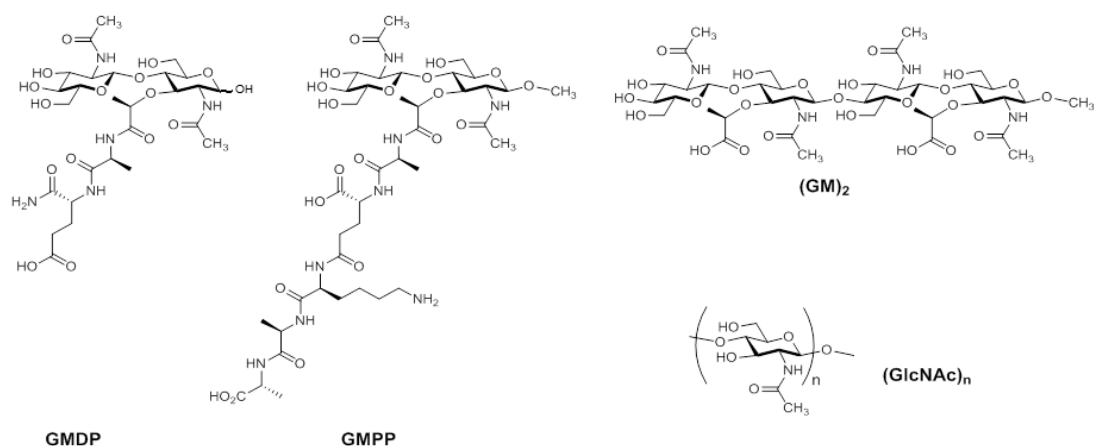


Figura 4.18. Representación esquemática de los análogos estructurales del PG de neumococo ensayados como posibles sustratos de LytB: GMDP (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-γ-Gln), GMPP (GlcNAc-MurNAc(OCH₃)-L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala), (GM)₂ (GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc(OCH₃) y oligómeros de GlcNAc ((GlcNAc)_n).

4.3.2.1. Actividad quitinasa

En primer lugar, y debido a la relación estructural entre LytB y las quitinasas de plantas y estreptomicetos de la familia GH19 y lisozimas con actividad quitino-hidrolasa de las familias GH22 y GH23 (Charlemagne y Jollès, 1972), se emplearon como sustrato los oligómeros de *N*-acetylglucosamina (GlcNAc)₄ y (GlcNAc)₅. LytB degradó ambos compuestos pero los productos sólo se detectaron tras varias horas de incubación (Figuras 4.19 y 4.20), indicando que la formación del complejo productivo requiere una reorganización lenta ya sea de la proteína libre o de complejos no productivos previamente formados (Hirakawa *et al.*, 2008). Tras esa primera fase, la reacción avanza relativamente rápido y pueden observarse todos los productos de degradación posibles, que fueron identificados mediante HPLC y MALDI-TOF utilizando como patrones oligómeros de GlcNAc con 1 a 5 unidades (Figuras 4.19 y 4.20). El producto final de la degradación es, en ambos casos, GlcNAc. A las 30-35 horas de incubación los principales productos de la hidrólisis fueron GlcNAc y (GlcNAc)₃ para (GlcNAc)₄ y GlcNAc y (GlcNAc)₄ para (GlcNAc)₅.

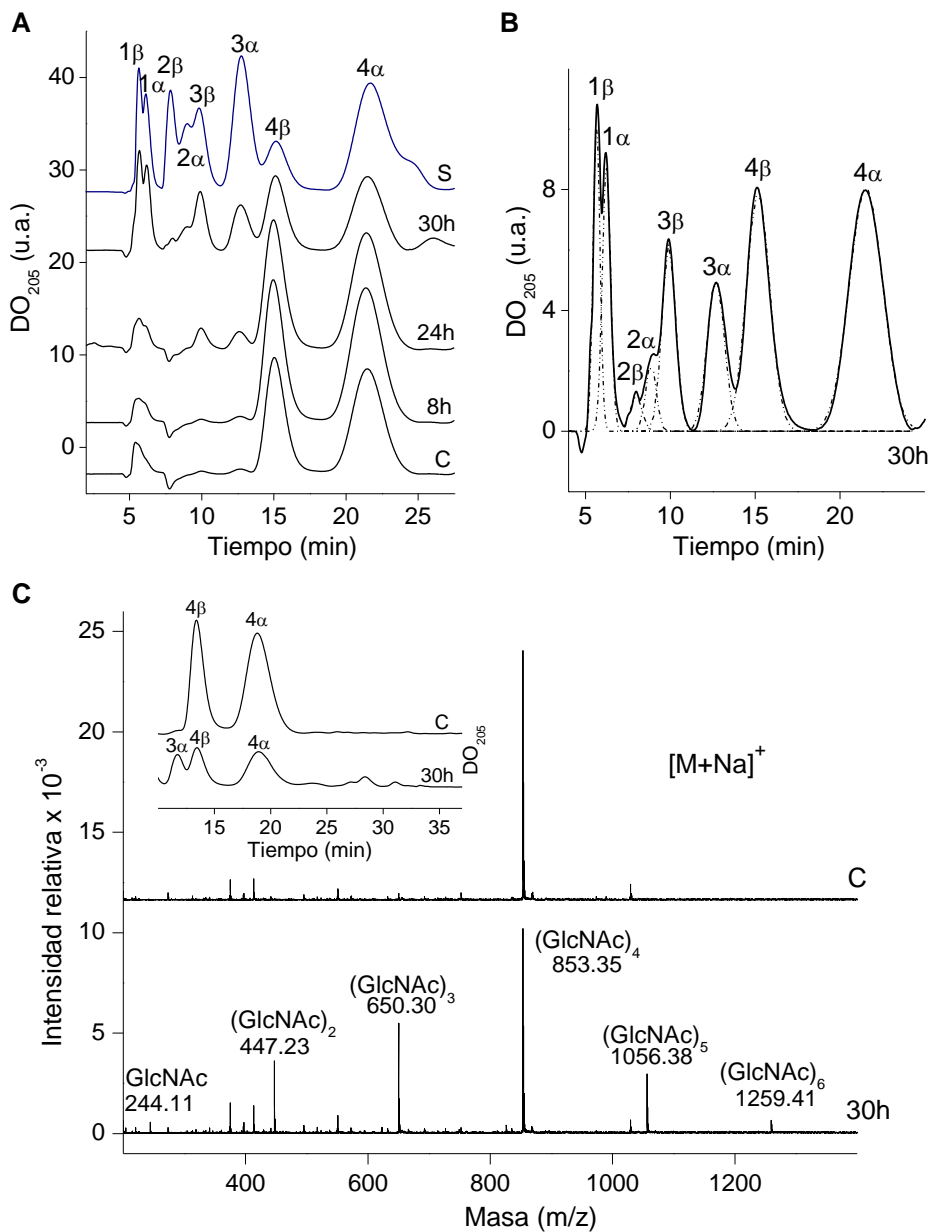


Figura 4.19. Análisis por HPLC y MALDI-TOF de los productos obtenidos tras la hidrólisis de (GlcNAc)₄ con LytB. La reacción tuvo lugar a 37°C en Pi, pH 7,0. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación y los productos se separaron por HPLC siguiendo la DO₂₀₅. (A) Perfiles de HPLC de la mezcla de reacción de (GlcNAc)₄ (84 μ M) con LytB (4,2 μ M) a distintos tiempos de incubación. (B) Deconvolución del perfil obtenido en (A) tras 30 h de incubación. (C) Detección de los productos de transglucosilación mediante HPLC y MALDI-TOF tras 30 h de incubación de (GlcNAc)₄ (1,5 mM) con LytB (4 μ M). Los productos de masas m/z se corresponden con las especies [M+Na]⁺ de (GlcNAc)₅ y (GlcNAc)₆ junto con los productos de la hidrólisis y el sustrato. Las masas monoisotópicas [M+Na]⁺ están representadas para cada uno de los compuestos detectados. Los trazos marcados como C corresponden a los controles sin proteína. La asignación de los picos de los cromatogramas se indica mediante un número que indica el número de unidades de GlcNAc y una letra (α o β) para el anómero, basándose en los perfiles de elución de los oligómeros aislados y la mezcla de oligómeros de GlcNAc (n = 1-6; 300 μ M cada uno) empleados como patrón (perfil S).

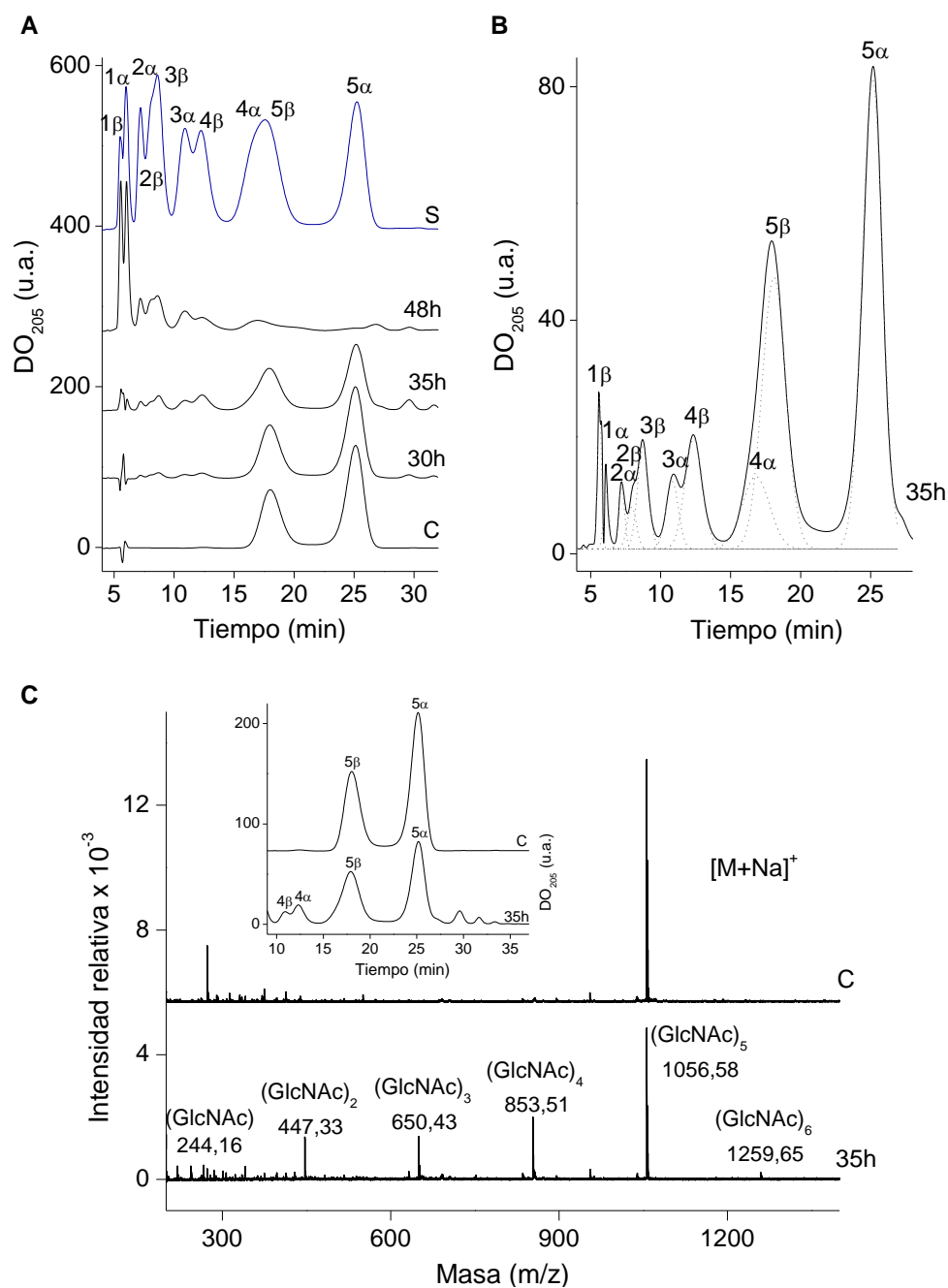
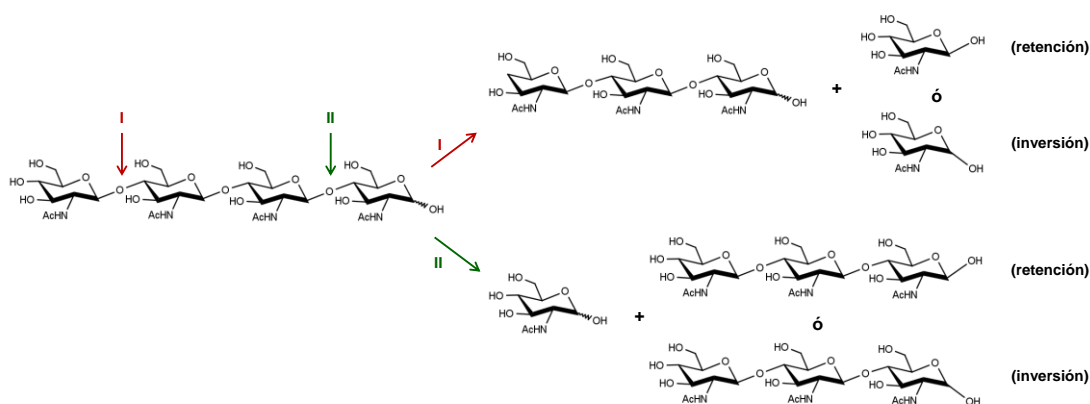


Figura 4.20. Análisis por HPLC y MALDI-TOF de los productos obtenidos durante la hidrólisis de (GlcNAc)₅ por LytB. Las condiciones de la reacción y el posterior análisis fueron los mismos que en la Figura 4.19. (A) Perfiles de HPLC de la mezcla de reacción de (GlcNAc)₅ (1,5 mM) con LytB (8,4 μ M) a distintos tiempos de incubación. (B) Deconvolución del perfil de elución obtenido en (A) tras 35 h de incubación con LytB. (C) Detección de los productos de transglucosilación mediante HPLC y MALDI-TOF tras 35 h de incubación. Los productos de masas m/z se corresponden con las especies [M+Na]⁺ de (GlcNAc)₆ junto con los productos de hidrólisis y el sustrato inicial. Las masas monoisotópicas [M+Na]⁺ de cada compuesto aparecen indicadas. El perfil C corresponde a los controles sin proteína. Los picos de los cromatogramas se etiquetan como en la Figura 4.19.

Tras la deconvolución de los respectivos perfiles de HPLC en sus componentes individuales (Figura 4.19 B y 4.20 B) se obtuvieron valores de ≈ 1 para la relación entre los anómeros α y β de $(\text{GlcNAc})_3$ en los productos de $(\text{GlcNAc})_4$, o para $(\text{GlcNAc})_4$ en los de $(\text{GlcNAc})_5$, que están por debajo de la proporción en el equilibrio reportada para oligómeros de GlcNAc ($\approx 1,5$) (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1995) y de los valores obtenidos para los correspondientes controles en las mismas condiciones experimentales. La formación de GlcNAc y $(\text{GlcNAc})_3$ a partir de $(\text{GlcNAc})_4$ puede tener lugar a través de la hidrólisis del residuo de GlcNAc situado tanto en extremo no reductor de la cadena (vía I) como en el reductor (vía II) (ver Esquema 4.1).

