

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA FOSFORILCOLÍN
ESTERASA DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Lagartera Ortiz

Bajo la dirección de los doctores:
Margarita Menéndez Fernández y Juan Antonio Hermoso Domínguez

Madrid, 2006

- **ISBN: 978-84-669-2969-1**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA FOSFORILCOLÍN
ESTERASA DE *Streptococcus pneumoniae***

TESIS DOCTORAL

Laura Lagartera Ortiz

Madrid, 2006

**Instituto de Química-Física Rocasolano
Departamento de Química-Física de
Macromoléculas Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA FOSFORILCOLÍN
ESTERASA DE *Streptococcus pneumoniae***

Memoria presentada por Laura Lagartera Ortiz
para optar al grado de Doctor en Química.

Directores: Dra. Margarita Menéndez Fernández

Dr. Juan Antonio Hermoso Domínguez

ABREVIATURAS

CBPs	Proteínas que unen colina
CBM	Módulo de unión a colina
CDP-colina	Citidina-5'-difosfocolina
CM	Módulo catalítico
CRP	Proteína C-reactiva humana
C_p	Capacidad calorífica a presión constante
DEAE-Celulosa	Dietiletanolamino-celulosa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino tetra-acético
ESRF	European synchrotron radiation facilities
GOX	Glioxalasa II humana
ΔG	Energía libre de Gibbs
HEPBS	Ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazina-N'-(4-butanosulfónico)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico
ΔH	Variación de entalpía
H90A	Mutación de histidina 90 por alanina
ICP-OES	Espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo
ITC	Calorimetría isoterma de valoración
K_i	Constante de inhibición
K_D	Constante de disociación
k_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas
LTA	Ácido lipoteicoico
MALDI-TOF	Ionización y desorción por láser asistida con matriz
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	Ácido-N-acetilmurámico
NPPC	<i>p</i> -nitrofenilfosforilcolina
PAF	Factor de activación plaquetaria
PAP	Fosfatasa ácida púrpura
PC	Fosforilcolina
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenglicol

PIPES	Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
rPAF	Receptor celular del PAF
R_{sym}	Factor R de simetría
RRO	Rubredoxín oxígeno: oxidoreductasa
SAD	Dispersión anómala a una única longitud de onda
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SeMet	Selenio-metionina
SH3	Dominio de tipo espectrina
TA	Ácido teicoico
TEMED	N, N, N', N'- Tetrametil-etilendiamina
T_m	Temperatura del máximo de la función C_p
TRIS	Trihidroximetilaminometano

Antes de avanzar en una investigación haré alguna experiencia, pues mi intención es alegar, ante todo, la experiencia, y demostrar luego, con el razonamiento, por qué tal experiencia ha de operar de tal modo.

Aforismos. Leonardo Da Vinci.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> : NEUMOCOCO	1
1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
1.1.2. LA CÁPSULA POLISACARÍDICA	3
1.1.3. LA PARED CELULAR DE NEUMOCOCO	4
1.1.3.1. El peptidoglicano	5
1.1.3.2. Otros componentes de la pared celular	7
1.2. PROTEÍNAS DE UNIÓN A COLINA	10
1.3. MUREÍN HIDROLASAS DE LA PARED DE NEUMOCOCO	12
1.3.1. MUREÍN HIDROLASAS CODIFICADAS POR NEUMOCOCO	15
1.3.1.1. LytA	15
1.3.1.2. LytB	15
1.3.1.3. LytC	16
1.3.1.4. CbpD	16
1.3.1.5. Fosforilcolín esterasa (Pce)	16
1.3.2. MUREÍN HIDROLASAS CODIFICADAS POR FAGOS	17
1.4. PAPEL DE LA ENVUELTA CELULAR Y DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE EN LA VIRULENCIA DE NEUMOCOCO	18
1.5. ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE CPPS	21
1.5.1. C-LytA	21
1.5.2. Cpl-1	22
1.6. ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE PROTEÍNAS DE LA SUPERFAMILIA DE LAS METALO- β -LACTAMASAS	24
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. MATERIALES	33
3.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS	33
3.1.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	33
3.1.3. ESTUDIOS DE RECONSTITUCIÓN DE LA APOENZIMA	35
3.2. MÉTODOS	36
3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN POR PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO	36

3.2.1.1. Consideraciones generales.....	36
3.2.1.2. Cuantificación de metales unidos a Pce.....	37
3.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	38
3.2.2.1. Consideraciones generales.....	38
3.2.2.2. Determinación de especies moleculares en muestras purificadas de Pce	39
3.2.2.3. Identificación de sustratos no cromogénicos de Pce y cuantificación de la reacción de hidrólisis	39
3.2.3. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA.....	40
3.2.4. MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CON NPPC.....	41
3.2.4.1. Estudios de inhibición de la hidrólisis del NPPC.....	42
3.2.4.2. Efecto del pH en la actividad enzimática. Consideraciones generales	43
3.2.5. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	47
3.2.6. CALORIMETRÍA DE VALORACIÓN ISOTERMA	50
3.2.7. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X.....	53
3.2.7.1. Generalidades.....	53
3.2.7.2. Principios de la Cristalización de proteínas	55
3.2.7.3. Proceso experimental de cristalización	56
3.2.7.4. Recogida de datos de difracción	57
3.2.7.5. El problema de la fase en cristalografía.....	58
3.2.7.6. Equipos de difracción y fuentes de radiación	59
3.2.7.7. Criocristalografía.....	60
3.2.7.8. Procesado de datos	61
3.2.7.9. Resolución de la estructura	63
3.2.7.10. Construcción del modelo y refinamiento.....	65
3.2.7.11. Construcción del modelo Pce-teicoico y Pce-NPPC	66
4. RESULTADOS	69
4.1. Pce: UNA ENZIMA DEPENDIENTE DE CINC.....	69
4.1.1. ANÁLISIS DE POSIBLES METALES UNIDOS A Pce. INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ...	69
4.1.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN POR Zn ²⁺	71
4.1.3. RECONSTITUCIÓN DE LA APOENZIMA CON Fe ²⁺ Y Fe ³⁺	76
4.1.4. DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DE Pce CON EL pH.....	77

4.1.5. INFLUENCIA DEL SEGUNDO CATIÓN Zn^{2+} SOBRE LA ACTIVIDAD	83
4.2. ESTABILIDAD TÉRMICA Y RECONOCIMIENTO DE COLINA	87
4.2.1. ESTABILIDAD TÉRMICA.....	87
4.2.2. RECONOCIMIENTO DE COLINA	91
4.3. CRISTALIZACIÓN	95
4.3.1. OBTENCIÓN DE CRISTALES DE Pce.....	95
4.3.1.1. Búsqueda de condiciones iniciales	95
4.3.1.2. Optimización del proceso de cristalización: Construcción de Pce $\Delta 55$	96
4.3.2. OBTENCIÓN DE CRISTALES DE Pce $\Delta 55$	98
4.3.2.1. Cristalización de Pce $\Delta 55$ en presencia de colina 10 mM	98
4.3.2.2. Cristalización de Pce $\Delta 55$ en ausencia de colina	101
4.3.3. EXPERIMENTOS DE DIFRACCIÓN. RECOGIDA DE DATOS	103
4.3.4. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL	104
4.4. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL COMPLEJO Pce-Fosforilcolina	109
4.4.1. ORGANIZACIÓN Y PLEGAMIENTO GENERAL.....	109
4.4.2. MÓDULO CATALÍTICO: DESCRIPCIÓN DEL SITIO ACTIVO	113
4.4.3. MÓDULO DE ANCLAJE A LA PARED CELULAR. SITIOS DE UNIÓN A COLINA	115
4.4.4. ESTRUCTURA MODULAR DE Pce.....	118
4.4.5. UNIÓN DE Pce A LA CADENA DE ÁCIDO TEICOICO	120
4.4.6. HIDRÓLISIS DE <i>n</i> -DODECILFOSFORILCOLINA Y PAF POR Pce	122
5. DISCUSIÓN	127
5.1. Pce: UNA METALO-FOSFODIESTERASA DEPENDIENTE DE CINC	127
5.2. ESTRUCTURA Y MECANISMO CATALÍTICO	128
5.2.1. COMPARACIÓN DEL CENTRO METÁLICO DE Pce CON EL DE OTRAS ENZIMAS RELACIONADAS	129
5.2.1.1. Comparación de los centros bimetálicos de Pce y la Glioxalasa II humana	132
5.2.2. GRUPOS RELEVANTES EN LA CATÁLISIS y MECANISMO CATALÍTICO	134
5.2.3. INFLUENCIA DE LOS METALES Y DE SUS ESFERAS DE COORDINACIÓN EN EL MANTENIMIENTO DEL SITIO ACTIVO	138
5.3. RECONOCIMIENTO DE LA PARED BACTERIANA POR Pce	140
5.4. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS SUSTRATOS E IMPLICACIONES FUNCIONALES. PAPEL DE Pce EN LA PATOGENICIDAD ...	143

6. CONCLUSIONES	151
------------------------	------------

7. BIBLIOGRAFÍA	155
------------------------	------------

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Streptococcus pneumoniae*: NEUMOCOCO

1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es una bacteria Gram positiva de 1,2-1,8 μm de longitud, que presenta forma oval y la extremidad distal lanceolada, es inmóvil, y no forma endosporas. Generalmente, se presenta en forma diploidea, por lo que inicialmente fue denominada *Diplococcus pneumoniae* (Fig. 1.1), aunque existen algunos factores que pueden inducir la formación de cadenas. Neumococo es un patógeno humano causante de un gran número de infecciones (neumonía, sinusitis, peritonitis, etc) y de procesos invasivos severos (meningitis, septicemia, etc), particularmente en ancianos, niños y personas inmunodeprimidas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la neumonía es la cuarta causa de mortalidad mundial, y neumococo es el responsable del 10-25 % de los casos en países desarrollados (Shann, 1990), y de hasta un 70% en países en vías de desarrollo (OMS, 1997). El hábitat natural de neumococo es la nasofaringe humana y la colonización puede tener lugar durante los primeros días de vida.

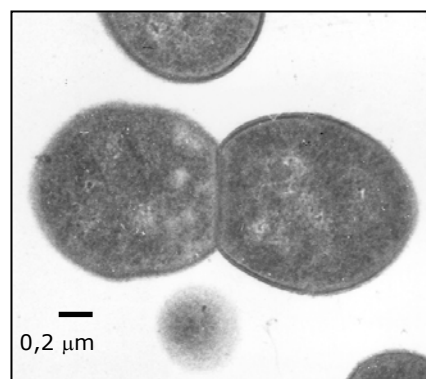


Figura 1.1. *Diplococos de S. pneumoniae*.

La variante morfológica más frecuentemente aislada en personas infectadas con neumococo es la forma "lisa" de Griffith, que se presenta encapsulada, con los márgenes lisos y cuyas colonias tienen una apariencia de tipo mucosa (Austrian, 1953). Fue precisamente Griffith,

quien, en 1928, puso de manifiesto que la cápsula es el principal factor de virulencia. Mediante la inoculación a ratones de neumococos encapsulados (estirpe lisa) y no capsulados (estirpe rugosa), encontró que los animales tratados con la forma encapsulada morían, mientras que la inyección de la estirpe rugosa era inocua (Griffith, 1928). Posteriormente, se aisló una nueva variedad que se manifestaba como no capsulada, con superficies irregulares, y que mostraba alteraciones en el patrón de división, produciendo filamentos de gran longitud (Dawson, 1933).

Una de las características más importantes de neumococo es que presenta un requerimiento nutricional absoluto por colina. La ausencia de este aminoalcohol del medio de cultivo produce alteraciones fisiológicas como la detención de la división celular y la formación de cadenas celulares, unidas mediante pequeñas expansiones de los polos (filamentos) de la pared celular (Tomasz *et al.*, 1975). Este efecto también se observa si se incluyen concentraciones elevadas de colina en el medio de cultivo (20 µg/ml) o si ésta se sustituye por análogos estructurales como la etanolamina (Tomasz, 1968) y otros compuestos de amonio cuaternario. Cuando se reemplaza la colina por etanolamina, además de no producirse la separación de las células hijas, aparecen otras alteraciones, como el bloqueo de la autólisis al final de la fase estacionaria, la resistencia a la lisis producida por desoxicolato sódico (DOC), la tolerancia a antibióticos β-lactámicos, la incapacidad de transformación y el aumento de la resistencia a la infección por fagos (Tomasz, 1970). Sin embargo, la adición de colina al medio revierte todos estos efectos. Estudios posteriores han permitido la obtención de mutantes de neumococo (cepas JY2190 y R6Col⁻) que no muestran este requerimiento por colina y que son capaces de multiplicarse en ausencia de este aminoalcohol (Yother *et al.*, 1998; Severin *et al.*, 1997).

Existen otros factores que pueden alterar la morfología de neumococo, como son los iones metálicos (Austrian, 1953). En ausencia de cationes divalentes las formas no filamentosas se comportan fenotípicamente como las filamentosas, lo que indica que los metales pueden influir en el proceso de división celular (Webb, 1951; Shankar y Bard, 1952). En base a este hecho se ha sugerido la presencia de una enzima, en las formas no filamentosas, que estaría implicada en la separación de las células hijas tras la división celular y cuya actividad sería dependiente de metales divalentes.

En un principio se describió que la virulencia de neumococo venía exclusivamente determinada por la presencia de la cápsula (Austrian, 1953) aunque, recientemente, se han

descrito nuevos factores de virulencia, entre los que se encuentran diversas proteínas y componentes de la pared celular (McCullers y Tuomanen, 2001; Mitchell, 2003).

A continuación se describen detalladamente los distintos componentes estructurales de la envuelta celular de neumococo.

1.1.2. LA CÁPSULA POLISACARÍDICA

La cápsula es la estructura más externa (Fig.1.2) y el principal factor de virulencia de neumococo. Está compuesta, principalmente, por polisacáridos cargados negativamente (Kamerling, 2000) que rodean a la célula y que se mantienen unidos a la superficie de la bacteria, posiblemente, mediante enlaces covalentes (Sørensen *et al.*, 1988; Yeung y Mattingly, 1986). Existen aproximadamente 90 serotipos capsulares distintos con una composición química compleja y variable (Paton y Morona, 2000), en la que los polisacáridos confieren las propiedades inmunogénicas y los componentes no sacarídicos proporcionan el carácter antigénico.

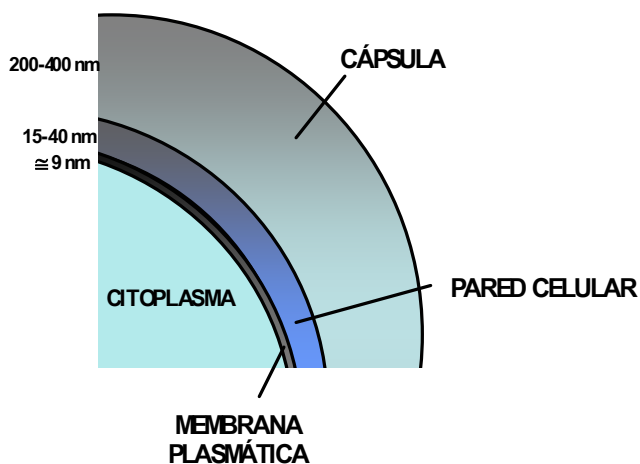


Figura 1.2. Esquema de la estructura externa de *S. pneumoniae*. Los espesores aproximados de cada capa se indican a la izquierda de la figura.

A pesar de que la cápsula no parece tener ningún papel en los fenómenos de adherencia, invasión o inflamación, es esencial para la virulencia de la bacteria debido a su capacidad para bloquear el reconocimiento de neumococo por parte del hospedador, impidiendo

así fagocitosis (Jonsson *et al.*, 1985; Yother, 2004). Existen variantes morfológicas de cepas de neumococo con diferente capacidad de unión a las células de la nasofaringe, y que se clasifican en función del fenotipo que presentan (variación de fase) sobre placas transparentes de agar sólidas. Las variantes se denominan opacas, semi-transparentes y transparentes (Weiser *et al.*, 1994). Las primeras presentan mayor cantidad de cápsula polisacáridica, menor contenido de ácidos teicoicos en la pared celular (Kim y Weiser, 1998), y su mayor virulencia se ha asociado a una mejora de la supervivencia en sangre. Las variantes transparentes poseen menor cantidad de cápsula y mayor contenido de ácidos teicoicos, lo que aumenta la capacidad para colonizar la nasofaringe (Weiser *et al.*, 1994).

1.1.3. LA PARED CELULAR DE NEUMOCOCO

La pared celular rodea a la membrana citoplasmática (Figs. 1.2 y 1.3) y confiere a la bacteria una morfología típica. La adquisición de este tipo de estructuras, a modo de exoesqueleto, ha servido a las bacterias como mecanismo de adaptación al medio externo, protegiéndola de su posible lisis, ya sea osmótica o mecánica (Salton, 1994). Además de ser el medio de intercambio de solutos entre el exterior y el interior celular, la pared bacteriana sirve de punto de unión para toda una batería de proteínas implicadas en procesos de crecimiento y división celular, y en las interacciones de la célula con el medio exterior. De hecho, la pared desempeña un papel importante en los procesos de colonización, adherencia, inflamación e invasión bacteriana (McCullers y Tuomanen, 2001), ya que neumococo modula, a través de la variación de fase, la distribución de subcomponentes de la pared relacionados con la internalización de la bacteria o la inducción de la respuesta inflamatoria durante el proceso de infección (Tuomanen *et al.*, 1985a; Tuomanen *et al.*, 1987).

La composición de la pared varía de unas especies a otras. En el caso de neumococo está constituida por un entramado de cadenas de peptidoglicano (mureína) y los ácidos teicoicos asociados a ellas, formando este conjunto una estructura multilaminar con un espesor comprendido entre 15-40 nm (Figs. 1.2 y 1.3).

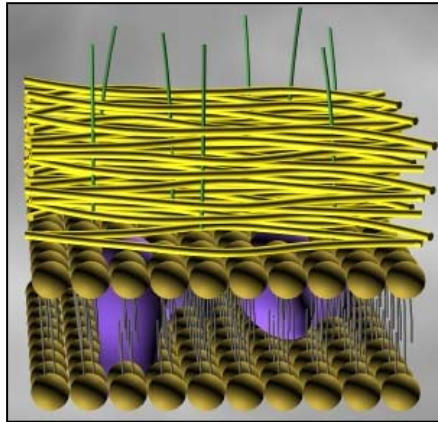


Figura 1.3. Representación esquemática de la pared celular de *S. pneumoniae*. Está constituida por el peptidoglicano (fibras amarillas) y los ácidos teicoicos (trazos verdes), así como la membrana plasmática (bolas marrones) y proteínas de membrana (morado).

1.1.3.1. El peptidoglicano

El peptidoglicano de neumococo está formado por un entramado tridimensional de cadenas glicánicas constituidas por residuos alternantes de ácido N-acetilmurámico y glucosamina unidos mediante enlaces glicosídicos $\beta 1 \rightarrow 4$ (Fig. 1.4a y 1.5), que se entrecruzan mediante cortos segmentos peptídicos. Cada cadena glicánica posee alrededor de unos 35 disacáridos (Beveridge, 1981), lo que supone, en su conformación más extendida, una longitud media de 35 nm (Formanek, 1983). La orientación de las cadenas es perpendicular al eje mayor de la célula, y el crecimiento de la pared se realiza intercalando nuevos anillos de peptidoglicano a los ya existentes (Pelzer, 1983). El nivel de acetilación de los residuos es del 90% para el murámico y del 16% para la glucosamina (Vollmer y Tomasz, 2000). La desacetilación de los residuos tiene lugar tras su incorporación a la pared celular y constituye uno de los mecanismos de virulencia de la bacteria, al hacerla resistente a las lisozimas del hospedador.

La unión entre el polisacárido y las pequeñas cadenas peptídicas se realiza mediante el grupo D-lactilo del ácido murámico (Fig. 1.4a). La disposición helicoidal que adoptan las cadenas glicánicas hace que las unidades peptídicas queden proyectadas en las tres direcciones del espacio, lo que permite establecer enlaces cruzados con los péptidos de cadenas próximas (Barnickel *et al.*, 1983) (Fig.1.4b y 1.5). Las capas de mureína se disponen formando ángulos de 68° con las adyacentes, favoreciendo así la formación del mayor número de conexiones interpeptídicas. Esto proporciona rigidez a la pared y aumenta la resistencia a la

degradación por las enzimas líticas, manteniendo, por otra parte, cierta flexibilidad debido a la presencia de las cadenas peptídicas. Además, la estructura del peptidoglicano presenta poros que facilitan la interacción de la pared con las proteínas de superficie de la bacteria (Beveridge, 1981).

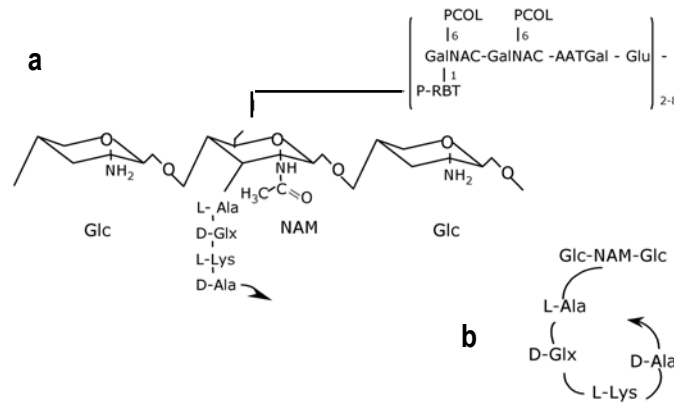


Figura 1.4. Estructura primaria del peptidoglicano (a). Cadena glicánica formada por la repetición de los residuos de ácido N-acetilmurámico (NAM) y glucosamina (Glc). En la posición 6 del NAM se unen las cadenas de ácido teicoico (GalNAC, N-acetilglucosamina; AATGal, diacetoamidotridesoxigalactosa; Glu, glucosa; PC, fosforilcolina; P-RBT, ribitol fosfato). Unida al grupo D-lactilo en posición 2 del NAM se posiciona la cadena peptídica que, en su conformación más estable, presenta un giro (b).

En neumococo las cadenas peptídicas contienen mayoritariamente tres (L-Ala-D-iGln-L-Lys) o cuatro (L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala) aminoácidos, apareciendo en mucha menor proporción el pentapéptido L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Schleifer y Kandler, 1972). La presencia del tripéptido parece indicar la existencia de D,D y D,L-carboxipeptidasas (García Bustos *et al.*, 1987; García Bustos y Tomasz, 1990). Existen dos tipos de conexiones interpeptídicas: la primera tiene lugar mediante el puente L-Ala-L-Ser (o menos frecuentemente L-Ala-L-Ala) entre la D-Ala en posición terminal de la unidad donadora y la L-Lys en posición 3 de la unidad receptora; el segundo tipo es el enlace directo entre la D-Ala terminal y la L-Lys (Fig. 1.5). El primer tipo es el más abundante y, aunque, estos son los aminoácidos que se han encontrado en mayor proporción en las uniones interpeptídicas, se ha descrito también la presencia minoritaria de glicina y aspártico (Fischer y Tomasz, 1985). Por otro lado, se ha observado que las estirpes resistentes a penicilina presentan un contenido importante de péptidos ramificados,

mientras que en cepas sensibles el 70% de los peptidos son lineales (García Bustos y Tomasz, 1990; Severin y Tomasz, 1996).

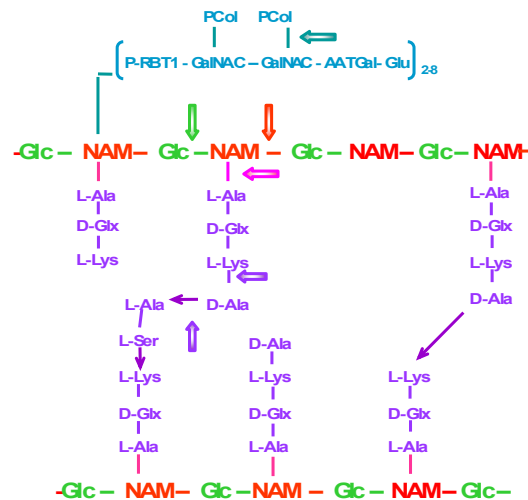


Figura 1.5. Esquema de la pared celular de neumococo. Cadenas glicánicas (rojo y verde); péptidos y uniones interpeptídicas (violeta); ácido teicoico (azul). Las flechas indican los enlaces de la pared que hidrolizan las amidasas (rosa), lisozimas (rojo), glucosaminidasas (verde), peptidasas (violeta), y fosforilcolín esterasa (azul).

1.1.3.2. Otros componentes de la pared celular

La pared celular contiene otros polímeros sintetizados por la propia bacteria que le confieren características diferenciales. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos teicoicos (TA) y lipoteicoicos (LTA) (Salton, 1994). Los ácidos teicoicos (TA) fueron descritos por primera vez en 1930 como el polisacárido C de neumococo debido a su interacción con la proteína C reactiva humana (Tilled *et al.*, 1930). Los ácidos lipoteicoicos (LTA), denominados antígeno F, poseen la misma composición que los ácidos teicoicos, lo que genera una situación única en bacterias Gram-positivas (Fischer, 1994). Mediante el empleo de técnicas inmunocitoquímicas se comprobó que los TAs se localizan en las caras externas e internas de paredes celulares aisladas (Sørensen *et al.*, 1988), mientras que los LTAs lo hacen sobre la membrana citoplasmática, uniéndose a ella a través de un glicolípido. Su síntesis se inicia en el citoplasma bacteriano por distintas rutas metabólicas (Bracha *et al.*, 1978; Glaser y Lindsay, 1974) y, una vez sintetizados, son translocados a través de la membrana citoplasmática

(Lazarevic y Karamata, 1995; Fischer, 1993), aunque la incorporación al peptidoglicano insoluble tiene lugar durante la formación de la pared celular.

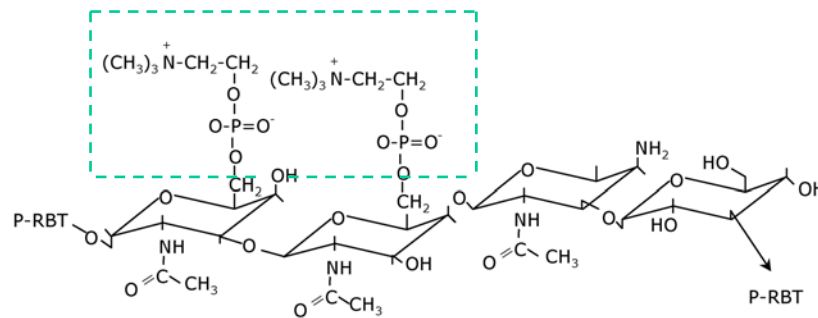


Figura 1.6. Estructura del pentasacárido que forma la unidad repetitiva básica del ácido teicoico. Se encuentra constituido de izquierda a derecha por: P-RBT, ribitol fosfato; dos residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAC) sustituidos en posición 6 por fosforilcolina (recuadro verde); diacetoamidotridesoxigalactosa (AATGal), y glucosa (Glu).

Los ácidos teicoicos son polímeros del pentasacárido [D-ribitol ($\beta 1 \rightarrow 1$) D-N-acetilgalactopiranososa ($\alpha 3 \rightarrow 1$) D-N-acetilgalactopiranososa ($\alpha 4 \rightarrow 1$) diacetamidotridesoxigalactopiranososa ($\beta 3 \rightarrow 1$) α -D-glucopiranososa] (Fig. 1.6), en los que el residuo de α -D-glucopiranososa de cada repetición se une, en posición 3, con el ribitolfosfato del siguiente pentasacárido a través de un enlace fosfodiéster (Fischer *et al.*, 1993). Los dos residuos de N-acetilgalactopiranososa, o sólo el unido al ribitol fosfato, pueden estar sustituidos en posición 6 por fosforilcolina (PC) (Fig. 1.4). Las cadenas de teicoico contienen, como promedio, de 6 a 8 repeticiones del pentasacárido (Yother *et al.*, 1998) y constituyen entre un 40% y un 50% del peso seco de la pared. El contenido medio es de una cadena de TA por cada unidad de tetradisacárido-tetrapéptido (García Bustos *et al.*, 1987). La distribución uniforme de los TAs y LTAs en la pared celular (Umeda *et al.*, 1992) le confiere carga negativa debido a sus numerosos grupos fosfato, capaces de formar quelatos con magnesio y otros cationes divalentes, lo que aumenta la rigidez del exoesqueleto.

La unión de los TAs a la pared celular se establece a través de un conector formado por glicerol fosfato, ribitol fosfato o glucosil-fosfato que puede estar glicosilado o esterificado (su composición en neumococo no ha sido todavía determinada). Este conector se une, a su vez, a

la cadena glicánica (Fig. 1.4A y 1.5) a través de un disacárido que establece un enlace fosfodiéster con la posición 6 del NAM (Behr *et al.*, 1992). Los ácidos lipoteicoicos se unen covalentemente a un glicolípido (D-Gal(α 1 \rightarrow 2)-D-Glu(α 1 \rightarrow 3)-*di*-O-acilglicerol) insertado en la cara externa de la membrana citoplasmática, y al intercalarse a través de la pared celular acceden hasta la superficie de la bacteria, donde pueden actuar como antígenos (Fischer, 2000).

Como ya se ha mencionado, la presencia de colina como componente estructural de la pared celular es una característica específica de neumococo (Tomasz, 1967). El 85% de la colina macromolecular presente en la célula se encuentra formando parte de los TAs (Brundish y Baddiley, 1968), por lo que el 15% restante está unido a los LTAs. El porcentaje de residuos de N-acetilgalactosamina monosustituidos por PC es de un 83%, correspondiendo el resto a la doble sustitución, aunque estos valores pueden variar de unas cepas a otras (Fischer *et al.*, 1993). Recientemente, se ha detectado la presencia de colina como componente de estructuras periféricas en otros patógenos del tracto respiratorio como *Streptococcus mitis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus constellatus*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium NI-4* (Gosink *et al.*, 2000).

La fosforilcolina (PC) tiene un papel importante en la patogenicidad de neumococo. Participa directamente en la internalización de la bacteria, interaccionando con los receptores celulares del factor de activación plaquetaria (PAFr) expuestos en la superficie de las células epiteliales activadas (Cundell *et al.*, 1995). Además, durante el proceso de inflamación la PC es reconocida por la proteína C-reactiva humana (CRP) (Mold *et al.*, 1982), implicada en la respuesta inmune del hospedador (Szalai *et al.*, 1996; Hirschfield y Pepys, 2003). Por otra parte, los residuos de fosforilcolina actúan como receptores para toda una familia de proteínas codificadas por la bacteria, denominadas CBPs (del inglés 'choline binding proteins'), entre las que se encuentran las enzimas que hidrolizan la pared celular (mureín hidrolasas) y otros factores implicados en la infectividad de la bacteria (Höltje y Tomasz, 1975b; Rosenow *et al.*, 1997; Hammerschmidt *et al.*, 1999; Jedrzejas, 2001).

Además de intervenir en el control de la actividad de las CBPs, tanto los TAs como los LTAs forman parte de los receptores de algunos bacteriófagos, y activan la ruta alternativa del complemento (Höltje y Tomasz, 1975a; Horne y Tomasz, 1985; Bierbaum y Shal, 1985; Rogers y Thurman, 1985; Tsuchido *et al.*, 1985; Fischer, 1988). Además, son altamente antigénicos,

actúan como agentes quimiotácticos en la inflamación meníngea (Tuomanen *et al.*, 1985b) y estimulan la formación de interleucina 1 en los monocitos humanos (Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989).

1.2. PROTEÍNAS DE UNIÓN A COLINA

En la Tabla 1.1 se muestran las distintas CBPs identificadas en las dos cepas de neumococo cuyo genoma ha sido secuenciado completamente: TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) y R6 (Hoskins *et al.*, 2001). Entre ellas se encuentran las mureín hidrolasas codificadas por neumococo, diversos factores asociados con adhesión y virulencia, y otras proteínas con función desconocida. Además de las funciones específicas desarrolladas por cada una de ellas, las CBPs podrían ser importantes en el establecimiento de interacciones de contacto no específicas con las células del hospedador, y estabilizar electrostáticamente la cápsula por la carga neta positiva que aportan a la superficie celular (Swiatlo *et al.*, 2002).

Las CBPs muestran una organización modular de la cadena polipeptídica. Además del módulo responsable del reconocimiento de colina (CBM), generalmente situado en posición C-terminal, cada CBP contiene uno o varios módulos responsable/s de la función específica desarrollada por cada una de ellas (López y García, 2004). El CBM tiene una estructura repetitiva y está formado por la disposición en 'tandem' de un motivo conservado de secuencia, que contiene unos 20 aminoácidos, variando el número de repeticiones de unas proteínas a otras (García *et al.*, 2000; García *et al.*, 1999a y 1999b; Tabla 1.2).

La presencia de colina en la pared celular parece haber condicionado también la estructura de las enzimas líticas (endolisinas) codificadas por los bacteriófagos de neumococo que facilitan la salida de progenie fágica al final del ciclo vegetativo (López *et al.*, 1982). Todos los fagos de neumococo, con la excepción de Cpl7, codifican para una endolisina constituida por un módulo catalítico en posición N-terminal y un módulo de unión a colina en el extremo C-terminal, altamente relacionado en secuencia con los de las mureín hidrolasas codificadas por la propia bacteria (García *et al.*, 1990). De hecho, las primeras CBPs identificadas fueron LytA, la autolisina mayoritaria de neumococo y Cpl-1, la lisozima codificada por el fago Cp-1 (García *et al.*, 1987a; García *et al.*, 1987b).

Tabla 1.1. Proteínas de unión a colina (CBPs) identificadas en las cepas TIGR4 y R6 de *S. pneumoniae*

TIGR4	R6	Función	Referencia
Cbpl	--	n.d.	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001)
PspA	PspA	Proteína de superficie. Inhibe la ruta del complemento y une la lactoferrina humana.	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1999; Tu <i>et al.</i> , 1999)
CbpC	CbpF	n.d.	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001)
CbpJ	--	n.d.	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001)
CbpG	CbpG truncada ¹	Serín-proteasa (CbpG-truncada); adhesina (CbpG)	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001; Gosink <i>et al.</i> , 2000; Mann <i>et al.</i> , 2006) Z82002**
CbpF	PcpC	n.d.	Z82002 **
PSP ²	Proteína hipotética	n.d.	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001)
CbpE	Pce ³	Hidrólisis de fosforilcolina de la pared celular (ver apartado 1.3.1.5)	(Höltje y Tomasz, 1974; de las Rivas <i>et al.</i> , 2001)
Glucosaminidasa	LytB	Separación de células hijas (ver apartado 1.3.1.2)	(de las Rivas <i>et al.</i> , 2002; García <i>et al.</i> , 1999a)
CbpA	PspC ⁴	Adhesina. Une la inmunoglobulina A y la proteína C3 del complemento	(Briles <i>et al.</i> , 1997; Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997; Rosenow <i>et al.</i> , 1997; Smith y Hostetter, 2000)
PspC, degenerada	SpsA truncada	n.d.	--
*	LytC	Lisozima. Autólisis a 30 °C (ver apartado 1.3.1.3)	(García <i>et al.</i> , 1999b)
Autolisina	LytA	Amidasa (ver apartado 1.3.1.1)	(García <i>et al.</i> , 1985; Höltje y Tomasz, 1976)
PcpA	PcpA	Adhesina	(Sánchez-Beato <i>et al.</i> , 1998)
CbpD	CbpD	Posible amidasa (ver apartado 1.3.1.4)	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001; Gosink <i>et al.</i> , 2000)

¹Nombre alternativo PcpB ; ²*Pneumococcal surface protein*; ³ Nombre alternativo LytD; ⁴ Nombre alternativo SpsA y PbcA; n.d, no determinada; * Salto de fase en el marco de lectura. ** Número de acceso PcpB-PcpC.

El motivo de unión a colina, inicialmente descrito en neumococo, ha sido identificado posteriormente en proteínas de otros microorganismos que contienen colina en su pared celular y en las de los bacteriófagos que las infectan (Sánchez-Beato, 1995a; Sánchez-Beato, 1995b; Katayama *et al.*, 1995). Por otro lado, se han encontrado secuencias relacionadas en glicosiltransferasas y proteínas de unión a carbohidratos de diversas especies de *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Janecek *et al.*, 2000), y en toxinas de *Clostridium* (García *et al.*, 1988a; Wren,

B.W., 1991; Green *et al.*, 1995;) ([http://www.Sanger.ac.uk/Software/Pfam/número de acceso PF01473](http://www.Sanger.ac.uk/Software/Pfam/número_de_acceso/PF01473)).

1.3. MUREÍN HIDROLASAS DE LA PARED DE NEUMOCOCO

Las mureín hidrolasas hidrolizan de forma específica los enlaces del peptidoglicano de la pared bacteriana. Las hidrolasas codificadas por la bacteria están implicadas en la remodelación continua de esta estructura celular y, por su potencial actividad “suicida”, el desarrollo de su función debe estar finamente regulado a lo largo del ciclo celular (Giesbrecht *et al.*, 1976). Las mureín hidrolasas están presentes en todas las eubacterias conocidas, en general de forma redundante, y pueden, eventualmente, causar la lisis celular, siendo entonces denominadas autolisinas (López y García, 2004). Neumococo fue el primer microorganismo sobre el que se estudió la naturaleza enzimática de la autólisis bacteriana (Dubos, 1937) y del que se clonó el gen que codifica a una autolisina bacteriana (García *et al.*, 1985; García *et al.*, 1986). Por el contrario, las endolisinas codificadas por fagos deben garantizar la liberación de la progenie fágica al final del ciclo lítico, produciendo la desintegración de la pared bacteriana tras la hidrólisis de determinados enlaces y su actividad no está, en principio, regulada como las de las mureín hidrolasas bacterianas.

En función del tipo de enlace covalente que hidrolizan, las mureín hidrolasas se pueden clasificar como:

- **Muramidasa (lisozimas):** hidrolizan el enlace $\beta 1 \rightarrow 4$ entre el ácido N-acetil-murámico y la glucosamina de la cadena glicánica, liberando grupos reductores de ácido N-acetilmurámico. A este grupo pertenecen LytC, codificada por neumococo y las lisozimas fágicas Cpl-1, Cpl-7 y Cpl-9.
- **Glucosaminidasas:** hidrolizan el enlace $\beta 1 \rightarrow 4$ entre la glucosamina y el ácido N-acetilmurámico. LytB, codificada por neumococo, es la única enzima de este tipo identificada hasta el momento.
- **Amidasas (N-acetilmuramil-L-alanil amidasas):** hidrolizan el enlace amida entre la cadena glicánica y el péptido, concretamente entre el grupo D-lactilo del NAM y el grupo amino de la L-alanina. Pertenecen a este grupo LytA, la autolisina mayoritaria de neumococo, y las

enzimas Pal, Hbl, y Ejl, codificadas por los fagos Dp-1, HB-3, y Ej-1, respectivamente (López y García, 2004).

- **Endopeptidasas:** hidrolizan tanto los péptidos principales como los puentes interpeptídicos, eliminando siempre el residuo de D-alanina situado en la posición terminal. Hasta el momento no se ha identificado ninguna endopeptidasa en neumococo.

- **Fosforilcolín esterasa:** Neumococo codifica también para una enzima (Pce o CbpE) que hidroliza los residuos de fosforilcolina de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos unidos a la pared celular o a la membrana (Höltje y Tomasz, 1974).

En la Figura 1.7 se representa, de forma esquemática, la organización modular de las mureín-hidrolasas codificadas por neumococo y sus bacteriófagos. El módulo de unión a la pared determina la especificidad hacia el sustrato y Cpl-7 es la única capaz de hidrolizar paredes de bacterias crecidas en etanolamina (López y García, 2004). Esta organización modular de la cadena polipeptídica incrementa la actividad enzimática varios órdenes de magnitud (Sanz *et al.*, 1992).

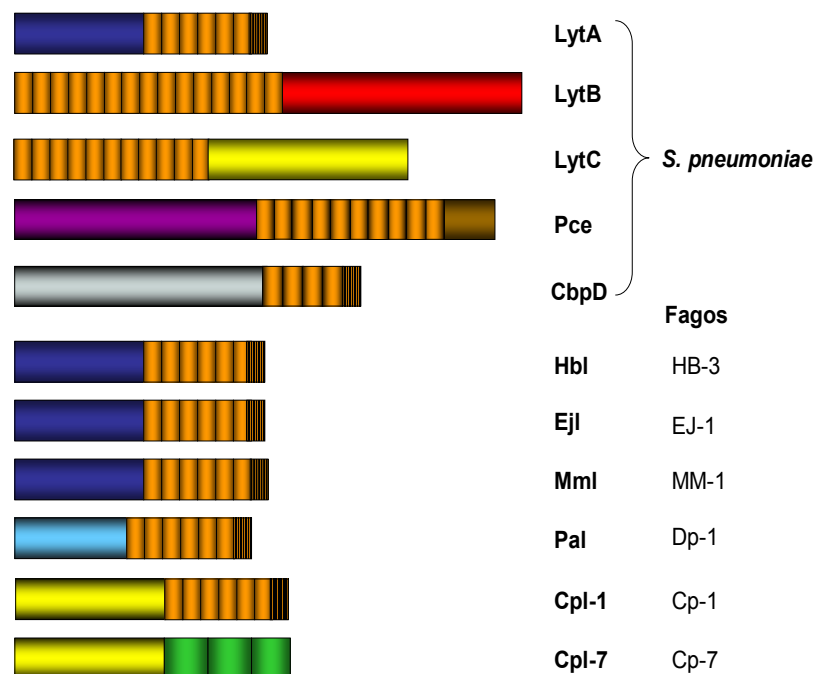


Figura 1.7. Representación esquemática de las mureín hidrolasas que actúan sobre la pared de neumococo clasificadas por el organismo de procedencia. Los dominios catalíticos se identifican según su función; en azul (amidasas), gris (posible amidasa de la familia CHAP), rojo (glucosaminidasa), amarillo (lisozimas), y morado (fosforilcolín esterasa). Las repeticiones de los CBMs se muestran en naranja y Cpl-7 en verde.