En el primero de los casos el $(\text{GlcNAc})_3$ formado incluiría el extremo reductor del sustrato inicial, por lo que la proporción entre los anómeros α y β $(\text{GlcNAc})_3$ debería ser la existente en el equilibrio. Por el contrario, si la reacción tiene lugar a través de la vía II, se generaría la forma α o β de $(\text{GlcNAc})_3$, según si la reacción tuviese lugar con inversión o con retención de la configuración del carbono anomérico, respectivamente, y el producto formado evolucionaría, por mutarrotación, dando lugar al otro anómero, pudiendo también ser degradado de nuevo por LytB, y lo mismo ocurriría con la formación de $(\text{GlcNAc})_4$ durante la hidrólisis de $(\text{GlcNAc})_5$.



Esquema 4.1. Representación de las dos posibles vías (I y II) a través de las que se podrían formar los principales productos de la hidrólisis de $(\text{GlcNAc})_4$ ($(\text{GlcNAc})_3$ y GlcNAc) a las 30-35 horas de incubación con LytB. A través de la vía I, el sustrato se uniría a los subsitios -1 a +3 y los productos resultantes serían las formas α y β de $(\text{GlcNAc})_3$, en la proporción correspondiente al equilibrio anomérico, y el anómero α ó β de GlcNAc , dependiendo de que la reacción transcurra con inversión o con retención de la configuración, respectivamente. El anómero formado mutarrotaría hacia la otra forma hasta alcanzar el equilibrio. Si la hidrólisis transcurriese mediante la vía II, el sustrato se uniría a los subsitios -3 a +1, liberando GlcNAc (formas α y β en equilibrio) junto con el anómero α ó β de $(\text{GlcNAc})_3$, dependiendo del mecanismo, que mutarrotaría como en la vía I para formar el otro anómero.

Los resultados obtenidos para la hidrólisis de (GlcNAc)₄ y (GlcNAc)₅ parecen indicar, por tanto, que la hidrólisis tiene lugar con retención de la configuración β del carbono anomérico, el cual mutarrotaría lentamente hacia el anómero α que es más estable, aproximándose de este modo la proporción de ambas formas al valor en el equilibrio (≈ 1,5). Por el contrario, en un mecanismo de inversión, la proporción entre los anómeros α y β de (GlcNAc)₃, o de (GlcNAc)₄, debería ser siempre igual o mayor que la del equilibrio, ya que la forma β sólo aparecería por interconversión del producto de hidrólisis; el anómero α de (GlcNAc)₃ o de (GlcNAc)₄.

A tiempos largos de reacción cabe destacar la aparición de varios picos con tiempos de retención superiores a los del sustrato original, cuyas masas moleculares son consistentes con la incorporación de una o dos unidades de GlcNAc al sustrato inicial (Figuras. 4.19 C y 4.20 C). La interpretación más sencilla de estos resultados es que LytB puede también catalizar una reacción de tipo glicosil transferasa, aunque de manera menos eficiente que la de hidrólisis teniendo en cuenta la intensidad relativa de los respectivos productos. Esta actividad, también observada en ciertas variantes de las lisozimas HEWL y T4 (Rupley *et al.*, 1967; Kuroki *et al.*, 1999), sólo se ha identificado en enzimas que actúan con retención de la configuración (Fukamizo, 2000), lo que apoyaría el mecanismo inferido a partir de la relación entre los anómeros de los productos de hidrólisis durante las primeras etapas de la reacción.

4.3.2.2. Actividad sobre compuestos miméticos del PG bacteriano

La hidrólisis de pequeños compuestos relacionados estructuralmente con los componentes del PG se analizó también utilizando como sustrato GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-γ-Gln (GMDP), GlcNAc-MurNAc(OCH₃)-L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (GMPP) y GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc(OCH₃) (GM)₂ (Figura 4.18).

El análisis cromatográfico y por espectrometría de masas de las mezclas de reacción reveló que sólo el tetrasacárido (GM)₂ es reconocido como sustrato por LytB (Figuras 4.21 y 4.22), obteniéndose como únicos productos de la reacción el trisacárido GlcNAc-MurNAc-GlcNAc y el monosacárido MurNAc(OCH₃), según muestran los resultados de UPLC/MS y UPLC/MS/MS (Figura 4.21 F y G). Esto indica que de las tres posibles rutas (a, b y a/b) mostradas en la Figura 4.21 A, la hidrólisis mediada por LytB tiene lugar únicamente a través de la ruta b. La conversión es muy lenta (≈ 10% en 48 h) pero muestra claramente i) que (GM)₂ es el fragmento de menor tamaño perteneciente a la cadena glicosídica del PG que es reconocido como sustrato (el trisacárido formado no es hidrolizado), ii) que el sustrato ocupa los subsitios -3 a +1 del centro activo (el corte tiene lugar entre los residuos unidos a los subsitios -1 y +1), y iii) que LytB es, efectivamente, una glucosaminidasa (Figura 4.21), tal y como demostraba el análisis por ESI-MS/MS de los fragmentos de pared liberados por LytB.

RESULTADOS

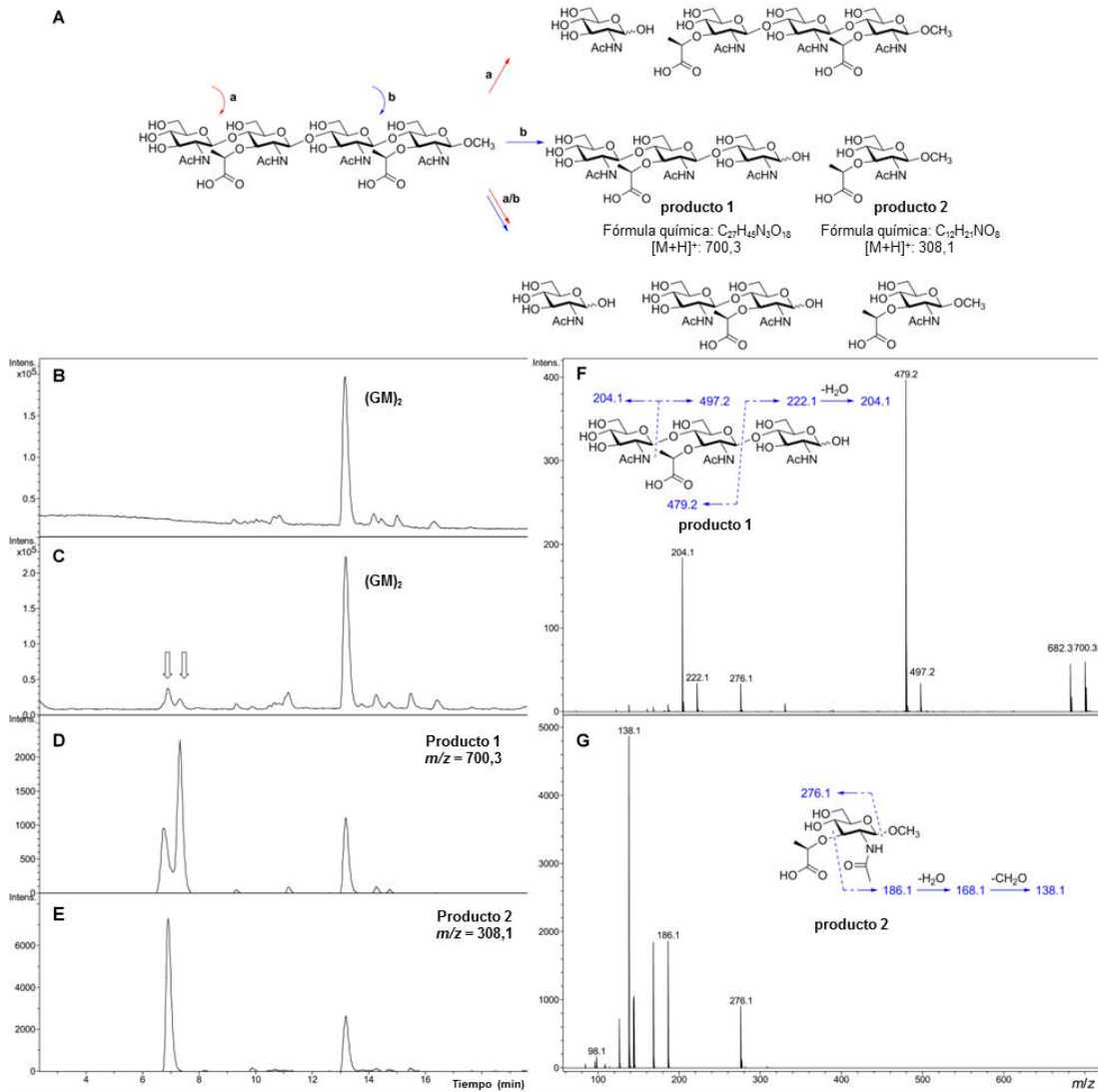


Figura 4.21. Análisis mediante UPLC/MS y UPLC/MS/MS de la actividad de LytB sobre (GM)₂. La incubación se llevó a cabo a 37°C en tampón Pi (pH 7,0) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para ser analizadas por UPLC. (A) Posibles productos formados tras la hidrólisis de (GM)₂. Entre las tres posibles rutas (a, b o a/b), la reacción tiene lugar según la ruta b. (B) y (C) Cromatogramas de la hidrólisis de (GM)₂ (1,5 mM) por LytB (4 µM) a las 0 h y 48 h, respectivamente, seguida por UPLC/MS. (D) Cromatograma correspondiente a la traza del ion (UPLC/MS EICs) con $m/z = 700,3$ (Producto 1) y (E) con $m/z = 308,1$ (Producto 2). (F) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) del Producto 1 y (G) Producto 2.

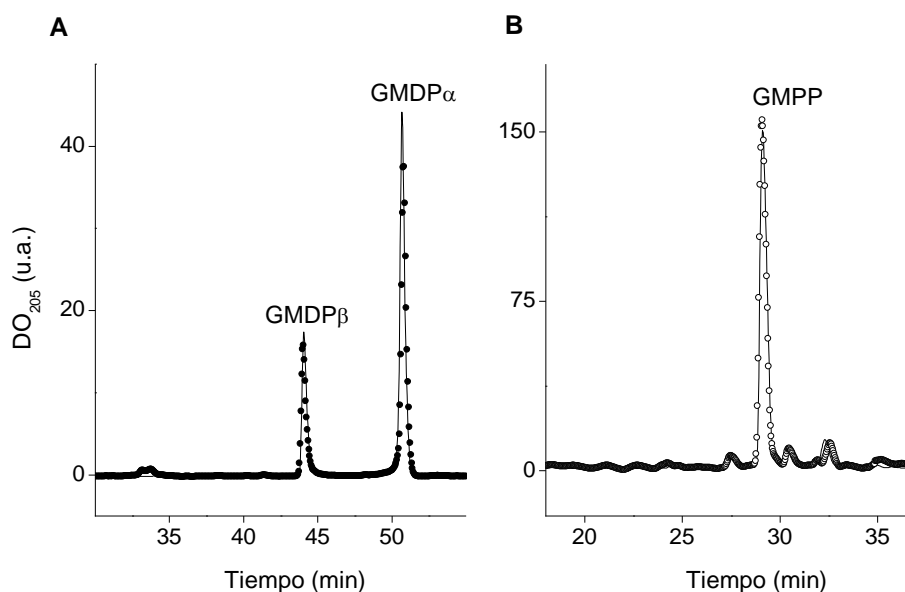


Figura 4.22. Análisis por HPLC de la actividad de LytB sobre GMDP y GMPP. La reacción se llevó a cabo a 37°C en Pi (pH 7,0) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción. Los perfiles con línea continua y los símbolos se corresponden a los controles y las muestras tras 48 h de incubación, respectivamente. (A) Incubación de GMDP (106 μ M) con LytB (5,3 μ M); α y β hacen referencia a los anómeros α y β de GMDP. (B) Incubación de GMPP (200 μ M) con LytB (5,6 μ M).

4.4. Identificación de los residuos implicados en la catálisis enzimática

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo catalítico e identificar los residuos aminoácidos de LytB implicados en la catálisis se construyó un modelo estructural del módulo glucosaminidasa de LytB (LytB_{GH73}), ya que la estructura de la región catalítica no se había resuelto cuando se llevó a cabo esta parte del trabajo.

La búsqueda de proteínas de estructura conocida que pudieran servir como molde estructural para la construcción del modelo proporcionó dos posibles patrones: el dominio C-terminal de SPH1045 (SPH1045-C), la proteína flagelar bacteriana FlgJ de la cepa A1 de la bacteria Gram-negativa *Sphingomonas* sp. (código PDB 2ZYC; Maruyama *et al.*, 2010), y el dominio N-terminal de la autolisina Auto (Lmo1076) codificada por el patógeno Gram-positivo *L. monocytogenes* (código PDB 3FI7; Bublitz *et al.*, 2009), ambos pertenecientes a la familia GH73 de las glicosil hidrolasas. La estructura 2zyc de SPH1045-C fue identificada como primera opción por los servidores FUGUE, I-TASSER y SPARK-X y como segunda opción por Phyre, que seleccionó como primer candidato la estructura 3fi7 del dominio Lmo1076 (Auto), identificada a su vez, como segunda opción, por FUGUE y SPARK-X. El modelo con mejor valoración energética y estereoquímica se generó utilizando como molde la estructura de SPH1045-C y se construyó con SWISS-MODEL (Figura 4.23 A) empleando el alineamiento de secuencias que se muestra en la Figura 4.23 D.

RESULTADOS

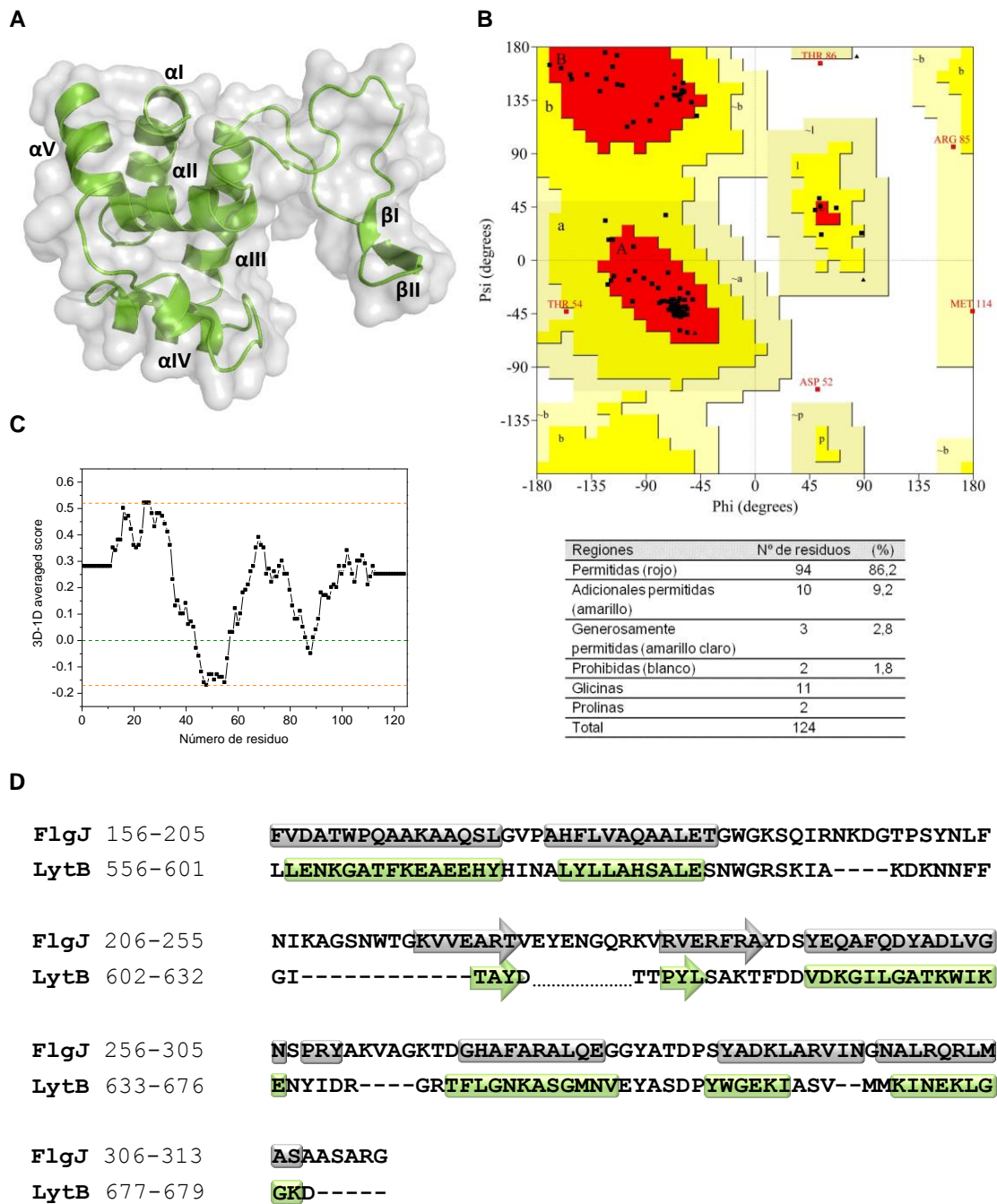


Figura 4.23. (A) Modelo estructural del módulo LytB_{GH73} obtenido mediante el programa SWISS-MODEL, utilizando como molde la estructura de SPH1045-C (PDB 2ZYC), el módulo C-terminal de la proteína flagelar de *Shingomonas* sp. A1. (B) Representación de Ramachandran del modelo estructural de LytB_{GH73}, en la que los triángulos representan las glicinas y los cuadrados el resto de los residuos. (C) Evaluación energética del modelo con Verify 3D de la energía promedio por residuo. (D) Alineamiento de secuencia de LytB_{GH73} (cepa R6 de *S. pneumoniae*; residuos 556-679) y el dominio SPH1045-C (cepa A1 de *Shingomonas* sp.; residuos 156-313), utilizado como molde en la construcción del modelo estructural. Los rectángulos (hélices α) y las flechas (hebras β) muestran la estructura secundaria de SPH1045-C y la predicción obtenida en modelo de SWISS-MODEL para LytB_{GH73}.

Como puede verse en la Figura 4.23 A, el modelo de $\text{LytB}_{\text{GH73}}$ constaría de dos lóbulos o regiones, el mayor de ellos formado por cinco hélices α (αI a αV), mientras que el menor lo constituye una pequeña horquilla β (hebras βI y βII) que se extiende a partir de la hélice αII creando un sitio extenso de unión para el sustrato en la interfaz de los dos lóbulos. La estereoquímica del modelo según PROCHECK es buena, con un 86,2% de los residuos en regiones favorables, un 9,2% en las permitidas de manera adicional y un 2,8% en las generosamente permitidas (Figura 4.23 B). De los dos residuos situados en regiones no permitidas, Asp607 y Thr641 (Asp52 y Thr86 en la representación de Ramachandran), el primero estaría situado en el posible lóbulo beta, una región flexible y mucho más corta en $\text{LytB}_{\text{GH73}}$ que en el molde utilizado, lo que podría explicar su mala estereoquímica. Los resultados de la evaluación energética, realizada con Verify 3D, muestran valoraciones promedio por residuo que van desde -0,17 a 0,52 (Figura 4.23 C), correspondiendo de nuevo la zona peor evaluada al posible lóbulo beta.

La estructura del modelo de $\text{LytB}_{\text{GH73}}$ se superpone bien con las de SPH1045-C y Lmo1076 (Figura 4.24 A y B), aunque la horquilla β y el lazo que conecta ambas regiones es mucho mayor en estas últimas, al igual que sucede en otras glicosil hidrolasas de la familia GH73 (Bublitz *et al.*, 2009).

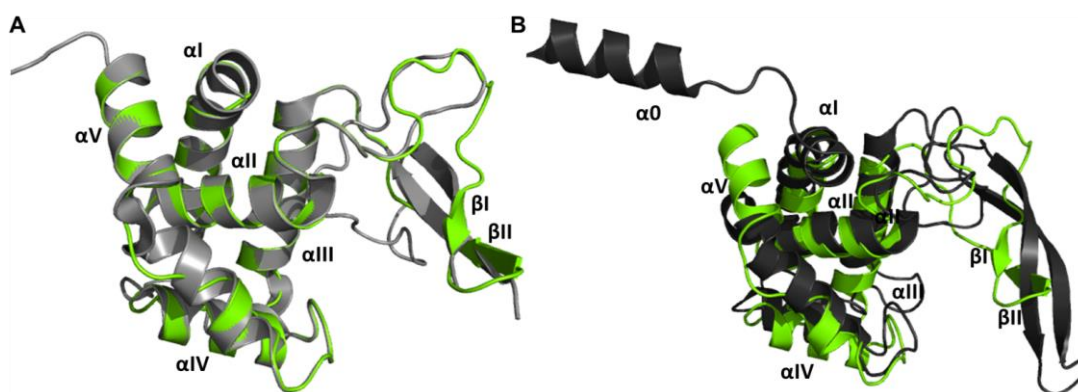


Figura 4.24. Superposición del modelo generado con SWISS-MODEL para $\text{LytB}_{\text{GH73}}$ (verde) con las estructuras de los módulos (A) SPH1045-C (PDB 2ZYC) (gris claro) y (B) Lmo1076 (PDB 3FI7) (gris oscuro).

Como se indicó anteriormente la familia GH73 está relacionada estructuralmente con las quitinasas de plantas y estreptomicetos de la familia GH19 y con las lisozimas de las familias GH22 y GH23 (Bublitz *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2009). Todas ellas comparten una organización del módulo catalítico en dos lóbulos, un núcleo estructural de naturaleza helicoidal y un glutamato conservado (enmarcado en color rojo en el alineamiento de la Figura 4.25), que ha sido propuesto como el catalizador ácido que inicia la rotura del enlace glicosídico, y que se localiza cerca del extremo C-terminal de

RESULTADOS

la hélice α II (nomenclatura del modelo de LytB_{GH73}). Así, en la cavidad catalítica de SPH1045-C y de Lmo1076, los residuos Glu185 y Glu122 ocupan, respectivamente, una posición análoga a la del Glu35 de la lisozima de huevo HEWL (familia GH22) y el Glu73 de la lisozima de ganso GEWL (familia GH22) (Malcolm *et al.*, 1989; Weaver *et al.*, 1995), y lo mismo ocurre con el Glu34 de la glucosaminidasa TM0633 de *T. marítima* (Lipski *et al.*, 2015), perteneciente también a la familia GH73. Este glutámico catalítico que actúa como ácido general durante la catálisis se encuentra localizado en un entorno hidrofóbico debido a la presencia de dos residuos aromáticos cercanos altamente conservados, Tyr281 y Tyr287 en SPH1045-C, Tyr220 y Tyr226 en Lmo1076 y Tyr118 y Tyr124 en TM0633 (enmarcados en color morado en el alineamiento de la Figura 4.25), que contribuyen a facilitar la protonación del grupo carboxilo en las condiciones en que tiene lugar la catálisis (Maruyama *et al.*, 2010; Bublitz *et al.*, 2009; Lipski *et al.*, 2015).

```

LYTB_STRR6          KG-ATFKEAEEHYHINALYLLAHSALESNWGRSK-----
B7XH69_9SPHN       -TWPQAAKAAQSLGVPAHFLVAQAALETGWGKSQIR-----
Q8Y842_LISMO       IS-TQAMDLCKKYNLYPSVMIAQAALESNWGRSE-----
Q5NTY7_STAWA       QG-AAFSQAAKQYLGLNEIYLISHALLETGNGQSLAKGANITNGVVN
Q9WZA1_THEMA       FS-ESAFLLERLTGIDGKILLAQSALETGWGRHT-----

LYTB_STRR6          --IAKDKN-NFFGITA-----YDTPPYLSAKT
B7XH69_9SPHN       NKDGTPSY-NLFNIKAGSNWTGKVEARTVEYEN-GQRKVRVERFRA
Q8Y842_LISMO       --LGKAPNYNLFGIKGS--YNGKSVTMKTWEYSDSKGWYQINANFAK
Q5NTY7_STAWA       TRSTTKYH-NVFGIAA-----FDYNA-LGEGVKFAKASG
Q9WZA1_THEMA       ----VGN-NLFGIKKLS-WLEGGVRAETKEFDG----VKTIDTFQS

LYTB_STRR6          FDDVDKGILGATKWIKEN-----YIDRGRTFL----GNKASGM--
B7XH69_9SPHN       YDSYEQAFQDYADLVGNSPR-----Y----AKVAG---KTDGHAFAR
Q8Y842_LISMO       YPSHKESLEDNAKKLRNGPSWDSSYY----KGAWR-ENAKTYKDATA
Q9WZA1_THEMA       FVSPENSMIAYLILIKEC-----Y----NRAWECRK--EPEKYFR
Q5NTY7_STAWA       WNSVSKAIIGGAKFIGNS-----Y----VKAGQ-NT--LYKMR-W

LYTB_STRR6          --NVE---YASDPYWGEKIASVMMKIN-E---
B7XH69_9SPHN       ALQEGG---YATDPSYADKLARVINGN--AL--
Q8Y842_LISMO       WLQGR---YATDNTYASKLNTLISSYNL-----
Q5NTY7_STAWA       NPENPGTHQYATDINWAESNAQVLK----GLYD
Q9WZA1_THEMA       LLQRYG---YATDPMYAEKCLDVYN----CVE--

```

Figura 4.25. Alineamiento de secuencia de los módulos GH73 de las glucosaminidasas LytB (LYTB_STRR6; cepa R6 de *S. pneumoniae*; residuos 583-696), SPH1045-C (B7XH69_9SPHN; cepa A1 de *Sphingomonas* sp.; residuos 160-300), Lmo1076 (Q8Y842_LISMO; autolisina de *Listeria monocytogenes*; residuos 97-239), Atl_{WM} (Q5NTY7_STAWA; autolisina de *Staphylococcus warneri* M; residuos 1213-1351) y TM0633 (Q9WZA1_THEMA; *Thermotoga marítima*; residuos 9-136). El residuo glutámico que actúa como el catalizador ácido en la reacción de hidrólisis (conservado en la familia) aparece recuadrado en rojo. El recuadro gris indica el segundo residuo catalítico identificado en SPH1045-C, Lmo1076 y TM0633. En morado se destacan los residuos aromáticos que podrían participar en la configuración del sitio catalítico. El motivo YATD, altamente conservado en la familia GH73, se recuadra en verde.

En el modelo de LytB_{GH73}, la cadena lateral del residuo Glu585, así como la de la Tyr654 y la del Trp660, se superponen con las de las tríadas conservadas de SPH1045-C (Glu185, Tyr281 y Tyr287), Lmo1076 (Glu122, Tyr220 y Tyr226) y TM0633 (Glu34, Tyr118 y Tyr124), y el grupo hidroxilo de la Tyr654 se sitúa a distancia de enlace de hidrógeno ($\approx 3,5$ Å) de la cadena lateral del Glu585 (Figuras 4.25 y 4.26). Todo esto señala al Glu585 como el residuo catalítico que, al actuar como ácido general, protona al oxígeno del enlace glicosídico que va a ser hidrolizado durante la catálisis.

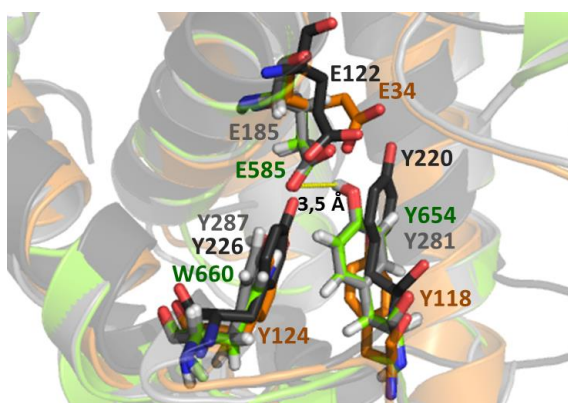


Figura 4.26. Ampliación de la región del centro activo mostrando la tríada de residuos conservados, integrada por los residuos Glu585, Tyr654 y Trp660 en LytB (verde), Glu185, Tyr281 y Tyr286 en SPH1045-C (gris claro), Glu122, Tyr220 y Tyr226 en Lmo1076 (gris oscuro) y Glu34, Tyr118 y Tyr124 en TM0633 (naranja).

Como se indicó en la introducción, el mecanismo de hidrólisis de las glicosil hidrolasas transcurre generalmente mediante una reacción general ácido/base, en la que suelen estar implicados dos residuos catalíticos de carácter ácido. Uno de ellos actúa como donador/aceptor de protones (ácido general) y el otro como nucleófilo (mecanismo de retención de la configuración) o base general (mecanismo de inversión de la configuración), y la distancia entre ambos determina si la reacción tiene lugar con retención o inversión de la configuración. Sin embargo, en algunas glicosil hidrolasas que actúan con retención de la configuración la reacción de hidrólisis es asistida por el grupo acetoamido de la posición C2 del anillo de azúcar unido en posición -1, el cual actúa como residuo nucleófilo. En este caso sólo hay un grupo ácido de la enzima implicado en la catálisis (ácido general). Los residuos Glu224 (SPH1045-C), Glu156 (Lmo1076) y Glu65 (TM0633) han sido identificados como el posible segundo residuo catalítico a partir de ensayos de mutagénesis (Maruyama *et al.*, 2010; Bublitz *et al.*, 2009; Lipski *et al.*, 2015). Estos residuos se localizan en una región flexible del lóbulo β y sus grupos carboxilato se encuentran a unos 13 Å del carboxilato del catalizador ácido (Figura 4.27 A), de modo que su acción requeriría un cambio de conformación tras la unión del sustrato para acercarse al glutamato que actúa como ácido general

(Maruyama *et al.*, 2010; Bublitz *et al.*, 2009), ya que la distancia entre ambos grupos en enzimas que actúan con inversión de la configuración es del orden de 9-11 Å (Wang *et al.*, 1994). Como ya se ha mencionado antes, la región del módulo catalítico que comprende la horquilla β y el lazo que une los dos lóbulos es muy variable entre los miembros de la familia GH73, lo que podría explicar que la posición del segundo aminoácido catalítico no esté conservada en la familia (Maruyama *et al.*, 2010). Por ejemplo, en la autolisina Atl_{WM} , la sustitución del Asp1275, equivalente al Glu224 de SPH1045-C y al Glu156 de Lmo1076, por alanina o asparagina produce mutantes que mantienen casi intacta su actividad (Yokoi *et al.*, 2008). En LytB, la asignación del segundo residuo catalítico es también incierta, ya que la región donde éste se localiza en las glucosaminidasas SPH1045, Lmo1076 y TM0633 es mucho más corta en la secuencia de la glucosaminidasa de neumococo, aunque el Asp607, situado en el modelo de $LytB_{GH73}$ en la región flexible y a unos 14,6 Å del Glu585, podría ser el residuo equivalente al Glu224 de SPH1045-C o el Glu156 de Lmo1076 (Figura 4.27 A).