Hasta el momento sólo se han identificado dos proteínas, LytB y LytC, cuyo CBM se localiza en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica. Ambas proteínas son, junto con Pce, las únicas mureín hidrolasas cuyos CBMs están formados por más de seis repeticiones. Este hecho podría indicar una adaptación evolutiva para optimizar y/o regular el desarrollo de su función (García *et al.*, 1999a y 1999b; García *et al.*, 2000). En la Tabla 1.2 se muestran las secuencias consenso de las repeticiones que constituyen el CBM de las distintas mureín hidrolasas identificadas hasta el momento, el número de repeticiones que los forman y los organismos de procedencia.

Tabla 1.2. Secuencias consenso de las repeticiones que forman los CBMs de las mureín hidrolasas codificadas por neumococo y sus fagos. Los residuos conservados en más del 50% de las repeticiones de cada proteína se indican en mayúscula, y en minúsculas los conservados entre un 25-50%. En azul aparecen los residuos conservados, al menos, en un 50% en todas las secuencias consenso.

Enzima	Microorganismo de origen	Repeticiones del ChBM		
		Nº Rep ¹	Nº aa ²	Secuencia consenso ³
LytA	<i>S. pneumoniae</i>	6	20-23	gw x K xx DGT WYY f d xsx GaMa xx
LytB	<i>S. pneumoniae</i>	18	17-23	E W v y Dkhsq Wyy l kSd GyMA en
LytC	<i>S. pneumoniae</i>	11	17-23	E wxx D xx G xx wYY L Kxd GaMA qn
Pce	<i>S. pneumoniae</i>	10	19-23	GW x k xxxx WYY lxxx G xmxx
CbpD	<i>S. pneumoniae</i>	4	20-21	GW l K xn GS WYY l kSS Gam xT
Cpl-1	Fago Cp-1	6	19-22	e W v K dg kG WYY md d n Gam x t x
Cpl-9	Fago Cp-9	6	19-22	e W v K dg kG WYY md d n Gam x t x
Ejl	Fago Ej-1	6	20-22	gW k K xxx Gt WYY f D xx G x Ma d
Hbl	Fago HB-3	6	20-22	GW k K ia DGT WYY f D xx GaMa xx
Mm1	Fago MM1	6	20-24	gW k K ix dGT WYY f D xd GaMa td
Pal	Fago Dp-1	6	21-23	gW i K xx dG wyY fxa D GyMa xx

¹Número de repeticiones que forman el CBM. ²Variación en el número de residuos que forma cada repetición. ³Los residuos no conservados entre motivos de la misma proteína se indican con una x y los espacios en blanco indican saltos en la secuencia.

1.3.1. MUREÍN HIDROLASAS CODIFICADAS POR NEUMOCOCO

1.3.1.1. LytA

La amidasa LytA es la autolisina mayoritaria de neumococo. Está implicada en la separación de las células hijas tras la división celular, y en la lisis en fase estacionaria o inducida por detergentes y antibióticos β -lactámicos (Sánchez-Puelles *et al.*, 1986; López *et al.*, 1986). LytA está considerada, además, como uno de los factores de virulencia de neumococo (sección 1.4; Berry *et al.*, 1989). El producto primario del gen *LytA* es una proteína que se encuentra en una forma de baja actividad enzimática (forma E) capaz de transformarse tras su unión a la pared en la forma de alta actividad (forma C) a través de un proceso denominado 'conversión' (Tomasz y Westphal, 1971). La conversión '*in vitro*' tiene lugar tras la incubación de la enzima con paredes que contengan colina o en presencia de cloruro de colina al 2% (Briese y Hakenbeck, 1985).

LytA, al igual que las otras mureín hidrolasas cuyos CBMs contienen 6 repeticiones (Fig. 1.7) puede autoasociar a través del CBM, generando dímeros elongados (Usobiaga *et al.*, 1996; Sáiz *et al.*, 2002; Varea *et al.*, 2004). La unión a colina desplaza el equilibrio hacia la formación del dímero, en cuyos extremos se situarían los módulos catalíticos (Usobiaga *et al.*, 1996). La existencia de varios sitios de unión a colina en cada monómero y el aumento de la multivalencia a través de la dimerización son mecanismos complementarios para incrementar la afinidad de las mureín hidrolasas hacia la pared celular mediante la formación de enlaces múltiples. La pérdida de la capacidad para dimerizar, al delecionar los últimos 11 aminoácidos de la cadena (Varea *et al.*, 2000), lleva asociada una caída del 90% en la actividad catalítica de LytA (Sánchez-Puelles *et al.*, 1990).

1.3.1.2. LytB

LytB es la primera mureín hidrolasa no lítica de neumococo y es responsable de la separación de las células hijas al término de la división celular (García *et al.*, 1999a). Se localiza en las zonas polares de la superficie de neumococo (De las Rivas *et al.*, 2002) y su CBM contiene 18 repeticiones, de las que aproximadamente la segunda mitad (p10-p18) presentan

una alternancia casi perfecta en sus secuencias. Estas diferencias podrían explicar el que LytB se pueda unir a paredes de células crecidas en etanolamina aunque no sea capaz de dispersar las células hijas (De las Rivas *et al.*, 2002).

1.3.1.3. LytC

La lisozima LytC es dependiente de colina y se encuentra fuertemente unida a la pared celular de la bacteria (García *et al.*, 1999b). Presenta su actividad máxima a 30 °C, induciendo la lisis bacteriana, por lo que su función podría desarrollarse en las vías superiores del tracto respiratorio, donde la temperatura es inferior a la corporal (García *et al.*, 1999b). El CBM de LytC posee 11 repeticiones con una notable variabilidad de secuencia y, al igual que en LytB, se encuentra en el extremo N-terminal. En ausencia de colina, LytC forma agregados de alto peso molecular debido a la exposición al solvente de zonas del CBM que no tienen la conformación nativa. La unión de colina estabiliza la estructura y provoca su disociación en monómeros correctamente plegados (Monterroso *et al.*, 2005). Esta característica puede contribuir a confinar la actividad de LytC en áreas específicas de la envuelta celular, ya que su completa disociación de la pared sería altamente desfavorable (Monterroso *et al.*, 2005).

1.3.1.4. CbpD

CbpD es, probablemente, una amidasa, que posee en posición N-terminal un dominio CHAP (peptidasa/amidohidrolasa dependiente de cisteína e histidina) seguido de dos dominios SH3 y del CBM (Kausmally *et al.*, 2005). Está implicada en el fenómeno de 'alolisis', basado en la capacidad de las bacterias competentes para inducir la muerte celular de las no-competentes y promover así la liberación de factores de virulencia (Guiral *et al.*, 2005).

1.3.1.5. Fosforilcolín esterasa (Pce)

En 1974 se describió por primera vez en *S. pneumoniae* la presencia de una enzima capaz de eliminar un número limitado de residuos de fosforilcolina de los ácidos teicoicos de la pared celular (Höltje y Tomasz, 1974). Posteriormente, se identificó una enzima con el mismo

tipo de función en *S. oralis*, un microorganismo genéticamente relacionado con *S. pneumoniae* que coloniza también el tracto respiratorio humano (Ronda *et al.*, 1991).

Pce contiene un péptido señal de 25 aminoácidos que, tras su liberación, da lugar a una proteína madura de 602 aminoácidos con una masa molecular de 69.426 Da (de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001). El análisis de secuencia muestra que Pce presenta la organización modular característica de las CBPs aunque el CBM, constituido por 10 repeticiones, va seguido de un segmento C-terminal formado por 86 aminoácidos que no presenta similitud de secuencia con otras proteínas incluidas en las bases de datos (de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001). Por el contrario, el dominio catalítico de Pce presenta cierta similitud con las enzimas que poseen un plegamiento de tipo metalo- β -lactamasa (sección 1.6).

Pce es inactiva frente a paredes celulares de bacterias crecidas en etanolamina, aunque es capaz de hidrolizar otros sustratos de pequeño tamaño como *p*-nitrofenilfosforilcolina (NPPC) o CDP-colina (de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001).

La inactivación del gen *Pce* da lugar a una alteración de la morfología de las colonias, que se ha relacionado con el contenido en fosforilcolina de la pared celular, y a un aumento de la virulencia en un modelo animal de infección intraperitoneal con la cepa R36A (Vollmer y Tomasz, 2001). Por otra parte, se ha observado una pérdida de la capacidad de colonización de la nasofaringe en mutantes *Pce*⁻ (cepa TIGR tipo IV), que ha sido atribuida a una disminución en la capacidad de adhesión a células humanas (Gosink *et al.*, 2000). El mecanismo mediante el cual se produce el aumento en la virulencia del mutante *Pce*⁻ en la cepa R36A no se conoce aún, aunque el mayor contenido en residuos de fosforilcolina de la pared celular del mutante podría facilitar la interacción con los receptores del PAF durante la infección y/o aumentar la retención de la cápsula (Vollmer y Tomasz, 2001).

1.3.2. MUREÍN HIDROLASAS CODIFICADAS POR FAGOS

Todos los bacteriófagos de neumococo codifican para una lisozima (Cpl-1, Cpl-7 y Cpl-9) o una amidasa (Hbl, Ejl, Mml y Pal) cuya actividad es, salvo en el caso de Cpl-7, dependiente de colina (López y García, 2004). Además, la unión del aminoalcohol induce su dimerización a

través del CBM (Sáiz *et al.*, 2002; Varea *et al.*, 2004; Monterroso *et al.*, 2005). Como se indicó en el apartado 1.3, la lisozima Cpl-7 es la única capaz de degradar paredes de neumococo que contengan colina o etanolamina y su módulo de unión a la pared celular está formado por un motivo de 48 aminoácidos que se repite 2,8 veces (García *et al.*, 1990). El hecho de que las repeticiones de Cpl-7 sean idénticas sugiere una duplicación reciente.

La comparación de las secuencias de las mureín hidrolasas codificadas por neumococo y sus bacteriófagos sugiere la existencia de una coevolución (García *et al.*, 1988b; García *et al.*, 1990), y su estudio ha aportado una de las primeras evidencias experimentales a la teoría de la evolución modular de las proteínas (Sánchez-Puelles *et al.*, 1990; Sanz *et al.*, 1992; Sanz *et al.*, 1993; Usobiaga *et al.*, 1996). La capacidad de intercambio de los distintos módulos se puso de manifiesto mediante la construcción de enzimas quimeras entre la autolisina LytA y las enzimas fágicas Cpl-1 y Cpl-7 (Díaz *et al.*, 1991a; Díaz *et al.*, 1991b). En todos los casos se obtuvieron proteínas funcionales que poseían la actividad y la especificidad hacia el sustrato correspondientes al módulo catalítico y al módulo de unión a la pared utilizados. Asimismo, la amidasa Pal puede considerarse una quimera natural originada por la fusión de dos genes, uno de origen desconocido que codifica para el módulo catalítico y que se encuentra presente en fagos de *Lactococcus lactis* y *S. mitis* (Sheehan *et al.*, 1997; Siboo *et al.*, 2003), y otro que codifica el CBM presente en las otras mureín hidrolasas de la pared celular de neumococo (Figura 1.7).

1.4. PAPEL DE LA ENVUELTA CELULAR Y DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE EN LA VIRULENCIA DE NEUMOCOCO

Como ya se ha mencionado, *S. pneumoniae* es un colonizador pasivo habitual de la nasofaringe humana y uno de los principales patógenos humanos (Musher, 1992). El mecanismo mediante el cual se produce la invasión hacia el tracto inferior respiratorio y el pulmón, o hacia el cerebro no se ha elucidado completamente (Novak y Tuomanen, 1999).

Entre los factores de virulencia más importantes se encuentran, además de la cápsula y de los componentes de la pared celular (secciones 1.1.2 y 1.1.3) diversas proteínas de la superficie celular, incluidas algunas CBPs, y la neumolisina (Mitchell, 2003; Fig. 1.8).

Las proteínas de la familia de las CBPs consideradas como factores de virulencia son CbpA, PspA, CbpG y LytA (Tabla 1.1). CbpA fue la primera adhesina identificada en la superficie y está implicada en los procesos de adherencia y colonización de la nasofaringe a través de su interacción con citoquinas en células humanas activadas (Rosenow *et al.*, 1997). Además, se une a la IgA humana y a sus componentes de secreción (Hammerschmidt *et al.*, 1997), así como a la proteína del complemento C3. Por otro lado, PspA (proteína A de la superficie de neumococo) inhibe y reduce la efectividad del sistema del complemento del hospedador, además de prevenir la fagocitosis de neumococo (Neeleman *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 1999). CbpG (Tabla 1.1) ha sido identificada como un determinante de la virulencia operativo tanto en adhesión, durante la colonización, como en la sepsis (Gosink *et al.*, 2000), siendo junto con PspA las únicas CBPs conocidas que desempeñan un papel dominante en el desarrollo de infecciones sistémicas. Recientemente, se ha descrito una forma truncada de CbpG (Tabla 1.1) que carece del CBM y presenta actividad proteásica cuando es secretada *in vitro* (Mann *et al.*, 2006). La autolisina LytA (sección 1.3.1.1), aunque de manera indirecta, coopera en la patogenicidad de neumococo al liberar componentes de la pared celular y otros factores de virulencia tan importantes como la neumolisina y la neuraminidasa (Berry *et al.*, 1989).

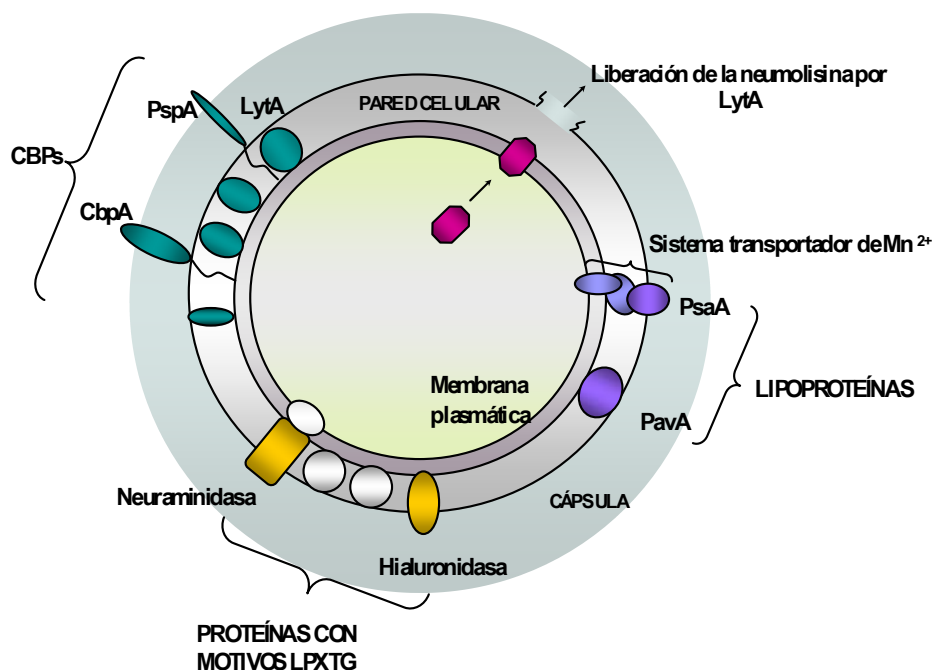


Figura 1.8. Esquema representativo de los principales factores de virulencia de *S. pneumoniae* (modificada de Mitchell, 2003).

Por otra parte, y aunque no se han descrito como tales factores de virulencia, CbpD, LytB, LytC, Pce y CbpG están implicadas en la colonización de la nasofaringe. A Pce y CbpG se les atribuye, también, un papel en el proceso de adherencia (Gosink *et al.*, 2000), mientras que CbpD asiste a LytA en la lisis celular (Kausmally *et al.*, 2005). LytC, al igual que LytA, tiene un efecto directo en la patogénesis derivado de su función lítica, que se sugiere localizada en la nasofaringe. En cuanto a LytB, la formación de cadenas de neumococo parece limitar la diseminación de la bacteria durante el proceso de infección, por lo que interés hacia dicha enzima aumenta debido a su actuación en la separación de las células hijas tras la división celular (de las Rivas *et al.*, 2002).

A diferencia de las CBPs, la hialuronidasa y la neuraminidasa se encuentran unidas covalentemente a la pared celular mediante un motivo LPXTG localizado en posición C-terminal y su actividad parece relacionada con la degradación de la matriz extracelular y la exposición de posibles receptores celulares (Mitchell, 2003). Otro grupo de proteínas con el mismo tipo de anclaje a la pared celular son las metaloproteasas IgA1, ZmpB, ZmpC, ZmpD y PrtA, cuya contribución a la virulencia se ha caracterizado recientemente mediante experimentos de infección en modelos animales (Oggioni *et al.*, 2003; Blue *et al.*, 2003; Chiavolini *et al.*, 2003; Bethe *et al.*, 2001).

Otras proteínas de superficie consideradas como factores de virulencia son las lipoproteínas PsaA y PavA unidas covalentemente a la membrana celular, cuya actividad está relacionada con los fenómenos de adhesión de neumococo a las células humanas (Tseng *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2001).

Por último, la neumolisina, de origen citoplasmático, es la principal toxina codificada por neumococo y promueve la colonización reduciendo la capacidad de eliminación del 'mucus' (Jedrzejewski, 2001). Otras de sus acciones más relevantes son la formación de poros, la activación de la vía del complemento (Rubins *et al.*, 1996), la estimulación de la producción de mediadores inflamatorios (Houldsworth *et al.*, 1994), la inhibición fagocítica y leucocítica (Paton y Ferrante, 1983) y la inducción de apoptosis y daño en células cerebrales (Braun *et al.*, 2002).

1.5. ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE CBPs

De todas las CBPs identificadas hasta el momento sólo se han caracterizado las estructuras tridimensionales de un fragmento del CBM de la autolisina LytA (Fernández-Tornero *et al.*, 2001), la estructura completa de la lisozima del fago Cp1, Cpl-1 (Hermoso *et al.*, 2003), y el dominio R2 de CbpA (Luo *et al.*, 2005), debido principalmente, a la dificultad que conlleva la cristalización de proteínas modulares.

1.5.1. C-LytA

El CBM aislado de la amidasa LytA (C-LytA) fue la primera estructura resuelta de un módulo de unión a colina (Fernández-Tornero *et al.*, 2001 y 2002). La forma cristalizada corresponde al dímero estabilizado en presencia de colina (Usobiaga *et al.*, 1996).

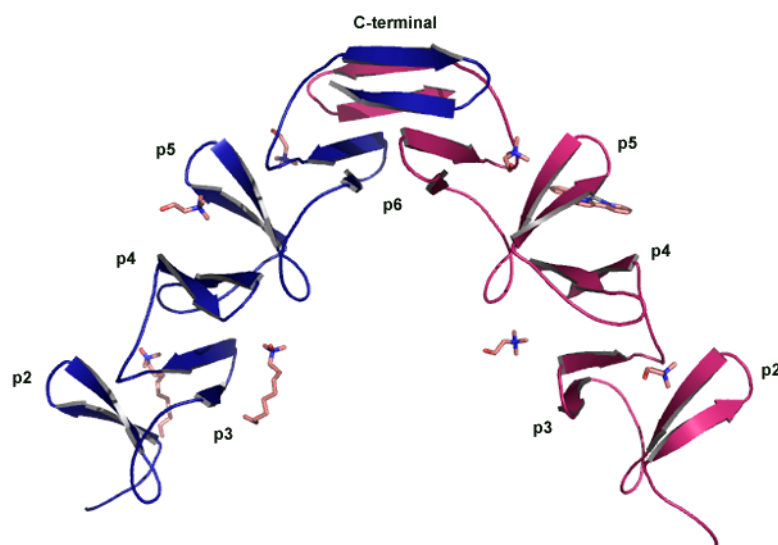


Figura 1.9. Estructura cristalográfica del dímero de C-LytA. Cada monómero aparece con distinto color y junto a cada horquilla se indica el motivo al que pertenece (datos tomados de Fernández-Tornero *et al.*, 2001). Los dos primeros sitios del monómero azul se encuentran ocupados por moléculas de DDAO (N-óxido de N,N-dimetil-decylamina), utilizadas en la cristalización. El sitio 3 del monómero rosa está ocupado por el derivado de platino utilizado para la resolución de la estructura (cloruro de 2,2':6',2"-terpiridina-platino II). En el resto de los sitios de ambos monómeros se encuentra situada la molécula de colina.

Las repeticiones visibles en la estructura (p2-p6) y el extremo C-terminal se pliegan formando una horquilla β seguida de un bucle, que enlaza con la siguiente repetición y que contiene un giro y una zona en conformación extendida. Las horquillas β están constituidas por unos 5 aminoácidos por hebra y se disponen formando una superhélice a izquierdas (solenoides β) de unos 25 Å de diámetro y 60 Å de altura, en la 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 disposición paralela. A diferencia de otros β -solenoides (Kobe y Kajava, 2000), la estructura de C-lytA está formada por unidades individuales de estructura supersecundaria (horquillas β).

Cada monómero de la estructura cristalizada posee cuatro sitios de unión a colina, localizados en las interfaces hidrofóbicas creadas entre dos horquillas β consecutivas. Cada uno de los sitios de unión a colina está conformado por tres residuos aromáticos, situados en las horquillas β , y un aminoácido hidrofóbico localizado en el bucle que las une. 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.

Los monómeros se disponen formando un ángulo de unos 85° e interaccionan a través de la región C-terminal del módulo de unión a colina (Fig. 1.9), tal y como se había sugerido previamente (Varea *et al.*, 2000). La interfase está formada por las horquillas de p6 y la cola C-terminal de cada monómero, encontrándose ligeramente giradas para favorecer las interacciones con la otra subunidad. La molécula de colina no participa directamente en la unión entre monómeros, aunque potencia la dimerización (Varea *et al.*, 2000).

1.5.2. Cpl-1

La estructura completa de la lisozima Cpl-1 ilustra claramente la naturaleza modular de las CBPs (Fig. 1.10; Hermoso *et al.*, 2003). La cadena polipeptídica está formada por el módulo catalítico y el módulo de unión colina, unidos mediante un conector ácido constituido por 11 residuos. El módulo catalítico está formado por un único dominio estructural que se pliega formando un barril α/β de estructura irregular (característico de la familia GH25 de las glicosilhidrolasas), al que le faltan las tres últimas hélices α y en el que la hebra β_8 adopta una

disposición antiparalela. Como en C-LytA, las repeticiones del CBM se pliegan formando una horquilla β seguida de un bucle y se organizan en dos regiones estructurales bien definidas, denominadas CI y CII (Figs. 1.9 y 1.10). CI está formada por las cuatro primeras repeticiones (p1-p4) que se disponen formando una superhélice a izquierdas, mientras que el dominio CII está constituido por una hoja β antiparalela de seis hebras que incluye las horquillas de las repeticiones p5 y p6 y dos hebras de la cola C-terminal. Esta región está directamente implicada en las interacciones existentes entre los dos módulos que forman Cpl-1.

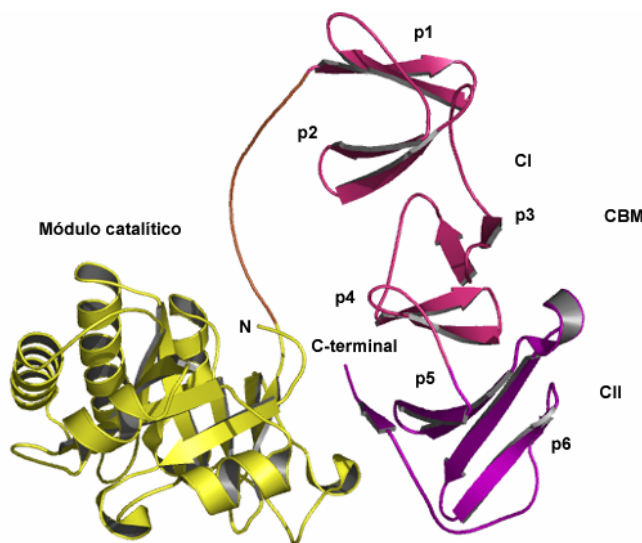


Figura 1.10. Estructura de Cpl-1. El código de colores es el siguiente: módulo catalítico en amarillo, conector en naranja y CBM en rosa. Se indican, además, las repeticiones del CBM y los dos dominios (CI y CII) que lo forman.

La posición relativa de ambos módulos viene determinada por la estructura extendida del conector que los une, constituido mayoritariamente por residuos ácidos, y por las fuertes interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las hebras $\beta 6$ - $\beta 8$ del módulo catalítico y la región C-terminal del CBM (Hermoso *et al.*, 2003).

A pesar de que todas las repeticiones del CBM de Cpl-1 presentan el mismo tipo de estructura secundaria y de que los residuos implicados en la unión a colina están absolutamente conservados, la desviación del plegamiento global de CII con respecto a la superhélice a izquierdas hace que sólo dos de los cinco posibles sitios de unión a colina de Cpl-1 sean funcionales (Hermoso *et al.*, 2003). Es hecho pone de manifiesto la versatilidad de las repeticiones que forman los CBMs y su capacidad para actuar como receptores de colina o para mediar en las interacciones entre dominios y en la autoasociación de las CBPs.

1.6. ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE PROTEÍNAS DE LA SUPERFAMILIA DE LAS METALO- β -LACTAMASAS

Las enzimas con plegamiento de tipo metalo- β -lactamasa han sido clasificadas en 17 grupos (Figura 1.11) basándose en similitud de secuencia (PSI-BLAST) y/o similitud estructural (Daiyasu *et al.*, 2001). De acuerdo con esta clasificación, Pce formaría parte del grupo noveno. Actualmente, se dispone información estructural a alta resolución de los grupos 1 (β -lactamasas), 2 (glioxalasa II), 3 (flavoproteínas y oxido-reductasas) y 6 (proteínas de procesamiento de ARNm).

A pesar de las diferencias encontradas en determinados elementos de estructura secundaria, características de cada familia o grupo, todos los dominios de tipo metalo- β -lactamasa presentan el mismo patrón global de plegamiento, con un núcleo central formado dos láminas- β antiparalelas flanqueadas por hélices α , que constituyen el denominado sándwich $\alpha\beta\text{-}\beta\alpha$ (Fig. 1.12; Fabiane *et al.*, 1998; Ullah *et al.*, 1998; Garau *et al.*, 2005a; Cameron *et al.*, 1999; Frazao *et al.*, 2000; de la Sierra-Galay *et al.*, 2005). En las β -lactamasas (grupo 1) la cavidad del sitio activo forma un surco poco profundo y accesible (Wang *et al.*, 1999) que está cubierto por un gran bucle y que cambia de conformación en presencia de sustratos e inhibidores (Toney *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1998).

Las enzimas de esta familia normalmente requieren como cofactor cationes Zn^{2+} ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en la oxigenoxidoreductasa de *D. gigas*) y, dependiendo de la enzima, se necesita la presencia de 1 ó 2 átomos de metal por molécula para que la actividad catalítica sea máxima (Rasia *et al.*, 2003). Sin embargo, en el caso de la metalo- β -lactamasa 2 de *Aeromonas hydrophila* la unión del segundo equivalente de cinc inhibe la actividad enzimática (Valladares *et al.*, 1997; Garau *et al.*, 2005a).

Los residuos implicados en la coordinación de los metales están conservados en estructura y se localizan, con frecuencia, en los conectores situados entre elementos de estructura secundaria.

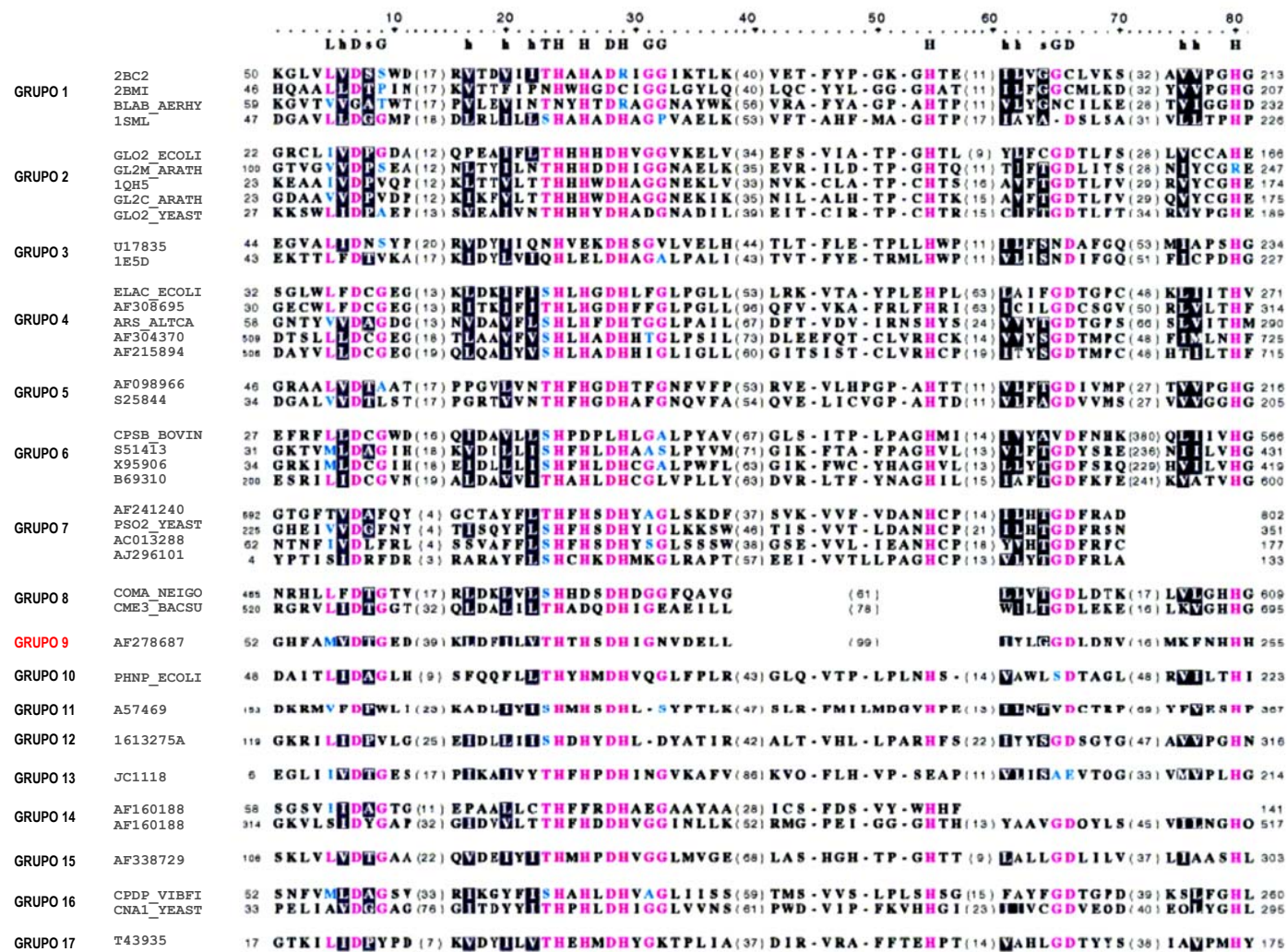


Figura 1.11. Alineamiento secuencial múltiple de los 5 segmentos conservados en la familia de las metalo-β-lactamasas (modificada de Daiyasu *et al.*, 2001). Cada proteína se indica según su código correspondiente (banco de genes, PIR, Swissprot, o PDB), eliminando en las secuencias los péptidos señal. Los aminoácidos consenso se indican en la parte superior de la figura. Los residuos coloreados en rosa indican más de un 50% de ocupación por el mismo residuo, y cuando estos aminoácidos están sustituidos por otros que mantienen las propiedades fisicoquímicas se muestran en azul. Los residuos sombreados en gris conservan las propiedades fisicoquímicas en un 70%, pero la conservación de un aminoácido determinado no supera el 50%. El grupo 9 (rojo) está constituido por Pce.

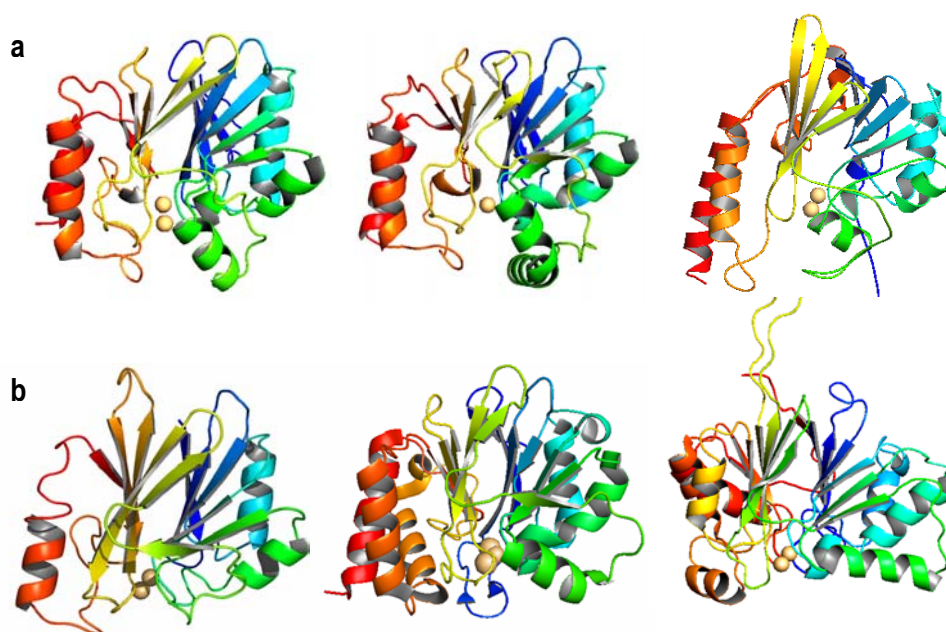


Figura 1.12. Estructuras cristalográficas de proteínas pertenecientes a la superfamilia de las metalo- β -lactamasas. a. Se representan de izquierda a derecha, las estructuras de las tres subclases del grupo 1; β 1 (BCII de *Bacillus cereus*), β 2 (CpHA de *Aeromonas hydrophila*), y β 3 (L1 de *Xanthomonas maltophilia*). **b.** Siguiendo el mismo orden, se muestran las estructuras de los dominios que presentan este plegamiento en: Glioxalasa II humana (grupo 2), RRO de *Desulfovibrio gigas* (grupo 3), y Rnasa Z de *Bacillus subtilis* (grupo 6). Los elementos de estructura se colorean desde el azul al rojo comenzando por el extremo N-terminal y los átomos metálicos se representan con esferas amarillas.

El motivo de secuencia HxHxDH (Fig. 1.11) forma parte de la esfera de coordinación del cinc y constituye la huella distintiva de la familia, aunque la última histidina no está conservada en las subclases β 1 y β 2 del grupo 1 (Wang *et al.*, 1999; Fabiane *et al.*, 1998; Ullah *et al.*, 1998; Garau *et al.*, 2005a). La geometría de coordinación de los átomos metálicos varía ligeramente de unas enzimas a otras (Wang *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 1999; Frazao *et al.*, 2000; de la Sierra-Galay *et al.*, 2005), aunque las dos primeras histidinas del motivo HxHxDH actúan como ligandos del primer átomo metálico (Zn1) y el par DH forma, generalmente, parte de la esfera de coordinación del segundo (Zn2). La coordinación del Zn1 se completa, en casi todas las estructuras conocidas, con un residuo de histidina alejado en secuencia y una molécula de agua o ión hidroxilo que actúa también como ligando del Zn2, cuya esfera de coordinación puede incluir, además, y otra histidina. Por otra parte, en algunas de ellas se ha descrito la presencia de un residuo ácido que, junto con la molécula de agua, hace de puente entre ambos metales, y que es característica de enzimas cuya actividad requiere la unión de dos átomos metálicos (centros cocatalíticos; Auld, 2001a).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neumococo es el único microorganismo conocido que presenta un requerimiento nutricional absoluto por colina. Este aminoalcohol es incorporado en forma de fosforilcolina a los ácidos (lipo)teicoicos que forman parte de la envuelta celular y desempeña un papel fundamental en la fisiología y la patogenicidad de neumococo. Así, los residuos de fosforilcolina: i) promueven la migración e internalización de neumococo, interaccionando con receptores específicos en las células del hospedador; ii) son reconocidos por componentes específicos del sistema inmune; y iii) actúan como receptores para las CBPs.

En este contexto, es interesante el estudio funcional y estructural de la proteína Pce, responsable de la liberación de los residuos de fosforilcolina de la pared celular, por la importancia que puede tener la modulación de su distribución en la envuelta celular sobre la patogenicidad e infectividad de neumococo. Cabe destacar que, hasta hace tan sólo tres años no se obtuvo la primera estructura tridimensional de una CBP completa debido, principalmente, a la dificultad que entraña la cristalización de proteínas modulares.

En el presente trabajo se ha planteado la caracterización estructural y funcional de Pce con los siguientes objetivos concretos:

- **Caracterización de la actividad enzimática de Pce frente a un sustrato soluble.** Determinación de los posibles residuos implicados en la catálisis.
- **Análisis de metales unidos a Pce y reconocimiento de colina.** Implicaciones estructurales y/o funcionales.
- **Caracterización estructural a alta resolución de Pce.** Cristalización de la enzima. Análisis de la estructura. Planteamiento de hipótesis sobre el mecanismo catalítico y asignación de nuevas capacidades funcionales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS

La acrilamida, la N,N' metilen-bis-acrilamida y los patrones de peso molecular utilizados fueron de Laboratorios Bio-Rad. El SDS, el EDTA, y la C545 DEAE-celulosa de Fluka. El carbonato sódico, los cloruros de sodio y potasio, el acetato amónico y la glicina eran de Panreac, el TEMED de Pharmacia Biotech y el persulfato amónico de Anresco. De Sigma se utilizaron: PIPES, HEPES, HEPBS, TRIS-HCl, BIS-TRIS, BIS-TRIS propano, sulfato de estreptomicina, PAF, NPPC, fosfato (sales monosódica y disódica) y cloruro de colina. Las soluciones estándar de cinc, hierro y calcio fueron de Alfa Aesar. El cloruro de cinc fue de Merck.

Las soluciones, detergentes y aditivos de cristalización, incluida la n-dodecilsfosforilcolina, fueron de Hampton Research. Los metales utilizados para la obtención de derivados de átomos pesados en la cristalización fueron: acetato de fenilmercurio (Fluka), cloruro de platino (Hampton Research), yoduro de platino (Panreac), tetracloruro de platino (II) potásico y el compuesto de gadolinio Gd-HPDO3A, proporcionado por la empresa Bracco Imaging.

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico o superior. Las disoluciones se prepararon utilizando agua Milli-Q.

3.1.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La forma silvestre de Pce fue expresada en las cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas con pRGR12, mientras que la forma truncada (Pce Δ 55) y el mutante H90A se obtuvieron mediante la transformación de dichas cepas con los plásmidos pAPM01 y pAPM02, respectivamente (de las Rivas *et al.*, 2001; Lagartera *et al.*, 2005a; Lagartera *et al.*, 2005b). La proteína con SeMet se expresó en medio M9 utilizando la misma cepa que se empleó para la forma silvestre (VanDuyne *et al.*, 1993). Cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento

logarítmico se indujo la expresión de SeMet-Pce con IPTG mediante la adición de una mezcla de aminoácidos que inhiben la ruta de la metionina, produciendo, así, la proteína con dicho derivado en lugar de metionina. Las células se recogieron en la fase estacionaria de crecimiento mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos, resuspendiéndose posteriormente en tampón fosfato 20 mM, pH 7,0. A continuación, se lisaron las células utilizando una 'French Press' y el extracto celular se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos. Las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad en columnas de DEAE-celulosa (Sanchez-Puelles *et al.*, 1990). Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. Tras agregar NaCl a una concentración final de 1M y sembrar el extracto en la columna, Pce se purificó siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- 1) Lavado exhaustivo de la columna con tampón A (fosfato 20 mM, NaCl 1,5 M y ZnCl₂ 3μM, pH 7,0) para eliminar otras proteínas retenidas en la columna.
- 2) Lavado con tampón B (fosfato 20 mM, NaCl 0,05 M y ZnCl₂ 3μM, pH 7,0) hasta conseguir la eliminación total de ADN.
- 3) Elución de Pce con un gradiente lineal de 0 a 70 mM colina en tampón B. La duración del gradiente fue de 2 horas y el flujo de 1ml·min⁻¹, recogiendo fracciones de 1 ml.

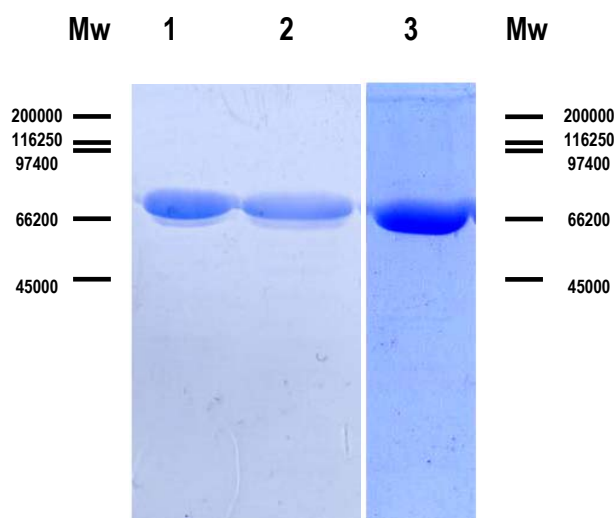


Figura 3.1. Electroforesis en SDS-PAGE al 12%. Pce (carril 1), mutante H90A (carril 2), y PceΔ55 (carril 3). La movilidad de los marcadores de peso molecular (Mw) se indican por orden creciente: Miosina, β-galactosidasa, fosforilasa b, seroalbúmina bovina y ovoalbúmina.