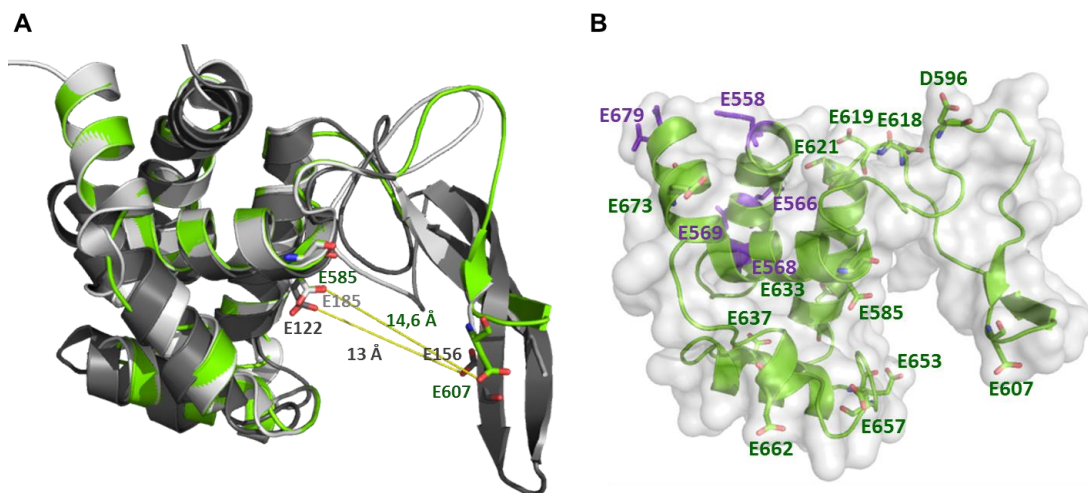


Figura 4.27. (A) Superposición del modelo para $LytB_{GH73}$ (verde) con las estructuras de los módulos SPH1045-C (gris claro) y Lmo1076 (gris oscuro), donde se indica la distancia (13 Å) entre el residuo catalítico donador de protones (Glu185 y Glu122 en SPH1045-C y Lmo1076, respectivamente) y el que actúa como base general (Glu156 en Lmo1076; el Glu224 de SPH1045-C no aparece en la estructura). El residuo Glu607 de LytB, que ocupa una posición análoga a la de la base general de SPH1045-C y Lmo1076 se localiza a unos 14,6 Å del Glu585. (B) Modelo estructural de $LytB_{GH73}$ en el que se muestran los diecisiete residuos ácidos que contiene el módulo; en color púrpura se indican los residuos no mutados (E558, E566, E568, E569 y D596) y en verde los doce mutados (Glu585, Asp596, Asp607, Asp618, Asp619, Asp621, Glu633, Asp637, Glu653, Asp657, Glu662 y Glu673).

Con el fin de confirmar el papel del Glu585 en la catálisis enzimática e identificar el residuo ácido que podría actuar como nucleófilo o base general en la reacción de hidrólisis, se remplazaron por alanina todos los residuos ácidos del módulo $LytB_{GH73}$ situados en la cavidad catalítica o en las proximidades de la misma (Glu585, Asp596,

Asp607, Asp618, Asp619, Asp621, Glu633, Asp637, Glu653, Asp657, Glu662 y Glu673), lo que supuso modificar doce de los diecisiete residuos ácidos que contiene el módulo (Figura 4.27 B). Todos los mutantes se sobre-expresaron y purificaron a homogeneidad y su capacidad para dispersar las células hijas se examinó sobre la cepa R6B de neumococo (Figura 4.28).

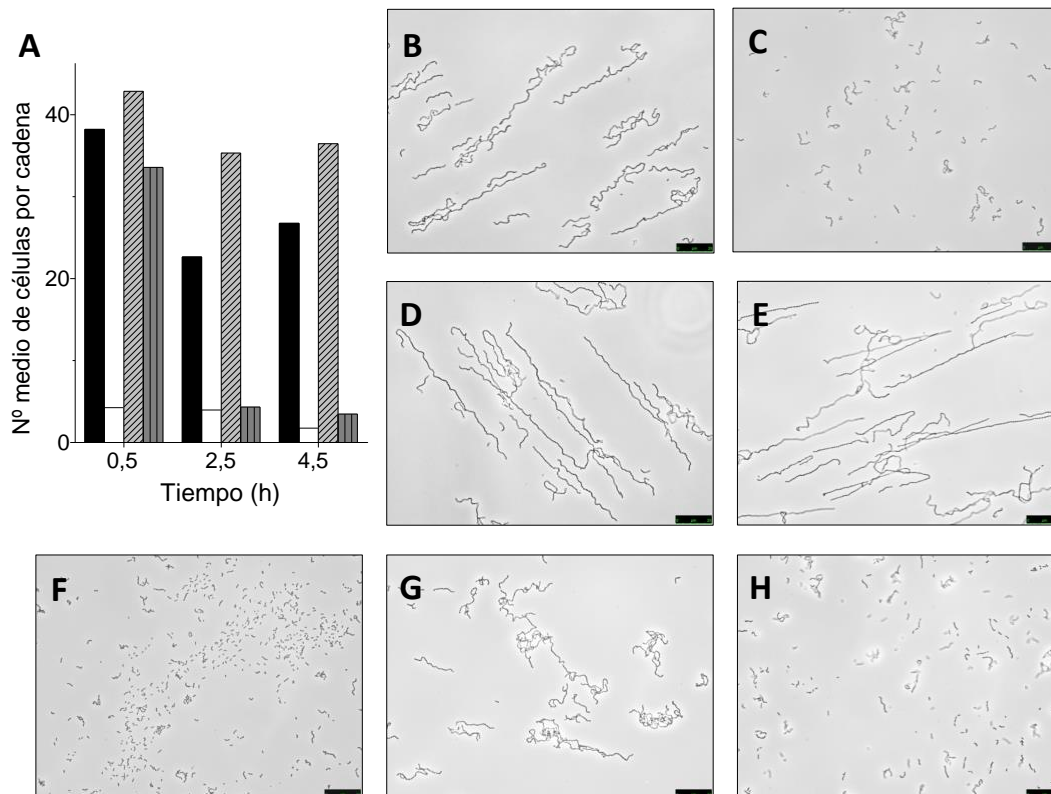


Figura 4.28. Análisis de la capacidad para dispersar células de los mutantes de LytB sobre cultivos de la cepa R6B de *S. pneumoniae*. (A) Diagrama de barras en el que se muestra el número promedio de células que componen las cadenas bacterianas, tras 0,5, 2,5 y 4,5 horas desde la adición a los cultivos de LytB silvestre (barras blancas), el mutante E585A (barras gris claro con rayas diagonales) y el mutante D657A (barras gris oscuro con rayas verticales); los controles sin proteína se muestran en negro. Las imágenes tomadas por microscopía de contraste de fase muestran cómo LytB reduce a diplococos o pequeñas cadenas el cultivo, tras 0,5 h de reacción (C), mientras que el mutante catalítico E585A ha perdido su capacidad dispersora (D y E); D657A apenas modifica la longitud de las cadenas a los 30 minutos de incubación (G) pero tras 4,5 horas de incubación diplococos y pequeñas cadenas son las especies predominantes (H); el resto de los mutantes mantienen su actividad sin alterar, como se ilustra en (F) para el mutante D619A.

Tras la adición de LytB silvestre a los cultivos, sólo se observaron diplococos o cadenas muy cortas tras 30 minutos de incubación en presencia de la enzima (Figura 4.28 A-C). Por el contrario, la longitud de las cadenas permaneció inalterada tras 5 h de incubación con el mutante E585A (Figura 4.28 D-E), confirmándose así su función esencial en la catálisis mediada por LytB. Todos los otros mutantes, a excepción de D657A, no mostraron diferencias en su actividad con respecto a la de la proteína silvestre, como se muestra en la Figura 4.28 F para el mutante D619A, ya que a los 30 min de su adición al cultivo sólo aparecen pequeñas cadenas celulares o diplococos, lo que permite descartar su participación en la catálisis, incluido el único residuo ácido (Glu607) que podría estar localizado en el posible lóbulo β . Por el contrario, la sustitución del Asp657 por alanina reduce la actividad de LytB, pues la adición del mutante D657A al cultivo de R6B resulta en una disminución significativa de la velocidad de dispersión. Durante los primeros 30 minutos de incubación apenas se producen cambios en la longitud media de las cadenas (Figura 4.28 A y G), pero tras 4,5 h de reacción las especies predominantes son, como en el caso de LytB silvestre, diplococos y pequeñas cadenas (Figura 4.28 H).

El residuo Asp657 se localiza a 8,7 Å del Glu585 en el modelo estructural del módulo LytB_{GH73} y forma parte del motivo conservado Tyr/Phe-Ala-Thr/Asn-Asp (ver el alineamiento de la Figura 4.25) situado en la región C-terminal de los miembros de las familias GH73 y GH23 (Yokoi *et al.*, 2008), lo que lo podría hacer de él un buen candidato como nucleófilo o base general que asista en la catálisis del enlace glicosídico. Sin embargo, la distancia al residuo Glu585 es netamente superior a la existente entre los dos residuos ácidos implicados en catálisis de enzimas que actúan con retención de la configuración (4-5 Å; Wang *et al.*, 1994), como parece ser el caso de LytB. Estos resultados, unidos a la especificidad que muestra LytB por regiones del PG con los residuos de glucosamina completamente acetilados, parecen indicar que la hidrólisis mediada por LytB podría estar asistida por el grupo *N*-acetilo del residuo de GlcNAc situado en posición -1 (asistencia anquimérica).

La actividad de los mutantes de LytB E585A y D657A se estudió, así mismo, utilizando como sustrato (GlcNAc)₄. Como ya se ha visto LytB presenta actividad quitinasa, baja pero detectable, y sería lógico esperar que los mutantes viesan alterada dicha actividad *in vitro*. La incubación de los mutantes con el sustrato se realizó en las mismas condiciones que para la proteína silvestre (tampón Pi, pH 7,0 y 37°C) y los productos de reacción se analizaron por HPLC y espectrometría de masas (MALDI-TOF). Como muestran los cromatogramas de HPLC de la Figura 4.29, ambos mutantes presentan actividad sobre (GlcNAc)₄ pero existe una clara diferencia en la velocidad de reacción con respecto a la proteína silvestre. Así, mientras que LytB degrada por completo el sustrato en 48 horas y sólo podemos ver en esas condiciones el monómero de GlcNAc, en el perfil de los mutantes todavía aparecen (GlcNAc)₃ y (GlcNAc)₂.

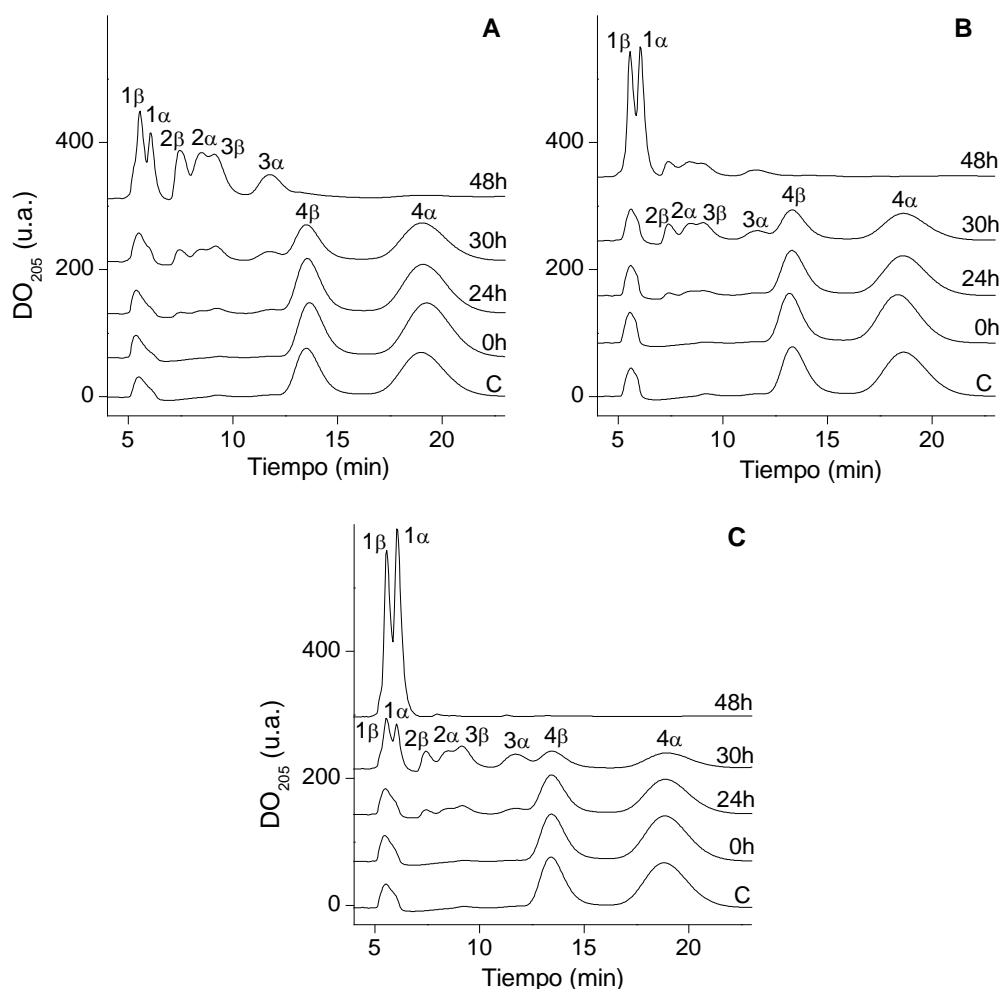


Figura 4.29. Seguimiento por HPLC de la degradación de GlcNAc_4 por (A) E585A, (B) D657A y (C) LytB silvestre. Cromatogramas obtenidos con alícuotas tomadas a los tiempos de reacción indicados en las figuras ($[\text{proteína}] = 4 \mu\text{M}$; $[\text{GlcNAc}_4] = 1,5 \text{ mM}$; 20 mM Pi , $\text{pH } 7,0$; 37°C).