La pureza de las muestras se verificó mediante electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (Laemli *et al.*, 1970; Fig. 3.1) y

espectrometría de masas (MALDI-TOF). La tinción de proteínas en el gel se realizó con Coomassie o plata.

Las proteínas purificadas se mantuvieron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, cuando fue necesario, se concentraron por ultrafiltración utilizando un concentrador de proteínas (Amicon YM-30) con un límite nominal de peso molecular de 30 kDa.

Antes de su utilización, las proteínas se dializaron durante 24 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ frente a 400 volúmenes de tampón (5 cambios) y, posteriormente, se centrifugaron a 13.000 x g durante cinco minutos para eliminar posibles precipitados. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente (Shimadzu UV-2100) a partir de la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $194.020\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

La concentración de colina se determinó a partir del incremento del índice de refracción de la solución con respecto al tampón, utilizando un interferómetro diferencial Carl Zeiss Jena LI3, previamente calibrado para la luz de la línea del sodio ($589\text{ x }10^{-7}\text{ cm}$), y una célula de doble sector con paso óptico de 1cm. El incremento del índice de refracción molar para colina en los tampones de HEPES y TRIS-HCl utilizados fue de $0,021\text{ M}^{-1}$.

3.1.3. ESTUDIOS DE RECONSTITUCIÓN DE LA APOENZIMA

La apoenzima se preparó mediante diálisis extensiva de muestras de Pce frente al tampón indicado en presencia de EDTA (3-20 mM). En paralelo, se realizaron controles en los que la enzima se dializó frente al mismo tampón pero eliminando el quelante del medio. Una vez preparadas las muestras de apoenzima se procedió a medir su actividad, según el método descrito en el apartado 3.2.4, utilizando las soluciones de diálisis como medio de reacción. La reconstitución con Zn^{2+} se realizó incubando las muestras a diferentes tiempos (entre 7 minutos y una hora) en la solución de diálisis suplementada con un exceso de, aproximadamente, $10\text{ }\mu\text{M}$ de Zn^{2+} sobre la concentración EDTA. En la reconstitución con Fe^{2+} se utilizó el compuesto $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, y para prevenir la oxidación del Fe^{2+} se incluyó DTT 10 mM. En el caso del Fe^{3+} , se siguió el procedimiento empleado para el Fe^{2+} pero sin la inclusión del agente reductor en el medio, generándose un color marrón característico de las disoluciones de Fe^{3+} .

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN POR PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO

3.2.1.1. Consideraciones generales

La espectrometría de emisión óptica (OES) es una técnica analítica basada en la espectrometría atómica que se utiliza, principalmente, para detectar y cuantificar trazas de elementos químicos (rango ppb). Tras someter la muestra a altas temperaturas (6.000-10.000 K) para provocar la disociación atómica e inducir una excitación colisional/ionización elevada, se determina la intensidad de la luz emitida por los distintos elementos que la componen al regresar a los estados de menor energía. Una de las principales ventajas de la OES es su capacidad para generar diferentes niveles de energía de excitación, lo que permite, por una parte, cuantificar un mismo elemento analizando la emisión a diferentes longitudes de onda y, por otra, determinar simultáneamente varios elementos.

Cuando la OES se combina con la utilización de descargas de plasma (obtenido a partir de argón) como sistema para inducir la disociación y la excitación/ionización atómica, se la denomina espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo, ICP-OES (Fig. 3.2; Greenfield *et al.*, 1964).

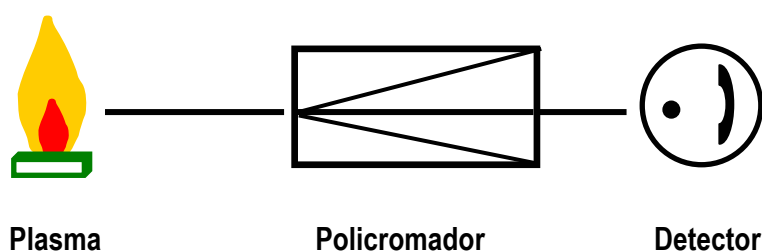


Figura 3.2. Representación esquemática del sistema de ICP-OES.

A continuación se describen las características generales de la ICP-OES:

- Descarga de ICP: El argón es introducido a través de una antorcha formada por 3 tubos concéntricos de cuarzo y recubierta por un serpentín de cobre, que está conectado a un

generador de radiofrecuencias, el cual es sometido a una descarga eléctrica para provocar la ionización de algunos átomos. Los electrones emitidos son capturados y acelerados dentro del campo electromagnético generado por la corriente aplicada a la cubierta de cobre, aumentando así su energía (acoplamiento inductivo). La ionización colisional de nuevos átomos de argón, inducida por estos electrones de alta energía, da lugar a reacciones en cadena que convierten el gas en un plasma de electrones, iones y átomos de argón, originando lo que se conoce como descarga de plasma generado por acoplamiento inductivo (Hasegawa y Haraguchi, 1992).

- Irradiación de la muestra con la descarga de ICP: La muestra se introduce en el centro del plasma para producir, en primer lugar, su vaporización y atomización y, a continuación, la excitación/ionización de los elementos presentes en ella.
- Detección de la emisión: La luz emitida por los átomos/iones excitados es policromática, por lo que se utiliza un policromador para poder medir simultáneamente la radiación emitida por la muestra a diferentes longitudes de onda. La identificación unívoca de cada elemento requiere, al menos, la caracterización de tres líneas espectrales del mismo.
- Cuantificación del elemento/s: La determinación cuantitativa de cada elemento se realiza a partir de curvas de calibrado, en las que se representa la intensidad de la luz emitida frente a la concentración, utilizando disoluciones estándar para cada uno de los elementos a identificar.

3.2.1.2. Cuantificación de los metales unidos a Pce

La cuantificación de metales mediante ICP-OES se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de Murcia, utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer Optima 2000DV. Los metales analizados fueron: Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} . Las medidas se realizaron utilizando muestras de proteína ($\cong 10\mu M$) dializadas extensivamente frente al tampón de medida correspondiente. Los tampones y las soluciones patrón se prepararon y almacenaron en contenedores y tubos de plástico. La cantidad de metal unido se calculó a partir de la diferencia entre la concentración total de metal en la muestra de Pce y el tampón de diálisis, utilizando las rectas de calibrado construidas con los correspondientes estándares. Todas las muestras se midieron por triplicado.

3.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3.2.2.1. Consideraciones generales

La espectrometría de masas es una técnica basada en la ionización de las moléculas y en su separación en función de la relación masa/carga (m/z). La ionización de las moléculas puede realizarse mediante diferentes técnicas:

- Electronebulización o electrospray (ESI): La ionización se produce mediante la aplicación de una diferencia de potencial (3-5 kV) al capilar por donde se introduce la disolución al analizador, que actúa como contraelectrodo. Con ayuda de nitrógeno gaseoso se consigue una nube de gotas cargadas que van siendo desolvatadas hasta obtener los correspondientes iones pseudomoleculares.

- Ionización y desorción por láser inducida por matriz (MALDI): La ionización de las moléculas de la muestra se consigue tras mezclar éstas con una matriz formada por una sustancia capaz de absorber en el UV. La mezcla sólida formada se irradia con un láser cuya energía es absorbida por la matriz, lo que provoca su ionización y la de la proteína. Una vez ionizadas y en estado gas, las moléculas se hacen pasar a un analizador donde se produce la separación en función de la relación masa/carga.

En la actualidad se utilizan dos tipos de analizadores distintos para proteínas:

- Analizador de trampa iónica (IT): Cuando la ionización se ha realizado por ESI se suele utilizar un analizador de trampa iónica (IT). Los iones se confinan durante un cierto tiempo (ms) en el analizador de campos eléctricos de corriente continua y radiofrecuencias. Posteriormente, son expulsados hacia el detector, de forma secuencial, en orden creciente de la relación m/z por la aplicación de una rampa de radiofrecuencias.

- Analizador de tiempo de vuelo (TOF): Es el sistema utilizado cuando se ha ionizado por MALDI. Los iones formados en la cámara de ionización son acelerados y se dejan volar libremente hacia el detector. Su separación se consigue por la distinta velocidad que adquieren debido a la diferencia de masas.

Finalmente, la representación de la corriente iónica detectada frente a la relación masa/carga de los iones, constituye el espectro de masas de la muestra analizada.

3.2.2.2. Determinación de especies moleculares en muestras purificadas de Pce

Los experimentos de MALDI-TOF se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) y se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) equipado con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm; anchura de pulso = 10 ns; $\nu = 3$ Hz) 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, trabajando en modo lineal. Todos los espectros de masas se obtuvieron recogiendo una media de 500 disparos, y la matriz utilizada fue ácido sinapínico (10 mg · ml⁻¹ en TFA al 0,21% y acetonitrilo al 30%). La calibración necesaria para los espectros de masas fue externa, empleándose albúmina de suero bovino (BSA).

3.2.2.3. Identificación de sustratos no cromogénicos de Pce y cuantificación de la reacción de hidrólisis

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) posee una elevada sensibilidad y permite diferenciar entre compuestos que coeluyen, minimizando al mismo tiempo posibles interferencias en la muestra. Esta técnica se utilizó para detectar y monitorizar la posible hidrólisis de *n*-dodecilosforilcolina y PAF por Pce. Los experimentos se realizaron en un sistema LC-MS compuesto por una bomba modelo Finnigan Surveyor acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica modelo LCQ Deca. Ambos compuestos se incubaron por separado, a una concentración de 1,5 mM, en presencia y ausencia de Pce (80 μ M) en tampón Bis-Tris 20 mM, pH = 5,5. Tras una dilución 1:100 de las alícuotas tomadas a distintos tiempos de incubación, los productos de la reacción se separaron por cromatografía utilizando una columna Hypersil Hypurity C18 para la *n*-dodecilosforilcolina, y una columna Hypersil HyPurity Advance para el PAF (100 x 2.1 mm; 3 μ m de tamaño de partícula en ambos casos). Ambas columnas se equilibraron en agua/metanol (80/20, v/v) y tras la inyección (10 μ l) de la muestra se mantuvo la composición del eluyente durante 1 minuto. A continuación, se aplicó un gradiente lineal de metanol (20-90% en 10 minutos; velocidad de flujo 100 μ l · min⁻¹) y se mantuvo constante (90% etanol) durante 15 minutos, alcanzando la composición original en 1

minuto. La detección fue monitorizada mediante ESI (+), aplicando un voltaje de 4.0 kV y una temperatura al capilar de 185 °C. Los espectros se recogieron, realizando previamente un barrido de masas ($m/z = 50-1200$), y los iones $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, y $[2M+Na]^+$ fueron seleccionados para la cuantificación (352, 374, 703, 725 para n-dodecilsfosforilcolina; 524, 546, 1047 y 1069 para el PAF).

3.2.3. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA

El estado de asociación de Pce se ha caracterizado mediante ultracentrifugación analítica. La masa molecular promedio se determinó mediante medidas de equilibrio de sedimentación. Los experimentos se realizaron en una ultracentrífuga analítica modelo Optima-XLA (Beckman), equipada con un sistema óptico UV-Vis instalado en el interior de la cámara de la centrífuga que permite la selección de una longitud de onda en el intervalo de 200-700 nm. Se utilizaron celdas de cuarzo de doble sector y seis agujeros con un paso óptico de 12 mm, siendo la temperatura de medida de 20 °C. Las muestras de proteína (2,9 μM) se equilibraron en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 y pH 8,0 y, en su caso, diferentes concentraciones de colina. Con el volumen de muestra utilizado ($\cong 70 \mu\text{l}$) la altura que se genera en la celda es de unos 0,14 cm, por lo que el equilibrio se alcanza en menos de 12 horas si la selección de la velocidad de sedimentación es adecuada (Chervenka, 1969). En nuestro caso la velocidad fue de 15.000 r.p.m. Posteriormente, se restó la línea de base (contribución del material no proteico) realizada tras centrifugar la muestra, una vez alcanzado el equilibrio, a 42000 r.p.m. durante seis horas.

La determinación de las masas moleculares promedio se realizó ajustando a los datos experimentales la ecuación [1], que describe la distribución radial del gradiente de concentración para un soluto ideal tras alcanzarse el equilibrio entre los flujos de las moléculas que sedimentan y difunden en cada posición radial:

$$w_i(r) = w_i(r_0) \exp\left[\left(M_i^* \omega^2 / 2RT\right)(r^2 - r_0^2)\right] \quad [1]$$

donde w_i es la concentración (peso/volumen) de la especie i , r y r_0 son las posiciones radial y

de referencia, respectivamente, M_i^* es la masa molecular de flotación de la especie i , ω es la velocidad angular, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta. La masa de flotación de la especie i está relacionada con la masa molecular aparente, M_i , por la expresión:

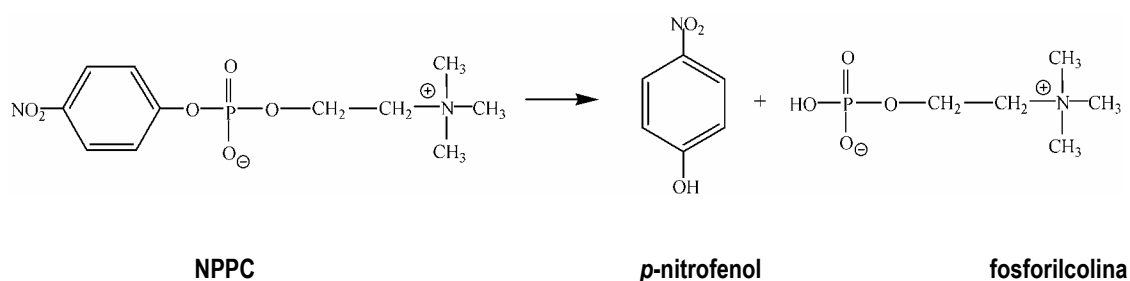
$$M_i^* = M_i(1 - \nu_i \rho_o) \quad [2]$$

donde ν_i es el volumen específico parcial del soluto y ρ_o es la densidad del disolvente. El ajuste se realizó utilizando los programas XLAEQ basados en el algoritmo de conservación de la señal (Minton, 1994).

Los valores de M_i^* se convirtieron en las correspondientes masas moleculares aparentes usando un volumen específico parcial de $0,73 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$, calculado a partir de la composición de aminoácidos (Laue *et al.*, 1992). La densidad de las disoluciones de colina a 20°C se determinó con un densitómetro de precisión Antón PAAR DM2, y las viscosidades con un viscosímetro Ubbelohde 01.

3.2.4. MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CON NPPC

Los estudios de actividad enzimática se realizaron utilizando como sustrato *p*-nitrofenilfosforilcolina (NPPC), cuyo enlace éster es hidrolizado por Pce, para dar lugar a la formación de *p*-nitrofenol y fosforilcolina (de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001):



La hidrólisis da lugar a la aparición de un color amarillo característico del *p*-nitrofenol,

que se cuantificó midiendo la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100. Debido a la ionización del grupo fenol, el coeficiente de extinción es dependiente del pH, por lo que se utilizó el valor de $17.528 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a pH 11.

Las medidas de actividad (velocidades iniciales) se realizaron, habitualmente, con 500 μl de sustrato incubados durante 7 minutos en un baño termostatzado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La reacción se inició con la adición de 6 μl de enzima a una concentración final de $0.1 \mu\text{M}$ y, tras 4 minutos, se paró con 20 μl de NaOH 2.5 N, midiéndose la cantidad de *p*-nitrofenolato formado. Las medidas de actividad en función del pH se realizaron en los siguientes tampones: PIPES (6,5-6,85), BIS-TRIS propano (6-10), HEPES (6,5-8,0), HEPBS (8,0-8,4), TRIS-HCl (7,6-8,8), manteniendo la fuerza iónica constante ($I = 0.05$) mediante adición de KCl. Salvo que se indique lo contrario, los tampones contenían, además, ZnCl_2 3 μM . Las medidas en función del pH en distintos tampones se han solapado para excluir la posibilidad de que alguno de ellos pudiese inhibir la actividad enzimática.

Los valores de las constantes cinéticas se determinaron a partir del ajuste no lineal de las curvas de velocidades iniciales en función de la concentración de NPPC según la ecuación:

$$V = \frac{k_{cat} [S]}{K_m + [S]} \quad [3]$$

donde k_{cat} y K_m son la constante catalítica y la constante de Michaelis, respectivamente, $[S]$ es la concentración de sustrato y V es la velocidad inicial (Michaelis y Menten, 1919).

Las medidas de actividad a temperatura variable ($20\text{-}70 \text{ }^\circ\text{C}$) se realizaron a pH 7,0 en tampón HEPES y a una concentración de NPPC de 10 mM.

3.2.4.1. Estudios de inhibición de la hidrólisis de NPPC

Las constantes de inhibición por elevadas concentraciones de cinc se determinaron a partir de las curvas de velocidad obtenidas en función de la concentración de sustrato y realizadas a distintas concentraciones del inhibidor. Los datos experimentales se analizaron utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk para determinar el tipo de inhibición, y se ajustaron

por mínimos cuadrados no lineales a la ecuación [4], obtenida para un modelo de inhibición competitiva, donde $[I]$ es la concentración de inhibidor y K_I la constante de inhibición.

$$V = k_{cat} \cdot \frac{[E]}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad [4]$$

Las medidas se realizaron a 25°C y pH variable, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

3.2.4.2. Efecto del pH en la actividad enzimática. Consideraciones generales

Existen varias causas por las que la actividad catalítica de una enzima nativa puede variar con el pH. En primer lugar, el estado de protonación del sustrato o de los grupos catalíticos de la enzima pueden ser determinantes para el desarrollo de la reacción enzimática. Por otro lado, la catálisis puede verse influida por cambios conformacionales derivados de variaciones en el estado de protonación de grupos alejados del centro activo (Cleland, 1977).

La dependencia de las constantes (k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m) con el pH puede aportar información sobre las condiciones en que las que la eficacia catalítica es óptima, el número de estados de protonación relevantes para la actividad, sus constantes de desprotonación, y, además, su posible asignación a grupos específicos si sus valores de pK_a se encuentran suficientemente separados. Para ello es necesario conocer si el sustrato/s empleado tiene grupos ionizables en el intervalo de pH analizado y, en su caso, determinarlos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que, debido a la influencia del entorno, la constante de disociación de los grupos protonables puede variar significativamente con respecto a los valores obtenidos para compuestos modelos estructuralmente relacionados.

En el caso de un sistema simple, en el que la enzima se comporta como un ácido monobásico y donde sólo la forma deprotonada une sustrato (Fig. 3.3a), la constante de Michaelis aparente (K_m^{ap}) disminuye con el pH (Fig. 3.3b), mientras que la constante catalítica permanece invariable. En general, el perfil logarítmico de K_m^{ap} en función del pH es complicado

de interpretar al verse normalmente afectado tanto por la ionización de la enzima libre como por la del complejo enzima-sustrato. En este caso particular, al depender sólo de la desprotonación de la enzima libre (K_a), es posible identificar el grupo esencial para la unión del sustrato, independientemente de su posible implicación en la catálisis.

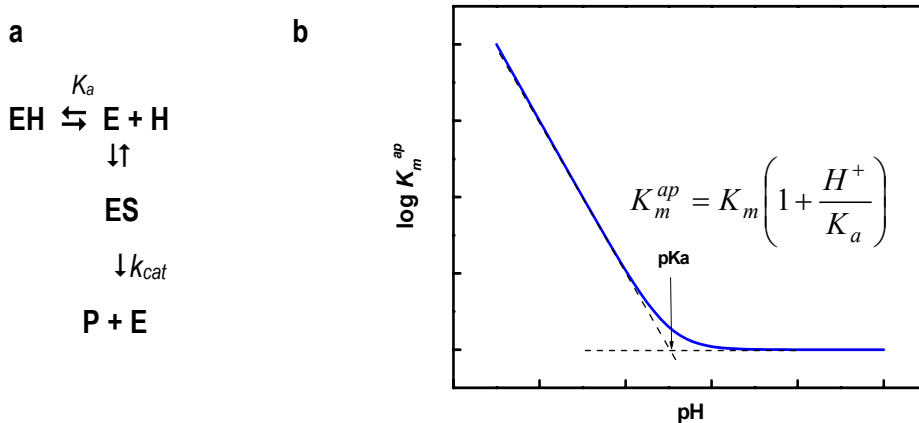


Figura 3.3. Esquema de reacción para una enzima que se comporta como un ácido monoprótico y que une sustrato en la forma deprotonada (a) y dependencia de K_m^{ap} con el pH (b). K_a es la constante de desprotonación de la enzima libre.

Cuando ambas formas de la enzima pueden unir sustrato, tanto K_m^{ap} como k_{cat}^{ap} y, por tanto k_{cat}^{ap} / K_m^{ap} dependerán del pH, aunque sólo uno de los dos estados sea catalíticamente activo (Fig. 3.4). En este caso, K_m^{ap} dependerá de las constantes de desprotonación de la enzima libre y del complejo enzima-sustrato (Fig. 3.4c). Así, cuando $pK_a < pK_a'$ la formación del complejo ES se ve dificultada al aumentar la basicidad del medio y K_m^{ap} aumenta con el pH hasta alcanzar un valor límite (K_m). Por el contrario, cuando $pK_a > pK_a'$, K_m^{ap} disminuye al aumentar el pH hasta alcanzar el valor límite en la región de máxima formación del complejo enzima/sustrato competente para la catálisis. Por el contrario, k_{cat}^{ap} y k_{cat}^{ap} / K_m^{ap} dependen, respectivamente, de la desprotonación del complejo enzima-sustrato (K_a') y de la enzima libre (K_a) (Fig. 3.4b y d). Ambos perfiles son similares, y a partir de ellos se puede determinar el valor de pK_a' (Fig. 3.4b) y pK_a (Fig. 3.4d). La dependencia del $\log k_{cat}^{ap}$ con el pH (Fig. 3.4.b) ilustra cómo al aumentar la basicidad del medio se ve favorecida la desprotonación del complejo

enzima-sustrato, lo que genera, a su vez, un incremento en la velocidad de liberación del producto de la reacción.

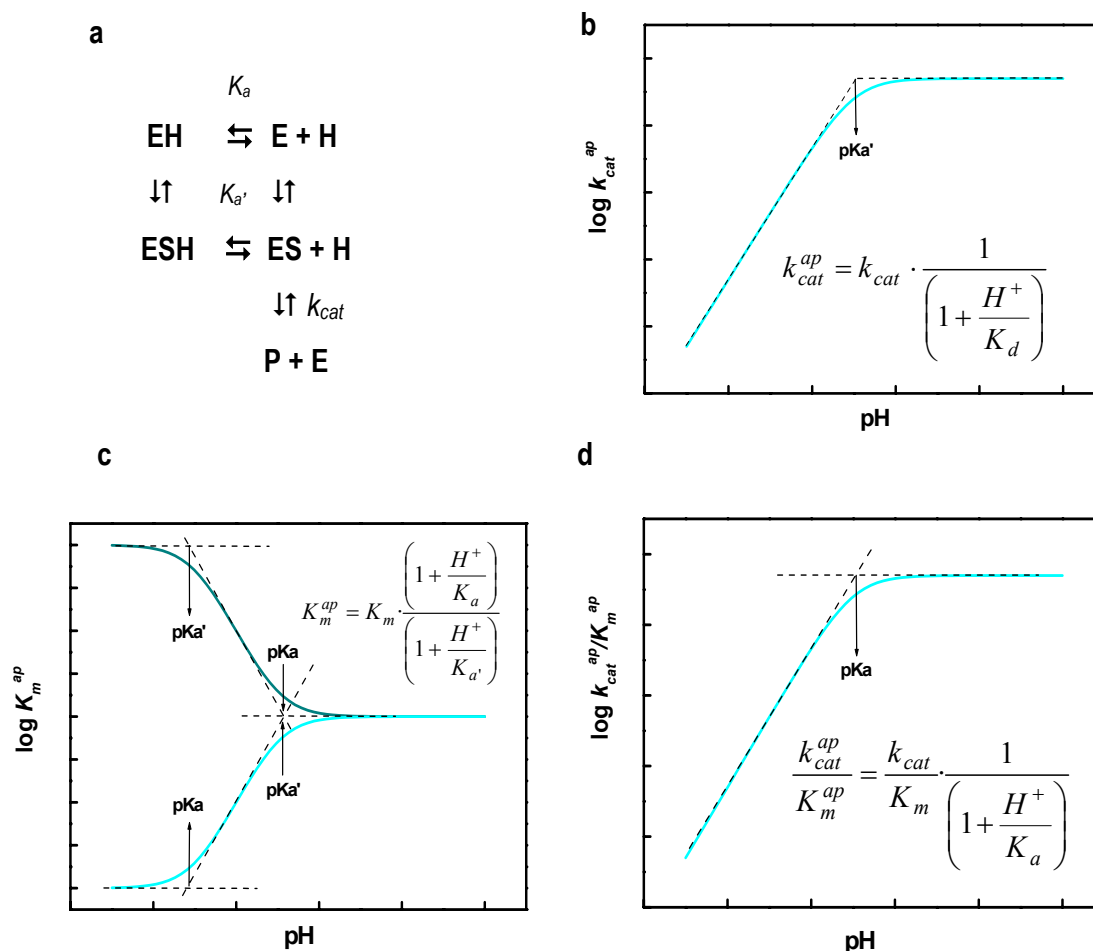


Figura 3.4. Esquema de un sistema en equilibrio donde el sustrato se une al estado protonado y deprotonado de la enzima (a) y perfiles logarítmicos de k_{cat}^{ap} (b), K_m^{ap} (c), y k_{cat}^{ap} / K_m^{ap} (d) en función del pH. k_{cat} y K_m son los valores límites de la constante catalítica y la constante de Michaelis, respectivamente; K_a y $K_{a'}$ son las constantes de desprotonación de la enzima libre y del complejo enzima-sustrato.

La dependencia de k_{cat} con el pH suele mostrar, en muchos casos, forma de campana (Fig. 3.5). Este comportamiento puede describirse, en términos muy sencillos, asumiendo que la enzima contiene dos grupos ionizables esenciales para la actividad cuya protonación y desprotonación puede ser detectada a partir de los ensayos de actividad enzimática. De acuerdo con este modelo (Fig. 3.5a), y como se muestra en la Figura 3.5b, la enzima puede considerarse

como un ácido dibásico en el que la constante K_1 refleja la disociación del primer protón, independientemente de la fracción del mismo que derive de los grupos XH o YH, y K_2 es la del segundo (Cleland, 1982). K_1 y K_2 se denominan, por tanto, constantes de disociación moleculares y son las únicas medibles experimentalmente. La posibilidad de asignar las constantes moleculares a grupos determinados depende de la diferencia existente entre las constantes microscópicas de ionización de los grupos en cuestión (K_x y K_y).

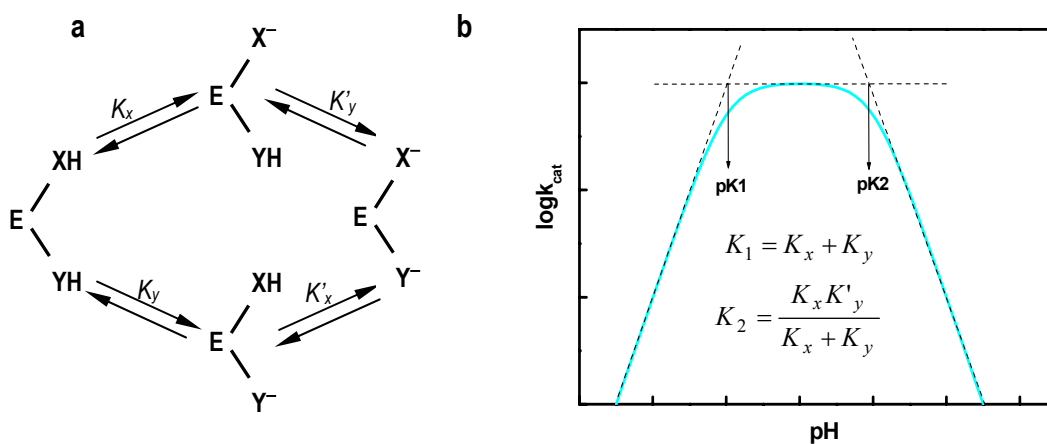


Figura 3.5. Esquema (a) y representación (b) de un sistema en equilibrio donde la enzima se comporta como un ácido dibásico. K_x y K_y son las constantes microscópicas de disociación de los grupos X e Y cuando estas se producen sin que haya tenido lugar la disociación del otro grupo. K'_x y K'_y son las constantes microscópicas de disociación de los grupos X e Y cuando ya se ha producido la disociación del otro grupo. K_1 y K_2 son las constantes moleculares de disociación.

El método más ampliamente utilizado para analizar el efecto del pH en la actividad enzimática es el de Dixon (Tripton y Dixon, 1979) y está basado en la representación logarítmica de las constantes cinéticas frente al pH (Figs. 3.3-3.5). La determinación de los valores de pK_a puede realizarse a partir del análisis de las regiones lineales de dichas representaciones, tal y como se indica en las Figuras 3.3-3.5, o mediante el ajuste de la curva completa en términos de las ecuaciones derivadas para la dependencia logarítmica de cada constante con el pH. Los perfiles logarítmicos de k_{cat}^{ap} y k_{cat}^{ap} / K_m^{ap} pueden ser suficientes para determinar los valores de pK_a con precisión cuando éstos se encuentran bien separados (> 3.5 unidades de pH), aunque existen casos en los que la utilización adicional de la representación de $\log K_m^{ap}$ puede ayudar a

resolver posibles ambigüedades (Tripton y Dixon, 1979). Cuando un determinado pK_a es identificado a partir de las representaciones de $\log k_{cat}^{ap} / K_m^{ap}$ y $\log k_{cat}^{ap}$ vs. pH, el proceso de protonación/desprotonación correspondiente estará, probablemente, implicado en la catálisis de la reacción. Por el contrario, si es identificado únicamente a partir de la dependencia de k_{cat}^{ap} / K_m^{ap} con el pH estará implicado en el reconocimiento del sustrato (Cleland, 1982).

3.2.5. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La estabilidad y la organización estructural de una proteína pueden ser estudiadas a través del proceso de desnaturalización inducido por temperatura o por agentes químicos. La calorimetría diferencial de barrido mide la variación de la capacidad calorífica a presión constante, C_p , de un sistema con la temperatura (Fig. 3.6), y permite monitorizar las transiciones inducidas térmicamente. El análisis de las mismas permite determinar los parámetros termodinámicos de la transición/es que tienen lugar durante su desnaturalización, siempre que tenga lugar en condiciones de equilibrio (Privalov, 1979; Freire *et al.*, 1990a, Sánchez-Ruiz, 1995), y es la única técnica que permite una medida directa de la energética del proceso (Privalov, 1979; Freire *et al.*, 1990a).

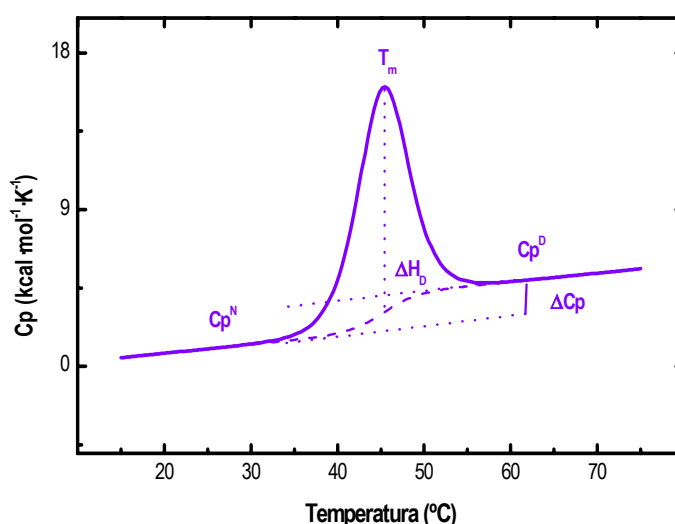


Figura 3.6. Curva de capacidad calorífica en función de la temperatura de una proteína que se desnaturaliza según un modelo de equilibrio entre dos estados (N \rightleftharpoons D). C_p^N y C_p^D , son las capacidades caloríficas de los estados nativo (N) y desnaturalizado (D), respectivamente. La curva se ha generado asumiendo los siguientes parámetros: $T_m = 45$ °C; $\Delta C_p = C_p^D - C_p^N = 2,1$ kcal \cdot mol $^{-1}$ \cdot K $^{-1}$; $\Delta H_b = 100$ kcal \cdot mol $^{-1}$. La línea de trazo discontinuo entre las capacidades caloríficas de ambos estados indica el incremento de la capacidad calorífica del sistema con el avance de la reacción. El área definida entre la curva experimental y la línea de trazo discontinuo equivale a la entalpía de desnaturalización ΔH_b .

Los calorímetros actuales operan en modo diferencial, midiendo la diferencia entre la capacidad calorífica de la célula de muestra (proteína) y la célula de referencia (tampón) (Fig. 3.7). El sistema se calienta cuasi-adiabáticamente a velocidad constante, y la potencia eléctrica (CBF) necesaria para minimizar la diferencia de temperatura (ΔT_1) entre las dos células es proporcional a la diferencia de C_p entre las mismas (capacidad calorífica de exceso).

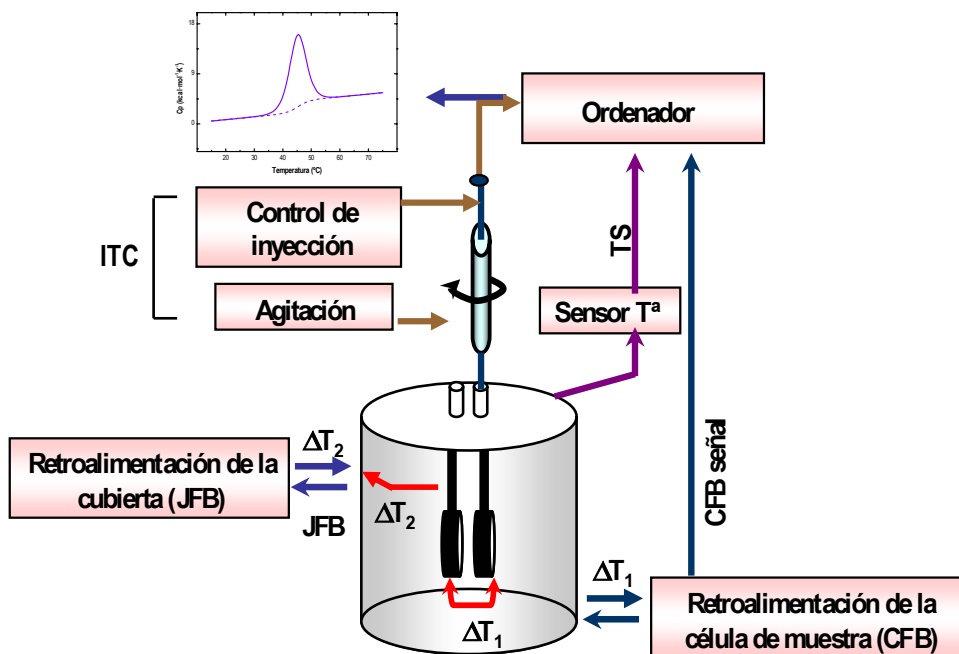


Figura 3.7. Representación esquemática de un calorímetro diferencial de barrido (DSC). Se muestran las dos células (muestra y referencia) rodeadas por la coraza adiabática (en gris), y los sistemas de termostatación (TS) y retroalimentación (CFB y JFB) controlados por el ordenador. El barrido de temperatura se realiza de manera adiabática mediante un controlador de temperatura (JFB) que mantiene constante la diferencia de temperatura (ΔT_2) entre la coraza adiabática (gris) y la célula de temperatura constante. A velocidad de calentamiento constante, la potencia del CFB es proporcional a la capacidad calorífica de exceso entre la muestra de proteína y el tampón. Los principios básicos de funcionamiento son similares a los utilizados en ITC, donde la jeringa de inyección del ligando en la célula de muestra es utilizada también como sistema de agitación.

Las transiciones conformacionales inducidas por la variación de la temperatura en proteínas vienen caracterizadas por la presencia de uno o varios picos en el intervalo de temperatura en que tiene lugar la desnaturalización de la misma (Fig. 3.6), mientras que los valores de C_p en las regiones de la pre- y post-transición corresponden a la capacidad calorífica de las formas nativa (C_p^N) y desnaturalizada (C_p^D), respectivamente. La entalpía de desnaturalización, ΔH_D , se obtiene por integración del área comprendida bajo la curva de la capacidad calorífica (Privalov, 1979).

$$\Delta H_D = \int_{T_0}^{T_f} \Delta C_p dT \quad [5]$$

La relación existente entre ΔC_p y ΔS (variación de entropía) permite obtener ésta última como una función continua de la temperatura a partir de la integral definida en la ecuación [6], siendo T_0 y T_f , temperaturas situadas por debajo y por encima del intervalo de temperaturas en que tiene lugar la transición.

$$\Delta S_D = \int_{T_0}^{T_f} \Delta C_p / T dT \quad [6]$$

Conocidas ΔH_D y ΔS_D , puede calcularse la energía libre de Gibbs (ΔG) de desnaturalización a partir de la relación $\Delta G_D = \Delta H_D - T\Delta S_D$, y conocer la dependencia de la estabilidad de la estructura nativa con la temperatura. En el caso de una proteína multidomínios la función de estabilidad debe definirse para cada una de las regiones cooperativas en que se encuentra plegada la cadena polipeptídica.

Para una transición que sigue el modelo de equilibrio entre dos estados, sin cambios en el estado de asociación, la dependencia de la estabilidad de la estructura nativa con la temperatura vendría dada por la expresión:

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(1 - T/T_m) + \Delta C_p[(T - T_m) - T \ln(T/T_m)] \quad [7]$$

El análisis de los termogramas obtenidos durante la desnaturalización de una proteína permite obtener información sobre el número de estados implicados el proceso (sin necesidad de asumir un modelo previo para el proceso estudiado; Freire y Biltonen, 1978); la organización de la cadena polipeptídica en dominios cooperativos y tamaño de los mismos; o la existencia de procesos acoplados a la pérdida de la estructura nativa (disociación de subunidades, ligandos, etc.) (Freire 1989; Brandts y Lin, 1990; Sánchez-Ruiz, 1995).

El análisis termodinámico y la obtención de información estructural mediante DSC están limitados, en principio, al estudio de procesos reversibles. Sin embargo, la desnaturalización térmica de proteínas es, frecuentemente, irreversible. En muchos de estos casos, el proceso está controlado cinéticamente por lo que debe describirse mediante ecuaciones de velocidad (Sánchez-Ruiz, 1992). En consecuencia, la forma de los termogramas obtenidos variará con la velocidad de barrido y la obtención de información termodinámica a partir del análisis de las curvas calorimétricas es posible, únicamente, en aquellos casos en los que la población de formas reversiblemente desnaturalizadas sea significativa dentro del intervalo de temperaturas en que se produce la transición, de tal forma que puedan aislarse las contribuciones de las formas reversible e irreversiblemente desnaturalizadas (Sánchez-Ruiz 1992; Varea *et al.*, 2004).

Los experimentos de DSC se realizaron en un microcalorímetro MCS (MicroCal Inc.) a una presión de nitrógeno de 2 atmósferas, para evitar la formación de burbujas durante el calentamiento. La velocidad de calentamiento utilizada fue 20 °C/h, salvo que se indiquen otras condiciones. La adquisición de datos y el análisis de las curvas experimentales se realizaron utilizando los programas MCS observer y Microcal Origin para DSC, respectivamente. Las curvas de capacidad calorífica de exceso se obtuvieron tras restar la línea de base correspondiente al tampón de medida procedente de la última diálisis, y aproximar las variaciones en la capacidad calorífica existentes entre el estado nativo y el desnaturalizado mediante una aproximación cúbica. Las curvas así obtenidas se dividieron por el número de milimoles utilizados para expresarlas en $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. La ausencia de transiciones térmicas en soluciones previamente calentadas indica que la desnaturalización de Pce es irreversible y la influencia de proceso irreversible sobre la forma de los termogramas se analizó realizando barridos a diferente velocidad de calentamiento (10-45 °C/h) (Sánchez-Ruiz, 1992).

3.2.6. CALORIMETRÍA DE VALORACIÓN ISOTERMA (ITC)

La calorimetría de valoración isoterma mide el calor absorbido o emitido como consecuencia de una reacción química a temperatura constante (Wiseman *et al.*, 1989; Freire *et al.*, 1990b; Todd y Gómez, 2001). Es la técnica experimental más directa para determinar los parámetros termodinámicos asociados a la formación de un complejo proteína:ligando.

La reacción se estudia midiendo el calor producido o absorbido al inyectar, en pasos sucesivos, uno de los ligandos en la solución del otro (generalmente proteína) situada en la célula de muestra del calorímetro. Como en el caso del DSC, el calorímetro cuenta con una célula de referencia que, en este caso, no participa en el proceso de valoración y se llena normalmente con agua o tampón. El calor absorbido o producido tras cada inyección de ligando genera una diferencia de temperatura entre ambas células que se compensa automáticamente mediante un sistema de retroalimentación. La energía eléctrica necesaria para mantener la paridad de temperatura entre ambas células tras cada inyección se registra en forma de picos (Fig. 3.8a), cuya integral corresponde al calor producido/absorbido como consecuencia de la reacción. A medida que aumenta el grado de saturación, la intensidad de los picos disminuye hasta alcanzar un valor constante que corresponde al calor de dilución del ligando. Este efecto debe ser descontado del calor medido en cada inyección y se determina realizando una curva de dilución del ligando en el tampón bajo las mismas condiciones experimentales.

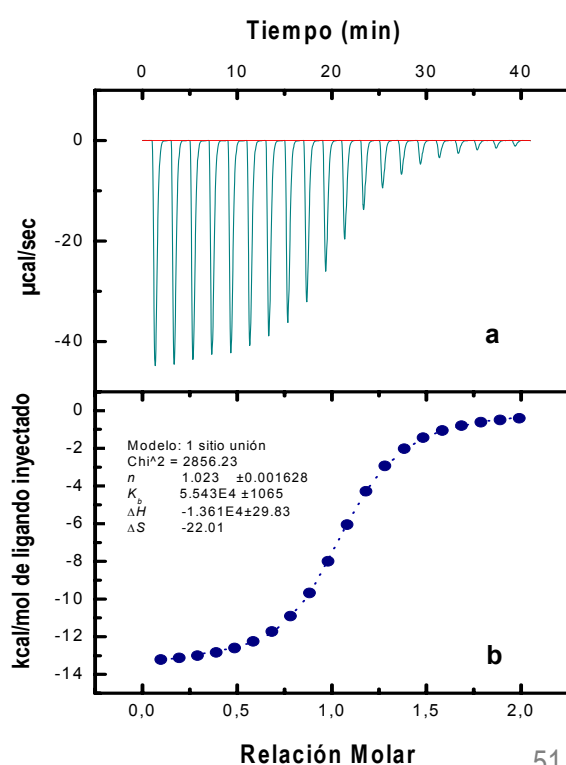


Figura 3.8. Valoración calorimétrica de una proteína por un ligando. a. Datos experimentales para una serie de 20 inyecciones de 4 µl espaciadas cada 5 min. Tras crear una línea de base (rojo) e integrar todos los picos, los símbolos en **b** muestran el calor producido por mol de ligando adicionado en cada inyección. El ajuste de éstos datos por mínimos cuadrados no lineales a una clase de sitios de unión (curva continua azul) genera los parámetros recogidos en la Tabla ($n = 1,02$; $K_b = 5,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$; $\Delta H = -13,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

El calor medido en cada inyección tras sustraer la dilución del ligando (q_i) es proporcional a la cantidad de ligando que se une a la proteína en cada inyección y a la entalpía de unión (ΔH):

$$q_i \cong v \cdot \Delta L_i \cdot \Delta H \quad [8]$$

siendo v el volumen de la celda de reacción y ΔL_i la variación en la concentración de ligando libre tras la inyección i .

El análisis de la isoterma de valoración generada a partir de la dependencia de q_i con la relación molar ligando/proteína (Fig. 3.8b) en términos de un modelo de unión adecuado permite calcular la entalpía de unión (ΔH), la constante de equilibrio (K_b) y la estequiometría de la unión (n). Conocidos K_b y ΔH , es posible determinar la energía libre ($\Delta G = -RT \ln K_b$) y la entropía (ΔS) de unión (Leavitt y Freire, 2001). La magnitud y el signo de ΔH y ΔS están relacionados con el tipo de fuerzas (hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno, van der Waals) implicadas en la estabilización del complejo formado (Eftink y Biltonen, 1980) y se pueden correlacionar con la estructura de las moléculas interaccionantes (Lin *et al.*, 1991; Leavitt y Freire, 2001).

Wiseman *et al.*, (1989) demostraron que el producto de la concentración de proteína en la célula calorimétrica, $[M_0]$, por la constante de unión y el número de sitios para el ligando define un parámetro ($c = [M_0] \cdot K_b \cdot n$) cuyo valor debe ser inferior a 1000 para que el valor de K_b pueda ser determinado con precisión mediante ITC. Como puede verse en la Fig.3.9, por encima de un cierto de valor de c la curva pierde su forma característica y se hace indistinguible de otra con valores más elevados de K_b (n y $[M_0]$ constantes). La concentración de sitios ($n \cdot [M_0]$) necesaria para que la determinación de los parámetros termodinámicos sea fiable viene determinada por el valor de K_b ($0.5 < K_b \cdot n \cdot [M_0] < 1000$) y/o la sensibilidad del aparato, y ha de elegirse de tal forma que la curva de valoración contenga al menos 8-10 puntos y una curvatura adecuada.

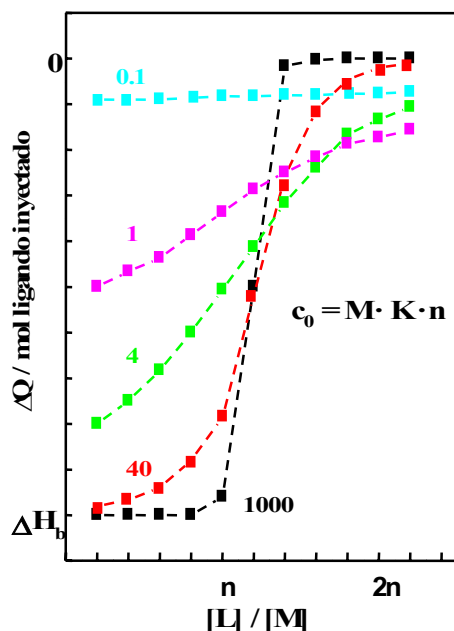


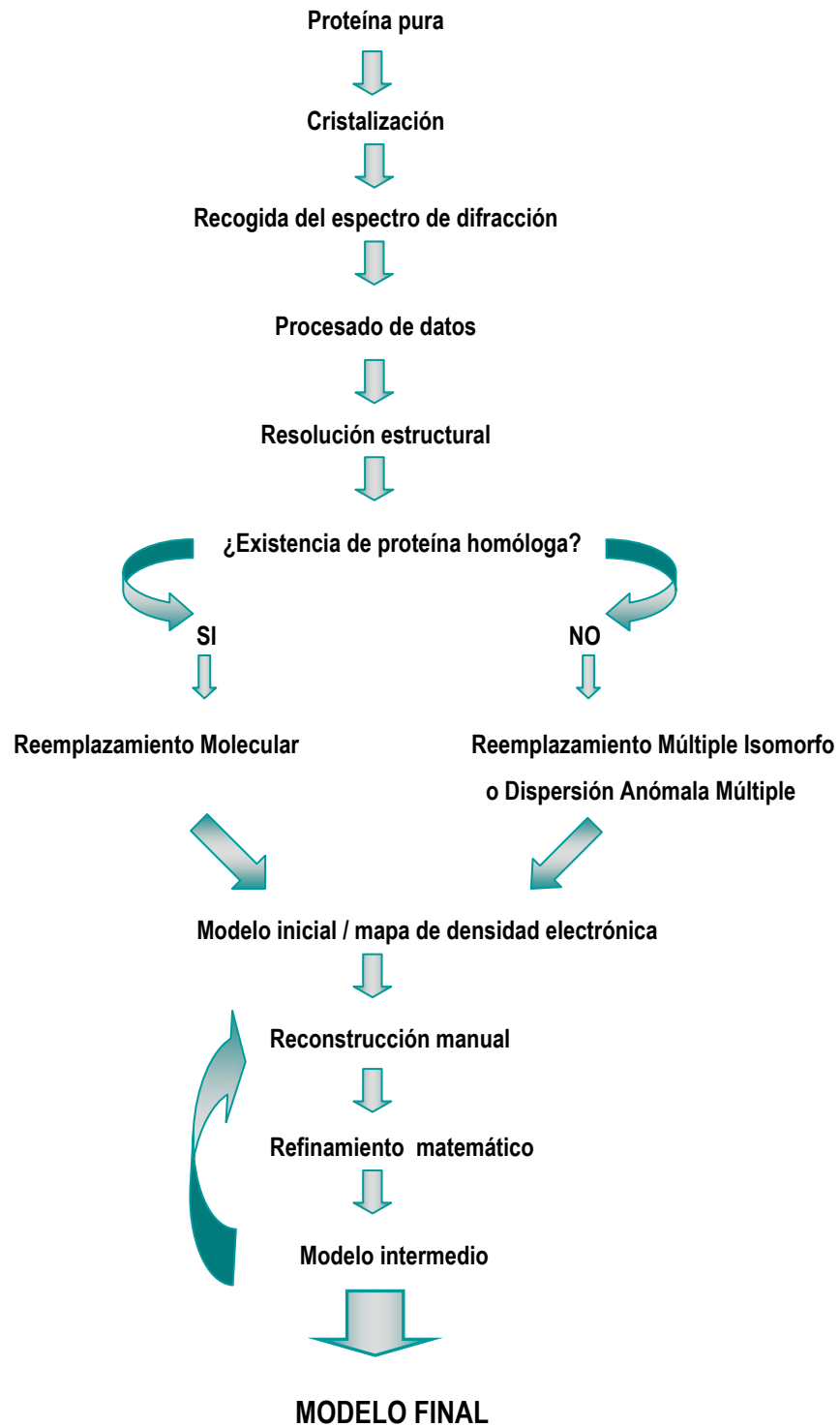
Figura 3.9. Simulación de isotermas de unión. Se representan diferentes valores del parámetro $c = [M_0] \cdot K_b \cdot n$ que controla la fuerza aparente de la unión para cualquier sistema.

La valoración calorimétrica de Pce con colina se realizó inyectando una solución de colina 120 mM (12 inyecciones de 3 μ l y 21 de 7 μ l) sobre la célula de reacción (1,4 ml), en la que se encontraba la proteína a una concentración de $3,29 \cdot 10^{-5}$ M. El tampón utilizado fue TRIS-HCl 20 mM, $ZnCl_2$ 10 μ M, pH 8,0. Los valores de K_b y ΔH se determinaron a partir del ajuste no lineal de la curva de valoración asumiendo un modelo de unión a dos clases de sitios de unión.

3.2.7. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

3.2.7.1. Generalidades

La cristalografía de rayos X es una técnica experimental que se utiliza para la determinación de estructuras moleculares a resolución atómica. El procedimiento a seguir para la obtención de la estructura tridimensional de una proteína mediante cristalografía de rayos X consta de las siguientes etapas:



3.2.7.2. Principios de la cristalización de proteínas

Los cristales están formados por moléculas ordenadas de forma periódica y su contenido puede entenderse como una red imaginaria de unidades elementales idénticas denominadas celdilla unidad que viene definida por tres ejes y tres ángulos interaxiales. La repetición por translación en las tres direcciones del espacio de la celdilla unidad genera el volumen del cristal. A su vez, la celdilla unidad contiene una unidad mínima, denominada unidad asimétrica, que mediante aplicación de los elementos de simetría del grupo espacial genera el contenido de la celdilla y, en consecuencia, el de todo el cristal. La combinación de la celdilla unidad con los elementos de simetría designa el grupo espacial, que describe el patrón de repetición de la unidad asimétrica en el espacio tridimensional. Existen 230 grupos espaciales de los que sólo 65 están presentes en los cristales de proteínas, ya que su quiralidad impide la existencia de determinadas operaciones de simetría que contienen un centro de simetría.

La determinación de la estructura tridimensional de una proteína por difracción de rayos X requiere la producción de monocristales de tamaño adecuado (McPherson, 1982), para lo que es necesario disponer de una muestra pura y conformacionalmente homogénea. Durante el proceso de cristalización las moléculas se llevan a un equilibrio de fases líquido/sólido mediante una minimización de la energía libre. Esta situación se alcanza cuando las interacciones atractivas entre moléculas son máximas y las repulsivas mínimas. Cuando el sistema se lleva muy lentamente a un estado de mínima solubilidad, se alcanza un grado limitado de sobresaturación (termodinámicamente inestable) que conduce a la cristalización de la proteína (Fig. 3.10).

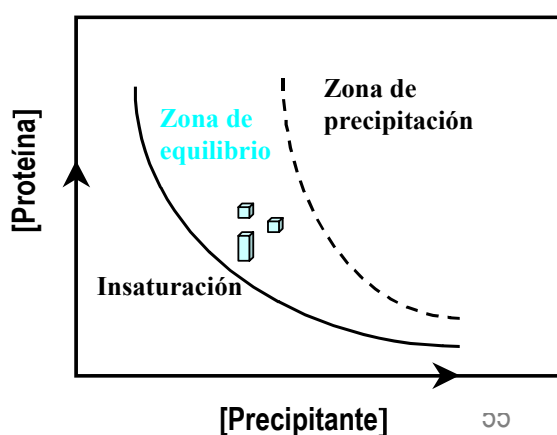


Figura 3.10. Representación de un diagrama de solubilidad. Se indica el equilibrio fase-líquida/fase-sólida alcanzado durante el proceso de cristalización.

Los cristales de proteína presentan unas características particulares:

- El contenido en solvente es muy elevado (50-80%) ya que la baja densidad de empaquetamiento de las moléculas de proteína en el cristal genera grandes canales ocupados por moléculas de agua desordenadas (Mathews, 1968).
- El volumen de la celdilla unidad suele ser bastante grande debido al tamaño de las proteínas y a su esfera de solvatación.

Estos factores hacen que la fuerza de interacción entre las moléculas sea débil, de manera que los cristales son muy frágiles, sensibles a la radiación y difíciles de manipular. Por otra parte, el elevado contenido en solvente desordenado hace que los datos de difracción que se obtienen sean muy débiles. Por tanto, el primer objetivo en la resolución de la estructura de una proteína por difracción de rayos-X es la obtención de un monocristal que tenga el mayor tamaño posible (mayor número de elementos dispersores) y la menor mosaicidad. Este parámetro informa del orden interno que posee un cristal, considerándolo como la adición de micro-dominios apilados en las tres direcciones del espacio. Cuanto más imperfecto y desordenado sea este apilamiento mayor será la mosaicidad y peor la calidad cristalina, lo que generará peores datos de difracción.

3.2.7.3. Proceso experimental de cristalización

El proceso de cristalización consta de dos etapas: nucleación y crecimiento. En él intervienen varios factores:

- Naturaleza y concentración de los agentes precipitantes.
- Concentración de proteína.
- pH y temperatura.
- Presencia de aditivos, detergentes, ligandos e iones.

Debido al gran número de variables que influyen en el proceso y al desconocimiento 'a

priori de las condiciones de cristalización de una proteína, es necesario explorar condiciones muy distintas establecidas a partir del análisis estadístico de las condiciones de cristalización de cientos de proteínas (Jancarik y Kim, 1991).

Los experimentos de cristalización de este trabajo se han realizado con la técnica de difusión de vapor denominada 'gota colgante' (Fig. 3.11). La muestra se lleva a un estado de sobresaturación mediante difusión de vapor entre la solución madre, compuesta por el tampón y el precipitante, y la solución de proteína. El intercambio de vapor entre ambas disminuye el volumen de la gota que contiene la proteína y, por tanto, aumenta la saturación de la disolución.

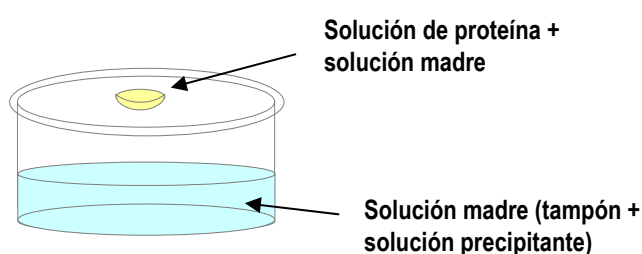


Figura 3.11. Esquema del montaje experimental de cristalización mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgante utilizada en la cristalización de Pce. En el interior del pocillo se colocan 500 μl de la solución madre y sobre el borde la solución de proteína (hasta 10 μl) en mezcla con la solución madre.

3.2.7.4. Recogida de datos de difracción

Una vez obtenido el cristal se procede a la medida de su espectro de difracción. El montaje experimental (Fig. 3.12) implica colocar los cristales en unos lazos de nylon donde un haz monocromático de rayos X incide sobre ellos.

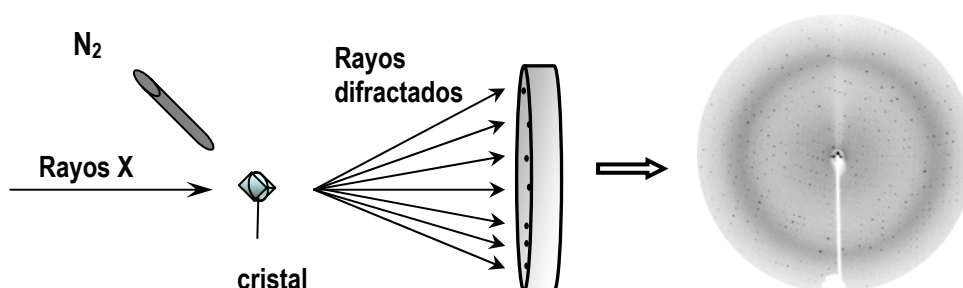


Figura 3.12. Proceso de recogida de datos de difracción de un cristal. El cristal se protege mediante un sistema de N_2 líquido, bajo la acción de los rayos X.

Los rayos X dispersados por los electrones de las moléculas ordenadas en el cristal generan máximos de difracción (dispersión cooperativa). Estos picos de difracción, también llamados reflexiones, siguen la ley de Bragg (Fig. 3.13) que relaciona el espacio entre planos atómicos (d) con el ángulo de incidencia de los rayos X (θ) y la longitud de onda de la radiación (λ) (Bragg, 1931). La intensidad de la difracción decae al aumentar el ángulo de incidencia debido a la movilidad térmica de los átomos y a la calidad del cristal, lo que afecta a los datos de mayor resolución (mayor ángulo θ).

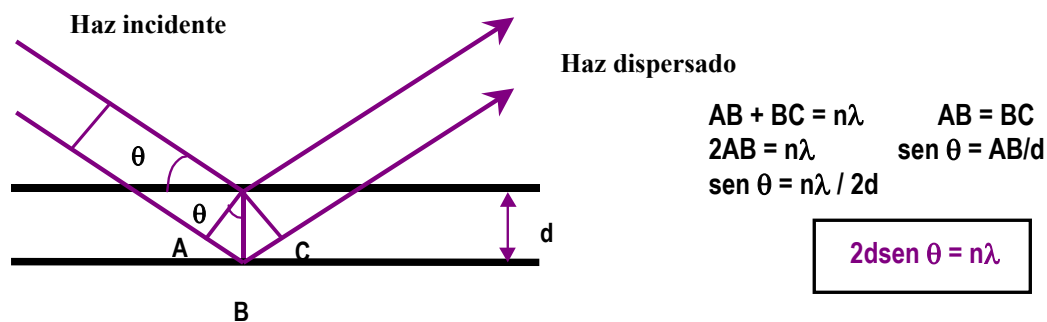


Figura 3.13. Representación de la ley de Bragg.

La dispersión de los rayos X generará un espectro de difracción que se digitalizará y se transformará en valores de intensidades asociados a cada familia de planos de Bragg. El espectro consta de una serie de elementos de área correspondientes a los máximos de difracción, 'spots', que constituyen el denominado 'espacio recíproco'.

3.2.7.5. El problema de la fase en cristalografía

La resolución estructural de una proteína implica obtener una imagen del 'espacio real' (nuestra proteína en el cristal) a partir del 'espacio recíproco'. Ambos están relacionados, ya que la densidad electrónica del cristal es la transformada de Fourier del patrón de difracción

obtenido experimentalmente. Matemáticamente, se relacionan mediante la siguiente expresión:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V_c} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-i\alpha}; \quad \alpha = 2\pi(hx + ky + lz) \quad [9]$$

donde $F(hkl)$ es el factor de estructura (magnitud vectorial asociada a cada reflexión) y $\rho(xyz)$ la función de densidad electrónica en cada punto (xyz) . Sin embargo, de los datos experimentales se obtienen los módulos o amplitudes de los rayos difractados $|F(hkl)|$ pero no sus fases, α , por lo que no es posible la obtención directa de la estructura a partir de los datos de difracción. Esto constituye el denominado 'problema de la fase', punto crítico en cristalografía, para el que se han desarrollado diferentes técnicas de resolución (Blundell y Johnson, 1976).

3.2.7.6. Equipos de difracción y fuentes de radiación

Convencionalmente, los rayos X se generan en tubos de alto vacío al emitir un cátodo electrones que son acelerados dentro de un campo eléctrico hacia el ánodo, produciendo la radiación. Sin embargo, en el caso particular de cristales de proteínas, y debido a sus características especiales, es necesario utilizar con frecuencia fuentes de radiación X mucho más intensas, que permitan obtener datos de difracción adecuados.

En este trabajo se han empleado 2 tipos distintos de fuentes de radiación y de equipos de difracción para la recogida de espectros de difracción:

- Generador de rayos X de ánodo rotatorio. Se ha utilizado el equipo de difracción del Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC). La fuente consta de un generador de ánodo rotatorio Enraf-Nonius FR591. Dicho ánodo es de cobre y produce una radiación con una longitud de onda de 1.5418 Å. El generador dispone de un sistema interno de refrigeración por agua y transferencia de calor que permite una potencia de 4 kW. El equipo consta de un sistema criogénico de Oxford Cryosystems que permite enfriar la muestra a 100 K y con él se midieron los datos de difracción de la proteína nativa. Los datos de difracción se recogieron en un detector del tipo Image Plate de 345 mm de Mar Research.
- Radiación sincrotrón. La radiación sincrotrón es la fuente de radiación X más intensa

que existe. El sincrotrón consta de un anillo de cientos de metros de longitud por el que se hacen circular electrones a velocidades cercanas a las de la luz. Al quebrarse la trayectoria de los electrones mediante imanes, para poder seguir la curvatura del anillo, se produce la emisión de una radiación muy energética y tangencial a la dirección seguida por los electrones denominada radiación sincrotrón. La radiación emitida muestra un espectro continuo de longitud de onda muy amplio, en el que se encuentran incluidos los rayos X. Por tanto, la radiación sincrotrón tiene como ventajas fundamentales su mayor brillo y la posibilidad de seleccionar la longitud de onda de los rayos X. La recogida de datos de los cristales de Pce con derivados de gadolinio se realizó en la línea BM30A del ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) utilizando la longitud de onda correspondiente a la capa L_{III} del gadolinio ($\lambda = 1,7110 \text{ \AA}$), determinada a partir de espectros de fluorescencia de los cristales. Como sistema de detección se utilizó una cámara CCD y la temperatura de trabajo fue de 100 K.

3.2.7.7. Criocristalografía

Los cristales de proteína sufren un gran deterioro al ser expuestos a la radiación, perdiendo su orden interno. Este efecto es dependiente del tiempo de exposición, de la longitud de onda de la radiación utilizada y de la potencia del haz incidente, condiciones que provocan la generación de radicales libres. Todo esto, unido al elevado contenido de solvente en el cristal, facilita la difusión de los radicales, que pueden llegar a degradar el cristal mediante una serie de reacciones químicas. Este efecto se puede paliar recurriendo a técnicas de criocristalografía (Garman y Schneider, 1997) que, al retrasar la ‘muerte’ del cristal permiten obtener un conjunto completo de datos antes de su destrucción. Para que las temperaturas utilizadas en criocristalografía ($\cong 100 \text{ K}$) no dañen el cristal por la formación de cristales de hielo se pueden utilizar sustancias crioprotectoras como el glicerol, metilpentanodiol, etilenglicol, etanol, polietilenglicol, sacarosa, etc, que evitan la formación de hielo mediante la generación de un estado vítreo alrededor del cristal. Sin embargo, estas sustancias pueden alterar el cristal, dañando el orden interno, o disolviéndolo en el crioprotector. Por este motivo, hay que elegir apropiadamente el agente crioprotector, su concentración y el tiempo de permanencia del cristal en la solución crioprotectora. El procedimiento seguido en nuestro caso, fue realizar la inmersión del cristal en la solución crioprotectora unos segundos antes de colocarlo a baja temperatura. La

solución crioprotectora utilizada fue la solución madre con un 20% de glicerol y la temperatura de trabajo fue de 100 K.

3.2.7.8. Procesado de los datos

A partir del espectro de difracción (Fig. 3.12) se puede obtener información tanto de la topología del cristal como de las dimensiones de la celdilla elemental. Por otro lado, la distribución de intensidades permite obtener los elementos de simetría del grupo espacial. El procesado de los datos de difracción se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

– Caracterización del cristal: Se obtiene información sobre la geometría de la celdilla unidad. Este proceso se denomina 'indexado' y en él se asignan a cada máximo de difracción unos índices hkl (índices de Miller) que representan la difracción por un conjunto de planos de átomos del cristal.

– Estimación de las intensidades de los máximos de difracción: Este proceso se realiza en dos fases: la estimación de la intensidad de cada reflexión y el escalado de las intensidades. La intensidad de cada reflexión se estima a partir de los 'spots' mediante la integración de las intensidades asociadas a cada elemento de área de cada 'spot'. Además, hay que tener en cuenta el ruido de fondo de la imagen y la mosaicidad del cristal lo que hacen que el perfil de los 'spots' sea diferente. Posteriormente, se aplican una serie de correcciones a las intensidades para que todas sean comparables y se puedan promediar las reflexiones equivalentes, reduciéndolas a la unidad asimétrica. En el proceso de escalado se utilizan una serie de parámetros estadísticos, siendo los siguientes los más importantes:

- R_{sym} : Representa las diferencias de intensidad entre reflexiones relacionadas por simetría.
- $I/\sigma I$: Indica la intensidad de la señal con respecto al ruido.
- Multiplicidad o redundancia: Representa el número de observaciones por cada reflexión. Cuanto mayor sea este parámetro mejor es la estimación de los errores experimentales y sistemáticos.
- Completitud: Indica el porcentaje del espacio recíproco recogido en los datos. Se

necesita una completitud del 90-100% y de al menos del 80% en la esfera de mayor resolución.

– Obtención del módulo del factor de estructura: Se obtiene a partir de la medida de las intensidades corregidas y escaladas de cada haz difractado con índices hkl , siendo la intensidad proporcional al cuadrado del modulo del factor de estructura, según:

$$I(hkl) \propto |F(hkl)|^2 \quad [10]$$

El factor de estructura es la resultante de las ondas dispersadas por todos los átomos de la celdilla unidad en cada dirección, y al ser una magnitud vectorial se puede expresar como una combinación de amplitud y fase (Fig. 3.14).

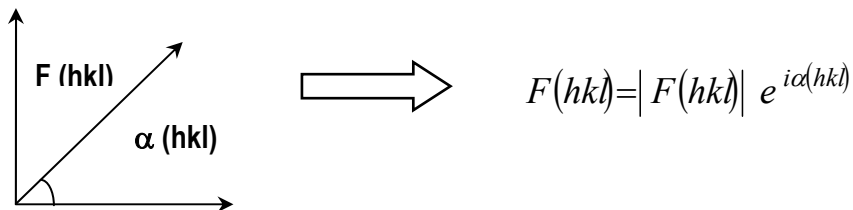


Figura 3.14. Diagrama de Argand. Representación vectorial del factor de estructura.

Mediante la asignación a cada máximo de los índices hkl y el cálculo del módulo de su factor de estructura se llega al resultado final del experimento de difracción. Para ello se emplean los siguientes programas incluidos en el paquete informático CCP4 (Collaborative Project, N4, 1994):

- MOSFLM: Programa para el procesamiento de los datos que incluye la determinación de la orientación del cristal, los parámetros de la celdilla unidad, la mosaicidad y propone un grupo espacial, generando una lista de reflexiones e integra las intensidades difractadas.
- SCALA: Programa que escala múltiples observaciones de reflexiones y las reduce a una intensidad promedio para después realizar un análisis estadístico de las medidas.
- TRUNCATE: Este programa permite obtener amplitudes a partir de las intensidades medias y las coloca en una escala absoluta usando el diagrama de Wilson (French y Wilson,

1978).

3.2.7.9. Resolución de la Estructura

Para determinar la estructura tridimensional de una proteína se necesita obtener el mapa de densidad electrónica $\rho(xyz)$ definido en cada punto de la celdilla unidad. Los máximos de esta función (Ec. 11) determinan las posiciones de los átomos y, por tanto, la estructura tridimensional.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V_c} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz+\alpha)} \quad [11]$$

A pesar de disponer de los módulos de $F(hkl)$ de cada reflexión, obtenidos directamente a partir de las intensidades, en el experimento de difracción se pierden sus fases, α . Existen diferentes métodos que se aplican para su resolución.

Los métodos de Patterson (Patterson, 1935) no aportan una solución directa al problema pero dan una información que, combinada con los métodos de resolución estructural en proteínas, permite la obtención de fases iniciales. La función de Patterson (Ec.12) es básicamente la transformada de Fourier de las intensidades y proporciona información acerca de la orientación relativa y la longitud de cada vector interatómico de la estructura, tanto a nivel intramolecular como intermolecular. Debido a la gran cantidad de vectores que se generan en el caso de las moléculas de proteínas, estos métodos no son suficientes para su resolución.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V_c} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad [12]$$

A continuación se describen brevemente los métodos más utilizados para resolver el problema de las fases en proteínas:

- Reemplazamiento Molecular (MR): Este método utiliza como fases iniciales las de una proteína de estructura conocida que se toma como modelo. La similitud de secuencia con la proteína problema debe ser superior al 30%, por lo que la aplicación de esta técnica depende de la disponibilidad de un modelo apropiado.

- Reemplazamiento Múltiple Isomorfo: Si no se conoce la estructura de ninguna proteína homóloga, se puede recurrir a la utilización de este método, basado en la introducción de átomos pesados (Au, Hg, Pd, Pt, etc) en zonas del cristal que están ocupadas por el solvente. Para que dos cristales cumplan la condición de isomorfismo, sus grupos espaciales, la celdilla unidad y su disposición atómica debe ser casi idéntica. Mediante la comparación de los espectros de difracción de la proteína nativa y del derivado con el átomo pesado se pueden determinar las posiciones de los átomos pesados en el cristal (utilizando los mapas de Patterson), siempre y cuando el cristal nativo y derivado sean isomorfos. En el caso de Pce se intentó la obtención de derivados con sales de mercurio y de platino.

- Dispersión Anómala Múltiple (MAD): Cuando la longitud de onda de los rayos X está muy próxima al máximo de absorción de un elemento, la radiación absorbida produce un desplazamiento en la fase y la amplitud de la radiación dispersada. Esto genera una desigualdad en las reflexiones relacionadas por simetría (parejas de Friedel) que deberían ser iguales en amplitud y presentar fases opuestas. Sólo los átomos pesados contribuyen de forma significativa a la dispersión anómala ya que los átomos ligeros como H, C, N y O no absorben a la longitud de onda de los rayos X. Las diferencias anómalas pueden utilizarse, como las diferencias isomorfas, para localizar los dispersores anómalos a través de los métodos de Patterson.

El factor de dispersión, $f(\lambda)$, de un átomo modificado por la dispersión anómala viene dado por la siguiente expresión:

$$f(\lambda) = f_0 + \Delta f'(\lambda) + i\Delta f''(\lambda) \quad [13]$$

siendo f' y f'' las componentes real e imaginaria de la dispersión anómala y f_0 la componente normal. Para llevar a cabo un experimento de MAD se necesita tener un átomo pesado en el cristal y recoger los espectros de difracción a longitudes de onda adecuadas (generalmente utilizando la radiación sintonizable del sincrotrón). La selección de las longitudes de onda se realiza a partir de un espectro de fluorescencia del dispersor anómalo recogido en el sincrotrón. Es necesario obtener datos a tres longitudes de onda, correspondientes al máximo de absorción (máximo de f''), al punto de inflexión de la curva de absorción (mínimo de f'), y a una longitud de onda lejana donde la dispersión anómala sea mínima, es decir, cuando el valor de f' sea cercano al valor normal. La combinación de estos datos permite calcular la distribución de amplitudes y fases que generan los dispersores anómalos y resolver la estructura con un único cristal.

- Dispersión anómala simple (SAD): El método está basado en la capacidad dispersora anómala de átomos pesados con una señal anómala muy intensa a la longitud de onda de medida, lo que permite resolver el problema de la fase con datos recogidos a una única longitud de onda. Recientemente, se ha descrito la utilización de complejos de lantánidos de alto poder de faseado en la resolución de macromoléculas biológicas (Girard *et al.*, 2003).

En este trabajo se ha utilizado la técnica SAD para resolver la estructura de Pce, utilizando como dispersor anómalo el átomo de gadolinio del complejo Gd-HPDO3A. El derivado no isomorfo se preparó por inmersión rápida (1 minuto) en una solución 10 mM del complejo de Gd-HPDO3A. El máximo de absorción se determinó a partir del espectro de fluorescencia registrado en la línea BM30A del ESRF y se recogió un conjunto de datos de difracción a la longitud de onda correspondiente a la capa L_{III} del gadolinio ($\lambda = 1,7110 \text{ \AA}$). Las posiciones de los átomos de gadolinio en la estructura se determinaron mediante mapas de Patterson, utilizando para ello el programa SHELX (Sheldrick, 1998).

3.2.7.10. Construcción del modelo y refinamiento

La construcción del modelo y la resolución estructural se llevó a cabo en el GCMBE del Instituto de Química-Física 'Rocasolano' por el Dr. J. A. Hermoso. Dicho modelo se generó a partir de los mapas de densidad electrónica experimentales mediante el empleo del programa O

(Jones *et al.*, 1991). El refinamiento matemático del modelo inicial se llevó a cabo mediante la utilización de los programas CNS (Brunger *et al.*, 1998) y Refmac (Murshudov, 1997). Por último, la estereoquímica y geometría del modelo final fue validada mediante el programa PROCHECK (Laskowsky *et al.*, 1993).

3.2.7.11. Construcción del modelo Pce-teicoico y Pce-NPPC

Para la construcción del modelo Pce-teicoico se utilizó el fragmento pentamérico de ácido teicoico resuelto por RMN (Klein *et al.*, 1996). Con el fin de mantener las conformaciones originales de los anillos de azúcar de los ácidos teicoicos, solamente se realizaron torsiones, siempre permitidas, para los residuos de fosforilcolina y la molécula de ribitol. En primer lugar se fijó el residuo de fosforilcolina del ácido teicoico sobre la cavidad generada por el sitio activo de Pce. A continuación, se posicionaron manualmente con el programa O los residuos de fosforilcolina correspondientes a las siguientes unidades de teicoico en los sitios de unión a colina del CBM. En segundo lugar, y, mediante el mismo procedimiento, se realizó un modelo utilizando el sitio de unión a colina no canónico (generado en la parte posterior del centro activo) y el sitio posicionado entre las repeticiones p3-p4.

El modelo del complejo Pce:NPPC se construyó a partir de la estructura de Pce:PC y de la estructura de la molécula de NPPC, extraída del complejo NPPC:anticuerpo-m3c65 (código PDB, 1DL7). En primer lugar, el residuo de fosforilcolina del NPPC se superpuso sobre la molécula de PC unida al sitio activo de Pce y, a continuación, se colocó el grupo *p*-nitrofenilo manualmente con el programa O (Jones *et al.*, 1991) hasta eliminar cualquier impedimento estérico con la molécula de Pce. Durante el ajuste sólo se modificaron los ángulos de torsión permitidos del grupo fosfato, para preservar la conformación original del grupo *p*-nitrofenilo en la molécula de NPPC. El modelo así obtenido se minimizó energéticamente utilizando el programa CNS (Brunger *et al.*, 1998).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Pce: UNA ENZIMA DEPENDIENTE DE CINCO

4.1.1. ANÁLISIS DE POSIBLES METALES UNIDOS A Pce. INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD

Para determinar si Pce era una metaloenzima, se cuantificó el contenido en metales (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+}) de la proteína mediante ICP-OES. El análisis de muestras de proteína, aisladas en tampones preparados sin añadir ninguno de los metales investigados y equilibradas en HEPES 20 mM pH=7,0, puso de manifiesto la presencia de $1,8 \pm 0,1$ equivalentes de Zn^{2+} y $2,1 \pm 0,1$ equivalentes de Ca^{2+} por mol de Pce. En algunas muestras se detectó la presencia de trazas de Fe^{2+} ($0,2 \pm 0,1$ equivalentes/mol). Resultados similares se obtuvieron con muestras de Pce purificadas en tampones suplementados con $ZnCl_2$ 3 μ M (Tabla 4.1).

Para estudiar la posible influencia de los cationes unidos a Pce en la actividad de la enzima, se realizaron medidas de actividad enzimática, tanto en ausencia como en presencia de metales.

Tabla 4.1. Contenido en metales de Pce a pH 7,0. Influencia en la actividad enzimática

Tampón de diálisis	Actividad (%) ^a			Relación ^b catión/Pce	
	HEPES 20 mM	HEPES 20 mM Zn^{2+} 10 μ M	HEPES 20 mM EDTA 3 mM	Zn^{2+}	Ca^{2+}
HEPES 20 mM	100	100	100	$2,00 \pm 0,01$	$2,10 \pm 0,02$
HEPES 20 mM Zn^{2+} 3 μ M	100	100	100	$2,00 \pm 0,01$	$2,10 \pm 0,01$
HEPES 20 mM Zn^{2+} 10 μ M	100	100	100	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
HEPES 20 mM EDTA 3 mM	40	90	40	$0,66 \pm 0,04$	$1,7 \pm 0,1$

^a Las muestras de Pce purificadas en tampones suplementados con $ZnCl_2$ o EDTA se diluyeron o re-equilibraron previamente en el tampón utilizado en los ensayos cinéticos para evitar posibles interferencias. ^b Las estequiometrías catión/proteína se midieron en el tampón de diálisis (concentración de Pce \cong 10 μ M).

La adición de EDTA (3 mM) al tampón de medida no producía ningún cambio significativo en la hidrólisis de NPPC por Pce. Sin embargo, tras diálisis prolongada (24 h) frente a EDTA 3 mM en HEPES 20 mM a pH 7,0 la actividad disminuía un 60%, observándose una reducción simultánea del 67% en el contenido total de cinc (Tabla 1), y una pequeña variación en el contenido de calcio (1,7 equivalentes por mol de enzima). En la Figura 4.1 se puede observar cómo a una concentración de EDTA 20 mM (HEPES 20 mM, pH 8,0) se consigue una inactivación casi total de la enzima (5% de la actividad inicial) tras 28 horas de diálisis. Estos resultados ponen de manifiesto que tanto el cinc como el calcio se encuentran fuertemente unidos a la enzima, siendo necesaria una concentración elevada de quelante y más de 24 horas de diálisis para poder eliminar el catión Zn^{2+} en las condiciones descritas ($t_{1/2} = 5,6 \pm 0,5$ h en EDTA 20 mM).

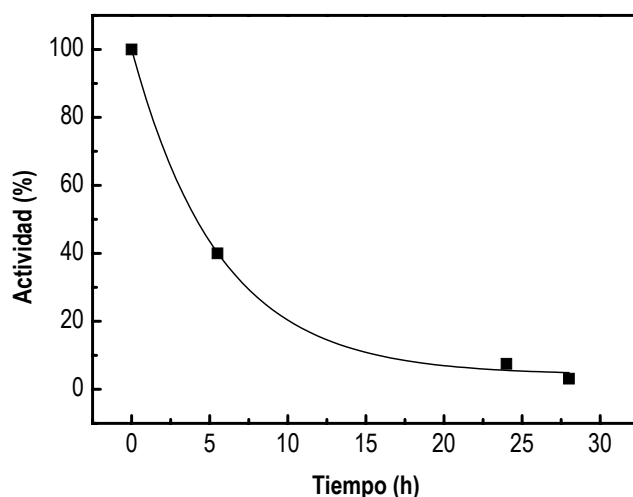


Figura 4.1. Cinética de inactivación de Pce. La enzima se dializó frente a EDTA 20 mM en tampón HEPES 20 mM, pH 8,0.

Como puede observarse en los datos recogidos en la Tabla 4.1, la dilución 1/100 de las muestras de apoenzima en tampones que contenían un ligero exceso de Zn^{2+} ($\cong 10 \mu M$) con respecto a la concentración total de EDTA permitía reconstituir la enzima, recuperándose hasta un 90% de la actividad inicial, lo que indica la alta reversibilidad del proceso.

Estos resultados sugieren que Pce es una fosfodiesterasa dependiente de cinc, cuya actividad requiere la ocupación de los dos sitios del catión (40% de actividad para un nivel de

ocupación total de $\cong 33\%$), mientras que el calcio, difícilmente eliminable en ninguna de las condiciones ensayadas, podría desempeñar un papel de tipo estructural.

4.1.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN POR Zn^{2+}

Tras comprobar que el catión Zn^{2+} era esencial para la actividad de la enzima, se procedió a estudiar su dependencia con la concentración de metal.

Como puede verse en la Figura 4.2 la presencia de Zn^{2+} a concentraciones superiores a $100 \mu M$ inhibe la actividad enzimática de Pce. La adición de un exceso de EDTA ($2,5 \text{ mM}$) al tampón de medida permite recuperar el 100% de actividad, lo que indica que el proceso de inhibición es completamente reversible.