Con el objetivo de descartar que la ausencia de actividad del mutante E585A de LytB sobre los cultivos de la cepa R6B de neumococo, o la disminución de la velocidad de hidrólisis en el mutante D657A sea debida a cambios estructurales en la proteína derivados de la mutación, se compararon los espectros de DC de ambos mutantes con los obtenidos para la proteína silvestre. Como puede verse en la Figura 4.30, los espectros registrados en la región del UV lejano son muy similares entre sí, tanto en ausencia como en presencia de colina, lo que demuestra que la estructura secundaria de la proteína y la contribución de los aminoácidos aromáticos en esta región del espectro permanece intacta en ambos casos.

RESULTADOS

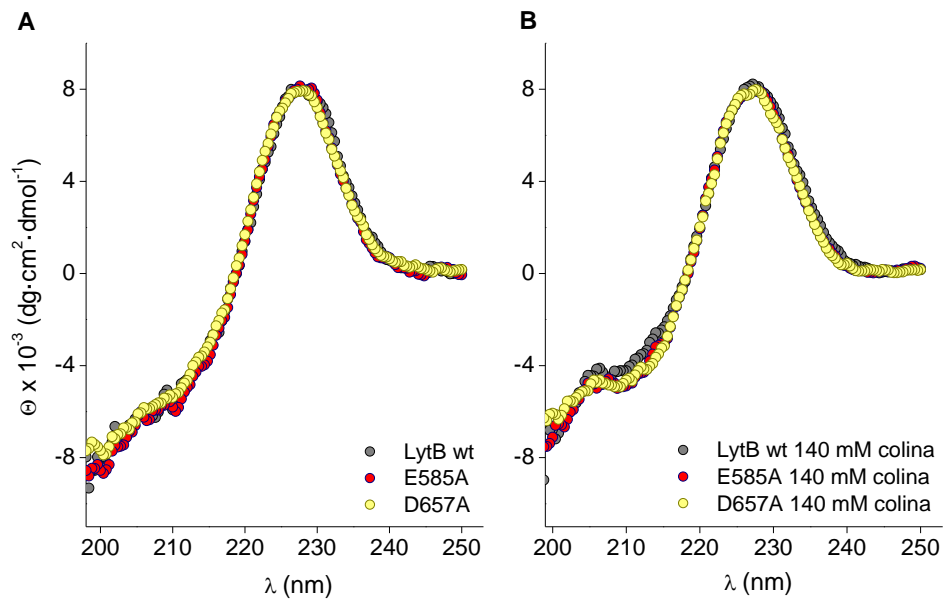


Figura 4.30. Comparación de los espectros de DC en el UV lejano de la proteína LytB silvestre (LytB wt) y los mutantes E585A y D657A en ausencia (A) y presencia (B) de colina a una concentración de 140 mM (medidas realizadas a 20°C en tampón Pi, pH 8,0 y 2 μ M de proteína).

En la Figura 4.31 se comparan los perfiles de desnaturalización térmica de LytB silvestre y los mutantes E585A y D657A, registrados por DC a 225 nm y una velocidad de calentamiento constante de 45°C/h.

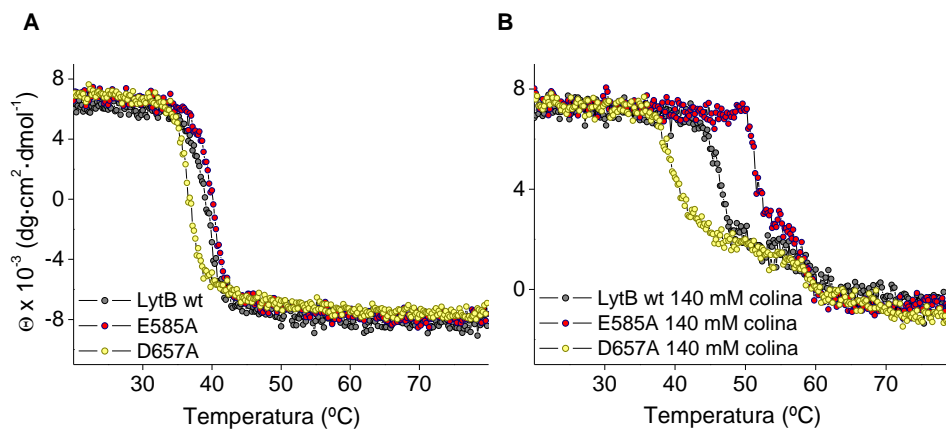


Figura 4.31. Comparación de los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos por DC para la proteína silvestre (LytB wt) y los mutantes E585A y D657A en ausencia (A) y presencia (B) de colina a una concentración de 140 mM. La concentración de proteína empleada fue de 2 μ M y las medidas se realizaron a 225 nm en tampón Pi pH 8,0 a una velocidad constante de barrido de 45°C/h. La pérdida de señal que se produce a altas temperaturas al aumentar la concentración de colina o P-colina es debida a la agregación parcial de la proteína desnaturalizada.

En ausencia de colina, la $T_{1/2}$ asociada a la desnaturalización de la proteína silvestre apenas sufre variaciones en los mutantes, observándose no obstante una cierta desestabilización en el mutante D657A ($\Delta T_{1/2} \approx -2,4^{\circ}\text{C}$) y una pequeña estabilización en E585A ($\Delta T_{1/2} \approx 0,8^{\circ}\text{C}$).

Los perfiles de $\Theta_{225\text{nm}}$ de los mutantes en presencia de colina, a una concentración de 140 mM, muestran el mismo carácter bifásico que el de la proteína silvestre, así como una agregación parcial de la proteína durante la desnaturalización que distorsiona las curvas, aunque las diferencias entre la proteína y los mutantes son más marcadas. Mientras que el mutante E585A sufre una considerable estabilización de la primera etapa ($\Delta T_{1/2} \approx 5,2^{\circ}\text{C}$), atribuida mediante DSC a la transición de la región catalítica, en el mutante D657A se produce el efecto contrario ($\Delta T_{1/2} \approx -6,4^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, los valores estimados para $T_{1/2}$ de la segunda etapa son similares al de la proteína silvestre ($T_{1/2} \approx 59,2, 58,2$ y $58,6^{\circ}\text{C}$ para LytB silvestre y los mutantes E585A y D657A, respectivamente). Estos resultados apoyan la observación realizada anteriormente acerca de la posibilidad de un acoplamiento entre la desnaturalización de LytB_{CBM} y la pérdida de estructura secundaria de la región catalítica, dado el efecto de las mutaciones de los residuos Glu585 y Asp657, situados en el centro activo, sobre la $T_{1/2}$ de la primera fase del perfil de desnaturalización.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La caracterización estructural y funcional de diversas CBPs ha puesto de manifiesto la gran versatilidad de estas proteínas y el complejo papel que juegan, a nivel funcional, tanto las repeticiones de unión a colina como la estructura global de las mismas. LytB consta, en su extremo N-terminal, de un péptido señal y un módulo de unión a colina (LytB_{CBM}), constituido este último, en la cepa R6 de neumococo, por 18 repeticiones de secuencia que unen la proteína a los motivos de fosforilcolina presentes en los ácidos teicoicos de la envuelta bacteriana. Además, presenta un módulo catalítico perteneciente a la familia GH73 de las glicosil hidrolasas (LytB_{GH73}), situado en el extremo C-terminal, responsable de su actividad glucosaminidasa. Entre estos dos módulos se encuentra una región que ha sido recientemente identificada como dos nuevos módulos, uno de tipo SH3b (LytB_{SH3b}) y otro de tipo WW (LytB_{WW}), ambos importantes para el reconocimiento del sustrato y la adhesión y la colonización del epitelio pulmonar (Bai *et al.*, 2014).

La función principal de LytB es la separación de las células hijas de *S. pneumoniae*, un patógeno humano que crece formando diplococos o pequeñas cadenas de células. De este modo, la cepa R6B, en la que se ha inactivado el gen que codifica para LytB (*lytB*⁻), forma largas cadenas de células (de las Rivas *et al.*, 2006), además de verse alteradas otras funciones como la formación de biofilms (Moscoso *et al.*, 2006), la colonización e infección de la nasofaringe y la evasión del sistema inmune del hospedador (Gosink *et al.*, 2000; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2014). La optimización de las condiciones de purificación de la proteína recombinante, a través de un segundo paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular, ha permitido aislar las formas monoméricas de LytB de las agregadas, caracterizar la enzima utilizando muestras estructuralmente homogéneas y demostrar la funcionalidad de los oligómeros o su capacidad para evolucionar hacia la forma activa de la enzima.

5.1. Estabilidad, organización modular y reconocimiento de ligandos

LytB muestra la organización modular más compleja de todas las PG hidrolasas de neumococo. En la enzima de la cepa R6, utilizada en este trabajo, el módulo LytB_{CBM} excede además en tamaño al de cualquier otra CBP. En ausencia de ligandos, el perfil de DSC de LytB pone de manifiesto una estructura moderadamente estable, al mostrar un único pico centrado en torno a los 39°C y una entalpía de desnaturalización de 260 kcal/mol, relativamente baja para la masa molecular que tiene la enzima. La unión de

colina y G-P-colina conlleva una notable estabilización de la estructura, que se extiende no sólo al módulo LytB_{CBM}, sino a una región de la proteína que posiblemente engloba los tres módulos que conforman LytB_{CAT}, poniendo así de manifiesto la interdependencia de las estructuras de ambas regiones de la proteína. Hay que destacar sin embargo, que la unión de colina introduce cambios muy pequeños en la región del UV-lejano del espectro de DC de LytB, un comportamiento que sólo se ha observado anteriormente en la fosforilcolín esterasa Pce (Hermoso *et al.*, 2005).

Por otro lado, el análisis de la estabilidad térmica de LytB en presencia de colina, P-colina y G-P-colina, tres ligandos que pueden considerarse análogos estructurales de los motivos de P-col de los ácidos teicoicos que reconoce la proteína, junto con la determinación de la afinidad de LytB por los mismos, ha permitido evaluar el papel que desempeña el grupo fosfato en el reconocimiento del aminoalcohol. Su presencia en la molécula de P-colina disminuye diez veces la afinidad que presenta LytB por colina, mientras que la incorporación del grupo glicerol y la consiguiente disminución de la carga negativa en la molécula de G-P-colina, reducen a la mitad esta caída. Estos resultados sugieren que la desestabilización introducida por el grupo fosfato es de carácter fundamentalmente electrostático y podría explicarse por la elevada carga negativa del módulo LytB_{CBM} ($\approx -14,71$ a pH 8,0). Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados obtenidos al estudiar la estabilidad térmica de LytB en presencia de GalNAc y Gal-6-sulfato. De estos experimentos se deduce que LytB_{CBM} no parece reconocer el anillo de GalNAc, portador de la P-col en los ácidos teicoicos, dada la incapacidad de ambos compuestos para estabilizar la proteína. Por otro lado, aunque no se ha podido establecer la estequiometría de los complejos formados, la elevada estabilización de LytB_{CBM} inducida por la unión de colina o G-P-colina sólo puede explicarse asumiendo la existencia de un número elevado de sitios de unión, dada la baja afinidad que éstos tienen por ambos ligandos. Esta conclusión se ve apoyada por la conservación de los residuos implicados en la formación de los sitios canónicos de unión a colina en 15 de las 18 CBRs de LytB (cepa R6) y la existencia del motivo "GYMA", ligado en LytC a la existencia de sitios de unión a colina formados por más de tres residuos aromáticos (Pérez-Dorado *et al.*, 2010; Figura 1.11 D), en 7 de las repeticiones (Figura 1.16). El análisis comparativo de las secuencias muestra, además, que la ausencia de alguno de los residuos aromáticos implicados en el reconocimiento de colina en las tres repeticiones más cortas de LytB (1ª, 5ª y 8ª) podría verse compensada, como en LytC, por la presencia de residuos aromáticos adicionales localizados en los lazos que conectan las dos hebras β de la repetición (n+1) o dos repeticiones sucesivas (n+1 a n+2 y n+2 a n+3). La presencia de estos residuos aromáticos adicionales en los sitios no canónicos de LytC en los que participan los motivos GYMA aumenta el tamaño de la cavidad de unión a colina, habiéndose propuesto, en base a estudios de "docking", la participación de los mismos en la unión a las cadenas de ácidos teicoicos mediante la

creación de nuevos contactos mediados por el grupo fosfato y el anillo del residuo de GalNAc-6-P-colina (Pérez-Dorado *et al.*, 2010). Esta hipótesis no parece, sin embargo, verse apoyada por los datos de ITC, dada la pérdida de afinidad que conlleva la presencia del grupo fosfato de la P-colina o la G-P-colina en comparación a la unión de colina a LytB. Por último, el hecho de que LytB no reconozca la etanolamina, ni la glucosa, el ribitol o GalNAc como ligandos abre la posibilidad a que su localización en los polos de la célula venga determinada por la interacción de la proteína con elementos del PG, o bien con proteínas de la superficie de la bacteria, y no con los ácidos teicoicos.

5.2. Identificación de los residuos catalíticos

La estructura del módulo LytB_{GH73} de la enzima codificada por la cepa R6 de *S. pneumoniae* se modeló utilizando como molde el módulo glucosaminidasa (SPH1045-C) de la proteína FlgJ de *Sphingomonas sp.* A1. La evaluación energética y estereoquímica del modelo generado, junto con la conservación estructural de residuos funcionales, indica que la estructura obtenida constituye una aproximación razonable a la estructura real del módulo GH73, como pudo confirmarse tras la resolución de la estructura del fragmento LytB_{CAT}, que incluye los módulos LytB_{SH3b}, LytB_{WW} y LytB_{GH73} de la proteína aislada de la cepa TIGR4 de neumococo (código PDB 4Q2W; Bai *et al.*, 2014). Según el modelo, el módulo LytB_{GH73} estaría organizado en dos lóbulos formados por cinco hélices alfa (seis α -hélices y una hélice 3_{10} (η -2) en la estructura cristalográfica de Bai y colaboradores) y una horquilla β , situada en una región flexible cuya densidad electrónica no es visible en la estructura cristalográfica, ambos conectados por lazos cuya longitud es claramente menor en LytB que en las estructuras de las otras tres glucosaminidasas de la familia GH73 de estructura conocida (SPH1045-C, Lm01076 y TM063). Debido a ello, esta es la zona peor evaluada del modelo. Como puede verse en la Figura 5.1, existe una buena correlación entre el modelo y la estructura cristalográfica LytB_{GH73}, incluido el posicionamiento relativo de los residuos aromáticos conservados y de los grupos de carácter ácido, con excepción, en este último caso, de los residuos localizados en la zona flexible de la estructura o en el extremo C-terminal de la cadena, y los cinco aminoácidos ácidos no mutados se sitúan, según indicaba el modelo, en la superficie opuesta a la de la cavidad del centro activo.

El sitio catalítico queda situado en la interfaz que forman ambos lóbulos y en él se localiza el Glu585 (Glu564 en Bai *et al.*, 2014), cuya implicación en la catálisis hemos demostrado por mutagénesis. Este residuo se encuentra conservado secuencial y estructuralmente en toda la familia GH73 (se corresponde con el Glu185 de SPH1045-C, el Glu122 de Lm01076, el Glu1238 de AtI_{WM}, el Glu34 de TM0633 y el Glu184 de FlgJ de *S. enterica*) y ha sido propuesto como el catalizador ácido que inicia la rotura del enlace glicosídico. Además, también está conservado en otras familias estructuralmente

relacionadas como la GH19, la GH22 o la GH23 (Bublitz *et al.*, 2009; Maruyama *et al.*, 2010). Sin embargo, el segundo residuo ácido, que sí ha sido identificado en el lóbulo β de Lm01076 (Glu156), SPH1045-C (Glu224) y TM0633 (Glu65), no se ha encontrado ni en LytB, ni en Atl_{WM}. Sólo el Asp657, localizado a 7,9 Å del Glu585 en el cristal, hace disminuir la velocidad con que LytB dispersa las células hijas o la hidrólisis de (GlcNAc)₄. Sin embargo, la sustitución del residuo Asp1335 de Atl_{WM}, equivalente al Asp657 de LytB, por alanina o asparagina apenas modifica la actividad catalítica. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las glicosil hidrolasas de la familia GH73 no comparten un único mecanismo catalítico, como se discutirá más adelante.

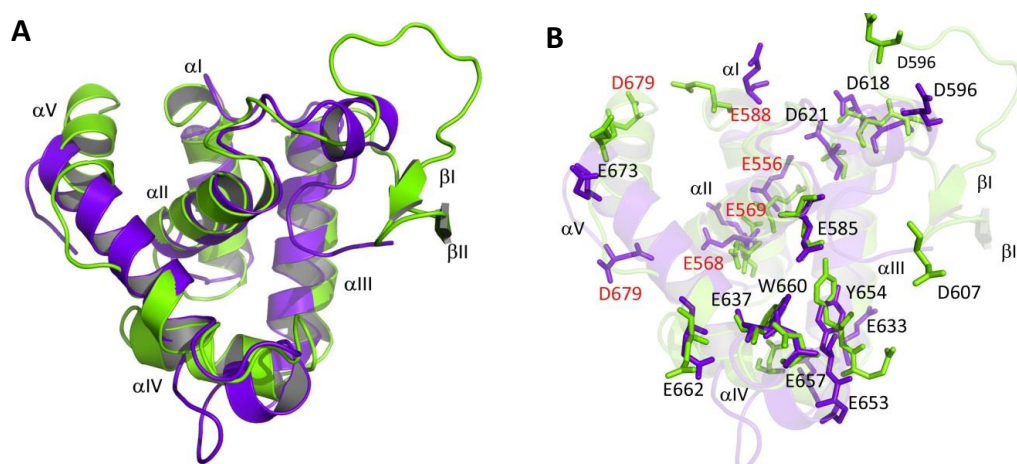


Figura 5.1. Comparación del modelo obtenido para el módulo LytB_{GH73} con la estructura cristalográfica de Bai *et al.* 2014. (A) Superposición de los elementos de estructura secundaria, en verde para el modelo y en violeta para la estructura de rayos-X. (B) Localización de las cadenas laterales de los residuos ácidos y los aromáticos conservados; en negro se identifican los residuos ácidos mutados (Glu585, Asp596, Asp607, Asp618, Asp619, Asp621, Glu633, Asp637, Glu653, Asp657, Glu662 y Glu673) y los aromáticos conservados (Tyr654 y Trp660), y en granate los residuos ácidos no mutados (Glu558, Glu566, Glu568, Glu569 y Asp679).

5.3. Selectividad de sustrato

La identificación de los productos solubles liberados por la digestión de las paredes celulares de neumococo con LytB ha permitido demostrar la actividad glucosaminidasa de la enzima. Estos resultados, unidos a los obtenidos para la hidrólisis del PG con la lisozima cellosyl, han mostrado también que LytB no es activa sobre sustratos desacetilados. En concordancia con estos resultados, la digestión con LytB de las paredes procedentes de la cepa R36A::*pgdA*, en la que los residuos de GlcNAc están acetilados debido a la inactivación de la desacetilasa *pgdA*, aumentó casi al doble la cantidad de material liberado en la hidrólisis, en comparación con el obtenido tras la degradación de las paredes de la cepa R36A, con un claro aumento, como cabría esperar, en la proporción de las formas acetiladas de los muropéptidos TetraTri y

Tetra(SA)Tri (fracciones 19' y 23'). A diferencia de TM0633 (Lipski *et al.*, 2015), LytB hidroliza eficientemente cadenas glicánicas sin sustituir y, al igual que AltA (Eckert *et al.*, 2015), actúa preferentemente sobre muropéptidos no entrecruzados (con y sin ramificaciones dipeptídicas) y dímeros directamente entrelazados (TetraTri). Según los resultados de Bui y colaboradores (2012), la distribución de los residuos de GlcN en el PG de neumococo varía con el grado de entrecruzamiento (45,1% en muropéptidos diméricos frente al 18,5% en monómeros y el 14,2% en trímeros), lo que podría explicar, en parte, la mayor resistencia de los dímeros a la hidrólisis por LytB en cepas parcialmente desacetiladas. No explicaría sin embargo la escasa liberación de dímeros ramificados y trímeros, casi indetectables entre los productos de reacción de todas las paredes de neumococo tras la degradación por LytB pero visibles en los productos de cellosyl. Una posible explicación de la baja o nula eficacia de LytB sobre este tipo de muropéptidos podría recaer sobre la región flexible de LytB_{GH73} (no visible en la estructura cristalina), o bien en el módulo LytB_{CBM} (cuya posición en la estructura global de la proteína sigue siendo desconocida), ya que ambos podrían obstaculizar la unión LytB a este tipo de muropéptidos. Todas las estructuras por las que LytB muestra preferencia podrían ser mayoritarias en los finos filamentos de pared que mantienen unidas las células hijas, ya que es donde la enzima actúa *in vivo*, tanto endógena como exógenamente. De hecho la densidad electrónica observada en las polos de las células de neumococo difiere de la de las paredes laterales, lo que sugiere que son estructural y/o químicamente diferentes (De Las Rivas *et al.*, 2002).

A nivel molecular, la resistencia que muestran los sustratos desacetilados a ser degradados por LytB podría explicarse en base a dos mecanismos distintos, aunque no excluyentes: *i*) la implicación del grupo *N*-acetilo de los residuos de GlcNAc en el reconocimiento del sustrato por el centro activo y *ii*) la participación directa del grupo *N*-acetilo del residuo de GlcNAc unido en posición -1 en la catálisis, actuando como nucleófilo en la reacción de hidrólisis a través de un mecanismo asistido por el sustrato, en el que la reacción tiene lugar con retención de la configuración (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1995). La observación de que en LytB sólo hay un residuo ácido esencial para la catálisis supone un importante argumento a favor de que la hidrólisis mediada por LytB tenga lugar a través de este tipo de mecanismo, justificando así el papel fundamental de la acetilación para la catálisis y, por tanto, en la regulación de la actividad de LytB.

Además de actuar como una glucosaminidasa, se ha probado que LytB es capaz de hidrolizar oligómeros solubles de GlcNAc (actividad quitinasa) y el análisis de la proporción de anómeros α y β en los primeros productos obtenidos tras la degradación de (GlcNAc)₄ y (GlcNAc)₅ es consistente con que la reacción tenga lugar a través de un mecanismo con retención de la configuración. Esta observación es coherente con la hipótesis de que la reacción de hidrólisis tenga lugar a través de un mecanismo asistido

por el sustrato. La lenta aparición de los productos de hidrólisis podría deberse a la formación previa de un complejo no productivo, siendo necesaria su reconversión a una forma competente para la catálisis (Hirakawa *et al.*, 2008), o a la necesidad de que la proteína modifique su conformación para poder unir el sustrato. Además, LytB muestra actividad glicosil transferasa baja, pero detectable, observada también en otras enzimas que presentan mecanismos catalíticos con retención de la configuración como, por ejemplo, la lisozima de huevo de gallina HEWL (Rupley y Gates, 1967) o el mutante T26H de la lisozima T4L (Kuroki *et al.*, 1999). Estas dos actividades, quitinasa y glicosil transferasa, podrían estar relacionadas, al menos en parte, con el papel que desempeña LytB en la formación de biofilms y su capacidad para desintegrar este tipo de estructuras, ya que la matriz del biofilm neumocócico contiene un polisacárido con unidades de β -(1 \rightarrow 4)GlcNAc muy sensible a la acción de las quitinasas (Domenech *et al.*, 2013). Además, la existencia en los biofilms de *S. pneumoniae* de complejos formados por LytB y DNA extracelular ha sido descrita recientemente (Domenech *et al.*, 2015). LytB es sin embargo incapaz de hidrolizar GMDP o GMPP, lo que pone de manifiesto la importancia de cada uno de los posibles subsitios de unión del centro activo para el reconocimiento del PG y, en consecuencia, para la formación de complejos catalíticamente productivos. El hecho de que el tetrasacárido (GM)₂ sea el fragmento más pequeño hidrolizable del PG y que el patrón de corte sólo sea compatible con su unión a las posiciones -3 a +1 revela la importancia de la ocupación de estos subsitios para la formación de complejos competentes para la catálisis. Al mismo tiempo, la comparación con la hidrólisis de (GlcNAc)₄ o (GlcNAc)₅, muestra claramente que los grupos lactilo de los residuos de MurNAc son los que determinan los posibles modos de unión de (GM)₂ al sitio activo. Que LytB no hidrolice el trisacárido formado por GlcNAc-MurNAc-GlcNAc (GMG) ni GMDP o GMPP podría reflejar por tanto modos de unión no productivos (Hirakawa *et al.*, 2008).

5.4. Similitudes y diferencias con otras glucosaminidasas de la familia GH73

La selectividad de LytB por sustratos completamente acetilados no parece inherente a todas las glucosaminidasas de la familia GH73. Aunque en baja proporción, la autolisina Auto (Lmo1076) y la glucosaminidasa IspC de *L. monocitogenes* también degradan muropéptidos desacetilados (Bublitz *et al.*, 2009; Ronholm *et al.*, 2012). Esta posibilidad permite descartar, en principio, un mecanismo de reacción asistido por el sustrato en ambas enzimas, lo que concuerda con la identificación de dos grupos ácidos esenciales para la actividad en Auto (Glu122 y Glu156). Aunque no hay datos sobre su capacidad para actuar sobre sustratos desacetilados, también se han identificados dos residuos ácidos esenciales para la actividad en los módulos glucosaminidasa de las proteínas flagelares de *Sphingomonas sp.* A1 (SPH1045-C) y *S. enterica*, o la proteína TM0633 de *T. maritima* (Maruyama *et al.*, 2010; Herlihey *et al.*, 2014; Lipski *et al.*, 2015).

Los residuos Glu156 (Lmo1076) y Glu224 (SPH1045-C), situados cerca del extremo C-terminal de la primera hebra del lóbulo β , están a 13,3 Å de distancia del carboxilato del residuo que actúa como donador de protones (ácido general) y, tras la unión al sustrato, se debería producir un cambio estructural en la cavidad catalítica (gracias a la flexibilidad del lazo situado entre los lóbulos α y β), facilitando el acercamiento entre los dos residuos catalíticos, hasta situarlos a la distancia necesaria (9-11 Å; Wang *et al.*, 1994) para que la hidrólisis del sustrato tenga lugar mediante un mecanismo con inversión de la configuración del carbono anomérico (Bublitz *et al.*, 2009). Según el modelo construido para la glucosaminidasa FlgJ de *S. enterica*, la distancia entre los dos residuos catalíticos (Glu184 y Glu223) sería de 11 Å, un valor que está en el límite superior de los observados en enzimas inversoras (Herlihey *et al.*, 2014). Debido a ello, Herlihey y colaboradores han planteado la posibilidad de que el lazo flexible del lóbulo β , en lugar de acercar los dos grupos carboxilato implicados en la catálisis, pueda estar posicionando al Glu223 para permitirle que facilite la formación del intermedio de la reacción (un catión oxazolinio) en un modo de acción anquimérico, dando lugar a la retención de la configuración anomérica del producto de la hidrólisis.

Como se detalla en el apartado 5.3, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la hidrólisis mediada por LytB, al igual que podría suceder en Atl_{WM}, tendría lugar a través de un mecanismo catalítico con retención de la configuración asistido por el sustrato, con el Glu585 actuando como ácido general y como nucleófilo el oxígeno carbonilo del *N*-acetilo del residuo de GlcNAc unido en la posición -1 del centro activo. En este contexto, el Asp657, situado a 7,9 Å del Glu585 y conservado en la familia GH73, podría participar en el reconocimiento del sustrato, lo que explicaría la caída en la velocidad de dispersión observada para el mutante D657A.

Así pues, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las glicosil hidrolasas de la familia GH73 no comparten un único mecanismo catalítico, un fenómeno que podría estar relacionado con el tamaño y/o la estructura del lóbulo β , que contribuye a modelar la forma de la cavidad catalítica (Lipski *et al.*, 2015). La evolución hacia enzimas inversoras (con dos residuos ácidos esenciales para la actividad) o enzimas cuya actividad murolítica es asistida por el sustrato (un solo residuo ácido esencial para la actividad y conservación de la esteroquímica) podría constituir un mecanismo de ajuste fino de la especificidad de sustrato.

5.5. Factores que determinan la actividad de LytB *in vivo*

In vivo LytB actúa exclusivamente sobre los filamentos celulares que conectan las células hijas. En concordancia con estudios anteriores (De Las Rivas *et al.*, 2002), nuestros resultados muestran que LytB puede solubilizar hasta un 36% del PG cuando se utilizan como sustrato fragmentos de paredes de la cepa R36A, cuyos residuos de

GlcN están parcialmente desacetilados, y hasta un 66%, aproximadamente, cuando las paredes están completamente acetiladas, como ocurre en la cepa R36::*pgdA*. Todo ello lleva a pensar que LytB podría ser, potencialmente, una enzima autolítica, cuya actividad debe estar altamente regulada para prevenir la lisis celular. De hecho, la imposibilidad de clonar el fragmento de DNA que codifica para la forma inmadura de la proteína (portadora del péptido señal) en *E. coli* es consistente con la idea de que la enzima, cuando es procesada y transportada al exterior de la membrana citoplasmática, puede degradar el PG y ocasionar la lisis del cultivo cuando su actividad no está regulada, como también sucede con las endolisinas de los bacteriófagos de neumococo EJ-1 y Cpl-1 (De Las Rivas *et al.*, 2002). En este sentido, nuestros resultados sugieren que la actividad de LytB podría estar controlada, al menos, por tres mecanismos distintos como son: *i*) el confinamiento en los polos de la célula (independiente de la presencia de colina), *ii*) la unión a los residuos de colina de los ácidos teicoicos (esencial para la actividad *in vivo*) mediada por el módulo LytB_{CBM}, y *iii*) la composición del PG (selección de los enlaces potencialmente hidrolizables mediante desacetilación de los residuos de GlcNAc de las cadenas glicánicas y el entrecruzamiento del PG).