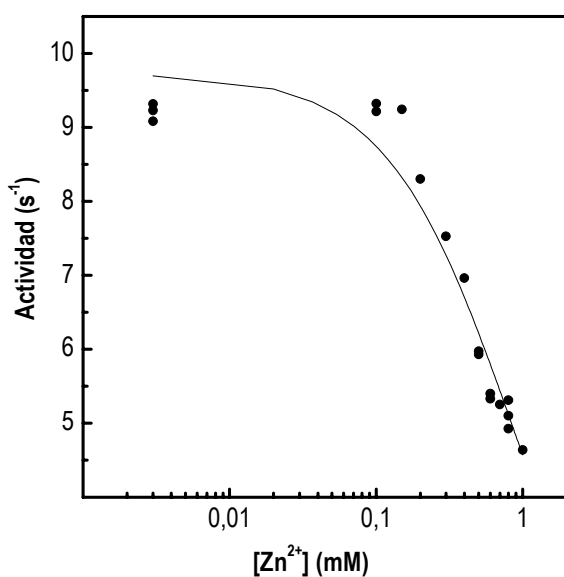


Figura 4.2. Inhibición de Pce por Zn^{2+} . Actividad de Pce ($0,1 \mu M$) sobre NPPC (3 mM) en función de la $[Zn^{2+}]$. Las medidas se realizaron en HEPES 20 mM ($pH=7,0$) a $25 \text{ }^\circ C$ y a $I = 0,05$.

Con objeto de caracterizar el tipo de inhibición producida por el cinc, se estudió la dependencia de la velocidad de hidrólisis de NPPC con la concentración de sustrato a distintas concentraciones del catión. Debido a los problemas de solubilidad que presenta el cinc en medios básicos, las medidas de inhibición se realizaron en el intervalo de pH comprendido entre $6,5$ y $7,5$ utilizando los tampones descritos en el apartado 3.2.4.

En la Figura 4.3 se muestran las curvas experimentales obtenidas a $pH 7,22$.

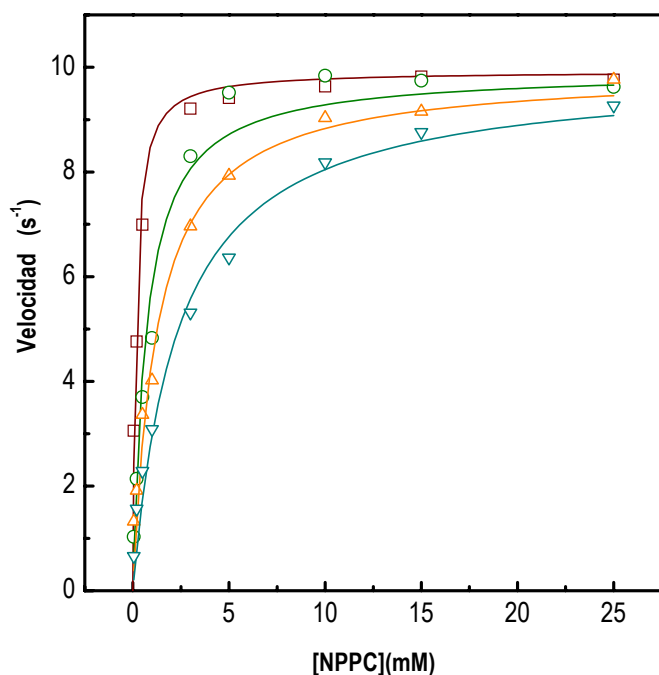


Figura 4.3. Dependencia de la actividad de Pce con la concentración de Zn^{2+} . Las medidas se realizaron en presencia de $3 \mu M$ (\square), $200 \mu M$ (\circ), $400 \mu M$ (\triangle) y $800 \mu M$ (∇) Zn^{2+} en tampón HEPES 20 mM pH $7,22$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,05$). Las líneas continuas corresponden al ajuste teórico de la ecuación 4 a los datos experimentales.

Los parámetros obtenidos del ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales (Tabla 4.2) muestran un aumento de la K_m aparente con la concentración de cinc, mientras que los valores de k_{cat} permanecen aproximadamente constantes, lo que sugiere un mecanismo de tipo competitivo.

Tabla 4.2. Variación de los parámetros cinéticos de Pce con la concentración de Zn^{2+}

$[Zn^{2+}]$ (μM)	$K_{m,ap}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_{m,ap}$ ($mM^{-1} s^{-1}$)
3	$0,17 \pm 0,02$	$9,8 \pm 0,3$	58 ± 6
200	$0,9 \pm 0,1$	$10,5 \pm 0,2$	12 ± 1
400	$1,2 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,6$
800	$2,3 \pm 0,4$	$9,9 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,2$

Todas las medidas se realizaron en HEPES 20 mM a pH $7,22$.

Los resultados obtenidos pueden describirse, de hecho, asumiendo un modelo de inhibición competitiva, como muestra la representación de dobles inversos de Lineweaver-Burk (Fig. 4.4).

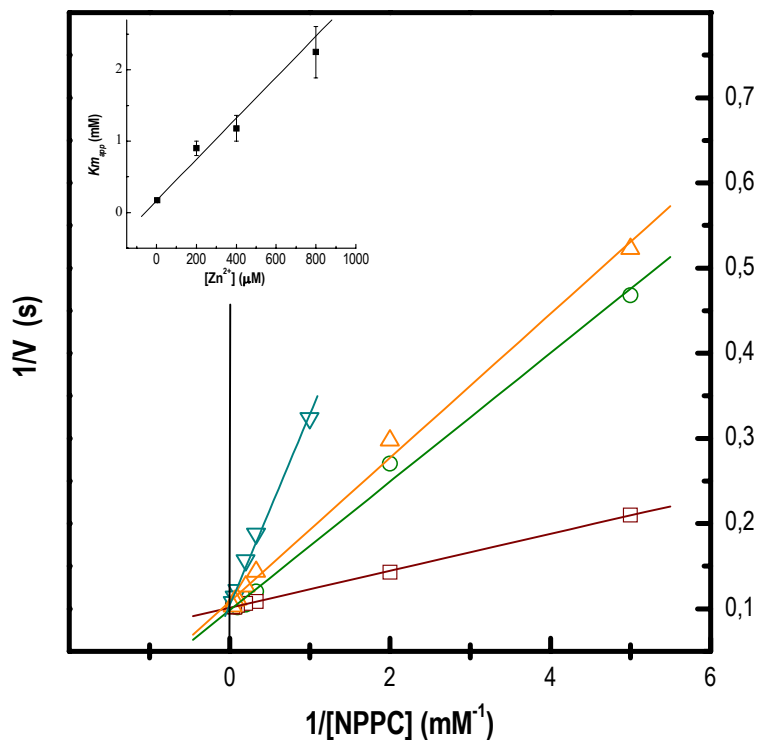


Figura 4.4. Representación de Lineweaver-Burk de los datos experimentales representados en la Fig. 4.3. El inserto muestra la dependencia de la $K_{m,ap}$ con la concentración de Zn^{2+} . Las líneas muestran el ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales a una recta (Zn^{2+} : 3 μM (\square), 200 μM (\circ), 400 μM (\triangle) y 800 μM (∇)).

Los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste simultáneo de la ecuación 4 (inhibición competitiva; sección 3.2.4.1) a las curvas de actividad medidas a pH 7,22 ($K_i = 54 \pm 2 \mu M$, $K_m = 160 \pm 40 \mu M$ y $k_{cat} = 9,9 \pm 0,3 s^{-1}$) concuerdan con los calculados a partir de la representaciones primaria y secundaria de Lineweaver-Burk ($K_i = 54 \pm 2 \mu M$, $K_m = 180 \pm 40 \mu M$ y $k_{cat} = 10,1 \pm 0,3 s^{-1}$). Resultados similares se obtuvieron a todos los pHs ensayados dentro del intervalo de medida (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Influencia del pH en la inhibición de la hidrólisis de NPPC por Pce.

pH	[Zn ²⁺] (μ M)	$K_{m,ap}$ (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{cat}/K_{m,ap}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)
6,50	3	0,40 ± 0,07	6,6 ± 0,2	16 ± 2
	100	0,6 ± 0,1	6,6 ± 0,2	10 ± 2
	400	1,2 ± 0,3	6,5 ± 0,3	5,5 ± 0,9
	800	1,8 ± 0,2	6,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3
6,65	3	0,30 ± 0,07	7,6 ± 0,3	25 ± 5
	200	0,68 ± 0,06	7,9 ± 0,1	11,6 ± 0,8
	500	1,20 ± 0,09	7,9 ± 0,1	6,6 ± 0,4
	800	1,6 ± 0,1	8,0 ± 0,1	5,1 ± 0,2
6,75	3	0,17 ± 0,04	7,9 ± 0,3	46 ± 5
	100	0,52 ± 0,06	7,9 ± 0,2	15 ± 1
	400	1,1 ± 0,1	7,9 ± 0,2	8,1 ± 0,7
	800	1,8 ± 0,2	8,0 ± 0,2	4,5 ± 0,3
6,85	3	0,16 ± 0,02	8,1 ± 0,2	50 ± 5
	200	1,0 ± 0,1	9,2 ± 0,2	9,5 ± 0,8
	400	1,3 ± 0,1	9,1 ± 0,2	7,0 ± 0,5
	600	2,2 ± 0,1	9,2 ± 0,2	4,2 ± 0,2
	800	1,8 ± 0,2	8,3 ± 0,2	4,7 ± 0,3
7,00	3	0,16 ± 0,02	9,9 ± 0,2	60 ± 10
	250	1,0 ± 0,1	9,8 ± 0,2	10,1 ± 0,9
	400	1,5 ± 0,2	9,5 ± 0,3	6,1 ± 0,6
	800	2,7 ± 0,2	9,1 ± 0,2	3,4 ± 0,2
7,35	3	0,19 ± 0,02	10,2 ± 0,2	50 ± 20
	200	0,47 ± 0,06	10,6 ± 0,3	23 ± 2
	400	1,0 ± 0,1	10,2 ± 0,2	10,5 ± 0,8
	800	2,2 ± 0,2	10,5 ± 0,3	4,9 ± 0,3
7,43	3	0,19 ± 0,04	11,1 ± 0,4	59 ± 8
	200	0,8 ± 0,1	12,5 ± 0,4	16 ± 2
	400	1,0 ± 0,2	11,9 ± 0,4	11 ± 1
	800	2,08 ± 0,09	12,0 ± 0,1	5,8 ± 0,2

Los parámetros cinéticos ($K_{m,ap}$, k_{cat} y $k_{cat} / K_{m,ap}$) obtenidos a cada uno de los pHs estudiados, asumiendo un modelo de inhibición competitiva, se recogen en la Tabla 4.3, observándose que la inhibición es máxima en torno a pH 7,0 ($K_i = 46 \pm 2\mu\text{M}$), Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Dependencia con el pH de la inhibición de la actividad catalítica de Pce por Zn^{2+} ($T = 25^\circ\text{C}$, $I = 0,05$)

pH	K_i (mM)
6,5	$0,25 \pm 0,03$
6,65	$0,206 \pm 0,007$
6,75	$0,122 \pm 0,007$
6,85	$0,056 \pm 0,004$
7,00	$0,0460 \pm 2\text{E-}4$
7,22	$0,0540 \pm 2\text{E-}4$
7,35	$0,080 \pm 0,003$
7,43	$0,100 \pm 0,003$

Tras caracterizar la inhibición de la actividad enzimática de Pce a altas concentraciones de cinc en tampón HEPES, se procedió a comprobar si este efecto inhibitorio era dependiente de la naturaleza de las especies químicas utilizadas como reguladoras del pH, usando como tampón BIS-TRIS propano. A diferencia del HEPES, que en el intervalo de pH 6,5-7,5 está constituido por especies 'zwitteriónicas' y aniónicas, el BIS-TRIS propano es un regulador de pH de tipo catiónico.

Como se muestra en la Figura 4.5, la actividad de Pce en BIS-TRIS propano no es inhibida a altas concentraciones de cinc. Este hecho indica que la inhibición observada en presencia de cinc está mediada por otros componentes del medio de reacción, cuya composición química y/o carga son determinantes para que se produzca este efecto. La unión

de diferentes especies químicas procedentes de la solución tamponante al sitio activo ha sido descrita previamente en otras enzimas de la familia de las metalo- β -lactamasas, como en la β -lactamasa de *Bacteroides fragilis* (Fitzgerald *et al.*, 1998) y la glioxalasa II humana (Cameron *et al.*, 1999).

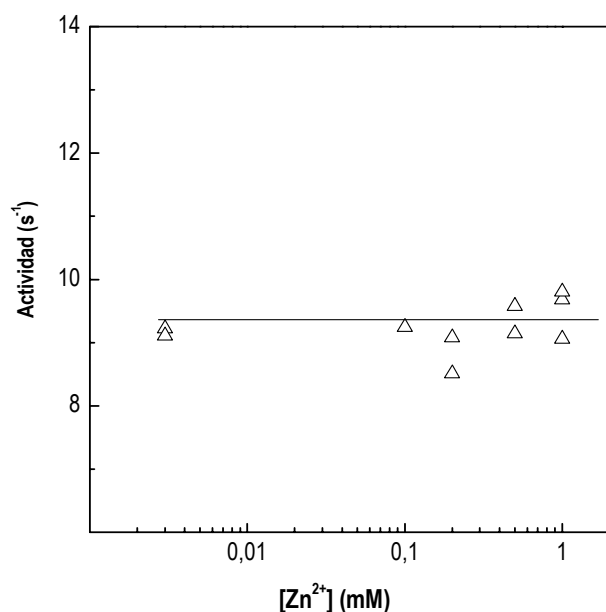


Figura 4.5. Actividad de Pce a concentraciones crecientes de Zn²⁺ en BIS-TRIS propano. Las medidas se realizaron en BIS-TRIS propano 20 mM (pH=7,0) a 25 °C y $I = 0,05$. Las concentraciones utilizadas de Pce y NPPC fueron de 0,1 μ M y 3 mM respectivamente.

4.1.3. RECONSTITUCIÓN DE LA APOENZIMA CON Fe²⁺ y Fe³⁺

Como se ha descrito en la sección 4.1.1 de Resultados, la diálisis prolongada frente a EDTA permite obtener la apoenzima. Debido a la existencia de centros cocatalíticos Zn²⁺/Fe²⁺, Fe²⁺/Fe²⁺, Fe²⁺/Fe³⁺, e incluso Mn²⁺/Mn²⁺ en dos de las metalo-hidrolasas pertenecientes a la familia de las β -lactamasas (Schilling *et al.*, 2003) y en otras metalo-fosfoesterasas (Guddat *et al.*, 1999; Griffith *et al.*, 1995) se procedió a estudiar la posible incorporación de Fe²⁺ o Fe³⁺ al sitio activo de la apoenzima, ya que se había detectado la presencia de trazas en algunas muestras de Pce. Las medidas de reconstitución a partir de la apoenzima se llevaron a cabo a pH 6,0 siguiendo el procedimiento descrito en la sección experimental (apartado 3.1.3) y realizando un control paralelo sin EDTA en el medio de diálisis. Los resultados mostraron que la enzima reconstituida con Fe²⁺ tiene una actividad tres veces superior a la del control y a la reconstituida con Zn²⁺ (Tabla 4.5). Sin embargo, el bajo nivel de actividad de la enzima

reconstituida con Fe^{3+} ($\cong 5\%$) indica que el estado de oxidación del metal es importante para la actividad de Pce. La actividad de la enzima reconstituida con Zn^{2+} o Fe^{2+} muestra que el centro activo es capaz de aceptar diversos metales para generar formas funcionales de Pce, por lo que la naturaleza del centro activo podría venir determinada por su afinidad hacia cada metal y la disponibilidad de cada uno de ellos '*in vivo*'.

Tabla 4.5. Actividad relativa de muestras de Pce reconstituidas con Zn^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} .

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (%)			
Zn^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Control
100	302	5%	100

El control representa la actividad de una muestra de Pce procesada en paralelo sin incluir EDTA en el medio. Las medidas de actividad se realizaron en 20 mM BIS-TRIS propano pH 6,0, utilizando NPPC 10 mM.

4.1.4. DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DE Pce CON EL pH

Con objeto de caracterizar la naturaleza de los residuos ionizables de la proteína implicados en la reacción de hidrólisis se estudió la dependencia de los parámetros cinéticos con el pH. En primer lugar, se analizó la estabilidad de la enzima en las condiciones de ensayo a lo largo de todo el intervalo medida, verificando la recuperación total de actividad cuando las muestras expuestas a los pHs más extremos se llevaban de nuevo a pH 8,0.

Para descartar la posibilidad de que las variaciones observadas en las curvas de actividad se correspondiesen con cambios en la estequiometría de unión del cinc o del calcio se realizaron medidas del contenido de ambos metales en el intervalo de pH a estudiar, no observándose variaciones significativas con respecto a los valores obtenidos a pH 7,0 (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Influencia del pH en la fracción de metales unidos a Pce.

Tampón ^a	Estequiometría catión/Pce	
	Zn ²⁺	Ca ²⁺
Bis-Tris, pH 5,5	2,2 ± 0,1	2,40 ± 0,01
HEPES, pH 7,0	2,02 ± 0,01	2,05 ± 0,02
BIS-TRIS propano, pH 8,0	2,30 ± 0,01	n.d.
BIS-TRIS propano, pH 9,0	2,00 ± 0,01	2,50 ± 0,01

^aTodos los tampones contenían Zn²⁺ 3 μM.

La dependencia de la actividad de Pce con el pH en el intervalo comprendido entre 5,5 y 10 se estudió a partir de las curvas de actividad (velocidad iniciales) siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (sección 3.2.4). Las constantes cinéticas (k_{cat} y K_m) se calcularon a partir del ajuste de las curvas experimentales en términos de la ecuación de Michaelis-Menten. En las Figuras 4.6-4.8 se muestra la variación de k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m con el pH. El hecho de que el sustrato utilizado (NPPC) no tenga grupos ionizables en el intervalo estudiado permite asignar a Pce los grupos responsables de las variaciones observadas en la actividad enzimática.

La representación del $\log k_{cat}$ frente al pH (Fig. 4.6) muestra un incremento de la actividad al aumentar la basicidad del medio, observándose una ligera inflexión en torno a pH 7,5 y un 'plateau' a pHs superiores a 9,0. La pendiente del logaritmo de k_{cat} con el pH tiene un valor límite de 0,25. Esta clara desviación de un valor cercano a la unidad sugiere un sistema de equilibrios de ionización complejo y la existencia de más de una especie enzimática catalíticamente activa. El perfil del $\log K_m$ (Fig. 4.7) muestra un mínimo en torno a pH 7,4 y el aumento observado a pH básico podría indicar una disminución en la afinidad de la enzima hacia el sustrato.

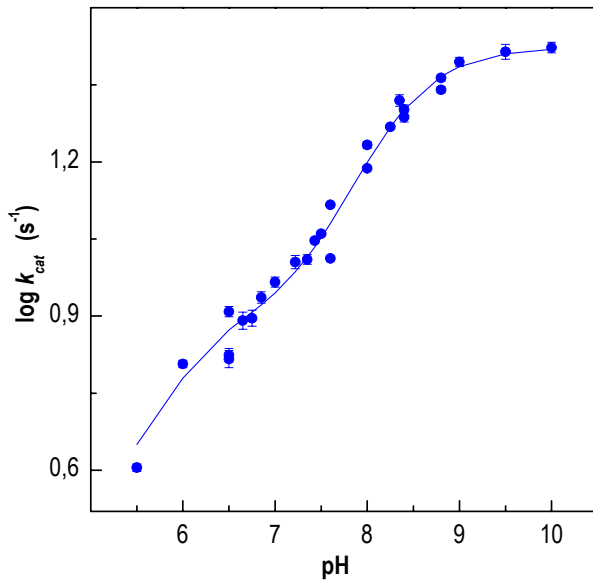


Figura 4.6. Representación logarítmica de k_{cat} (s^{-1}) en función del pH. La línea continua muestra el mejor ajuste de los datos experimentales en términos de la ecuación [14].

Figura 4.7. Representación logarítmica de K_m (mM) en función del pH. La línea continua muestra el mejor ajuste de los datos experimentales en términos de la ecuación [15].

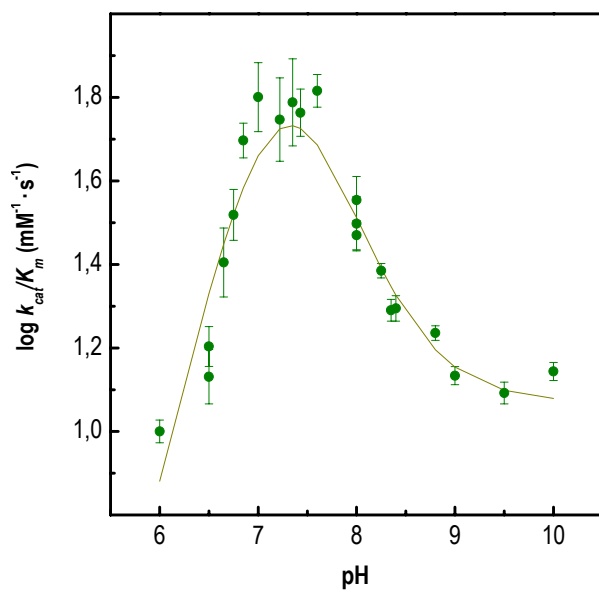
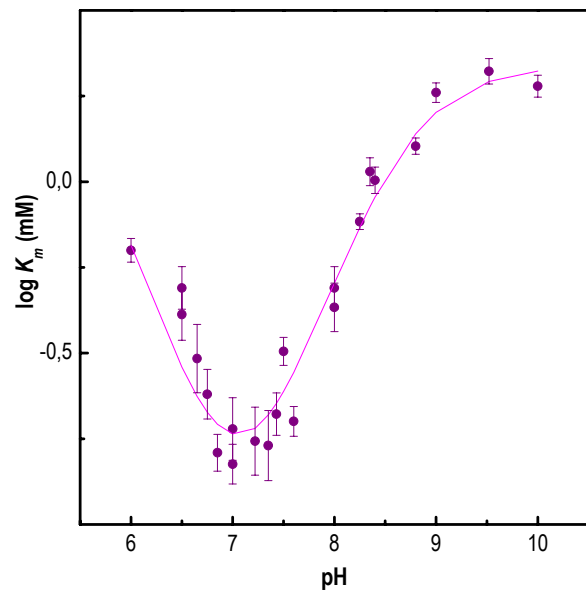


Figura 4.8. Representación logarítmica de k_{cat}/K_m frente al pH. La línea continua muestra el mejor ajuste de los datos experimentales en términos de la ecuación [16].

La representación del $\log k_{cat} / K_m$ en función del pH (Fig. 4.8) muestra un perfil de campana con un máximo centrado en torno a pH 7,4, y su caída a pH básico refleja el incremento que se produce en la K_m . Los valores de $0,8 \pm 0,1$ (limbo ácido) y $-0,5 \pm 0,1$ (limbo básico) obtenidos para las pendientes de la variación del $\log k_{cat} / K_m$ con el pH indican que la actividad enzimática de Pce dependería, al menos, del estado de ionización de dos grupos. La caída en la actividad observada por debajo de pH 6,0 sugiere que la primera desprotonación es esencial para la actividad de Pce, mientras que la segunda disminuye la eficacia catalítica, posiblemente debido a una menor afinidad hacia el sustrato.

El sistema más sencillo capaz de explicar la dependencia con el pH de los parámetros cinéticos obtenidos para la hidrólisis de NPPC (Fig. 4.9) requiere, por tanto, la existencia de tres estados de protonación distintos en el intervalo de pH estudiado, todos ellos capaces de unir sustrato, aunque sólo las formas monoprotonada ($k_{cat}^{SEH} = k_l$) y deprotonada ($k_{cat}^{SE} = k_h$) serían capaces de hidrolizarlo:

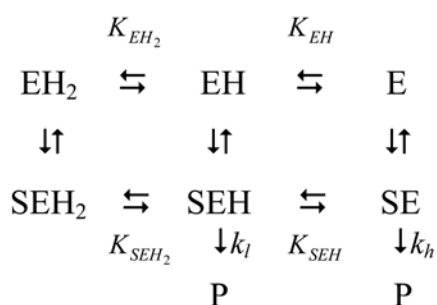


Figura 4.9. Esquema de reacción propuesto para la hidrólisis de NPPC por Pce.

De acuerdo con el esquema propuesto EH_2 , EH y E son las formas bi-protonada, mono-protonada, y deprotonada de la enzima libre; SEH_2 , SEH y SE corresponden a los complejos formados por cada una de ellas con el sustrato y P es el producto de la reacción. K_{EH_2} y K_{EH} son las constantes de disociación de las formas bi- y mono-protonadas de la enzima libre, y K_{SEH_2} y K_{SEH} las correspondientes a los complejos enzima-sustrato.

Las ecuaciones [14]-[16] describen la dependencia con el pH de los parámetros cinéticos para el modelo propuesto en la Figura 4.9 (Tripton y Dixon, 1979):

$$\log k_{cat} = \log \frac{k_h + k_l \cdot 10^{pK_{SEH} - pH}}{10^{pK_{SEH_2} + pK_{SEH} - 2pH} + 1 + 10^{pK_{SEH} - pH}} \quad [14]$$

$$\log K_m = \log K_{m,lim} + \log \frac{10^{pK_{EH_2} + pK_{EH} - 2pH} + 1 + 10^{pK_{EH} - pH}}{10^{pK_{SEH_2} + pK_{SEH} - 2pH} + 1 + 10^{pK_{SEH} - pH}} \quad [15]$$

$$\log(k_{cat} / K_m) = \log \frac{k_h + k_l 10^{pK_{SEH} - pH}}{10^{pK_{EH_2} + pK_{EH} - 2pH} + 1 + 10^{pK_{EH} - pH}} - \log K_{m,lim} \quad [16]$$

donde $K_{m,lim}$ es el valor límite al que tiende la constante de Michaelis-Menten a pH básico.

Como puede verse en la ecuación [14], la k_{cat} depende de las constantes de disociación del complejo enzima-sustrato, mientras que la eficacia catalítica (Ec. 16) y la K_m (Ec. 15) están influenciadas tanto por las ionizaciones de la enzima libre, como por las del complejo enzima-sustrato.

Los parámetros catalíticos y las constantes de ionización obtenidos del análisis de los datos experimentales representados en las Figuras 4.6-4.8 en términos de las Ecuaciones [14]-[16] se encuentran recogidos en la Tabla 4.7. Con objeto de minimizar el número de variables a ajustar, se utilizaron los valores de k_l , k_h y $K_{m,lim}$ obtenidos del análisis de la representación logarítmica de k_{cat} y K_m frente al pH para ajustar la dependencia con el mismo de $\log k_{cat}/K_m$.

Tabla 4.7. Parámetros cinéticos y constantes de ionización relevantes para la actividad enzimática de Pce utilizando como sustrato NPPC^a

PARÁMETROS	
k_l (s ⁻¹)	7,8 ± 0,5 ^b
k_h (s ⁻¹)	26,5 ± 0,5 ^b
$K_{m,lim}$ (mM)	2,2 ± 0,2 ^c
pK_{EH_2}	7,3 ± 0,3 ^d
	7,1 ± 0,6 ^c
pK_{EH}	7,3 ± 0,3 ^d
	7,1 ± 0,4 ^c
pK_{SEH_2}	5,5 ± 0,3 ^b
	5 ± 1 ^c
pK_{SEH}	8,12 ± 0,05 ^b
	8,9 ± 0,1 ^d
	8,6 ± 0,1 ^c

^aDatos obtenidos del ajuste de: ^b k_{cat} , ^c K_m , y ^d k_{cat}/K_m .

En el rango de pH en el que $[H^+]/K_{SEH_2} \ll 1$, se pueden obtener, modificando la ecuación [14], representaciones lineales secundarias de la variación de k_{cat} con la concentración de protones mediante las cuales es posible calcular el valor de K_{EHS} y la relación $\alpha = k_h / k_l$, utilizando como valor inicial de k_h , el máximo experimental de la constante catalítica (26,5 s⁻¹):

$$\left[\left(\frac{1}{k_{cat}} \right) - \left(\frac{1}{k_h} \right) \right]^{-1} = k_h \frac{\alpha}{(\alpha-1)} + \frac{k_h}{(\alpha-1)} \frac{K_{SEH}}{[H^+]} \quad [17]$$

A partir del ajuste de los valores de k_{cat} comprendidos en el intervalo de pH 7-8,5 a la ecuación [17] se obtuvieron valores de $\alpha = 3,49$ ($k_f = 7,4 \text{ s}^{-1}$) y de $pK_{SEH} = 8,1$, en concordancia con los calculados a partir del ajuste por mínimos cuadrados no lineales de todo el conjunto de datos experimentales (Tabla 4.7).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la primera desprotonación daría lugar a la formación de una forma monoprotonada y activa ($k_f = 7,8 \text{ s}^{-1}$) de la enzima con mayor afinidad hacia el sustrato, mientras que el segundo proceso de desprotonación, a pesar de aumentar 3,4 veces la constante de hidrólisis ($k_h = 26,5 \text{ s}^{-1}$) aumenta significativamente la constante de Michaelis-Menten ($K_{m,lim} = 2,2 \text{ mM}$). Por otra parte, las constantes aparentes de ionización de los residuos implicados en los grupos importantes para la actividad son muy parecidos en la enzima libre ($pK_{EH2} \cong pK_{EH} \cong 7,2$), pero claramente diferentes para el complejo enzima-sustrato ($pK_{SEH2} \cong 5,3$; $pK_{SEH} \cong 8,5$). Los desplazamientos observados cuando se comparan los valores de pK_a obtenidos para la enzima libre y los complejos enzima-sustrato sugieren que la unión de NPPC favorece la liberación del primer protón y dificulta la del segundo, estabilizando la especie monoprotonada, SEH, a pH neutro.

4.1.5. INFLUENCIA DEL SEGUNDO CATION Zn^{2+} SOBRE LA ACTIVIDAD

De acuerdo con los alineamientos de secuencia de la Figura 1.11 la histidina 90 (H90), altamente conservada dentro de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, podría ser uno de los ligandos del segundo átomo de cinc, como se confirmó posteriormente al determinar la estructura tridimensional de la enzima (sección 4.4 de Resultados). Para estudiar el efecto de la perturbación de la coordinación del segundo ión Zn^{2+} en la actividad enzimática, se procedió a sustituir la histidina 90 por alanina (H90A), analizando la influencia de esta mutación en la actividad y en la estequiometría del cinc unido al centro activo.

El contenido en metales del mutante H90A se midió a distintos pHs utilizando el mismo procedimiento que en la enzima silvestre. Los resultados se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Variación con el pH de la fracción de cationes unidos a Pce-H90A^a

Tampón	Relación catión/Pce-H90A	
	Zn ²⁺	Ca ²⁺
Bis-Tris (pH 5,5)	1,20 ± 0,02	3,10 ± 0,01
HEPES (pH 7,0)	2,40 ± 0,04	1,90 ± 0,01
BIS-TRIS propano (pH 9,0)	2,10 ± 0,02	1,90 ± 0,03

^a Medidas realizadas en presencia de Zn²⁺ 3 μM en el medio.

A pH neutro y básico el contenido en cinc del mutante no se ve afectado, indicando que la mutación en la H90A no altera la capacidad de unión de Pce al metal en este rango de pH. El hecho de que disminuya a pHs ácidos hasta un equivalente por molécula de Pce, refleja la caída en la afinidad hacia el metal provocada por la sustitución de la histidina por alanina, ya que la presencia de una concentración libre de Zn²⁺ 3 μM no es suficiente para mantener los dos sitios ocupados. En el caso del calcio, la estequiometría de unión es similar a la de la enzima silvestre, aunque se observa un aumento a pH 5,5.

La dependencia de la actividad del mutante H90A con el pH se estudió en las condiciones empleadas para Pce silvestre. Los parámetros cinéticos obtenidos se detallan en la Tabla 4.9. Los resultados muestran como la k_{cat} y la eficacia catalítica del mutante disminuyen hasta alcanzar valores del 12% y del 1%, respectivamente, comparadas con las de Pce silvestre.

La dependencia del $\log k_{cat}$ con el pH es similar a la de Pce silvestre (datos no mostrados) aunque los valores de k_{cat} obtenidos, como ya se ha indicado, son un orden de magnitud menor. A partir del análisis de los mismos en función de la Ecuación [14] se obtuvieron unos valores de pK_a de 5,7 y 8,03, muy parecidos a los de Pce silvestre para la forma unida al sustrato.

Tabla 4.9. Constantes y parámetros cinéticos del mutante H90A en función del pH

pH	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
6,0	1,1 ± 0,1	0,43 ± 0,02	0,38 ± 0,20
7,0	1,7 ± 0,4	1,13 ± 0,07	0,7 ± 0,1
7,6	2,6 ± 0,3	1,47 ± 0,04	0,56 ± 0,05
8,0	1,0 ± 0,1	2,84 ± 0,07	2,8 ± 0,2
8,25	0,75 ± 0,06	2,95 ± 0,06	3,9 ± 0,2
9,0	1,8 ± 0,3	4,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3
10,0	3,9 ± 0,8	4,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1

Las medidas se realizaron en medios suplementados con Zn²⁺ 3 μM, a 25 °C y $I = 0,05$.

En cuanto a la variación del $\log K_m$ con el pH, se observa un ligero desplazamiento de la curva hacia pHs básicos, por lo que la eficacia catalítica es máxima en torno a pH 8,25. Estos resultados, unidos al hecho de que el contenido en cinc sólo disminuya a pHs ácidos, indican que la actividad es altamente dependiente de la geometría de coordinación del centro bimetalico. La caída en la afinidad hacia el metal, puesta de manifiesto a pH ácido, es consecuencia de la pérdida de la histidina 90 como donador del Zn₂ y de los posibles cambios derivados de esta sustitución en la disposición de los residuos que contribuyen a mantener la geometría del centro binuclear.

4.2. ESTABILIDAD TÉRMICA Y RECONOCIMIENTO DE COLINA

Mediante técnicas de baja resolución se procedió a caracterizar la estructura terciaria y cuaternaria de Pce, así como los cambios estructurales inducidos por la unión de colina.

4.2.1. ESTABILIDAD TÉRMICA

La estabilidad de Pce y el papel estructural desempeñado por los átomos de cinc unidos al centro activo se estudiaron comparando, por un parte, las estabilidades térmicas de la holoenzima y la apoenzima y, por otra, analizando la desestabilización inducida por la perturbación de la esfera de coordinación del cinc en el mutante H90A. El análisis, realizado fundamentalmente mediante DSC, se completó estudiando la dependencia de la actividad enzimática sobre NPPC con la temperatura y la estabilización inducida por la unión de colina.

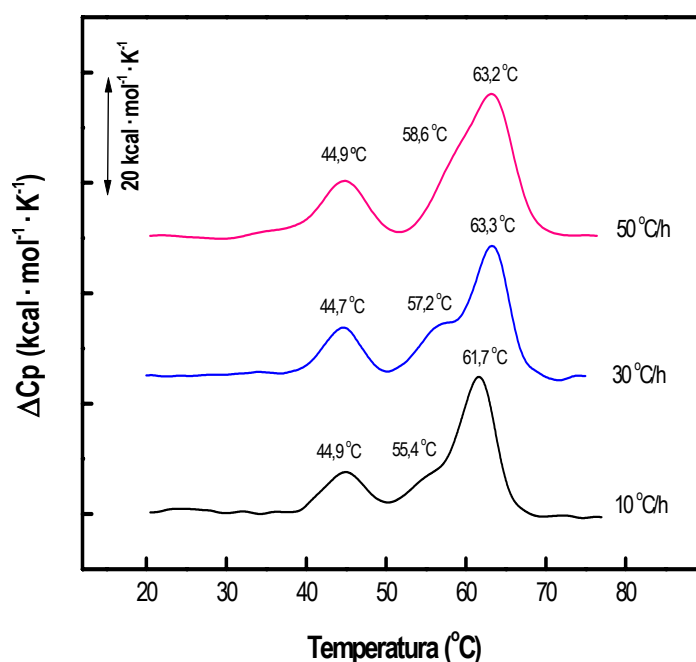


Figura 4.10. Efecto de la velocidad de barrido en el perfil del termograma de Pce. Las medidas se realizaron en tampón HEPES 20 mM (pH 7,0 y Zn^{2+} 3 μ M) y las velocidades de barrido fueron: 10 °C/h (negro), 30 °C/h (azul), y 50 °C/h (rosa). La concentración de Pce fue de 1mg · ml⁻¹.

La desnaturalización térmica de Pce resultó ser un proceso irreversible por lo que se realizaron experimentos de DSC utilizando diferentes velocidades de calentamiento. Como puede verse en la Figura 4.10 la desnaturalización térmica de la enzima silvestre en presencia de Zn^{2+} 3 μ M (HEPES 20 mM, pH 7,0) presenta tres transiciones, de las que sólo la segunda de ellas parece ser significativamente sensible a la velocidad de barrido utilizada. Así, aparece como un hombro de la última transición en la curva obtenida a 50 °C/h, mientras que en los termogramas registrados a 30 °C/h y 10 °C/h es claramente visible a menor temperatura. Las diferencias observadas en la T_m de la última transición cuando se comparan los barridos obtenidos a 50 °C/h ó 30 °C/h ($T_m \cong 63,25$ °C) con el de 10 °C/h ($T_m \cong 61,7$ °C) indican, posiblemente, una mayor contribución de la etapa irreversible asociada a esta última transición cuando se utilizan velocidades de barrido muy lentas.

La eliminación de los iones cinc del centro bimetalico produce una drástica reducción en la estabilidad de la proteína que parece afectar a ambos módulos, ya que la curva de desnaturalización de la apoenzima, preparada por diálisis frente a EDTA (sección 3.1.3 de Materiales y Métodos), muestra dos únicos picos centrados en torno a 30,7 °C y 36,2 °C (Figura 4.11). En el caso del mutante, la sustitución de la histidina 90 por alanina disminuye la T_m de las dos últimas transiciones que aparecen a mayor temperatura, observándose un único pico centrado a 49,9 °C además del primer pico cuya T_m permanece prácticamente invariante. Las diferencias existentes en los perfiles de desnaturalización representados en la Figura 4.11 sugieren que la primera transición de la enzima silvestre y del mutante H90A correspondería a la desnaturalización del CBM, dada la escasa influencia de la unión del cinc en la estabilidad de la región de Pce responsable de la misma. Por otro lado, los dos procesos que tienen lugar a mayor temperatura en la forma silvestre podrían corresponder al módulo catalítico y a alguna región del CBM cuya estabilidad fuera fuertemente dependiente de la estructura de éste. Las claras diferencias observadas entre la estabilidad del mutante y la apoenzima son consistentes con el hecho de que el primero sea todavía capaz de unir dos cationes cinc a pH neutro y básico, poniendo así de manifiesto el papel esencial que desempeña este catión en la estabilización estructural de Pce, ya que su disociación parece desestabilizar toda la estructura de la enzima.

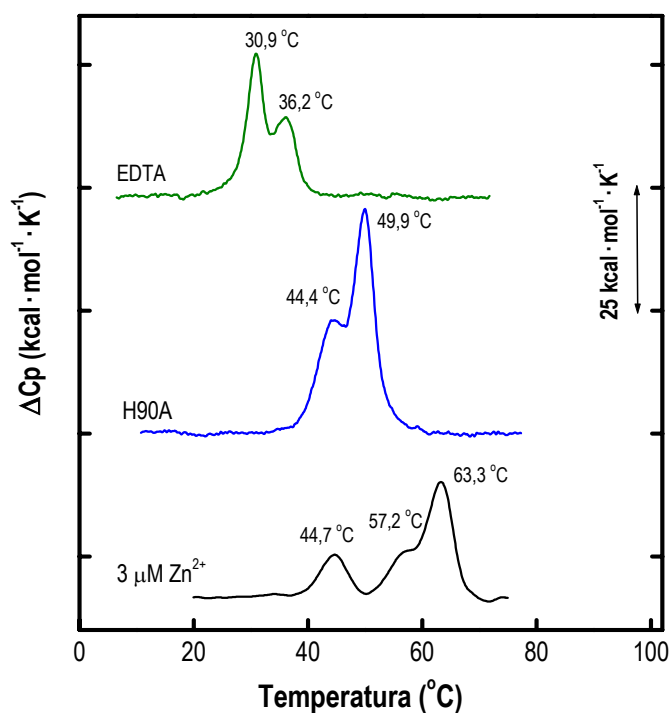


Figura 4.11. Influencia del cinc en la estabilidad de Pce. Comparación de los perfiles de desnaturalización térmica de la apoenzima (EDTA), el mutante H90A (Zn^{2+} 3 μ M) y la proteína silvestre (Zn^{2+} 3 μ M).

Para intentar corroborar la asignación de la desnaturalización del módulo catalítico a la transición de la holoenzima centrada en torno a 63 °C, se estudió la dependencia con la temperatura de la actividad de Pce frente a NPPC, ya que su hidrólisis es independiente del reconocimiento de colina por el CBM (de las Rivas, 2002). En la Figura 4.12 se muestra la velocidad de reacción en función de la temperatura (sección 3.2.4 Materiales y Métodos). Como puede observarse la caída de actividad se inicia en torno a 60 °C, lo que permite asignar de forma inequívoca la última transición de la holoenzima a la desnaturalización del módulo catalítico.

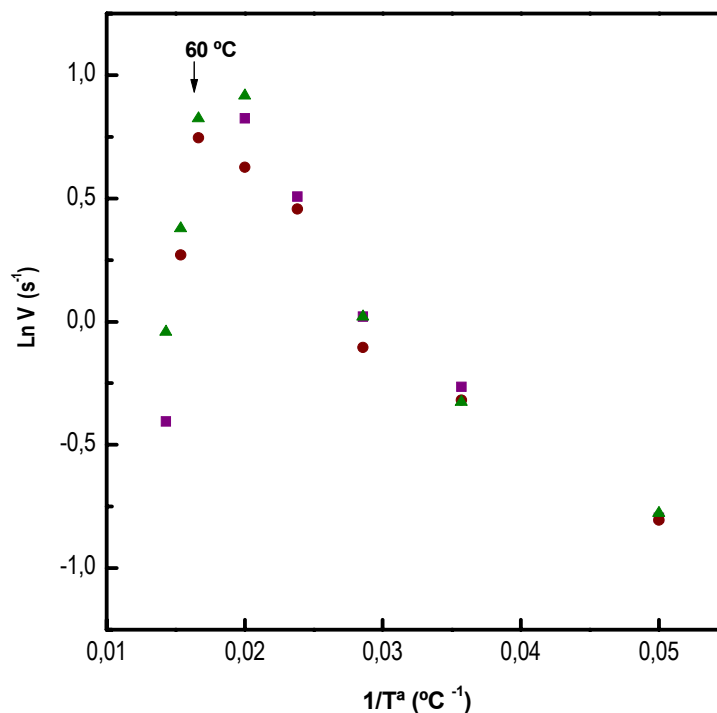


Figura 4.12. Dependencia de la actividad de Pce con la temperatura. Representación de la velocidad hidrólisis de NPPC en función de la inversa de la temperatura. Las medidas se realizaron en tampón HEPES (pH 7,0) utilizando una concentración de NPPC 10 mM y de Zn^{2+} 3 μ M. Los diferentes símbolos muestran los resultados de tres experimentos independientes.

La implicación del CBM en las otras dos transiciones observadas en la holoenzima se analizó estudiando la desnaturalización de Pce en presencia de Zn^{2+} 3 μ M y a concentraciones crecientes de colina. Como puede verse en la Figura 4.13, la unión de colina desplaza la primera transición hacia temperaturas más altas, como cabe esperar de la estabilización inducida por la unión del ligando al CBM, solapando con la segunda transición a 41,3 mM colina. Aunque la magnitud del efecto es menor y las variaciones observadas se producen a mayor concentración de colina, la adición del aminoalcohol produce también un incremento en la T_m de las dos últimas transiciones (Figura 4.13), lo que podría reflejar la unión de colina al sitio activo (de las Rivas, 2002) o a otros sitios del CBM con menor afinidad hacia el ligando. Aunque la irreversibilidad de la desnaturalización de Pce limita el análisis de las distintas transiciones visibles en el termograma (particularmente en el caso de la segunda) se ha realizado una deconvolución aproximada de las mismas a partir de la envolvente, con objeto de facilitar su

visualización y evolución con la concentración de colina. La unión del ligando y el incremento en la T_m de los distintos dominios cooperativos presentes en Pce dan lugar a un incremento en la entalpía de desnaturalización desde valores de $276 \pm 8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ en ausencia de colina hasta $430 \pm 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ en presencia de 41,3 mM colina.

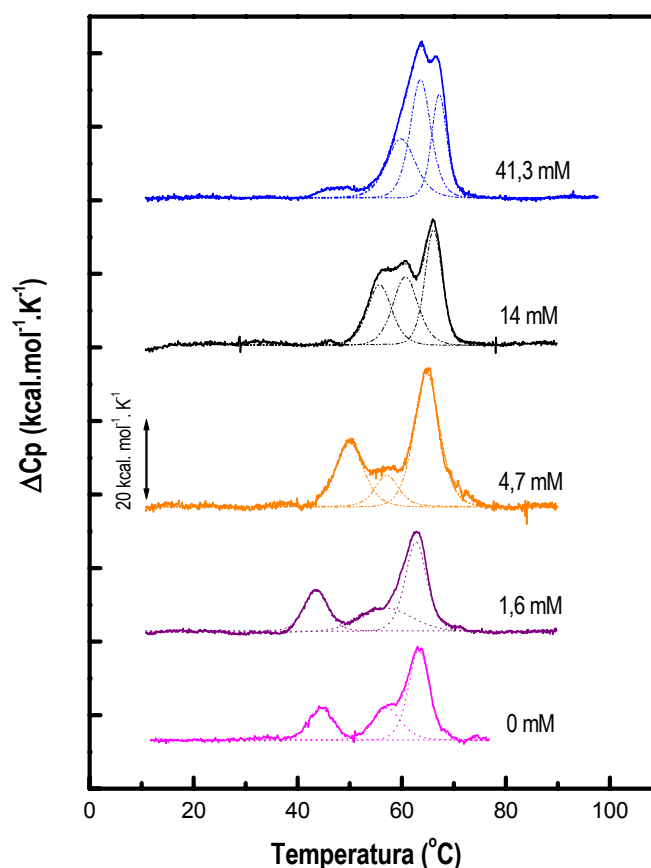


Figura 4.13. Desnaturalización térmica de Pce en presencia de concentraciones crecientes de colina. Las medidas se realizaron en HEPES 20 mM, Zn^{2+} 3 μM (pH 7,0), a las concentraciones de colina indicadas en la figura.

4.2.2. RECONOCIMIENTO DE COLINA

Debido a los fenómenos de asociación mediados por colina encontrados en las mureín-hidrolasas caracterizadas hasta el momento (Varea *et al.*, 2000; Sáiz *et al.*, 2002; Monterroso *et*

al., 2005) se procedió a estudiar el estado de asociación de Pce y su posible dependencia con la unión de este ligando mediante ultracentrifugación analítica.

Los estudios de equilibrio de sedimentación permitieron determinar el estado de asociación de la enzima, así como su masa molecular aparente. Los resultados indican que tanto en ausencia como en presencia de colina (Fig. 4.14) Pce sedimenta con una masa molecular promedio en peso aparente, M_w , correspondiente al monómero (69.053 Da; $M_w/M_0=0,98$) en todo el rango de concentración de proteína estudiado. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos anteriormente para Pce y su dominio N-terminal en ausencia de colina (de las Rivas, 2002).

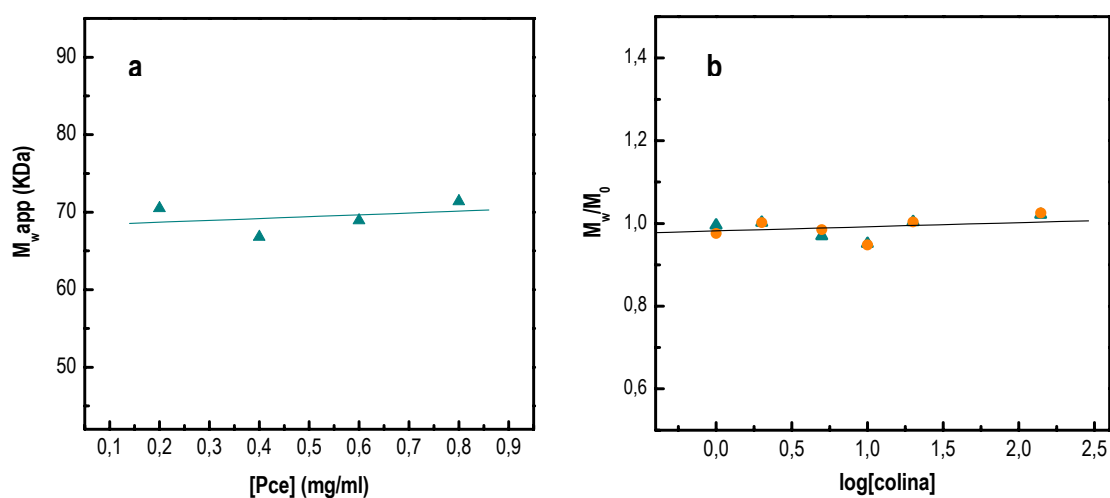


Figura 4.14. Variación de la masa molecular promedio en peso de Pce y dependencia con la concentración de colina. a. Dependencia de la concentración de Pce en ausencia de colina (triángulos verdes). **b.** Medidas realizadas en fosfato pH 7,0 (triángulos verdes) y pH 8,0 (círculos naranjas) con la concentración de colina (mM).

La unión de colina a Pce se caracterizó mediante calorimetría isoterma de valoración (ITC) a 25 °C. La figura 4.15 muestra una curva de unión obtenida a partir de la inyección de colina 113,5 mM (12 x 3 inyecciones de 3 μ l y 21 x 7 inyecciones de 73 μ l) sobre una muestra de Pce (2,3 mg \cdot ml⁻¹).

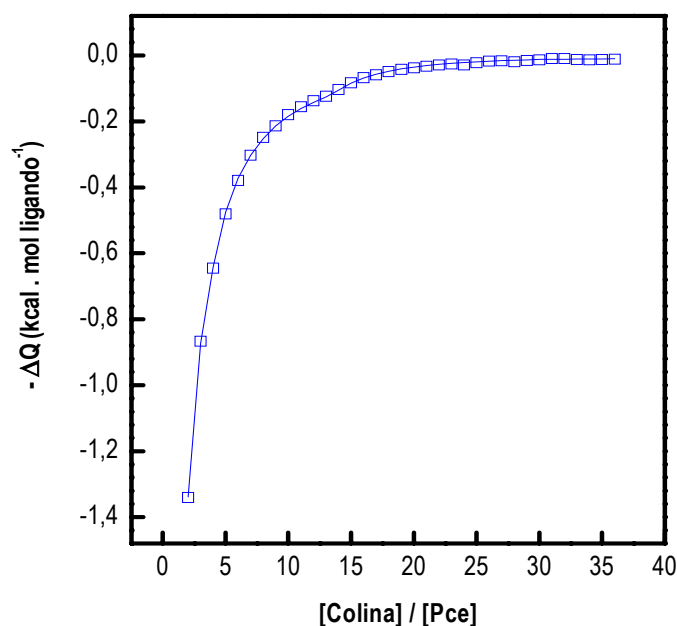


Figura 4.15. Curva calorimétrica de saturación de Pce por colina. El experimento se realizó en tampón TRIS-HCl 20 mM, ZnCl₂ 10 μM, pH 8,0 a 25 °C. La concentración final de colina alcanzada fue 13 mM. El trazo continuo indica el ajuste a los datos experimentales asumiendo un modelo de unión a dos tipos de sitios diferentes con $n_1 = 2$ y $n_2 = 8$.

Los datos experimentales se ajustan a un modelo de unión con dos clases diferentes de sitios de unión a colina. La unión a los sitios de mayor afinidad tendría lugar con una constante de disociación $K_1 = (3,5 \pm 0,4) 10^{-4} \text{ M}$ y una variación de entalpía $\Delta H_1 = 13,2 \pm 0,9 \text{ kcal/mol}$, mientras que los valores estimados para los sitios de menor afinidad $K_2 = (2,2 \pm 0,3) 10^{-3} \text{ M}$ y $\Delta H_2 = 4,2 \pm 0,4 \text{ kcal/mol}$. La constante correspondiente al primer tipo de sitios de unión se encuentra en el rango descrito para la disociación de colina a los sitios de mayor afinidad en otras CBPs como LytA y Pal (Medrano *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2004), mientras que la segunda es del orden de los valores estimados para Cpl-1 (Monterroso *et al.*, 2005). La determinación de la estructura (sección 4.4) es consistente con la existencia de más de un tipo de sitio de unión, siendo la estequiometría proporcionada por el mejor ajuste de los datos experimentales $n_1 = 2$ y $n_2 = 8$.

4.3. CRISTALIZACIÓN

4.3.1. OBTENCIÓN DE CRISTALES DE Pce

Como se ha indicado en Materiales y Métodos uno de los pasos determinantes en la resolución de la estructura tridimensional de una proteína es la obtención de muestras que sean homogéneas y puras, facilitando así el proceso de obtención del cristal.

4.3.1.1. Búsqueda de condiciones iniciales

Para la determinación de las condiciones iniciales de cristalización se utilizaron las soluciones comerciales '*Crystal Screen I*', '*Crystal Screen II*', '*Crystal Screen Lite*' e '*Index*' (Hampton Research, CA, USA), que permiten realizar un rastreo de condiciones mediante la combinación de aditivos (sales) y precipitantes (polímeros y disolventes orgánicos) en un amplio rango de pH (Jancarik y Kim, 1991). Además, se puede obtener información acerca de la solubilidad de la proteína, lo que es importante para el diseño de experimentos posteriores.

Como ya se indicó en el apartado 3.2.7.3 de Materiales y Métodos se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante a 293 K, mezclando 1 μl de Pce con 1 μl de solución de cristalización, equilibrando cada gota frente a 500 μl de dicha solución. Se utilizó como solución de partida una muestra de Pce ($8.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) dializada frente a TRIS/HCl 50 mM, ZnCl_2 3 μM (pH 8,0) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de colina (10-100 mM). Se intentó, también, cristalizar Pce en presencia de fosforilcolina (10-80 mM) agregando el ligando durante la diálisis o como aditivo.

Se obtuvieron diversos tipos de cristales pero eran extremadamente finos en algunos casos y pequeños en otros. Sin embargo, en presencia de colina y en la condición TRIS/HCl 0.1M, pH 8,5 y 25% de PEG 3350 de la solución '*Index Screen I*' crecieron unas placas de mayor tamaño y espesor (Fig. 4.16). Estos cristales se obtenían en 20 días, pero su reproducibilidad dependía enormemente de los lotes de proteína empleados y, a pesar de obtener datos de difracción hasta 3 Å de resolución, los problemas de maclaje impidieron determinar tanto el tipo de celdilla unidad como el grupo espacial y, por tanto, no se pudo llevar a cabo el procesado de los datos.

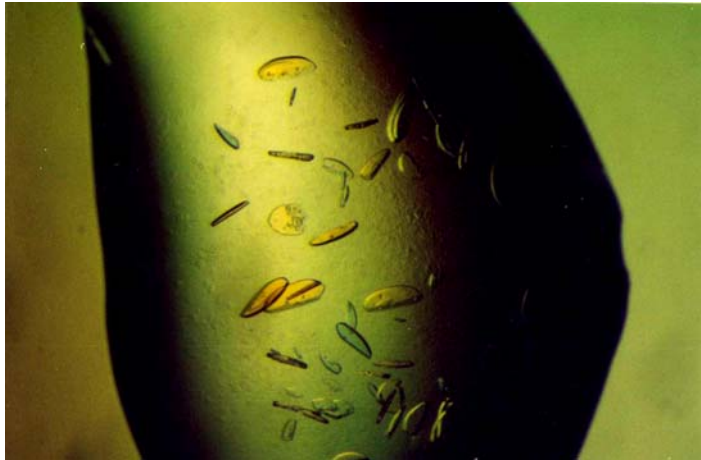


Figura 4.16. Placas de Pce obtenidas en presencia de colina 10 mM. El tamaño de la gota fue de 1 μ l de proteína y 1 μ l de solución madre.

4.3.1.2. Optimización del proceso de cristalización: Construcción de Pce Δ 55

Con objeto de investigar las posibles causas de los problemas observados en el crecimiento y reproducibilidad de los cristales, y mejorar así las condiciones de cristalización, se procedió a examinar las muestras de proteína utilizadas en la cristalización mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

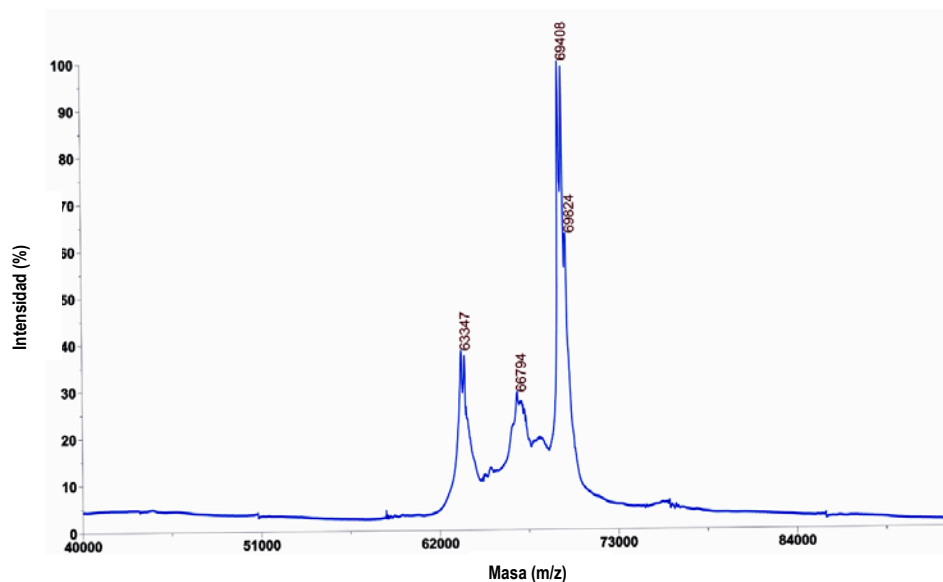


Figura 4.17. Espectro de masas MALDI-TOF de las muestras utilizadas en el proceso de cristalización. Tras 15 días a 293 K se puede observar la aparición de tres especies de proteína, con pesos moleculares de 69,4 kDa, 66,8 kDa y 63,3 kDa.

Los espectros realizados indicaban la aparición, dependiente del tiempo, de tres especies proteicas con pesos moleculares de 69,4 kDa, 66,8 kDa, 63,3 kDa (Fig. 4.17), no observándose especies de menor tamaño molecular incluso a tiempo largos de almacenaje. Estas especies eran claramente detectables a los 15 días de haber iniciado los experimentos de cristalización e indicaban que Pce se degradaba, por lo que el proceso de cristalización se veía dificultado. Para comprobar en qué zona de la proteína se producía la degradación se analizó la secuencia del extremo N-terminal de las distintas especies en el Departamento de Microbiología Molecular del C.I.B (CSIC), observándose que la hidrólisis tenía lugar por el extremo C-terminal. Para determinar si alguna de las especies formadas se incorporaba de forma preferencial a los cristales de proteína, se disolvieron varios cristales, previamente lavados en agua, en 20 μ l de tampón de carga. La muestra se analizó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y la detección de proteínas se realizó mediante tinción con plata, utilizando como control la solución de Pce utilizada para poner las gotas de cristalización. Como se puede observar en la Figura 4.18, las tres especies de Pce detectadas por espectrometría de masas en la solución utilizada para la cristalización son visibles en el gel, mientras que la muestra correspondiente al cristal sólo contiene la especie de menor masa molecular (63,3 kDa). Estos resultados demostraban que la única especie capaz de producir cristales carecía de los últimos 55 aminoácidos. El hecho de que los métodos de predicción de estructura secundaria (datos no mostrados) indiquen que esta región de la proteína está desestructurada podría explicar el problema de empaquetamiento de la proteína completa en el cristal.

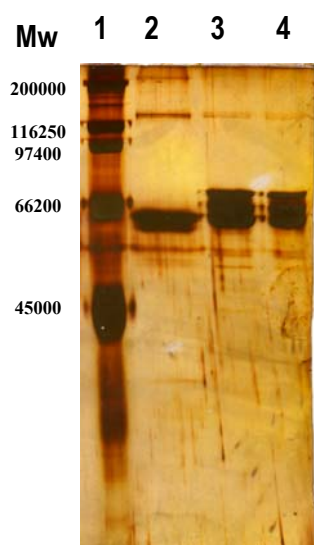


Figura 4.18. Electroforesis en SDS-PAGE de las muestras de Pce utilizadas en la cristalización y de la proteína cristalizada. El carril 1 corresponde a marcadores de alto peso molecular, el carril 2 a la muestra de proteína en el cristal. Los carriles 3 y 4, representan las muestras de Pce almacenadas después de 30 días de la realización de los experimentos en gota colgante.

En base a estos hechos se construyó un mutante de Pce en el que se delecionaron los últimos 55 aminoácidos (Pce $\Delta 55$; Fig. 4.19) con el objetivo de reproducir y mejorar los cristales obtenidos con la proteína completa (Pce silvestre). La construcción y expresión de Pce $\Delta 55$ se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Pedro García (CIB, CSIC) (Lagartera *et al.*, 2005a). Pce $\Delta 55$ fue purificada y dializada en las mismas condiciones que las descritas para Pce silvestre, llevándose hasta una concentración final de $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Pce $\Delta 55$ sin colina) y de $8.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Pce $\Delta 55$ en presencia de 10 mM colina). La actividad enzimática de Pce $\Delta 55$ frente a NPPC es similar a la de Pce silvestre (datos no mostrados).



Figura 4.19. Aminoácidos delecionados en Pce $\Delta 55$. Secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de Pce formada por 86 residuos. Los 55 marcados en amarillo se han delecionado en Pce $\Delta 55$.

4.3.2. OBTENCIÓN DE CRISTALES DE Pce $\Delta 55$

Tras la obtención de la proteína Pce $\Delta 55$ se procedió a realizar ensayos de cristalización en presencia y en ausencia de colina.

4.3.2.1. Cristalización de Pce $\Delta 55$ en presencia de colina 10 mM

Para la búsqueda de condiciones de cristalización de Pce $\Delta 55$ se ensayaron de nuevo todas las soluciones de cristalización comerciales anteriormente empleadas con Pce silvestre. En la caracterización de la dependencia con el pH se realizaron barridos finos de pH con variaciones de 0,1 unidades de pH entre pH 5,0 y pH 8,5, modificando además la concentración y el tipo de precipitante. El resultado fue la obtención de cristales en el intervalo de pH 6,5-6,8 y a pH 8,54, siendo las mejores condiciones a pH 6,5 y a pH 8,54. En ambos casos se empleó PEG 3350 como precipitante. En el resto del intervalo de pH estudiado no se observaron resultados positivos, confirmándose así la tendencia descrita en la cristalización de Pce silvestre. Mientras que a pH 6,5 los cristales eran pequeños y maclados (Fig. 4.20a) a pH 8,5 y

tras 8 días crecían placas de mayor tamaño (Fig. 4.20b). Sin embargo, en los dos casos, los cristales difractaron a baja resolución, a pesar de los intentos de optimizar las condiciones de cristalización utilizando distintos tampones para un mismo pH, la inclusión de diferentes sales, o variaciones en el tamaño de la gota.

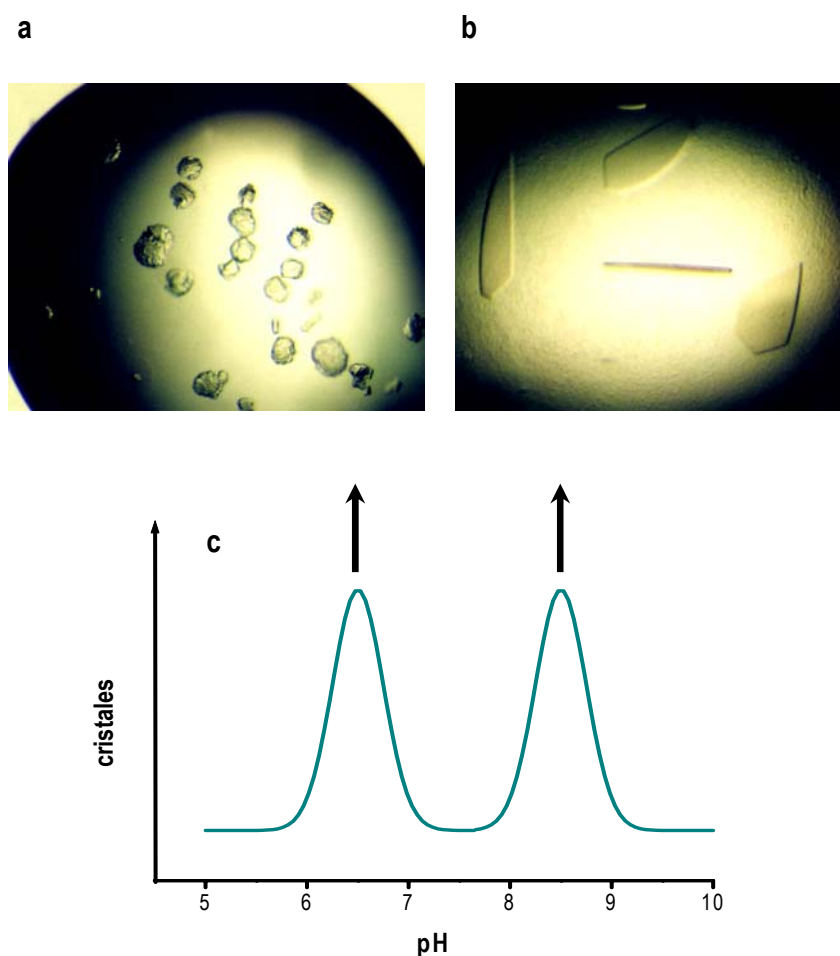


Figura 4.20. Representación y fotografías del hábito cristalino de Pce Δ 55 en función del pH. **a.** Cristales en BIS-TRIS 0,1M, pH 6,5 y NaCl 0,2 M, con PEG 3350 al 23% como precipitante. El tamaño de la gota fue de 1 μ l de proteína + 1 μ l de precipitante, necesitando 1 mes para su crecimiento. **b.** Cristales crecidos en Tris/HCl 0,1 M pH 8,54, y PEG 3350 al 23%. **c.** Perfil de crecimiento de los cristales en función del pH.

Para mejorar el proceso de cristalización se recurrió al empleo de 72 aditivos, tomando como condiciones de partida aquellas en las que se habían obtenido los mejores cristales, tanto en medio ácido, como en medio básico. Los aditivos pueden influir en las interacciones proteína-

proteína o proteína-disolvente, además de perturbar la estructura del agua, modificando así las condiciones de cristalización. El tamaño de la gota aplicada fue de 1 μl de proteína + 1 μl de solución madre + 0.5 μl de aditivo. La incorporación de aditivos no mejoró la calidad de los cristales, por lo que se procedió a la utilización de una gama de 72 detergentes. Este tipo de compuestos consiguen modificar las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína y suelen resultar bastante eficaces a la hora de estabilizar las regiones no polares expuestas. De todos los detergentes ensayados sólo en presencia de HECAMEG se obtuvieron cristales diferentes y mejores. Se profundizó en el estudio variando las concentraciones iniciales del precipitante y del detergente alrededor de su concentración micelar crítica (CMC), además de probar diferentes volúmenes de gotas. Los mejores resultados (cristales tridimensionales) se obtuvieron a los 15 días (Fig. 4.21), utilizando un tamaño de gota de 3 μl de proteína + 3 μl de solución madre + 1 μl de detergente, siendo la concentración inicial de éste 1,43 veces su CMC (19,5 mM), (Fig. 4.21b).

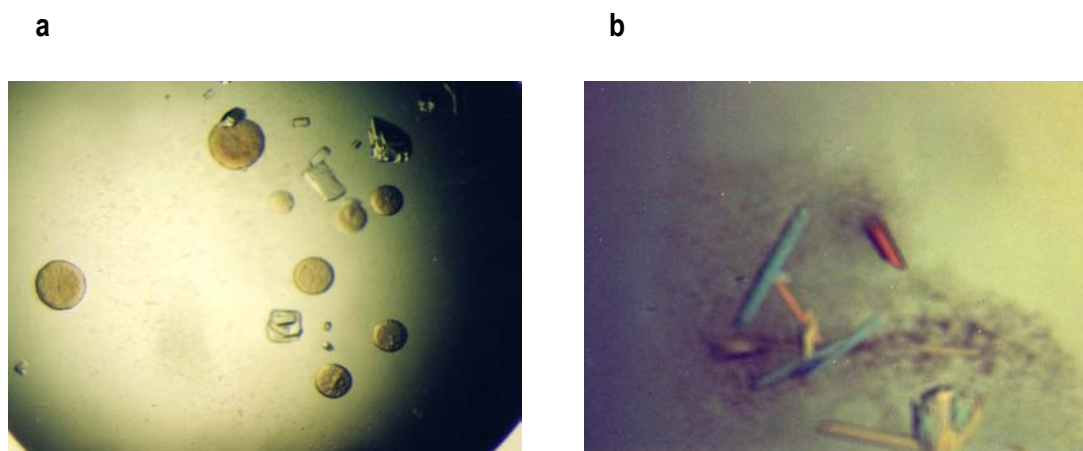


Figura 4.21. Barras y cristales tridimensionales de Pce Δ 55 obtenidos utilizando muestras dializadas frente a colina 10 mM. a. Cristales obtenidos en BIS-TRIS 0,1M pH 6,5, NaCl 0,2M y PEG 3350 al 24%. **b.** Optimización tras la adicción del detergente HECAMEG en las condiciones de **a**.

Los cristales así obtenidos difractaban sólo hasta 3 Å de resolución en el difractor de ánodo rotatorio del GCMBE. Además, presentaban una alta mosaicidad y mostraban más de una molécula por unidad asimétrica, lo que complicaba el proceso de obtención de las fases cristalográficas.

4.3.2.2. Cristalización de Pce $\Delta 55$ en ausencia de colina

En el caso de las muestras de Pce $\Delta 55$ dializadas en ausencia de colina, los mejores resultados obtenidos con las soluciones iniciales fueron unas barras que crecieron en la condición 65 de la solución '*Index Screen II*': BIS-TRIS 0,1M a pH 5,5, acetato amónico 0,1 M, y PEG 10K al 17%, (Fig. 4.22a). Aunque los cristales no difractaban a alta resolución se pudo observar un cambio en el hábito cristalino y la aparición de puntos de nucleación más definidos con respecto a las muestras de Pce silvestre. En este caso, la tendencia observada con el pH para la cristalización de las muestras en presencia de 10 mM colina no se repetía, ya que dichos cristales crecían en condiciones más ácidas.

Al igual que en el proceso seguido con Pce $\Delta 55$ en presencia de colina, se continuó con la adición de las soluciones de aditivos y detergentes. En el primer caso no se obtuvieron resultados positivos, pero en el segundo, tras la adición del detergente Fos-Choline 12 (*n*-dodecilmfosforilcolina) se produjo un cambio en el hábito de los cristales, pasando de ser barras bastante finas y no polarizantes a pequeños cristales tridimensionales y polarizantes, que crecían en 15 días apareciendo varios núcleos por toda la gota (Fig. 4.22b).

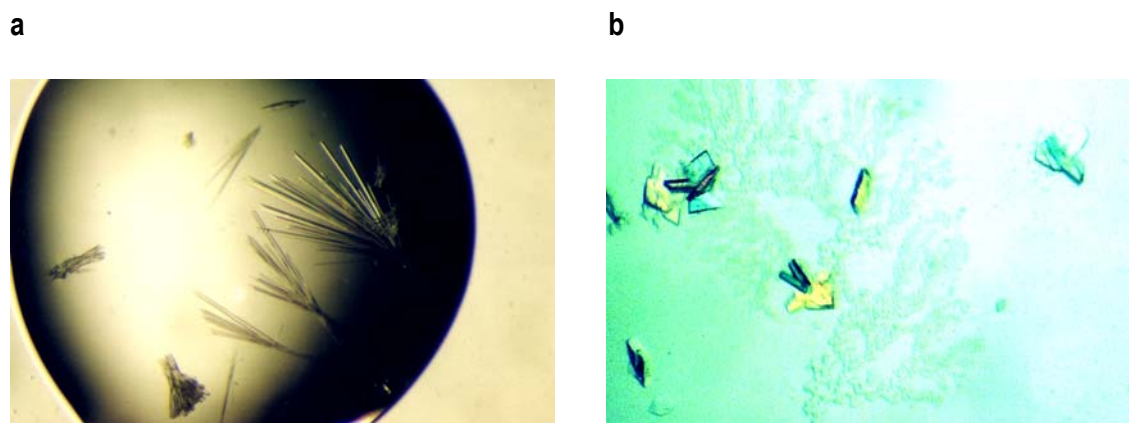


Figura 4.22. Cambio en el hábito de cristalización de Pce $\Delta 55$ producido por el detergente Fos-Choline 12.

a. Barras crecidas en ausencia de detergente en las condiciones BIS-TRIS 0,1M, pH 5,5, acetato amónico 0,1 M, y PEG 10K al 17%. El tamaño de la gota fue de 1 μ l proteína + 1 μ l solución madre. **b.** Cristales obtenidos en las condiciones anteriores pero con la adición del detergente Fos-Choline 12 a una concentración inicial 2 veces la CMC (1,5 mM). El tamaño de la gota en este caso fue de 1 μ l proteína + 1 μ l solución madre + 0,5 μ l del detergente Fos-Choline 12.

Como los cristales no presentaban aún un tamaño suficiente para realizar experimentos de difracción, se procedió a realizar un barrido fino de condiciones, variando, al igual que en el caso anterior, las concentraciones del precipitante y del detergente (en torno a su CMC) además de modificar el tamaño de la gota. Al cabo de 15-20 días se obtuvieron unos cristales tridimensionales. El tamaño de gota con el que se producían los mejores cristales era de 9 μ l: 4 μ l proteína + 4 μ l solución madre + 1 μ l del detergente Fos-Choline 12, que inicialmente se puso a una concentración de 1,5 mM (Fig. 4.23). Los cristales obtenidos en las condiciones descritas en la Fig. 4.23 fueron los mejores en cuanto a calidad y reproducibilidad de todos los mostrados anteriormente, por lo que se emplearon para los experimentos de difracción posteriores.

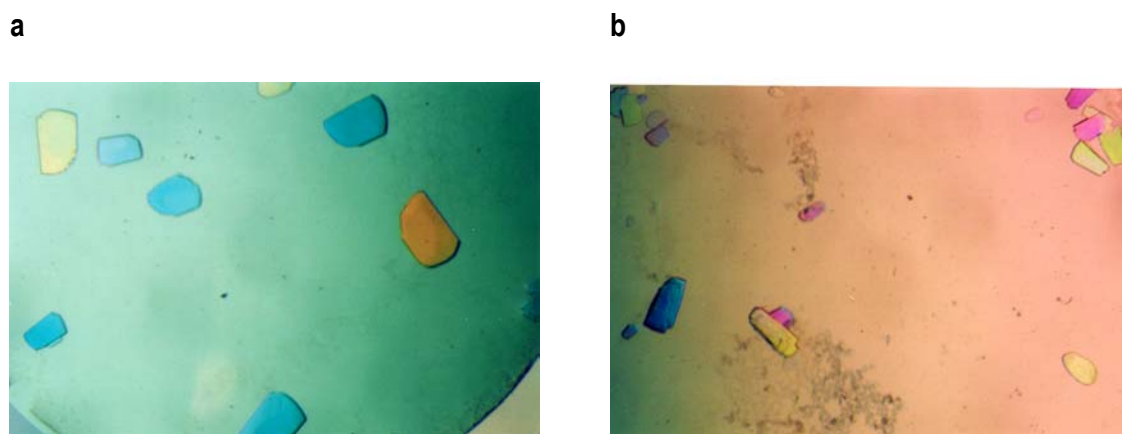


Figura 4.23. Optimización de las condiciones de cristalización de la muestra Pce Δ 55 en ausencia de colina. **a.** Cristales obtenidos en las condiciones BIS-TRIS 0,1M pH 5,5, acetato amónico 0,1 M, PEG 10K al 17%, y Fos-Choline 12 (1,5 mM). El tamaño (0,1 x 0,3 x 0,3 mm) era mayor que el de los obtenidos en ausencia del detergente, polarizaban y crecían independientes o en agrupaciones de varias unidades. **b.** Cristales en las mismas condiciones que en **a** pero a una concentración de precipitante (PEG 10K) del 20 %.

Como se puede observar en la Figura 4.24, el detergente Fos-Choline 12 utilizado para optimizar la cristalización de Pce Δ 55 contiene un residuo de fosforilcolina. Puesto que el sustrato natural de la enzima son los residuos de fosforilcolina presentes en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de neumococo, el detergente pudo haber contribuido en la estabilización de la proteína en el cristal, favoreciendo así el proceso de cristalización.

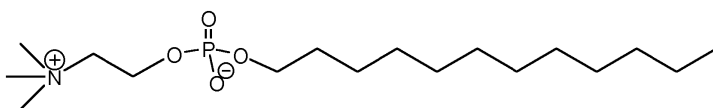


Figura 4.24. Fórmula química del detergente Fos-Choline 12 (*n*-dodecilsforilcolina).

4.3.3. EXPERIMENTOS DE DIFRACCIÓN. RECOGIDA DE DATOS

Los cristales de Pce $\Delta 55$ obtenidos en BIS-TRIS 0,1M (pH 5,5), acetato amónico 0,1 M, PEG 10K al 17%, y Fos-Choline 12 a 1,5 mM (Fig. 4.23), se sumergieron en una solución crioprotectora formada por la solución madre y glicerol al 30% durante 10 segundos. Los cristales se montaron en un lazo de nylon y se congelaron a 120 K. Posteriormente, se procedió a medir su espectro de difracción a una longitud de onda de 1,5418 Å, utilizando el equipo de difracción del Instituto de Química-Física 'Rocasolano'. La resolución máxima alcanzada fue de 1,92 Å.

Con el espectro recogido (Fig. 4.25) se determinó la celdilla unidad y se propuso el grupo espacial. Los cristales pertenecían al grupo espacial monoclinico C2 y los parámetros de la celdilla unidad eran $a = 173,49$ Å, $b = 58,12$ Å, $c = 68,65$ Å, $\beta = 108,29^\circ$ ($\alpha = \gamma = 90^\circ$). En la Tabla 4.10 se recogen las estadísticas del procesado de los datos de la proteína nativa que, posteriormente, fueron utilizados para la construcción del modelo.

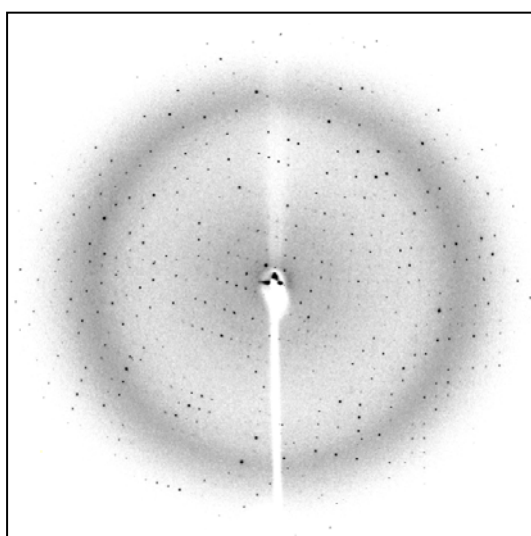


Figura 4.25. Imagen del espectro de difracción de los cristales de Pce $\Delta 55$. El ángulo de oscilación, $\Delta\varphi$, utilizado fue de 1° .

El contenido en solvente se calculó utilizando el peso molecular de Pce $\Delta 55$ y los volúmenes de la celdilla unidad y de Mathews (Mathews, 1968), según la expresión:

$$V_{\text{solvente}} (\%) = 100 \cdot (1 - 1,23/V_M) \quad [18]$$

donde V_{solvente} es el volumen del solvente y V_M es el volumen de Mathews, definido como:

$$V_M = V_{\text{celdilla}} / (Mw \cdot z \cdot n) \quad [19]$$

siendo V_{celdilla} el volumen de la celdilla, Mw el peso molecular de la proteína (63.347 Da), z el nº de posiciones equivalentes en la celdilla (4 para el grupo espacial monoclinico C2) y n el número de moléculas independientes por unidad asimétrica. De este modo, con una molécula independiente se obtuvo un contenido en solvente del 49%.

4.3.4. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL

Para resolver el problema de las fases, y debido a que no se disponía de ninguna estructura tridimensional homóloga para obtener un modelo inicial, se intentó la obtención de derivados de átomo pesado mediante inmersión de los cristales en soluciones con diferentes concentraciones de átomos pesados. Se probaron soluciones de mercurio, yodo, y platino a concentraciones de 1 y 10 mM (sección 3.1.1 y 3.2.7.9 de Materiales y Métodos) variando, además, el tiempo de inmersión en función del aspecto de los cristales. La mayoría de ellos no daban buenos espectros de difracción, debido principalmente a su degradación.

Tras los problemas surgidos en la obtención de derivados de átomo pesado se intentó obtener cristales de la proteína con SeMet. Al incorporar un dispersor anómalo, como es el selenio, durante la síntesis proteica se pueden realizar medidas a diferentes longitudes de onda (MAD) con un único cristal, evitando así los problemas de isomorfismo. La proteína se expresó, al igual que la proteína silvestre, en el laboratorio de Dr. Pedro García, como se indicó en Materiales y Métodos (sección 3.1.2). Sin embargo, se obtuvo muy bajo rendimiento en la expresión y purificación, consiguiendo sólo una cantidad aproximada de 20 μl a una concentración de 10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Se intentó la cristalización utilizando las condiciones óptimas definidas para la proteína silvestre pero no se obtuvieron cristales.

Tras estos resultados negativos se recurrió a la utilización del compuesto de gadolinio Gd-HPDO3A (Fig. 4.26). Este tipo de compuesto se emplea como agente de contraste en la visualización de imágenes en resonancia magnética (Girad *et al.*, 2003) y, muy recientemente, se ha comenzado a utilizar para resolver el problema de la fase en cristalografía de macromoléculas biológicas. Los complejos de gadolinio poseen las siguientes características:

- Son fuertes dispersores anómalos, especialmente en la longitud de onda de la capa L_{III} del gadolinio ($\lambda = 1,711 \text{ \AA}$).
- Se disuelven con facilidad en agua a alta concentración (1 M), lo que facilita su penetración en los cristales de proteínas sin dañarlos, y no afectan de manera significativa a las condiciones de cristalización.
- Son eléctricamente neutros.

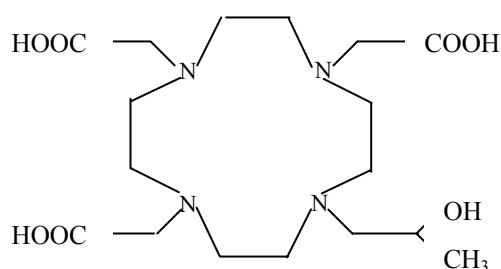


Figura 4.26. Ácido 10-(2-hidroxiopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (HPDO3A). Cuando el ión Gd^{3+} se une a la molécula de HPDO3A los grupos carboxílicos están deprotonados dando lugar al complejo neutro.