Como ya se ha indicado, las paredes laterales de neumococo podrían diferir estructural y/o químicamente de las de los polos de la célula y la acumulación de LytB en los mismos podría deberse al reconocimiento específico de un receptor/es, por el momento desconocido/s, con una distribución o accesibilidad desigual sobre la envuelta de la bacteria. Por otro lado, el propio PG podría actuar como una entidad, irregular y selectiva, en la que diferencias en las dimensiones de los poros, vinculadas al entrecruzamiento del PG, podrían determinar tanto la localización de LytB como su acceso a un posible receptor, considerando el tamaño de la enzima y la notable asimetría que presentan habitualmente las estructuras completas de las CBPs (Hermoso *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2005; Pérez-Dorado *et al.*, 2010). En relación con ello, hemos observado que la hidrólisis de los segmentos peptídicos por la amidasa LytA potencia notablemente la actividad específica de LytB, lo que es consistente con los resultados de los ensayos de degradación de las paredes celulares que indican que LytB prefiere regiones del PG pobres en entrecruzamientos. Por otro lado, las diferencias observadas entre los perfiles muropeptídicos obtenidos tras la digestión de paredes celulares o el PG de la cepa R6B por cellosyl parecen indicar que también los ácidos teicoicos podrían contribuir a la selectividad de LytB ocultando, al menos parcialmente, los posibles enlaces hidrolizables. Finalmente, el elevado número de CBRs que componen el módulo LytB_{CBM} también posibilita una fuerte fijación a la envuelta celular de bacteria mediante la creación de múltiples interacciones no covalentes con los ácidos teicoicos, dificultando así el desplazamiento de la enzima a través del PG para alcanzar nuevos enlaces hidrolizables.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- La proteína LytB recombinante aislada por cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa es molecularmente heterogénea, coexistiendo monómeros y formas agregadas separables por cromatografía de exclusión molecular. Ambas formas mantienen su capacidad dispersora de células sobre cultivos de neumococo pero se han observado diferencias en la estructura, por lo que los estudios llevados a cabo en esta tesis se han realizado con muestras monoméricas.

- La moderada estabilidad estructural que presenta LytB se ve extraordinariamente incrementada en presencia de ligandos que simulan su interacción con los residuos de fosforilcolina de los ácidos teicoicos, colina, P-col y G-P-col. La estabilización del CBM es transmitida al resto de la estructura, posiblemente a través de las interacciones establecidas entre ambas regiones de la proteína, efecto que es sensible a la presencia y carga del grupo fosfato.

- La desestabilización de la interacción con el CBM introducida por la presencia del grupo fosfato en los residuos de P-col y G-P-colina parece estar relacionada con su carga y podría tener su origen en la elevada carga negativa del módulo, estimada en -14,71 a pH 8,0. Considerando la baja afinidad de LytB por las moléculas de colina en solución, la fuerte estabilización por la unión del aminoalcohol debe reflejar una elevada estequiometría de unión, apoyada también por la conservación de los residuos implicados en la formación de los sitios de unión.

- El modelo construido por homología para el módulo GH73 de LytB nos ha permitido ubicar los residuos ácidos dentro de la estructura del módulo e identificar al residuo Glu585 como el catalizador ácido en el proceso de hidrólisis del enlace glicosídico entre los anillos de GlcNAc y MurNAc, cuya implicación en la catálisis se ha demostrado por mutagénesis. La mutación a alanina de los otros 11 residuos localizados en la cara en que se encuentra la cavidad catalítica ha demostrado que sólo el Asp657, situado a 8,7 Å del Glu585 en el modelo, contribuye a la eficacia del proceso catalítico.

- El análisis de los productos obtenidos tras la degradación de las paredes celulares de diferentes cepas de neumococo por LytB, nos ha permitido demostrar que la enzima es una *N*-acetilglucosaminidasa que hidroliza, preferentemente, regiones del PG con bajo nivel de entrecruzamiento y cadenas glicánicas sin sustituir. Estos resultados concuerdan con su capacidad para hidrolizar oligómeros de GlcNAc y (GM)₂. Además, a diferencia de otras enzimas también pertenecientes a la familia GH73, LytB no es capaz de liberar muropéptidos desacetilados, por lo que el grado de

desacetilación de los residuos de GlcNAc en las paredes de neumococo y la desigual distribución de esta modificación, podría ser un mecanismo de regulación de la actividad de LytB y contribuir a explicar, junto con otros factores, su carácter no lítico.

- LytB presenta actividad quitinasa y glicosil transferasa, como han mostrado los resultados obtenidos tras la hidrólisis de oligómeros de GlcNAc. La actividad catalítica de la enzima sobre estos compuestos tiene lugar con retención de la configuración.

- La identificación de un solo residuo ácido esencial para la catálisis junto con la incapacidad de LytB para hidrolizar muropéptidos que contengan GlcN en vez de GlcNAc y el hecho de que la degradación de oligómeros de GlcNAc tenga lugar con retención de la configuración, indica que la enzima podría actuar a través de un mecanismo catalítico asistido por el sustrato donde el residuo Glu585 actuaría como ácido general y el oxígeno carbonilo del grupo *N*-acetilo de la GlcNAc como nucleófilo. La posible participación del Asp657 en el reconocimiento del sustrato natural podría explicar el efecto de su mutación a alanina sobre la actividad.

- La incapacidad de LytB para hidrolizar los compuestos GMDP y GMPP, pero sí (GM)₂ o los oligómeros de GlcNAc, pone de manifiesto la importancia de cada uno de los posibles subsitios de unión del centro activo para el reconocimiento del PG y, en consecuencia, para la formación de complejos catalíticamente productivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Alfayate-Miguélez S, Ruiz J, Sanchez-Solis M, Guerrero C, Pérez M, Ortiz MM, Núñez ML, López ML, Blazquez A, Zarauz JM, Ruiz G, Ortuño MP y Grupo de estudio de Enfermedades infecciosas de la Comunidad Autónoma de Murcia. Sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* en niños portadores sanos en Murcia (España). *An Pediatr (Barc)*. 2014.

Alonso De Velasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.*, 59(4): 591-603, 1995.

American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*, 106: 362-366, 2000.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2): 195-201, 2006.

Avery OT, Macleod CM, McCarthy M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med.*, 79(2): 137-158, 1944.

Avery OT y Morgan HJ. Immunological reactions of the isolated carbohydrate and protein of pneumococcus. *J Exp Med* 42: 347-353, 1925.

Badger E. The nutritional requirements of a strain of Type III pneumococcus. *J. Biol. Chem.*, 47(6): 509-518, 1944.

Bai XH, Chen HJ, Jiang YL, Wen Z, Huang Y, Cheng W, Li Q, Qi L, Zhang JR, Chen Y, Zhou CZ. Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J. Biol. Chem.*, 289, 23403-23416, 2014.

Behr T, Fischer W, Peter-Katalinić, Egge H. The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur. J. Biochem.*, 207(3): 1063-1075, 1992.

Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62, 293-300, 1951.

Bogaert D, Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* 4: 144-154, 2004.

Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski, A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med.*, 231: 366-377, 2006.

Brameld KA y Goddard WA 3rd. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95(8): 4276-4281, 1998.

Brandts JF, Hu CQ, Lin L-N, Mas MT. A simple model for proteins with interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. *Biochemistry*, 28: 8588-8596, 1989.

Briles EB, Tomasz A. Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing LTA. *J. Biol. Chem.* 248: 6394-6397, 1973.

Brundish DE, Baddiley J. The characterization of pneumococcal C-polysaccharide as a ribitol teichoic acid. *Biochem. J.* 105: 30c-31c, 1967.

Brundish DE, Baddiley J. Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem. J.* 110: 573-582, 1968.

Bublitz M, Polle L, Holland C, Heinz DW, Nimtz M, Schubert W-D. Structural basis for autoinhibition and activation of Auto, a virulence-associated peptidoglycan hydrolase of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 71(6): 1509-1522, 2009.

Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D, Kern T, Bougault C, Tomasz A, Simorre J-P, Vollmer W. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Analytical Biochemistry* 421, 657-666, 2012.

Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol. Microbiol.*, 68(4): 838-847, 2008.

Burge RE, Fowler AG, Reaveley DA. Structure of the peptidoglycan of bacterial cell walls. I. *J. Mol. Biol.*, 117(4): 927-953, 1977.

Bustamante N, Rico-Lastres P, García E, García P, Menéndez M. Thermal stability of Cpl-7 endolysin from the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-7; cell wall-targeting of its CW_7 motifs. *PLOS One*, 7(10): 1-11, 2012.

Camiade E, Peltier J, Bourgeois I, Couture-Tosi E, Courtin P, Antunes A, Chapot-Chartier M-P, Dupuy B, Pons J-L. Characterization of Acp, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium perfringens* with N-acetylglucosaminidase activity that is implicated in cell separation and stress-induced autolysis. *J. Bacteriol.*, 192(9): 2373-2384, 2010.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZY): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37: D233-D238, 2009.

- Charlemagne D y Jollès P. The action of various lysozymes on chitopentaose. *FEBS LETTERS*, 23(2): 275-278, 1972.
- Chester FD. A manual of determinative bacteriology. The MacMillan Co., New York, 1901.
- Chipman DM, Sharon N. Mechanism of lysozyme action. *Science* 165(3892): 454-465, 1969.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49: 711-745, 1995.
- Crisóstomo MI, Vollmer W, Kharat AS, Inhülsen S, Gehre F, Buckenmaier S, Tomasz A. Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 61(6): 1497-1509, 2006.
- Croux C, Ronda C, López R, García JL. Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol. Microbiol.*, 9(5): 1019-1025, 1993.
- Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkilä, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377(5): 435-438, 1995.
- Dahlquist FW, Borders CL Jr, Jacobson G, Raftery MA. The stereospecificity of human, hen, and papaya lysozymes. *Biochemistry*, 8(2): 694-700, 1969.
- Davies G y Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9): 853-859, 1995.
- Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 321(Pt 2): 557-559, 1997.
- De Las Rivas B, García JL, López R, García P. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.*, 184: 4988-5000, 2002.
- Dennis RJ, Taylor EJ, Macauley MS, Stubbs KA, Turkenburg JP, Hart SJ, Black GN, Vocadlo DJ, Davies GJ. Structure and mechanism of a bacterial beta-glucosaminidase having O-GlcNAcase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(4): 365, 371, 2006.
- Díaz E, López R, García JL. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 8125-8129, 1991a.
- Díaz E, López R, García JL. Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.*, 266: 5464-5471, 1991b.

Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET. Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med. Microbiol. Immunol.*, 187(3): 173-181, 1999.

Dmitriev B, Toukach F, Ehlers S. Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *TRENDS in Microbiology*, 13(12): 569-574, 2005.

Domenech M, García E, Prieto A, Moscoso M. Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ. Microbiol.*, 15: 502-516, 2013.

Domenech M, Ruiz S, Moscoso M, García E. Formation of *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein-DNA complexes in vitro. Implications for biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2015.

Draing C, Pfitzenmaier M, Zummo S, Mancuso G, Geyer A, Hartung T, von Aulock S. Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 281(45): 33849-33859, 2006.

Eberhardt A, Hoyland CN, Vollmer D, Bisle S, Cleverley RM, Johnsborg O, Håvarstein LS, Lewis RJ, Vollmer W. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 18(3): 240-255, 2012.

Eckert C, Lecerf M, Dubost L, Arthur M, Mesnage S. Functional analysis of AtIA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, 188(24): 8513-8519, 2006.

Eldholm V, Johnsborg O, Straume D, Ohnstad HS, Berg KH, Hermoso JA, Håvarstein LS. Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol. Microbiol.*, 76(4): 905-917, 2010.

Fernández-Tornero C, García E, López R, Giménez-Gallego G, Romero A. Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.*, 321: 163-173, 2002.

Fernández-Tornero C, López R, García E, Gimenez-Gallego G, Romero A. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.*, 8, 1020-1024, 2001.

Fischer W. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 183: 61-76, 1994.

Fischer W. Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microbial Drug Resistance* 3(4): 309-325, 1997.

Fischer W. Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res. Microbiol.* 151: 421-427, 2000.

Fisher H y Tomasz A. Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Chem.* 53: 4813-4829, 2010.

Fisher JF y Mobashery S. Host-guest chemistry of the peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 163(1): 46-54, 1985.

Fischer W y Rösel P. The alanine ester substitution of lipoteichoic acid (LTA) in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.*, 119(2): 224-226, 1980.

Fischer W, Koch HU, Rösel P, Fiedler F. Alanine ester-containing native lipoteichoic acids do not act as lipoteichoic acid carrier. Isolation, structural and functional characterization. *J. Biol. Chem.*, 255(10): 4557-4562, 1980.

Fukamizo T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 1: 105-124, 2000.

García JL, García E, Arrarás A, García P, Ronda C, López R. Cloning, purification and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J. Virol.*, 61: 2573-2580, 1987.

García P, García JL, García E, Sánchez-Puelles JM, López R. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene*, 86: 81-88, 1990.

García P, González MP, García E, López R, García JL. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* 31: 1275-1277, 1999.

García-Bustos JF y Tomasz A. A biological Price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(14): 5414-5419, 1990.

García-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.*, 262(32): 15400-15405, 1987.

Giesbrecht P, Wecke J, Reinicke B. On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. *Int. Rev. Cytol.*, 44: 225-318, 1976.

Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182: 319-326, 1989.

Gisch N, Kohler T, Ulmer AJ, Müthing J, Pribyl T, Fischer K, Lindner B, Hammerschmidt S, Zähringer U. Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J. Biol. Chem.*, 288(22): 15654-15667, 2013.

Goebel WF, Shedlovsky T, Lavin GI, Adams MH. The heterophil antigen of *Pneumococcus*. *J. Biol. Chem.*, 148: 1-15, 1943.

Goodell y Schwarz U. Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 162(1): 391-397, 1985.

Gosink K, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 68(10): 5690-5695, 2000.

Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27(2): 113-159, 1928.

Hardy GG, Magee AD, Ventura CL, Caimano MJ, Yother J. Essential role for cellular phosphoglucosyltransferase in virulence of Type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 69(4): 2309-2317, 2001.

Hashimoto W, Ochiai A, Mommaa K, Itoh T, Mikami B, Maruyama Y, Murata K. Crystal structure of the glycosidase family 73 peptidoglycan hydrolase FlgJ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381: 16-21, 2009.

Heidelberger M. Precipitating cross-reactions among pneumococcal types. *Infect. Immun.* 41: 1234-1244, 1983.

Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2759-2762, 1995.

Herlihey FA, Moynihan PJ, Clarke AJ. The essential protein for bacterial flagella formation FlgJ functions as a β -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.*, 289(45): 31029-31042, 2014.

Hermoso JA, Lagartera L, González A, Stelter M, García P, Martínez-Ripoll M, García JL, Menéndez M. Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12: 533-538, 2005.

Hermoso JA, Monterroso B, Albert A, Galán B, Ahrazem O, García P, Martínez-Ripoll M, García JL, Menéndez M. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure*, 11: 1239-1249, 2003.

Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, 16: 7351-7367, 1988.

Hirakawa H, Ochi A, Kawahara Y, Kawamura S, Torikata T, Kuhara S. Catalytic reaction mechanism of goose egg-white lysozyme by molecular modelling of enzyme-substrate complex. *J. Biochem.*, 144(6): 753-761, 2008.

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77: 51-59, 1989.