Se consiguió obtener un derivado mediante inmersión del cristal durante 1 minuto en una solución 10 mM del complejo Gd-HPDO3A. La recogida de los datos del derivado se llevó a cabo en la línea BM30A del ESRF de Grenoble. Los cristales se congelaron a 100 K y la longitud de onda para la recogida del espectro fue la del máximo de absorción del Gd^{3+} ($\lambda = 1,711 \text{ \AA}$), determinada previamente a partir del espectro de fluorescencia (Fig. 4.27). Los datos se procesaron en el Departamento de Cristalografía del IQFR utilizando los programas MOSFLM (Leslie, 1987) y SCALA del conjunto de programas CCP4 (Bailey, 1994; sección 3.2.7.8 de Materiales y Métodos). En la Tabla 4.10 se muestran las estadísticas de los datos procesados del derivado de gadolinio.

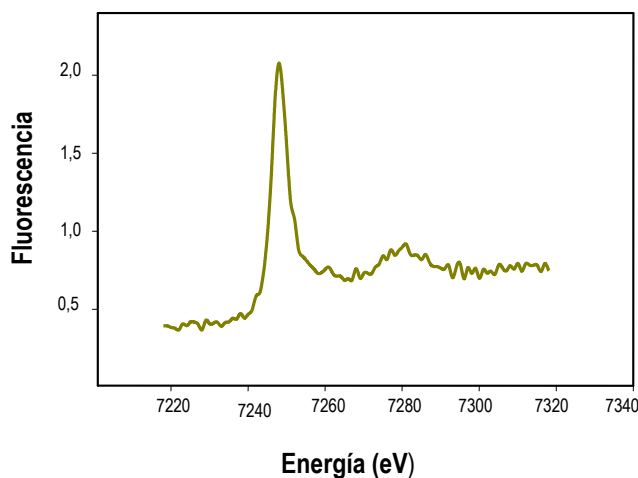


Figura 4.27. Espectro de fluorescencia del Gd³⁺. El máximo de absorción se corresponde con una longitud de onda de 1,711 Å.

Para la resolución estructural se utilizó la técnica SAD (dispersión anómala a una única longitud de onda). La determinación de la ocupación del gadolinio en la estructura se realizó mediante la utilización de mapas de Patterson (Fig. 4.28), identificándose cuatro sitios con el programa SHELX (Sheldrick, 1998).

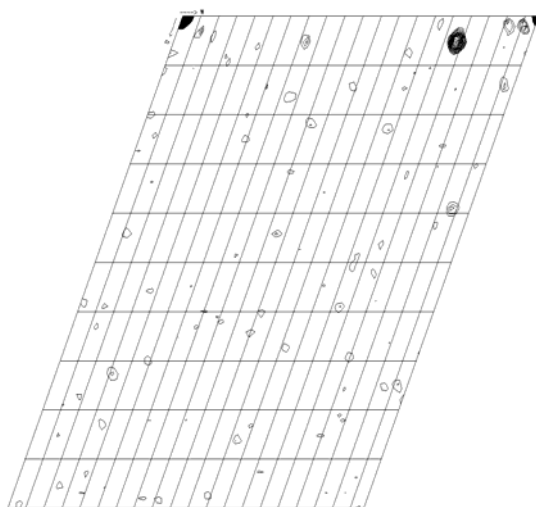


Figura 4.28. Mapa de Patterson para el complejo Pce Δ 55-gadolinio. En la figura se indica la sección de Harker ($v=0$) donde se encuentra la densidad de uno de los átomos de gadolinio.

Las fases iniciales fueron calculadas a 2,68 Å de resolución mediante el programa SHARP (De la Fortelle y Bricogne, 1997) y el refinamiento de éstas se llevó a cabo mediante aplanado del solvente con el programa DM del paquete CCP4, tomando 49% como contenido de solvente (una molécula de proteína por unidad asimétrica). Tras el refinamiento de las fases se realizó un modelado manual de la cadena peptídica para los dos módulos de Pce con el programa O (Jones *et al.*, 1991). El modelo inicial se refinó con el programa CNS (Brünger *et al.*,

1998). Posteriormente se utilizó el modelo de Pce $\Delta 55$ construido y se realizó un reemplazamiento molecular con MOLREP (CCP4), usando los datos de Pce $\Delta 55$ nativa sólo hasta 3,5 Å. Los elementos de estructura adicional fueron construidos manualmente con el programa O sobre el mapa de densidad electrónica de Pce nativa hasta el máximo de resolución de los datos nativos, que fue de 1,92 Å. El modelo completo se refinó, en primer lugar, con CNS y en él se incluyeron los iones metálicos, 433 moléculas de agua y siete moléculas de BIS-TRIS. El refinamiento final de dicho modelo se realizó usando REFMAC, que utiliza restricciones geométricas y aproximaciones de máxima probabilidad (Murshudov *et al.*, 1997). El mapa de densidad electrónica mostraba 540 aminoácidos de los 547 que constituyen Pce $\Delta 55$. No fue posible visualizar los últimos 7 aminoácidos en posición C-terminal. Con el programa PROCHECK (Laskowsky *et al.*, 1993) se evaluó la calidad del modelo final mediante verificaciones estereoquímicas y energéticas. En la Figura 4.29 se representa el diagrama de Ramachandran, donde se muestran los ángulos de torsión ψ y ϕ de los residuos de la cadena polipeptídica. El 87,5% de los residuos se encuentran en las zonas más favorables, el 11,5% en zonas permitidas, el 0,8% en zonas generosamente permitidas, y el 0,2% en zonas prohibidas. Las estadísticas del refinamiento, así como el contenido final del modelo y la estereoquímica se detallan en la Tabla 1.

Figura 4.29. Representación de Ramachandran de la estructura de Pce $\Delta 55$. Código de colores: rojo, zona más favorable; amarillo, zona permitida; amarillo claro, zona generosamente permitida; blanco, zona prohibida. Con triángulos se representan los residuos de glicina, y con cuadrados el resto de residuos.

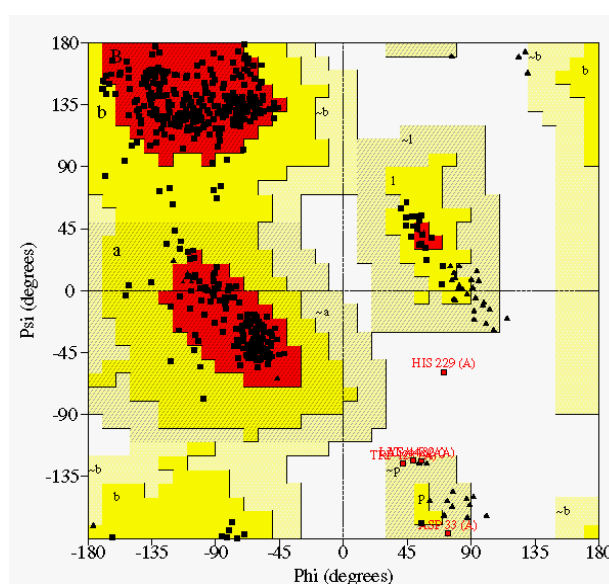


Tabla 4.10 Datos estadísticos y de determinación estructural para Pce nativa y del derivado

	Derivado Gd-HPDO3A	Pce
Estadística del procesamiento de datos		
Grupo espacial	C2	C2
Parámetros celdilla		
<i>a</i> , (Å)	169,82	173,49
<i>b</i> , (Å)	57,26	58,12
<i>c</i> , (Å)	67,44	68,65
β, (°)	112,60	108,29
Longitud de onda (Å)	1,7110	1,5418
Resolución (Å)	43,85 (2,82)-2,68 ^a	27,52 (2,02)-1,92 ^a
Número total de reflexiones	58930	634062
Reflexiones únicas	16810	44362
Redundancia	3,5 (2,2)	6,2 (5,7)
Complejidad (%)	97,8 (85,4)	95,5 (88,5)
I/σ (I)	20,2 (5,0)	13,7 (1,7)
R _{sym} ^b	0,04 (0,28)	0,11 (0,60)
Estadísticas del refinamiento		
Intervalo de resolución (Å)	43,85-2,68	27,52-1,92
Átomos de proteína no-hidrógenos		4439
Átomos metálicos		4
Átomos de ligando		108
Átomos del solvente		433
Factor R		0,19 (0,32)
Factor R _{libre} ^c		0,23 (0,39)
Rmsd de los enlaces (Å)		0,012
rmsd de los ángulos (°)		1,36
Valor medio de los factores térmicos (Å ²)		34,1

^a valores del paréntesis indican la última concha de resolución

^b $R_{sym} = \sum |I - I_{av}| / \sum I$

^c R calculado para el 7% de los datos excluidos del refinamiento

4.4. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL COMPLEJO Pce-Fosforilcolina

4.4.1. ORGANIZACIÓN Y PLEGAMIENTO GENERAL

La estructura de Pce, la primera CBP resuelta codificada por la bacteria, muestra una disposición modular (Fig. 4.30), donde el módulo catalítico (residuos 1-300) se encuentra unido al módulo de unión a colina (residuos 313-547) por un conector formado por 12 residuos (301-312). El extremo C-terminal está formado por 86 aminoácidos (residuos 517-602), de los que 55 se deleccionaron para construir Pce Δ 55 (sección 4.3.2).

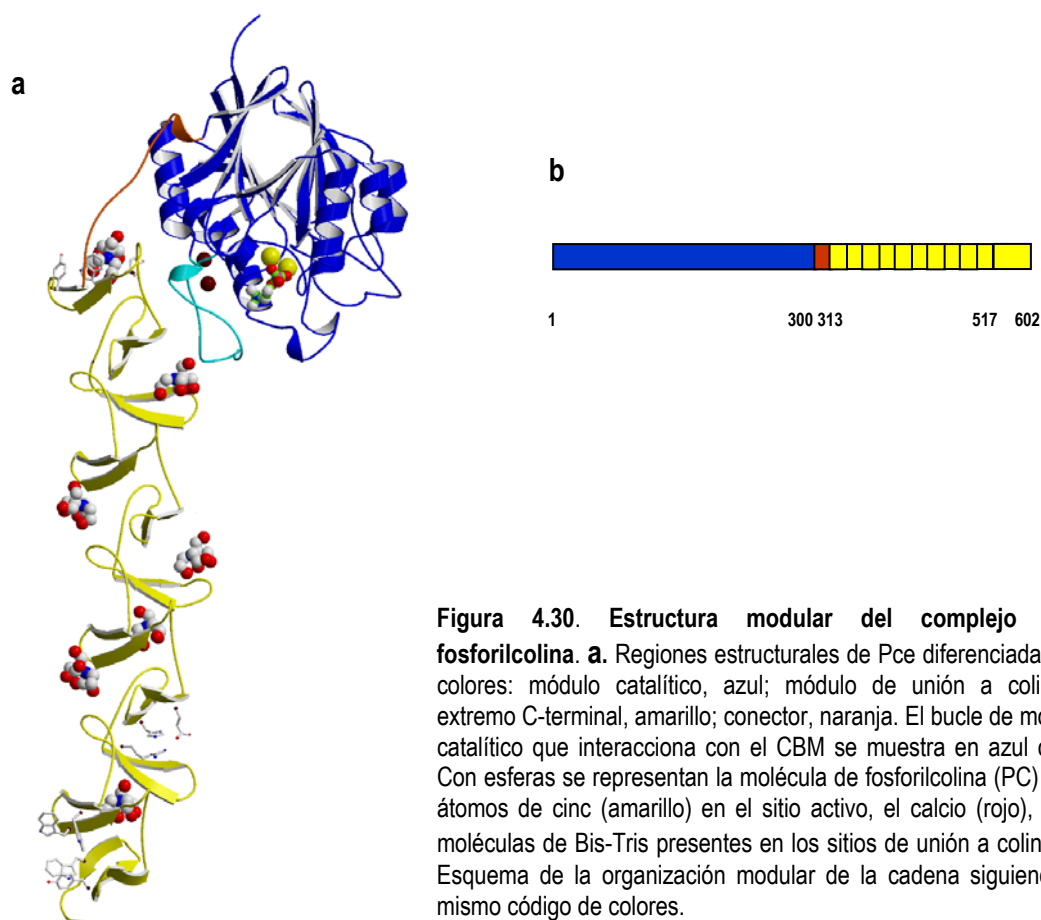


Figura 4.30. Estructura modular del complejo Pce-fosforilcolina. **a.** Regiones estructurales de Pce diferenciadas por colores: módulo catalítico, azul; módulo de unión a colina y extremo C-terminal, amarillo; conector, naranja. El bucle de módulo catalítico que interacciona con el CBM se muestra en azul claro. Con esferas se representan la molécula de fosforilcolina (PC) y los átomos de cinc (amarillo) en el sitio activo, el calcio (rojo), y las moléculas de Bis-Tris presentes en los sitios de unión a colina. **b.** Esquema de la organización modular de la cadena siguiendo el mismo código de colores.

En el siguiente esquema se aprecian los aminoácidos que contiene cada elemento de estructura secundaria para los módulos catalítico (Fig. 4.31a) y de unión a colina (Fig. 4.31b), así como los residuos implicados en la coordinación del cinc y calcio.

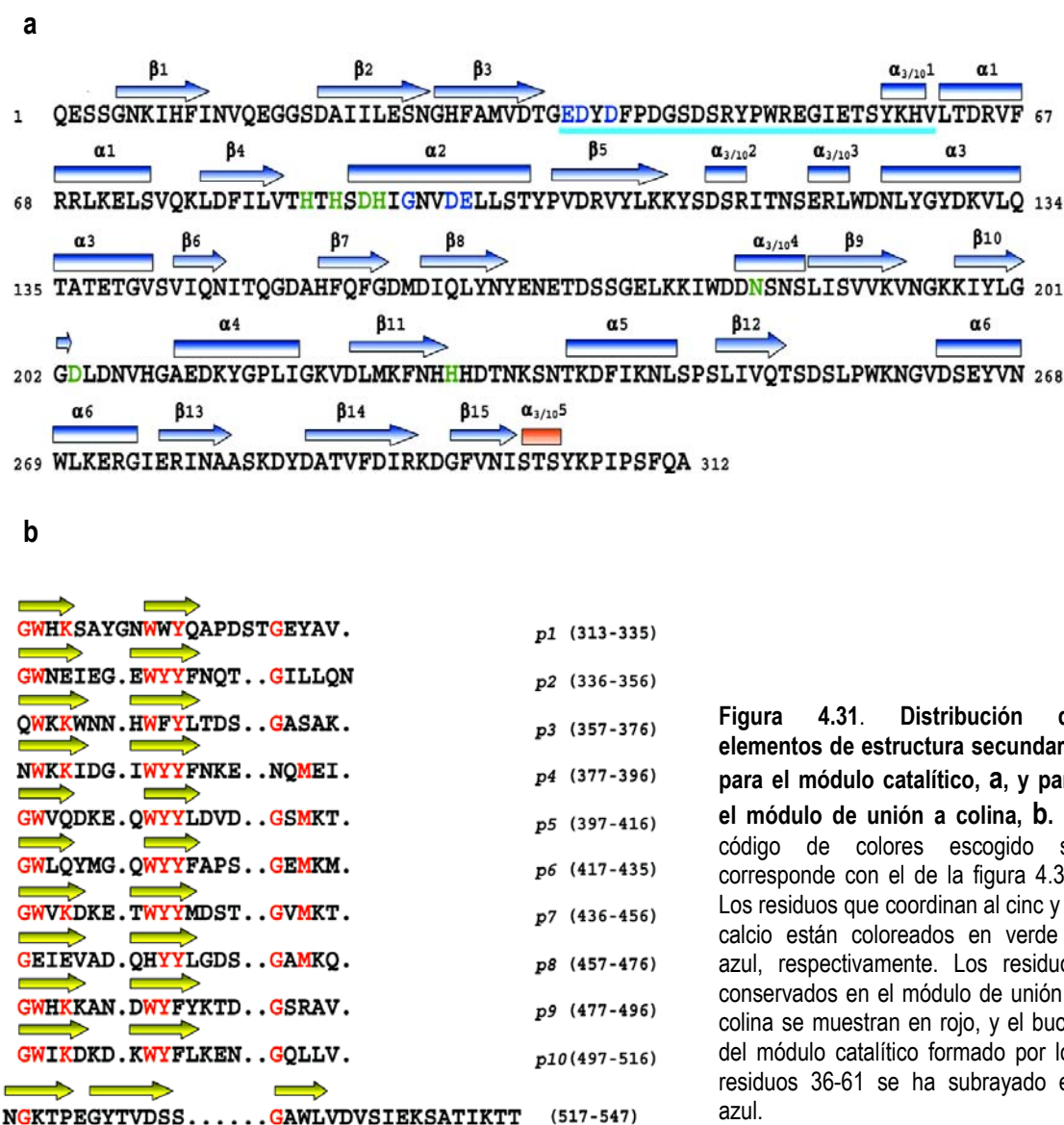


Figura 4.31. Distribución de elementos de estructura secundaria para el módulo catalítico, a, y para el módulo de unión a colina, b. El código de colores escogido se corresponde con el de la figura 4.30. Los residuos que coordinan al cinc y al calcio están coloreados en verde y azul, respectivamente. Los residuos conservados en el módulo de unión a colina se muestran en rojo, y el bucle del módulo catalítico formado por los residuos 36-61 se ha subrayado en azul.

El módulo catalítico de Pce está formado por un único dominio estructural constituido por un sandwich $\alpha\beta\text{-}\beta\alpha$ (Fig. 4.32). Ésta es la primera fosfodiesterasa resuelta cuya estructura presenta el plegamiento característico de la familia de las metalo- β -lactamasas, a pesar de tener una baja identidad de secuencia ($\leq 13\%$) con otras enzimas de esta familia y de poseer un tamaño considerablemente mayor. Al igual que ocurre con la secuencia, la similitud

estructural entre Pce y otras α/β hidrolasas con este tipo de plegamiento es baja, siendo la metalo- β -lactamasa de *Xanthomonas maltophilia* la que presenta mayor similitud (13% de identidad de secuencia y rmsd 3,1 Å para 176 átomos C α), seguida de la glicoxalasa II humana (15% de identidad de secuencia y rmsd 3,4 Å para 173 átomos C α) y de la rubredoxin:oxígeno reductasa de *Desulfovibrio gigas* (13% de identidad de secuencia y rmsd 7,9 Å para 183 átomos C α). Las dimensiones aproximadas del módulo catalítico son 55 x 53 x 45 Å³, dividiéndose en dos regiones equivalentes constituidas por láminas- β antiparalelas con 5 y 4 hebras β , respectivamente, seguidas de 3 motivos $\alpha\beta$ que enlazan con los conectores (Fig. 4.32b). Las hélices α se exponen al solvente rodeando el núcleo compacto formado por las hebras β .

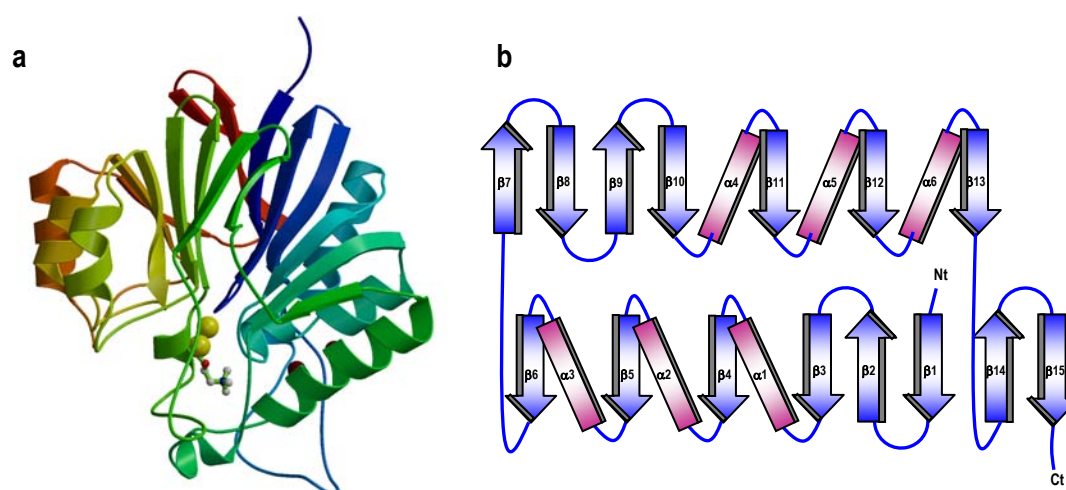


Figura 4.32. Estructura y topología del módulo catalítico de Pce. **a.** Estructura del módulo catalítico. Los elementos de estructura secundaria se colorean desde el azul al rojo comenzando por el extremo N-terminal. Los átomos de cinc, calcio, y la molécula de fosforilcolina se representan igual que en la figura 4.30. **b.** Topología del módulo catalítico de Pce dividido según la disposición del sandwich, con las láminas β coloreadas en azul y las hélices α en rosa. Las hélices 3_{10} se han omitido por claridad (ver Fig. 4.31a).

El conector que une ambos módulos está formado por una región con varios residuos polares plegados en una hélice 3_{10} , seguida de una zona constituida por residuos aromáticos y prolina que no presenta elementos de estructura secundaria.

El módulo de unión a colina está formado por 10 repeticiones (p1-p10) de 20 aminoácidos aproximadamente, con una secuencia consenso similar a la encontrada en otras CBPs (GWXK-X₄₋₅-WYY-hidrofóbico-X₃₋₅-GXM₂₋₃). Cada repetición contiene una horquilla β

seguida de un bucle que forma un giro (Fig. 4.33a). Esquemáticamente, la forma del módulo puede asemejarse a un prisma triangular regular de 110 Å de altura y 26 Å de base, con los sitios de unión a colina situados a lo largo de las tres caras laterales del prisma (Fig. 4.33b). El patrón de plegamiento global es el de una superhélice a izquierdas semejante a la descrita en C-LytA y el dominio CI del CBM de Cpl-1 (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003). Las horquillas que la forman se disponen perpendicularmente al eje de la hélice, y cada repetición presenta un giro de 120° con respecto a la anterior, de tal forma que la horquilla β_i es paralela a la horquilla β_{i+3} (Fig. 4.33b)

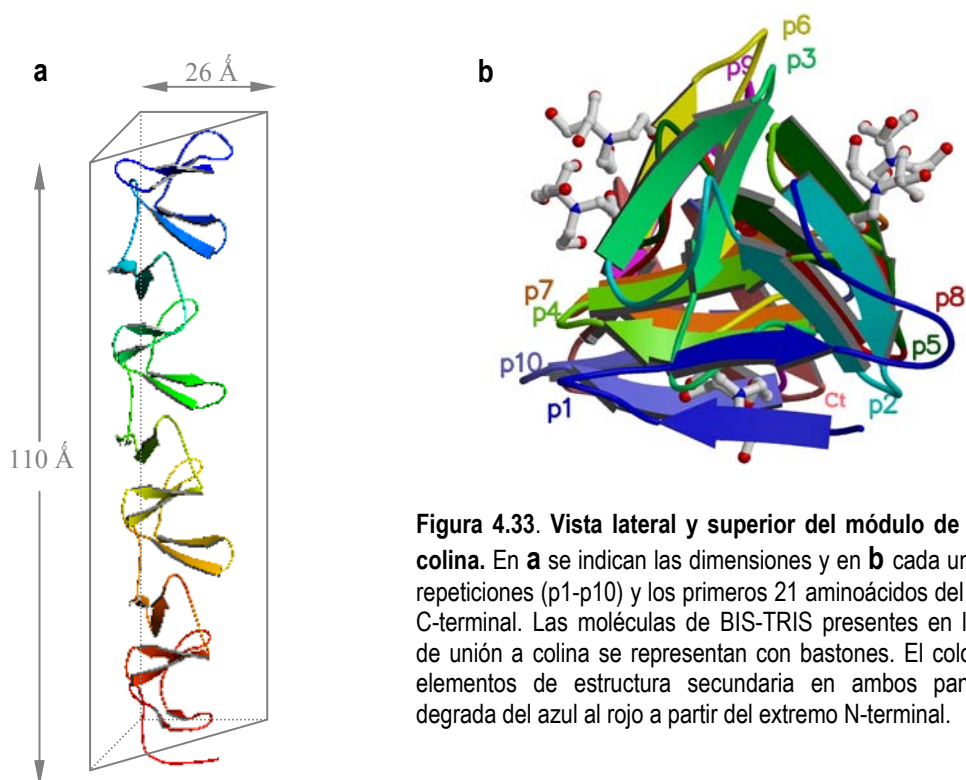


Figura 4.33. Vista lateral y superior del módulo de unión a colina. En **a** se indican las dimensiones y en **b** cada una de las repeticiones (p1-p10) y los primeros 21 aminoácidos del extremo C-terminal. Las moléculas de BIS-TRIS presentes en los sitios de unión a colina se representan con bastones. El color de los elementos de estructura secundaria en ambos paneles se degrada del azul al rojo a partir del extremo N-terminal.

Curiosamente, los primeros 21 aminoácidos (residuos 517-534) del extremo C-terminal, a pesar de no tener identidad de secuencia con las repeticiones, adoptan el mismo tipo de plegamiento, alargando la superhélice que forma el CBM (Fig. 4.33a).

4.4.2. MODULO CATALÍTICO: DESCRIPCIÓN DEL SITIO ACTIVO

Como se indica en la Introducción, Pce hidroliza residuos de PC unidos covalentemente a la N-acetilgalactosamina presente en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Höltje y Tomasz, 1974; Fig. 1.6).

El centro activo se localiza en la interfaz que generan las hojas- β , donde una profunda depresión con un potencial electrostático altamente negativo alberga a los dos átomos de cinc (Fig. 4.34 y Fig. 4.30) detectados por espectrometría ICP-OES (sección 4.1.1). Su localización en el fondo de la cavidad apoya su participación como cofactor en la catálisis, tal y como indicaban los estudios de inactivación por depleción del cinc en las muestras de Pce (sección 4.1.1).

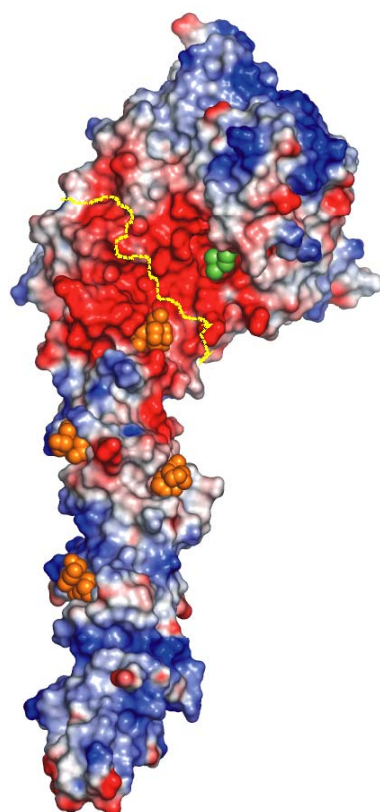


Figura 4.34. Superficie molecular de Pce representada en función de su potencial electrostático. En rojo se muestran las cargas negativas y en azul las positivas. La línea discontinua amarilla marca la unión entre módulos. Mediante bolas verdes y naranjas se representan las moléculas de PC y BIS-TRIS, respectivamente.

Por otra parte, la presencia de una densidad electrónica en contacto con el centro bimetalico reveló la existencia de una molécula de PC (Fig. 4.34), que podría haberse originado por hidrólisis del detergente (n-dodecilmfosforilcolina) utilizado en la cristalización de la enzima (ver sección 4.4.6).

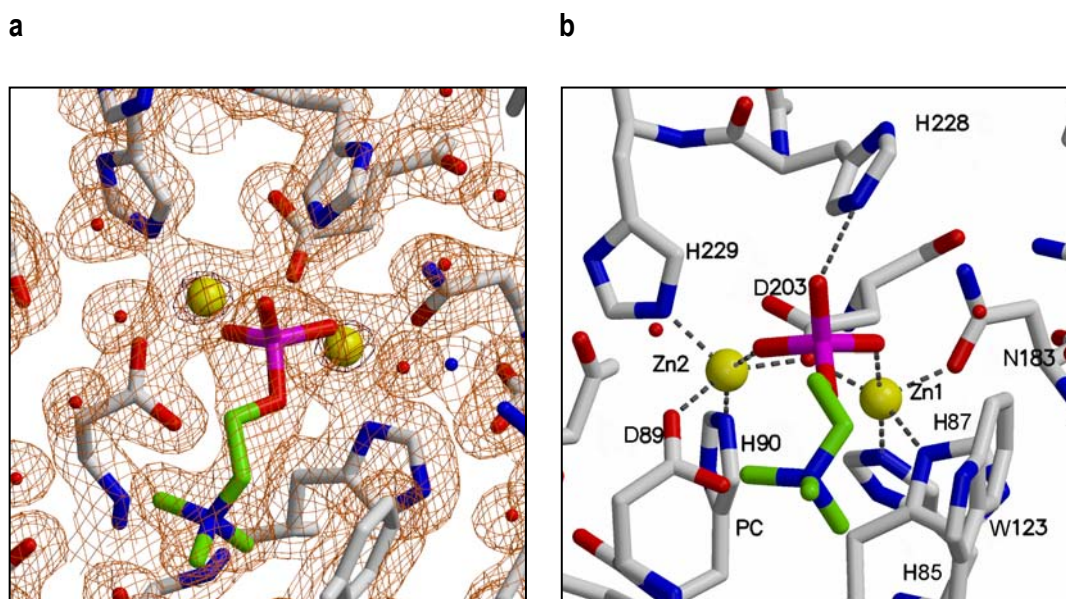


Figura 4.35. Centro binuclear de cinc con la molécula de PC unida al centro activo. **a.** El modelo muestra el mapa de densidad electrónica $2F_o - F$ contorneado a 1σ (naranja), y a 5σ (granate). Se representan los átomos de cinc (bolas amarillas), los residuos implicados en la coordinación de los metales y la molécula de fosforilcolina (bastones). **b.** Los residuos que coordinan a los átomos de cinc y a la molécula de PC se representan con bastones utilizando el mismo código de colores que en **a**. Las interacciones de la PC y los cationes con los residuos de Pce se indican con líneas discontinuas.

Los átomos de cinc del centro bimetalico (Zn1 y Zn2) están situados a una distancia de 3,6 Å y presentan una geometría de tipo piramidal con base cuadrada distorsionada, siendo la distancia media con respecto a los ligandos de 2,04 Å. Los residuos de Pce involucrados en la coordinación del cinc son: H85, H87 y N183 para el Zn1 y D89, H90 e H229 para el Zn2. Además, el D203 coordina ambos metales a través de su O δ 1 (Fig. 4.35b). Las posiciones apicales de los dos átomos de cinc están ocupadas por los residuos N183 (O δ 1) e H229 (N ϵ 2), encontrándose que el Zn2 está desplazado del plano basal 0,6 Å. El grupo fosfato de la PC se encuentra a una distancia óptima para interactuar con ambos cationes, pudiendo, además, establecer interacción con la H228 y dos moléculas de agua, mientras que el grupo trimetilamonio de la colina estaría estabilizado por interacciones polares con el D89 y de tipo catión- π con el W123.

4.4.3. MÓDULO DE ANCLAJE A LA PARED CELULAR. SITIOS DE UNIÓN A COLINA

Como se indicó en la Introducción, el CBM reconoce los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, permitiendo así la unión de la proteína a la pared celular de la bacteria mediante interacciones no covalentes. Los sitios de unión a colina se sitúan entre dos repeticiones consecutivas (Fig. 4.36) y están formados por una cavidad hidrofóbica delimitada por tres residuos aromáticos pertenecientes a las dos horquillas que conforman el sitio y un residuo hidrofóbico (metionina o leucina) situado en el fondo de dicha cavidad. Los dos primeros residuos aromáticos (triptófanos en el caso de Pce) pertenecen a las dos hebras (β_{1n} y β_{2n}) de la repetición 'n' y el tercero (tirosina o fenilalanina en Pce) a la segunda hebra (β_{2n+1}) de la repetición 'n + 1' (Fig. 4.36). Los residuos de triptófano expuestos al solvente están estabilizados a través de la cadena lateral de una lisina o una tirosina. Todo este conjunto de interacciones permiten estabilizar la estructura del modulo de unión a colina. En la Figura 4.36 se muestran los residuos aromáticos implicados en la formación de la cavidad generada entre las repeticiones p5 y p6.

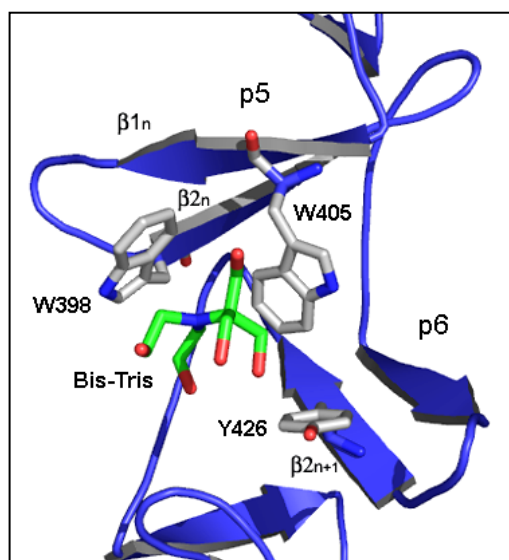


Figura 4.36. Sitio de unión a colina de Pce generado entre las repeticiones p5 y p6. Se muestran los residuos de las hebras β implicados en la unión del BIS-TRIS (análogo de colina) que se representa en verde.

Los contactos entre la proteína y el ligando son de tipo hidrofóbico, pero se potencian por interacciones electrostáticas, en las que la carga positiva del grupo amonio de la colina o del BIS-TRIS es reconocida y estabilizada por medio de interacciones catión- π con los sistemas ricos en electrones de los anillos aromáticos (Dougherty y Stauffer, 1990). Estas interacciones

también se producen en el caso de derivados y análogos de colina como la molécula de BIS-TRIS (Harel *et al.*, 1993).

Tabla 4.11. Residuos aromáticos implicados en la formación de los sitios (canónicos y no canónicos) de unión a colina en Pce. En rojo se indican los residuos no conservados en las repeticiones p8 y p9.

Motivos	Residuos aromáticos			
p1-p2	W314	W322	Y345	
p2-p3	W337	W344	F366*	
p3-p4	W358	W365	Y386	
p4-p5	W378	W385	Y406	
p5-p6	W398	W405	Y426	Sitios canónicos
p6-p7	W418	W425	Y446	
p7-p8	W437	W444	Y466	
p8-p9	E458	H465	Y486	
p9-p10	W478	W485	Y506	
p1	Y319	W323	Y333	Sitios no canónicos
P10-C terminal	W498	W505	Y524	

* La tirosina (Y) está sustituida por una fenilalanina (F) en la posición 366 (p3).

Teniendo en cuenta el número de repeticiones, podrían existir nueve sitios de unión a colina en el módulo de unión a la pared celular, pero tanto la estructura tridimensional (Fig. 4.37) como la secuencia (Tabla 4.11) muestran que la cavidad formada por las repeticiones p8 y p9 carece del sitio de unión a colina. Los residuos 458 y 459 son, respectivamente, glutámico e histidina, en lugar de triptófano, lo que impide la interacción de tipo catión- π . Además, la presencia de una arginina, en lugar de una metionina, en la posición 494 produce un cambio en la naturaleza y en la geometría de la cavidad, contribuyendo a impedir la unión (Fig.4.37).

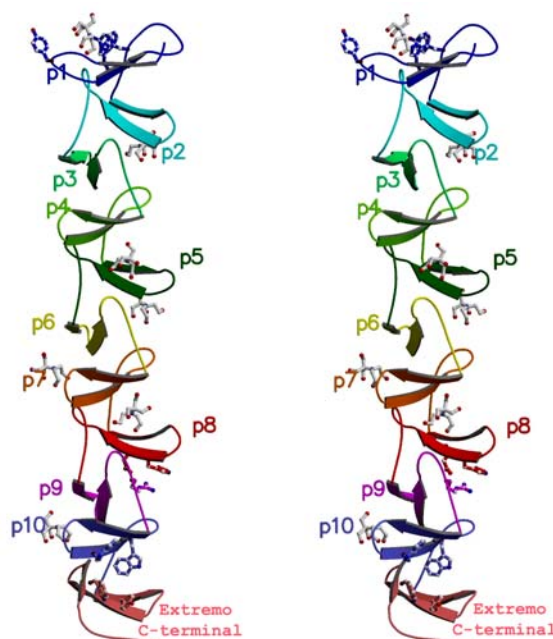


Figura 4.37. Representación estereográfica del módulo de unión a colina. Las moléculas de BIS-TRIS y las cadenas laterales de los residuos que forman los dos sitios adicionales (el primero formado por aminoácidos de la repetición p1, y el segundo por residuos de la repetición p10 y el extremo C-terminal) se representan con bolas y bastones. Además, se señalan los residuos que impiden la unión a colina entre las repeticiones p8 y p9.

Existen algunas peculiaridades del CBM que se hacen patentes a partir de la estructura cristalina de Pce. Por un lado, hay siete moléculas de BIS-TRIS unidas al CBM (Fig. 4.37) y, además, se detectó una densidad residual en otros dos sitios, aunque no pudo ser asignada. Este hecho se debe a la capacidad de los sitios de unión a colina para reconocer aminas terciarias (Sanz *et al.*, 1988) y, por tanto, a las moléculas de BIS-TRIS como análogos de colina. Si se tiene en cuenta la proporción relativa (200:1) en que se encuentran las moléculas de BIS-TRIS y los residuos de PC procedentes del detergente en el tampón de cristalización, no es extraño que los sitios de unión a colina estén ocupados por el primero.

Por otra parte, es interesante destacar que, junto a los ocho sitios canónicos de unión a colina identificados en la estructura de Pce, existen otros dos sitios adicionales que deben ser considerados como sitios putativos de unión para este ligando (Tabla 4.11 y Fig. 4.38):

– El primero, localizado en una cavidad situada en la parte posterior del módulo catalítico, está formado por tres aminoácidos aromáticos (Y319, W323, Y333) pertenecientes a la primera repetición (Fig. 4.38a). En este sitio, se modeló, inequívocamente, una molécula de BIS-TRIS en el mapa de densidad electrónica.

– El segundo se forma por las cadenas laterales de cuatro residuos aromáticos, que provienen de la repetición p10 (W498 y W505) y la horquilla (Y524 y W532) de la cola C-terminal (Fig. 4.38b). En este sitio, se observó una densidad residual, aunque no pudo ser asignada a una molécula de BIS-TRIS.

Por tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones, el módulo de unión a la pared bacteriana de Pce presentaría un total 10 sitios de unión a colina.

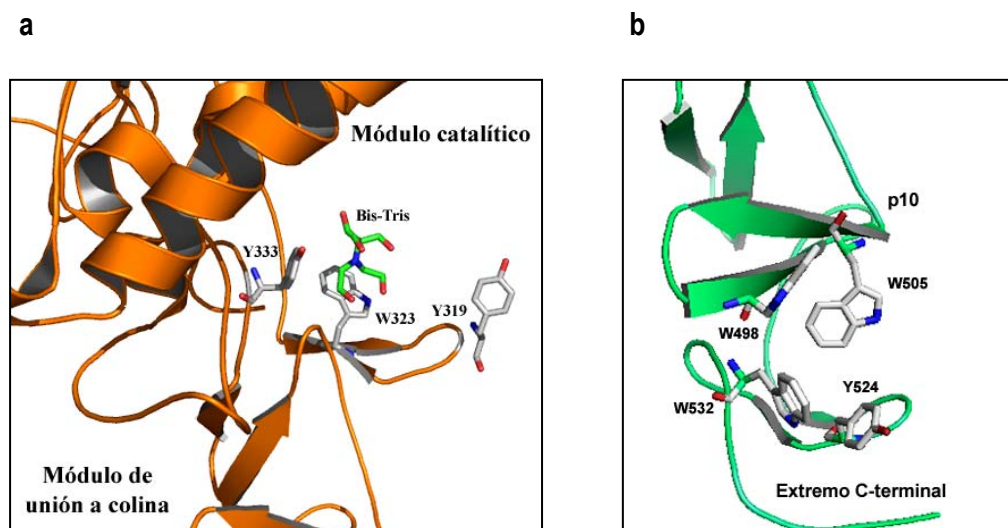


Figura 4.38. Sitios no canónicos de unión a colina. **a.** Sitio localizado entre la parte posterior del módulo catalítico y la primera repetición del módulo de unión a colina. **b.** Cavidad generada entre la repetición p10 y el extremo C-terminal.

4.4.4. ESTRUCTURA MODULAR DE Pce

La molécula de Pce es rígida pese a que ambos módulos presentan grandes diferencias tanto en tamaño como en forma (Fig. 4.30). La rigidez de la estructura viene determinada por los siguientes factores:

- Un conector corto, situado sobre la superficie de la molécula, permite la interacción entre ambos módulos a través de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos.
- La presencia de un largo bucle en el módulo catalítico (residuos 36-61) que interacciona fuertemente con las tres primeras repeticiones del CBM (Fig. 4.39a).
- La existencia de dos átomos de calcio estructurales (Ca1 y Ca2) que refuerzan la conformación del bucle anterior (Fig. 4.39b).