- Höltje J-V y Tomasz A. Lipoteichoic Acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus (physiological role of lipoteichoic acid/regulation of autolytic enzymes). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72(5): 1690-1694, 1975.
- Höltje JV y Tomasz A. Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol.Chem.*, 521: 4199-4207, 1976.
- Horne DS, Tomasz A. Possible role of a choline-containing teichoic acid in the maintenance of normal cell shape and physiology in *Streptococcus oralis*. *J. Bacteriol.* 175: 1717-1722, 1993.
- Huard C, Miranda G, Wessner F, Bolotin A, Hansen J, Foster SJ, Chapot-Chartier M-P. Characterization of Acmb, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. *Microbiol.*, 149: 695-705, 2003.
- Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect. Immun.* 78: 704-715, 2010.
- Inagaki N, Iguchi A, Yokoyama T, Yokoi KJ, Ono Y, Yamakawa A, Taketo A, Kodaira K. Molecular properties of the glucosaminidase AcmA from *Lactococcus lactis* MG1363: mutational and biochemical analyses. *Gene*, 447(2): 61-71, 2009.
- Iseli B, Armand S, Boller T, Neuhaus JM, Henrissat B. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.*, 382(1-2): 186-188, 1996.
- Jacobs C, Frère JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell*, 88(6): 823-832, 1997.
- Kelley LA, Sternberg MJE. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4(3): 363-371, 2009.
- Kern T, Giffard M, Hediger S, Amoroso A, Giustini C, Bui NK, Joris B, Bougault C, Vollmer W, Simorre J-P. Dynamics Characterization of Fully Hydrated Bacterial Cell Walls by Solid-State NMR: Evidence for Cooperative Binding of Metal Ions. *J. AM. CHEM. SOC.*, 132, 10911-10919, 2010.
- Kim JO y Weiser JN. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 177: 368-77, 1998.
- Kuroki R, Weaver LH, Matthews BW. Structural basis of the conversion of T4 lysozyme into a transglycosidase by reengineering the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 8949-8954, 1999.

Labischinski H, Barnickel G, Bradaczek H, Giesbrecht P. On the secondary and tertiary structure of murein. Low and medium-angle X-ray evidence against chitin-based conformations of bacterial peptidoglycan. *Eur. J. Biochem.*, 95(1): 147-155, 1979.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.*, 26: 283-291, 1993.

Laue, TM, ShahBD, Ridgeway TM, Pelletier SL. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In Harding SE, Rowe AJ, Horton JC, eds., *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer sciences*. Royal Soc. Chem. p 90-125, 1992.

Lebon A, Verkaik NJ, Labout JAM, de Vogel CP, Hooijkaas H, Verbrugh HA, van Wamel WJ, Jaddoe VW, Hofman A, Hermans PW, Ma J Mitchell TJ, Moll HA van Belkum A. Natural antibodies against several pneumococcal virulence proteins in children during the pre-pneumococcal-vaccine era: the generation R study. *Infect. Immun.* 79: 1680-1687, 2011.

Li Q, Cheng W, Morlot C, Bai XH, Jiang YL, Wang W, Roper DI, Vernet T, Dong YH, Chen Y, Zhou CZ. Full-length structure of the major autolysin LytA. *Acta Cryst.* 71, 1373-1381, 2015.

Lipski A, Hervé M, Lombard V, Nurizzo D, Mengin-Lecreulx D, Bourne Y, Vincent F. Structural and biochemical characterization of the β -N-acetylglucosaminidase from *Thermotoga maritima*: Toward rationalization of mechanistic knowledge in the GH73 family. *Glycobiology*, 25(3): 319-330, 2015.

Llull D, López R, García E. Skl, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS Lett.*, 580: 1959-1964, 2006.

Lode HM. Clinical impact of antibiotic-resistant Gram-positive pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15(3): 212-217, 2009.

López R y García R. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes and bacteriophages. *FEMS Microbiol Rev.*, 28: 553-580, 2004.

López R, García JL, García E, Ronda C, García P. Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.*, 100(1-3): 439-447, 1992.

López R, García E, García P, Ronda C, Tomasz A. Choline containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 151: 1581-1590, 1982.

Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364):83-85, 1992.

Magee A y Yother J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 69(6): 3755-3761, 2001.

Malcolm BA, Rosenberg S, Corey MJ, Allen JS, de Baetselier A, Kirsch JF. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(1): 133-137, 1989.

Mark BL, Mahuran DJ, Cherney MM, Zhao D, Knapp S, James MN. Crystal structure of human b-hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J. Mol. Biol.*, 327(5): 1093-1109, 2003.

Mark BL, Vocadlo DJ, Knapp S, Triggs-Raine BL, Withers SG, James MN. Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.*, 276(13): 10330-10337, 2001.

Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*, 8(10): 1025-1035, 2000.

Maruyama Y, Ochiai A, Itoh T, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. Mutational studies of the peptidoglycan hydrolase FlgJ of *Sphingomonas* sp. strain A1. *Journal of Basic Microbiology*, 50: 311-317, 2010.

McCarty M, Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J. Exp. Med.* 83: 89-96, 1946.

McCullers JA y Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Frontiers in Bioscience* 6: d877-889, 2001.

Medrano FJ, Gasset M, López-Zúmel C, Usobiaga P, García JL, Menéndez M. Structural characterization of the unligated and cholinebound forms of the major pneumococcal autolysin LytA amidase. Conformational transitions induced by temperature. *J. Biol. Chem.*, 271: 29152-29161, 1996.

Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(12): 4404-4409, 2006.

Minton AP. Modern analytical ultracentrifugation (Schuester, T.H., Lave, T.H., eds.), pp 81-93, Birkhäuser, Boston, 1994.

Mold C, Du Clos TW, Nakayama S, Edwards KM, Gewurz H. C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Ann N Y Acad Sci.* 389: 251-262, 1982.

Molina R, González A, Stelter M, Pérez-dorado I, Kakn R, Morales M, Campuzano S, Campillo NE, Mobashery S, García JL, García P, Hermoso JA. Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO reports*, 10: 246-251, 2009.

Monterroso B, López-Zumel C, García JL, Sáiz JL, García P, Campillo NE, Menéndez, M. Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme. *Biochem. J.*, 391: 41-49, 2005.

Monzingo AF, Marcotte EM, Hart PJ, Robertus JD. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into prokaryotic and eukaryotic families sharing a conserved core. *Nature Structural Biology* 3(2): 133-140, 1996.

Morlot C, Pernot L, Le Gouellec A, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O, Dessen A. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 280(16): 15984-15991, 2005.

Morona JK, Miller DC, Morona R, Paton JC. The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes *cpsA*, *cpsB*, and *cpsD* have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *JID* 189: 1905-1913, 2004.

Moscoso M, Obregón V, López R, García JL, García E. Allelic variation of polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12): 8706-8713, 2005.

Moscoso M, García E, López R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.*, 188(22): 7785-7795, 2006.

Mosser JL, Tomasz A. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 245(2): 287-298, 1970.

Moynihan PJ, Sychantha D, Clarke AJ. Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation. *Bioorganic Chemistry* 54, 44-50, 2014.

Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* 75: 83-90, 2007.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee I, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374: 893-902, 2009.

Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 75: 350-357, 2007.

- Ohno N, Yadomae T, Miyazaki T. Identification of 2-amino-2-deoxyglucose residues in the peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae*. *Carbohydrate Research*, 107: 152-155, 1982.
- Oshida T, Sugai M, Komatsuzawa H, Hong Y-M, Suginaka H, Tomasz A. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -N-acetylglucosaminidase domain: Cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(1): 285-289, 1995.
- Ottolenghi E, Hotchkiss RD. Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med.*, 116(4): 491-519, 1962.
- Paradiso PR. Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for infants and children. *Clin. Infect. Dis.*, 52: 1241-1247, 2011.
- Paradiso PR. Pneumococcal conjugate vaccine for adults: a new paradigm. *Clin. Infect. Dis.*, 55: 259-264, 2012.
- Patthy László. Modular exchange principles in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1(3): 351-361, 1991.
- Pérez-Dorado I, González A, Morales M, Sanles R, Striker W, Vollmer W, Mobashery S, García JL, Martínez-Ripoll M, García P, Hermoso JA. Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(5): 576-581, 2010.
- Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *TRENDS in Microbiology*, 10(4): 179-186, 2002.
- Pitsioui GG, Kioumis IP. Pneumococcal vaccination in adults: does it really work? *Respir. Med.*, 105(12): 1776-1783, 2011.
- Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T, Lode H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 32(3): 199-206, 2008.
- Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 6(8): e23626, 2011.
- Rane L, Subbarow Y. Choline, pantothenic acid, and nicotinic acid as essential growth factors for pneumococcus. *J. Biol. Chem.* 134: 455-456, 1940a.
- Rane L, Subbarow Y. Nutritional requirements of the pneumococcus. 1. Growth factors for types I, II, V, VII, VIII. *J. Bacteriol.* 40: 695-704, 1940b.

Rao FV, Dorfmüller HC, Villa F, Allwood M, Eggleston IM, van Aalten DM. Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J.*, 25(7): 1569-1578, 2006.

Ronholm J, Wang L, Hayashi I, Sugai M, Zhang Z, Cao X, Lin M. The *Listeria monocytogenes* serotype 4b autolysin IspC has N-acetylglucosaminidase activity. *Glycobiology*, 22(10): 1311-1320, 2012.

Rupley JA, Butler L, Gerring M, Hartdegen FJ, Pecoraro R. Studies on the enzymic activity of lysozyme, III. The binding of saccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57: 1088-1095, 1967.

Rupley JA, Gates V. Studies on the enzymic activity of lysozyme, II. The hydrolysis and transfer reactions of N-acetylglucosamine oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57: 496-510, 1967.

Sambrook, J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

Sánchez-Beato AR, Ronda C, García JL. Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain: molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 cspA gene. *J. Bacteriol.*, 177(4): 1098-1103, 1995.

Sanchez-Puelles JM, Ronda C, Garcia JL, Garcia P, Lopez R, Garcia E. Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.*, 158(2): 289-293, 1986.

Sanz JM, López R, García JL. Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase. A new single-step procedure for purification of this autolysin. *FEBS LETTERS*, 232(2): 308-312, 1988.

Sanz JM, Díaz E, García JL. Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol. Microbiol.*, 6: 921-931, 1992.

Schuck P, Rossmann P. Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modelling. *Biopolymers*, 54: 328-341, 2000.

Seo HS, Cartee RT, Pritchard DG, Nahm MH. A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *Journal of Bacteriology*, 190(7): 2379-2387, 2008.

Severin A, Schuster C, Hakenbeck R, Tomasz A. Altered Murein Composition in a DD-Carboxypeptidase Mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 174(15): 5152-5155, 1992.

Severin A y Tomasz A. Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 178: 168-174, 1996.

- Severin A y Tomasz A. The peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae*, p. 179-195. In Tomasz A (ed.), *Streptococcus pneumoniae: molecular biology and mechanisms of disease*. Mary Ann Liebert, Inc., New York, NY, 2000.
- Schuck P y Rossmann P. Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers*, 54: 328-341, 2000.
- Schuster C, Dobrinski B, Hakenbeck R. Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *Journal of Bacteriology*, 172(11): 6499-6505, 1990.
- Sheenan MM, García JL, López R, García P. The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.*, 25(4): 717-725, 1997.
- Shi J, Blundell TL, Mizuguchi K. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J Mol Biol*, 310(1): 243-57, 2001.
- Shockman GD, Daneo-Moore L, Kariyama R, Massidda O. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb. Drug Resist.*, 2(1): 95-98, 1996.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 225-420, 1980.
- Sorensen UBS y Henrichsen J. Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(19): 1854-1859, 1987.
- Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBioChem* 11: 35-45, 2010.
- Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promotor system, unit 16.2. En *Current protocols in molecular biology*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.). New York: Green Publishing Associates Inc. John Wiley & Sons.
- Terwisscha van Scheltinga A, Armand S, Kalk KH, Isogai A, Henrissat B, Dijkstra BW. Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin. Evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34: 15619-15623, 1995.
- Tews I, Terwisscha van Scheltinga A, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra W. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 7954-7959, 1997.

Thunnissen A-M WH, Isaacs NW, Dijkstra BW. The Catalytic Domain of a Bacterial Lytic Transglycosylase Defines a Novel Class of Lysozymes. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 22:245-258, 1995.

Tillet WS, Goebel WF, Avery OT. Chemical and immunological properties of a species-specific carbohydrate of pneumococci. *J. Exp. Med.*, 52: 895-900, 1930.

Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 157: 694-697, 1967.

Tomasz A. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 86-93, 1968.

Tuomanen E, Rich R, Zak O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 869-874, 1987.

Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B, Zak O. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *The Journal of Infectious Diseases* 151(3): 535-540, 1985.

Varea J, Monterroso B, Sáiz JL, López-Zumel C, García JL, Laynez J, García P, Menéndez M. Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci. *J. Biol. Chem.*, 279(42): 43697-43707, 2004.

Vialle S, Sepulcri P, Dubayle J, Talaga P. The teichoic acid (C-polysaccharide) synthesized by *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 has a specific structure. *Carbohydrate Research* 340: 91-96, 2005.

Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412(23): 835-838, 2001.

Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 287-306, 2008.

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32: 149-167, 2008.

Vollmer W y Höltje JV. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J. Bacteriol.*, 186(18): 5978-5987, 2004.

Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32(2): 259-286, 2008.

Vollmer W y Seligman SJ. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology*, 18:2, 2010.

- Vollmer W y Tomasz A. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 275: 20496-20501, 2000.
- Vollmer W y Tomasz A. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 70(12):7176-7178, 2002.
- Wang Q, Graham RW, Trimbur D, Warren RAJ, Withers SG. Changing enzymatic reaction mechanisms by mutagenesis: conversion of a retaining glucosidase to an inverting enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 11594-11595, 1994.
- Wang J, Wilkinson MF. Site-directed mutagenesis of large (13-kb) plasmids in a single-PCR procedure. *Biotechniques*, 29(5): 976-978, 2000.
- Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clinical Infectious Diseases*, 17: 913-924, 1993.
- Weaver LH, Grütter MG, Matthews BW. The refined structures of goose lysozyme and its complex with a bound trisaccharide show that the "goose-type" lysozymes lack a catalytic aspartate residue. *J. Mol. Biol.*, 245(1): 54-68, 1995.
- Weekly epidemiological record *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 87(14): 129-144; <http://www.who.int/wer>
- Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S, Dagan R, Adegbola R, Custts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 51: 692-699, 2010.
- Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 378: 1962-1973, 2011.
- Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure RH. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infection and Immunity*, 62(6): 2582-2589, 1994.
- Welch H, Bormand EK, Mickle FL. Preparation of diagnostic antipneumococcus sera. *Am. J. Public Health* 29: 35-42, 1939.
- Wirth R, Friesenegger A, Fiedler S. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.*, 216: 175-177, 1989.
- Yang Y, Faraggi E, Zhao H, Zhou Y. Improving protein fold recognition and template-based modeling by employing probabilistic-based matching between predicted one-

dimensional structural properties of the query and corresponding native properties of templates. *Bioinformatics*, 27(15): 2076-2082, 2011.

Yokoi K, Sugahara K, Iguchi A, Nishitani G, Ikeda M, Shimada T, Inagaki N, Yamakawa A, Taketo A, Kodaira K. Molecular properties of the putative autolysin Atl_{WM} encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*, 416: 66-76, 2008.

Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 65: 563-581, 2011.

Yother J, Leopold K, White J, Fischer W. Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *Journal of Bacteriology*, 180(8): 2093-2101, 1998.

Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.*, 56(3): 430-481, 1992.

Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32(2): 361-385, 2008.

Zapun A, Vernet T, Pinho MG. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 345-360, 2008.

Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(40): 1-8, 2008.

Zigheboim S, Tomasz A. Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 17(3): 434-442, 1980.