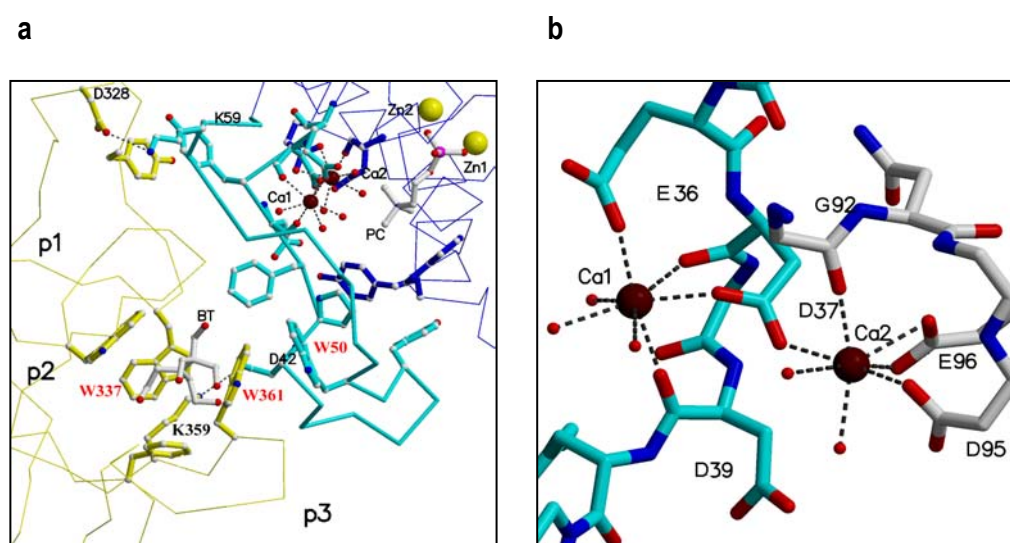


Figura 4.39. Interacciones entre módulos y sitios de unión a calcio en Pce. **a.** Interacciones más importantes entre el módulo catalítico (azul oscuro) y el CBM (amarillo) mediadas por el bucle constituido por los residuos 36-61 (azul claro). Los residuos de calcio y cinc se indican con bolas rojas y amarillas, respectivamente. Los residuos implicados en la interacción intermolecular se representan mediante bolas y bastones, así como las moléculas de BIS-TRIS (BT) y de PC. Los residuos en rojo participan en la estabilización del sitio de unión a colina. **b.** Representación de los centros de calcio. La coordinación (bipirámide pentagonal) de los átomos de calcio se indica con trazos discontinuos, y los grupos implicados se representan con bolas y bastones siguiendo el mismo código que en **a.**

Las principales interacciones mediadas por dicho bucle tienen lugar mediante un sistema de tipo 'cremallera', en el que los residuos aromáticos de ambos módulos se van alternando (Fig. 4.39a). La interacción que se produce entre el W50 (residuo del bucle) y el W361 (residuo de la repetición p3 del CBM) ayuda a posicionar el sitio de unión a colina formado por las repeticiones p2 y p3, ya que el W361 también interacciona con el W337 (residuo conservado en la repetición p2), haciendo que dicho sitio se sitúe a unos 22 Å del centro activo (Figs. 4.39a y 4.30).

Por último, la presencia de dos puentes salinos entre D42-K359 y K59-D328 ayuda a reforzar las interacciones entre ambos módulos. Los dos átomos de calcio estructurales tienen una coordinación de bipirámide pentagonal. El Ca1 está situado al comienzo del bucle (residuos 36-61) y se coordina con los residuos D37 (O), D37 (O δ 1) y tres moléculas de agua, formando la base de la bipirámide pentagonal, mientras que en las posiciones apicales se colocan los residuos E36 (O ϵ 2) y D39 (O). En el caso del Ca2, sólo el residuo D37 (O δ 2) pertenece al bucle anterior y actúa como ligando bidentado de los dos átomos de calcio, fortaleciendo la interacción entre el bucle y el módulo catalítico. Los otros ligandos implicados en la coordinación del Ca2 son: G92 (O δ 2), D95 (O δ 1), E96 (O ϵ 2), y tres moléculas de agua (Fig. 4.40).

Los contactos del bucle dan cuenta de la mayor parte de los 1985 Å² de la superficie de Pce ocluida en la interfase de ambos módulos y extienden la superficie del sitio catalítico de Pce hacia el sitio de unión a colina formado por las repeticiones p2 y p3, manteniendo al mismo tiempo el fuerte carácter ácido de la cavidad catalítica (Fig. 4.34).

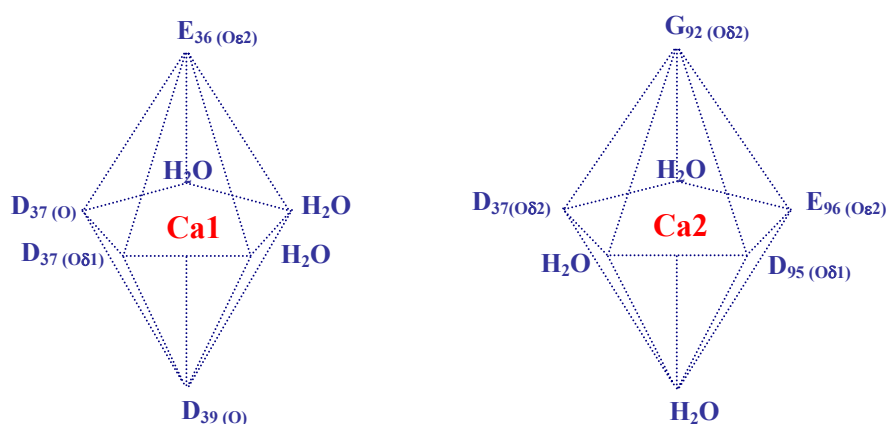


Figura 4.40. Coordinación de tipo bipirámide pentagonal de los átomos de Ca²⁺ (rojo) en la molécula de Pce.

4.4.5. UNIÓN DE Pce A LA CADENA DE ÁCIDO TEICOICO

La presencia de PC y análogos de colina unidos a la estructura cristalina de Pce, y el hecho de que se haya resuelto la estructura, en solución acuosa, de un fragmento de ácido teicoico formado por cinco repeticiones de la unidad pentasacárida básica (Klein *et al.*, 1996), ha permitido construir un modelo del complejo Pce:teicoico (Fig. 4.41; sección 3.2.7.11). El

fragmento de ácido teicoico se acomoda a la gran cavidad que se genera entre el sitio activo y la región N-terminal del módulo de unión a colina, de tal forma que el residuo de PC que va a ser hidrolizado interaccionaría con los dos átomos de cinc, mientras que los residuos de PC correspondientes a las siguientes unidades de teicoico se podrían acomodar en los sitios de unión localizados entre las repeticiones p2-p3, y p5-p6 (Fig. 4.41a).

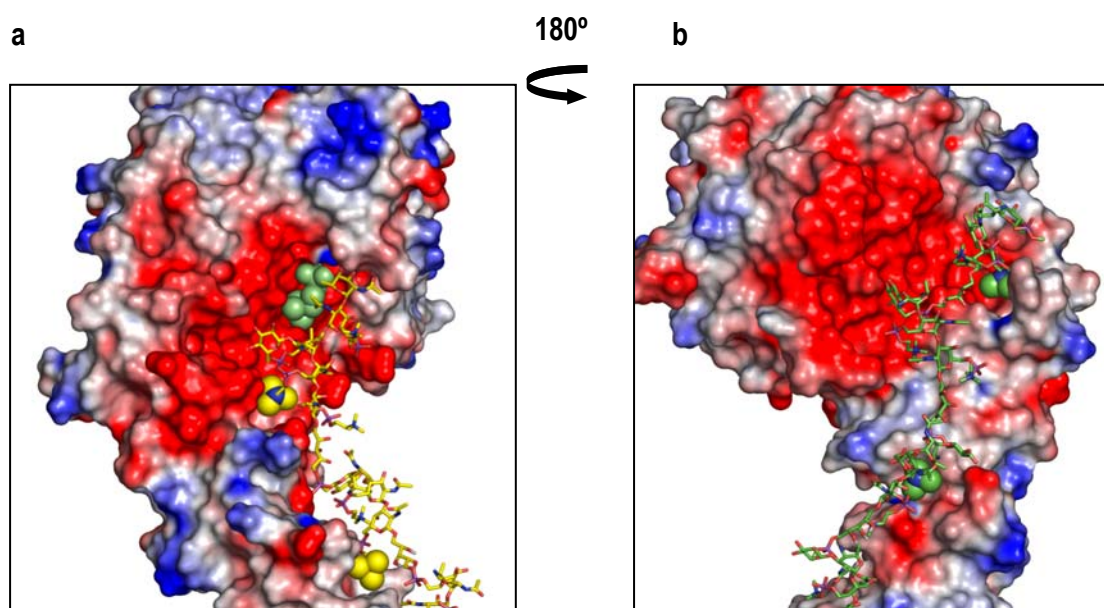


Figura 4.41. Complejos Pce-teicoico. En la figura **a** se representa la unión de la cadena de teicoico (amarillo) con los residuos de PC unidos al centro activo (bolas verdes) y a los sitios generados entre p2-p3 y p5-p6 (bolas amarillas). En **b** se muestra la unión de la cadena de teicoico (verde) al sitio no canónico situado en la parte posterior del centro activo (repetición p1) y el sitio localizado entre las repeticiones p3-p4. Las moléculas de PC se representan con bolas verdes.

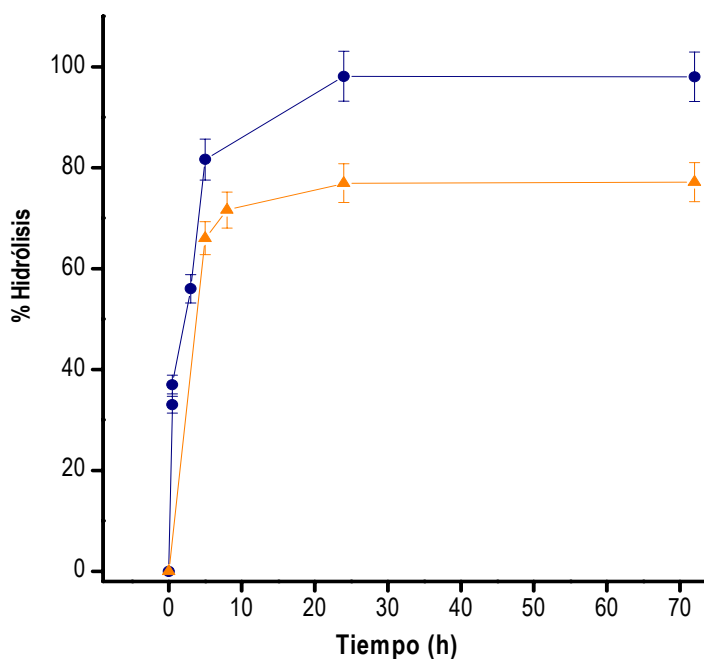
El análisis estructural indica que para poder satisfacer los requerimientos estereoquímicos del residuo de PC que va a ser hidrolizado y, a la vez, acomodar la cadena saliente de ácido teicoico se tendría que producir un cambio en la conformación del anillo de NAcGal, portador del residuo de PC que va a ser hidrolizado.

Todo esto indica que la hidrólisis de los residuos de PC está limitada por la configuración del sitio activo de Pce, de tal forma que solamente los residuos de PC situados al final de las cadenas de los ácidos teicoicos son accesibles al mismo. Este hecho explicaría por qué Pce sólo elimina un porcentaje determinado ($\cong 30\%$) de los residuos de PC de la pared celular de neumococo. Por otra parte, el sitio no canónico de la repetición p1, situado detrás del

sitio activo, muestra una accesibilidad excelente (Fig. 4.41b) por lo que la enzima podría interactuar con residuos de PC provenientes de otros neumococos o de compuestos del hospedador.

4.4.6. HIDRÓLISIS DE *n*-DODECILFOSFORILCOLINA Y PAF POR Pce

Para comprobar la hipótesis de que los residuos de PC unidos al centro activo de Pce pudiesen proceder de la hidrólisis de la *n*-dodecilfosforilcolina utilizada en la cristalización, se estudió la evolución con el tiempo de muestras incubadas con Pce mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). En paralelo se analizó la posible degradación de muestras de *n*-dodecilfosforilcolina incubadas en ausencia de enzima (sección 3.2.2.3 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 4.42, un 72% del detergente era hidrolizado en 8 horas.



La molécula de *n*-dodecilosforilcolina tiene una gran similitud química con el factor de activación plaquetaria, PAF (Fig. 4.43). Como se ha indicado en la Introducción, el PAF es un fosfolípido de bajo peso molecular que está implicado en la señalización intercelular en una gran variedad de situaciones fisiológicas (Chao y Olson, 1993). Considerando este hecho, y la funcionalidad de sus receptores en el mecanismo de invasión de neumococo, se procedió a comprobar si Pce era capaz de hidrolizar también dicho compuesto. Como se muestra en la Figura 4.42, el 82% del PAF es hidrolizado en 5 horas por Pce cuando se incubaba en condiciones similares a las utilizadas para seguir la degradación de la *n*-dodecilosforilcolina, alcanzándose el máximo (98%) en 25 horas.

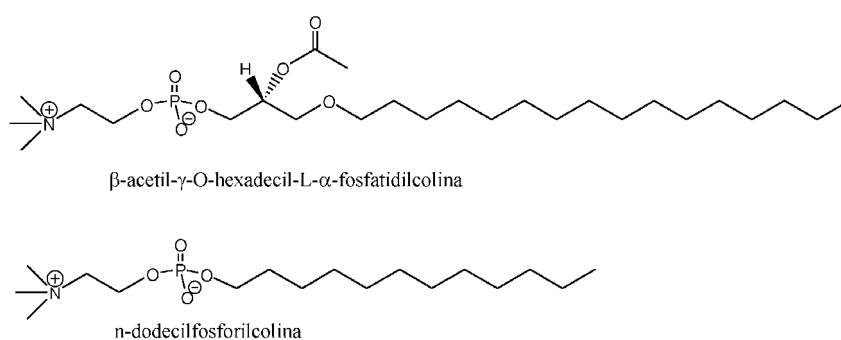


Figura 4.43. Estructuras químicas del PAF (parte superior) y del detergente *n*-dodecilosforilcolina (parte inferior).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Pce: UNA METALO-FOSFODIESTERASA DEPENDIENTE DE CINC

Pce es una metalo-fosfodiesterasa con un centro catalítico binuclear constituido por dos cationes Zn^{2+} , tal y como demuestran los resultados experimentales obtenidos por ICP-OES y la estructura cristalográfica. Tanto el plegamiento encontrado para el módulo catalítico como la detección de cinc confirman la inclusión previa de esta enzima en la familia de las metalo- β -lactamasas (grupo 9; Daiyasu *et al.*, 2001). La saturación de los dos sitios de unión al metal es fundamental para la actividad de la enzima, como muestran la caída en la actividad cuando la estequiometría es inferior a 2 equivalentes de Zn^{2+} /mol de Pce (Tabla 4.12) y su inactivación total al producirse su disociación completa (Fig. 4.1). Por otra parte, la difícil y lenta eliminación del cinc (diálisis extensiva con alta concentración de EDTA) indica una afinidad elevada entre la proteína y el cofactor metálico. Además, el hecho de que Pce mantenga unidos los dos átomos de cinc durante la purificación, independientemente de que ésta se realice en ausencia o en presencia del metal, sugiere que los cationes Zn^{2+} son capturados por la enzima durante el crecimiento bacteriano y una vez unidos al centro activo son difícilmente intercambiables.

Por otra parte, la actividad de Pce es inhibida competitivamente cuando se emplean altas concentraciones de cinc en presencia de determinados tampones. Este hecho sugiere que Pce es capaz de captar equivalentes adicionales del metal en la proximidad del sitio activo, aunque la unión requiere la participación de otras moléculas, como el HEPES, que podrían mediar o estabilizar el complejo formado. En este sentido, existe un número significativo de cinc-metaloenzimas y de enzimas independientes de metales que son inhibidas por cinc, aunque el mecanismo de inhibición no está perfectamente establecido en muchos de los casos (Auld, 2001b). Así, en la carboxipeptidasa A y la termolisina, activas con un solo átomo de cinc, la inhibición es de tipo competitivo, dependiente del pH, y la forma activa del inhibidor es el complejo $Zn(OH)^+$. Su unión desplaza a la molécula de agua catalítica inicialmente unida al cinc del sitio activo (Auld, 2001b), y la coordinación de la molécula de $Zn(OH)^+$ entrante se completa con un residuo ácido de la proteína y un anión cloruro, el cual potencia la inhibición del átomo de cinc (Larsen y Auld, 1991). Este tipo de complejos inhibitorios parecen ser importantes en procesos biológicos asociados a enzimas que contengan átomos pesados (Auld, 2001b).

Aunque en el caso de Pce no existen evidencias del tipo de complejo inhibitorio formado, el grupo sulfónico presente en las moléculas de HEPES y PIPES podría actuar como donador, estabilizando la unión de nuevos equivalentes de cinc al centro activo.

Además de cinc, Pce contiene dos iones Ca^{2+} que permanecen unidos a la enzima tras diálisis exhaustiva en tampones con altas concentraciones de EDTA, y que no tienen una influencia directa en la actividad, lo que sugería una función de tipo estructural para dicho metal. Esta hipótesis fue validada tras la resolución de la estructura cristalográfica (Fig. 4.30), dada la localización de los dos átomos de calcio en la interfaz generada entre el módulo catalítico y el módulo de unión a colina (Hermoso *et al.*, 2005).

La estructura tridimensional muestra que Pce está correctamente plegada y su desnaturalización térmica es irreversible, presentando dos grandes picos a 44,7 °C y a 60,8 °C que son identificados mediante la asignación del segundo a la desnaturalización del módulo catalítico, por producirse a la misma temperatura que el máximo de actividad encontrado en la representación de Arrhenius (Figs. 4.11 y 4.12).

5.2. ESTRUCTURA Y MECANISMO CATALÍTICO

El módulo catalítico de Pce presenta un plegamiento de tipo sándwich $\alpha\beta\text{-}\beta\alpha$ y, como ocurre en las demás enzimas de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, ambas mitades pueden superponerse mediante rotación a través de un eje central, lo que sugiere que puedan provenir de una duplicación genética (Massova, y Mobashery, 1998). A pesar de la gran divergencia existente entre las secuencias de las proteínas y de los diferentes tipos de reacciones que catalizan, la existencia de motivos conservados y un patrón global de plegamiento similar, han permitido su clasificación en una superfamilia, sugiriéndose un origen evolutivo común (Daiyasu *et al.*, 2001; Garau *et al.*, 2005b).

En un estudio paralelo realizado durante el transcurso de este trabajo, la estructura del módulo catalítico aislado de Pce ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Garau *et al.*, 2005b). El plegamiento del mismo es idéntico en ambas estructuras, aunque la asignación de la función realizada por el bucle al que se unen los iones calcio (residuos 30-61) es errónea. La ausencia del módulo de unión a colina en la estructura de Garau *et al.* (2005) impide ver el

papel de interfase que juega esta región de la proteína al empaquetarse entre ambos módulos (sección 4.4.4). Este hecho, unido a la presencia de un gran bucle que cubre la cavidad del sitio activo tras la unión del sustrato a las enzimas del grupo 1 (metalo- β -lactamasas) les llevó proponer un papel similar para la región de Pce comprendida entre los residuos 30-61.

5.2.1. COMPARACIÓN DEL CENTRO METÁLICO DE Pce CON EL DE OTRAS ENZIMAS RELACIONADAS

La conservación en secuencia de los residuos que constituyen la primera esfera de coordinación de los átomos de cinc en la superfamilia de las metalo- β -lactamasas no es completa, encontrándose diferencias entre proteínas de un mismo grupo. En la Tabla 5.1 se muestran los ligandos de coordinación del cinc de las proteínas resueltas que pertenecen a dicha familia. Como puede observarse, los ligandos del Zn1 están conservados en la mayoría de las estructuras, pudiendo destacarse, sin embargo, la ausencia de metal en la β -lactamasa de *Aeromonas hydrophila* (subclase β 2; Garau *et al.*, 2005a), y la sustitución de la H196 (numeración basada en las β -lactamasas) por la N183 en Pce. Sin embargo, los ligandos del Zn2 son más variables. En las β -lactamasas de las subclases β 1 y β 2, la coordinación se completa con la C221, la H263 y una molécula de agua (en la mayoría de los casos), mientras que en la β -lactamasa L1 de *X. maltophilia* (subclase β 3) el residuo de cisteína es sustituido por la H121, contigua al aspártico donador (Ullah *et al.*, 1998). La coordinación en los grupos 2 (glioxalasa II humana), 6 (RNasa Z) y 9 (Pce) es equivalente a la de la β -lactamasa de *X. maltophilia* aunque, en ellas, además de la molécula de agua, un aspártico coordina simultáneamente ambos metales (Figs. 1.11y 5.1). En la RRO de *D. gigas* (grupo 3), el residuo de histidina (H84 en la numeración de RRO) no actúa como donador del Fe2, a pesar de estar conservado, y es sustituido por una molécula de agua, manteniéndose la coordinación simultánea de los dos núcleos de hierro por un residuo ácido (D54).

Como se indica en la Introducción (sección 1.6), la presencia de un residuo, generalmente ácido, y de una molécula de agua que coordina simultáneamente los dos átomos metálicos es una característica general de los centros binucleares cocatalíticos que contienen cinc (Auld, 2001a). Por el contrario, en los centros catalíticos (activos con un equivalente de

dicho metal) sólo se ha detectado la presencia de la molécula de agua/ión hidróxido actuando como ligando del metal. Como puede observarse en la Figura 5.1 y en la Tabla 5.1, todas las estructuras resueltas de la familia de las metalo- β -lactamasas, salvo las correspondientes al grupo 1, muestran centros binucleares cocatalíticos entrecruzados por un aspártico. En este sentido, la estructura del centro bimetálico de Pce apoya los resultados de actividad que indicaban que los dos átomos de cinc eran necesarios para la actividad de Pce.

Tabla 5.1. Ligandos de coordinación de los átomos de cinc en Pce y otras enzimas con plegamiento tipo metalo- β -lactamasa de estructura conocida. Los residuos de las enzimas del grupo 1 se numeran siguiendo la nomenclatura utilizada para las metalo- β -lactamasas; entre paréntesis se indica la subclase a la que pertenecen.

Nombre	Código PDB	Residuos coordinación Zn1	Residuos coordinación Zn2
<i>Pce de S.pneumoniae</i>	12IB	H85; H87; N183; D203	D89; H90; H229; D203
β 1 de <i>Bacillus cereus</i>	1BC2	H116; H118; H196; H ₂ O (1)	D120; C221; H263; H ₂ O(1); H ₂ O (2)
β 1 de <i>Bacteroides fragilis</i>	1ZNB	H116; H118; H196; H ₂ O (1)	D120; C221; H263; H ₂ O (1); H ₂ O (2)
β 1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1JJE	H116; H118; H196	D120; C221; H263; H ₂ O (1)
β 1 de <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1M2X	H116; H118; H196	D120; C221; H263
β 2 de <i>Aeromonas hydrophila</i>	1X8G	*	D120; C221; H263
β 3 de <i>Xanthomonas maltophilia</i>	1SML	H116; H118; H196; H ₂ O (1)	D120; H121; H263; H ₂ O (1); H ₂ O (2)
β 3 de <i>Fluoribacter gormanii</i>	1K07	H116; H118; H196; H ₂ O (1)	D120; H121; H263; H ₂ O (1)
<i>Glioxalasa II humana</i>	1QH5	H54; H56; H110 D134; H ₂ O (1)	D58; H59; H173 D134; H ₂ O (1)
<i>ROO de D. gigas</i>	1E5D	H79; E81; H146 D165; H ₂ O (1)	D83; H226; H ₂ O (2) D165; H ₂ O(1)
<i>RnasaZ de Bacillus subtilis</i>	1Y44	H63; H65; H140 D211; H ₂ O(1)	D67; H68; H269 D211; H ₂ O (1)

Los ligandos conservados de GOX, RnasaZ, ROO, y Pce ocupan posiciones equivalentes en la secuencia respecto al grupo 1, a pesar de la diferente numeración de los residuos. Ver Figura 1.11 de Introducción. *El Zn1 puede unirse a la enzima dando lugar a una inhibición de la actividad.

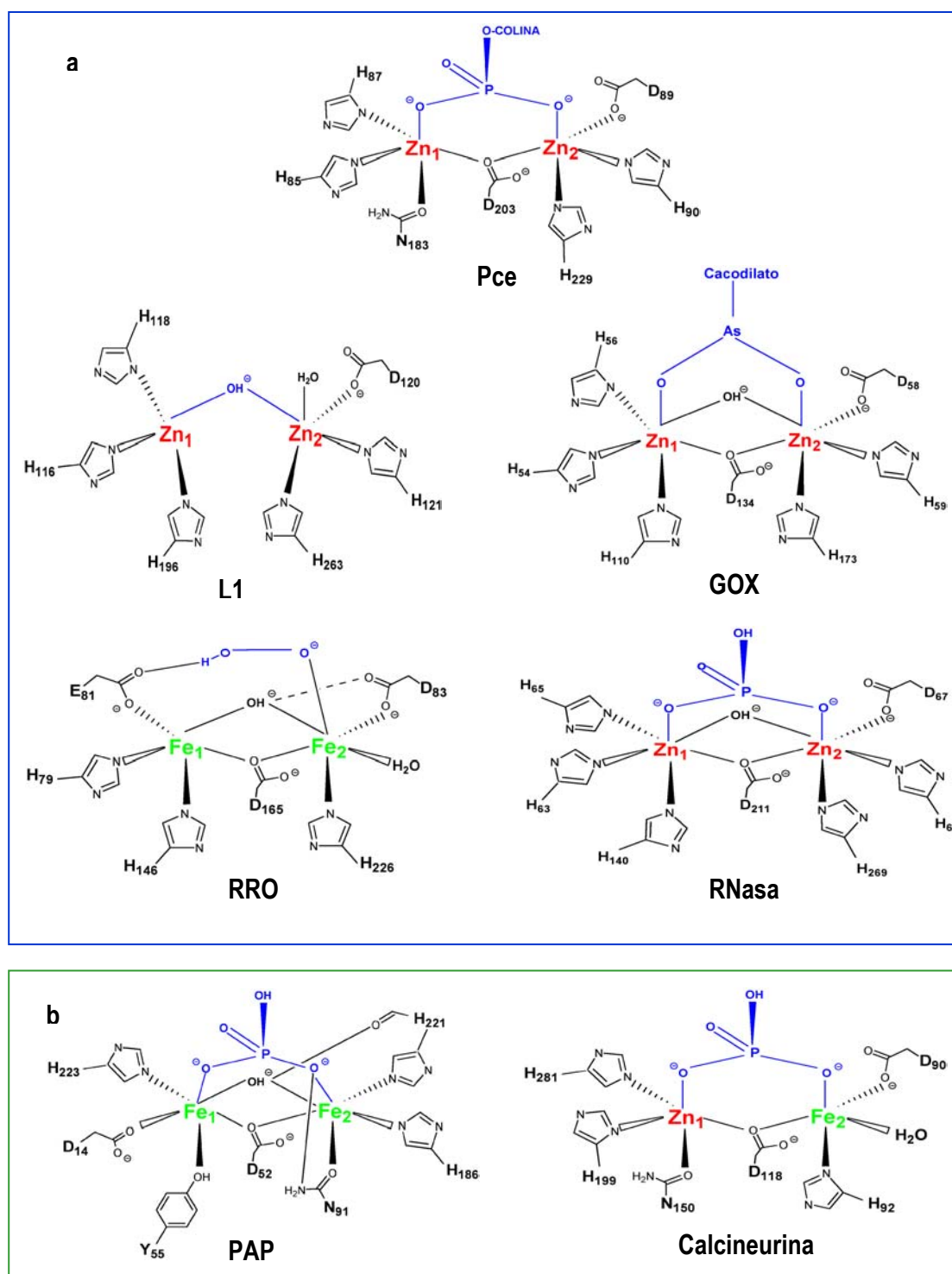


Figura 5.1. Comparación del centro metálico de Pce con los de enzimas de la familia de las metalo-β-lactamasas (a) y de las fosfatases (b). Esquema de coordinación del centro binuclear de las enzimas Pce; metalo-β-lactamasa de *Xanthomonas Maltophilia*, L1, (código PDB 1SML); glioxalasa II humana, GOX, (código PDB 1QH5); rubredoxín oxígeno: oxidoreductasa, ROO, (código PDB 1E5D); proteína de procesamiento del ARN-t, RNasa Z, (código PDB 1Y44); fosfatasa ácida púrpura, PAP, (código PDB 1UTE), y calcineurina (código PDB 1AUJ).

La principal diferencia a nivel del centro activo entre la molécula completa de Pce y del módulo catalítico aislado reside en la sustitución de los átomos de cinc por hierro en este último (Garau *et al.*, 2005). En nuestro caso, solamente se detectó la presencia de trazas de hierro en algunas de las muestras empleadas, y la ausencia de este metal en el centro activo de las muestras de Pce utilizadas en el presente estudio se confirmó, además, por la ausencia de las señales anómalas del hierro en el mapa diferencia de Fourier obtenido del pico de absorción del ligando de gadolinio. Por otra parte, los resultados de reconstitución con Fe^{2+} muestran que Pce, en principio, podría ser activa con centros cinc/cinc, hierro/hierro, y quizás hierro/zinc como ocurre en la glioxalasa II de *Arabidopsis thaliana* (Schilling *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2004), y en la fosfatasa ácida púrpura (Guddat *et al.*, 1999; Sträter *et al.*, 1995). Sin embargo, la inactivación que se produce cuando el Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} (proceso rápido sino se incluyen agentes reductores) o cuando se reconstituye en presencia de Fe^{3+} indica que para que la enzima fuese activa con hierro como cofactor, este metal tendría que mantenerse en su estado reducido, limitando así su actuación a medios anaerobios, como ocurre en el caso de la RRO, ya que la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} se produce de forma rápida en ausencia de agentes reductores. Por otra parte, a diferencia del hierro, el cinc posee la ventaja de ser una especie iónica estable en el medio biológico, donde el potencial redox se mantiene en flujo constante (Auld, 2001b).

5.2.1.1. Comparación de los centros bimetalicos de Pce y la Glioxalasa II humana

Las geometría de coordinación del centro metálico en la mayoría de las metalo- β -lactamasas es tetraédrica para el primer átomo de cinc y de tipo bipirámide trigonal para el segundo (Wang *et al.*, 1999), aunque se han descrito coordinaciones octaédricas o piramidales de base cuadrada en la glioxalasa II (Cameron *et al.*, 1999) y pseudo-octaédricas para la RNasa Z (de la Sierra-Galay *et al.*, 2005). En Pce, la geometría de coordinación encontrada es piramidal con la base cuadrada distorsionada, similar a la que presenta una de las estructuras resueltas de la glioxalasa II (Fig. 4.35).

La glioxalasa II humana y la recientemente resuelta RNasaZ son las enzimas que mayor similitud muestran con Pce en cuanto al centro bimetalico. La glioxalasa II forma parte de un sistema que cataliza la conversión de los oxoaldehidos (compuestos tóxicos) a los

correspondientes ácidos carboxílicos, utilizando glutation como coenzima. Dicha enzima cataliza la reacción de hidrólisis del tiol-éster generado en la primera etapa de la cadena de reacciones para producir los ácidos hidroxicarboxílicos y el glutation. La glioxalasa II humana se ha cristalizado en ausencia y en presencia de un análogo del sustrato lentamente hidrolizable, obteniéndose diversas estructuras en las que el centro activo contiene iones acetato y cacodilato, el sustrato o el producto de la reacción (Cameron *et al.*, 1999). Las pequeñas diferencias entre las distintas formas cristalizadas afectan al tipo de coordinación, pudiendo ser de tipo 5 (Zn1 en presencia del sustrato) o 6 (Zn1 y Zn2 en el complejo con cacodilato/acetato y con el análogo del producto), aunque en todos los casos se observan siete residuos de proteína idénticos y una molécula de agua interaccionando con los iones cinc (Fig. 5.1 y Tabla 5.1). A pesar de las distintas coordinaciones, son muy pequeños los cambios encontrados en las posiciones de los ligandos de la proteína con respecto a los átomos metálicos (Cameron *et al.*, 1999). En el caso de la estructura con cacodilato, la coordinación octaédrica de cada metal se completa con átomos de oxígeno de este ión (Fig. 5.1), mientras que en el complejo formado con el análogo del producto uno de los oxígenos del cacodilato es reemplazado por una molécula de agua y el otro por el azufre del glutation. De manera análoga la coordinación de los átomos de cinc en el complejo Pce:PC se completa con dos oxígenos del grupo fosfato de la PC. En la Figura 5.2 se muestra una superposición de los centros metálicos de ambas enzimas, que es prácticamente idéntica al que se obtiene con la RNasa Z (datos no mostrados).

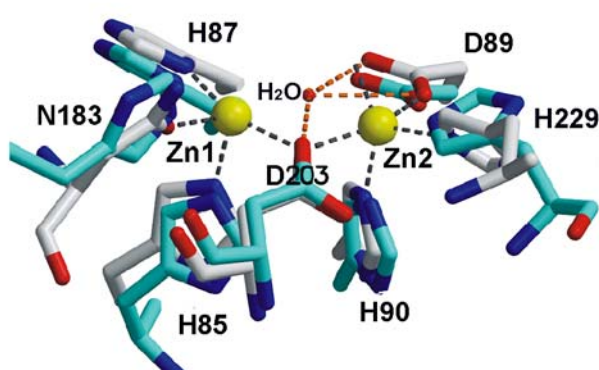


Figura 5.2. Superposición de los centros bimetalicos de Pce y glioxalasa II humana. En azul se representan los residuos de coordinación del cinc en la glioxalasa II y en gris los de Pce y sus interacciones (rayas discontinuas). Además, se incluye la molécula de agua unida al centro activo de la glioxalasa II y sus posibles contactos (líneas discontinuas en naranja) con los residuos de Pce.

Como se puede observar los residuos que forman la primera esfera de coordinación del cinc ocupan posiciones equivalentes en ambas enzimas. La principal diferencia es, como ya se ha mencionado, la sustitución de la H110 en GOX por la N183 en Pce.

5.2.2. GRUPOS RELEVANTES EN LA CATÁLISIS y MECANISMO CATALÍTICO

El mecanismo de reacción actualmente aceptado para la hidrólisis del enlace fosfoéster actualmente aceptado por las cinc-metalo-fosfatasa es de tipo aditivo con un ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo, en el que el grupo que ejerce el ataque se posiciona a 180° del grupo saliente (Lipscomb y Sträter, 1996; Wilcox, 1996). Este tipo de ataque se denomina 'en línea' y da lugar a la formación de un intermedio con una configuración de tipo bipirámide-trigonal, con el átomo de fósforo en el centro y los grupos entrante y saliente en posiciones axiales (Knowles, 1980). En los centros bimetálicos donde se producen este tipo de reacciones el grupo atacante es, normalmente, la molécula de agua o ión hidróxido que coordina simultáneamente a los dos átomos de cinc. Esta molécula está ausente en la estructura cristalográfica del complejo Pce:PC, un hecho que podría ser debido a la presencia de PC (uno de los productos de la reacción) en el sitio catalítico. En este sentido, se ha observado que la unión de análogos de sustrato a la fosfolipasa C desplaza al ión hidróxido del centro metálico (Hansen *et al.*, 1992).

Por otra parte, la presencia de la molécula de PC en la forma cristalizada de Pce, ha permitido la construcción de un modelo con el sustrato empleado en las medidas de actividad (NPPC) en el sitio activo. La Figura 5.3a muestra cómo el grupo saliente (*p*-nitrofenol) del sustrato sólo puede ser colocado en la posición ocupada por el oxígeno de la PC que interacciona con la H228. Los otros dos oxígenos se unen directamente a los átomos de cinc, contribuyendo a neutralizar la carga negativa del fosfato, y haciendo al átomo de fósforo más susceptible al ataque nucleofílico, mientras que el D89 y el W123 estabilizan la carga positiva del grupo trimetilamonio mediante una interacción electrostática y de tipo catión- π , respectivamente (Fig. 5.3a).

Cuando se realiza la superposición del modelo Pce:NPPC con el centro metálico de la glicoxalasa II humana (Fig. 5.3b) se observa que la molécula de agua/ión hidróxido unida al centro metálico en la enzima humana se encontraría en posición óptima para realizar el ataque

nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster del NPPC, formando un ángulo de 161° con el enlace formado entre el fosfato y el oxígeno del *p*-nitrofenol, quedando el grupo saliente orientado hacia el solvente.

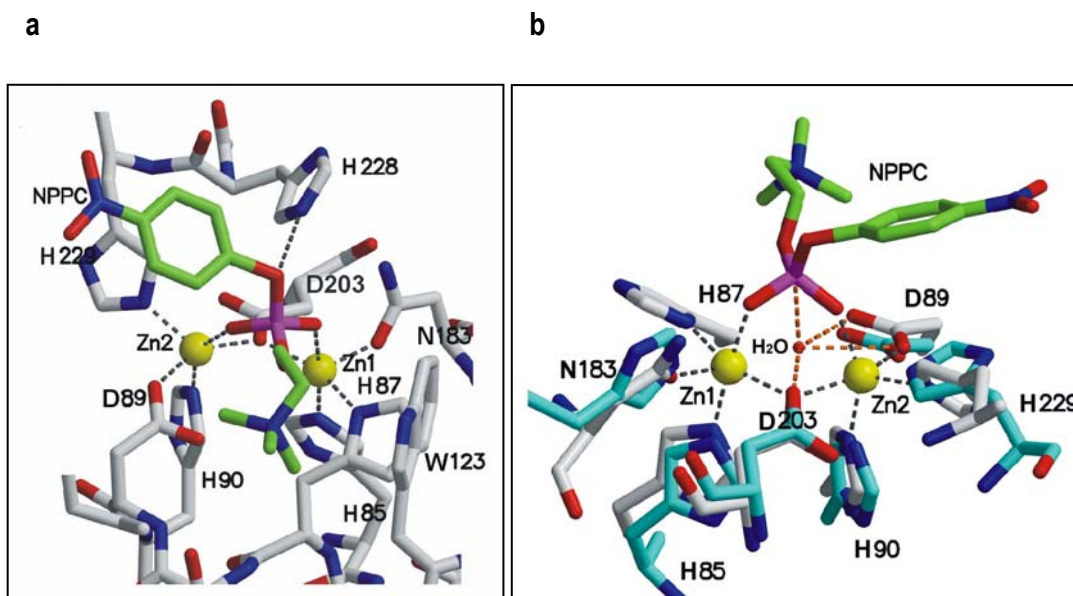


Figura 5.3. Modelo generado para el complejo Pce:NPPC. En **a** se representan, mediante líneas discontinuas, los contactos de los átomos de cinc y del NPPC (verde) con los residuos de Pce. **b.** Vista superior de la superposición del modelo Pce:NNPC (gris y verde) con el centro catalítico de la glicoxalasa II humana (azul; código PDB 1QH3).

La molécula de agua transferida al centro activo de Pce en una posición equivalente a la de la glicoxalasa II, se encontraría a la distancia adecuada para formar puentes de hidrógeno con el D203 (O δ 1) y con el D89 (O δ 1 y O δ 2), (Fig. 5.3b). Estos residuos de carácter ácido contribuirían a orientar dicha molécula y a mantener fija su posición, reduciendo así la barrera entrópica necesaria para realizar el ataque nucleofílico sobre el sustrato (Christianson y Cox, 1999).

La dependencia de la actividad enzimática con el pH sugiere la presencia de dos eventos de desprotonación relevantes para la hidrólisis del NPPC (Fig. 4.8). Los valores de pK_a para la enzima libre ($\cong 7,2$) se encuentran en el rango descrito para las histidinas, aunque también podría representar a carboxilatos, moléculas de agua unidas a Zn^{2+} o la combinación de ambas posibilidades (Auld *et al.*, 1986; Bounaga *et al.*, 1998). La disminución de la K_m tras la primera desprotonación sería consistente con la implicación del D89 en este proceso, debido a

la interacción electrostática que se establece con el grupo trimetilamonio del sustrato (Fig 5.3). Por otra parte, se ha propuesto que el aminoácido equivalente en la glioxalasa II (D58) y las β -lactamasas (D120) actuaría orientando a la molécula de agua/ion hidróxido mediante un puente de hidrógeno (Fig. 5.2). Este residuo modifica su pK_a para que la molécula de agua/hidróxido unida al metal realice el ataque nucleofílico sobre el enlace C-S (glutacion) o el enlace C-N (antibióticos β -lactámicos) (Cameron *et al.*, 1999; Rasia y Vila, 2002; Garrity *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2005). En Pce, el pK_a de 5,3 encontrado para el complejo enzima-sustrato podría reflejar la ionización de la molécula de agua unida al metal, que estaría formando un puente de hidrógeno con el D89. El hecho de que se hayan descrito en diferentes centros cocatalíticos valores de pK_a en el rango de 4 a 6 para la desprotonación de la molécula de agua unida al metal, cuando el proceso es asistido por residuos de la primera y segunda esfera de coordinación del metal (Auld, 2001b), refuerza la asignación del pK_a de 5,3 a la triada 'agua-cinc-D89'. Además, hay que destacar que la acidez de la molécula de agua unida al metal es dependiente de la naturaleza de los ligandos metálicos y del número de coordinación de éste (Auld, 2001b).

El segundo proceso de desprotonación da lugar a un aumento de la k_{cat} y K_m a pH básico (Figs. 4.6 y 4.7). La estructura del centro catalítico muestra cómo la H228 está a una distancia correcta para poder formar un puente de hidrógeno (2,74 Å) con el oxígeno del enlace que se va a hidrolizar (Fig. 5.3a), luego la pérdida del protón de la histidina dificultaría la formación de este puente de hidrógeno y por tanto la unión del sustrato.

Por otra parte, en el proceso de hidrólisis del intermedio de la reacción, la desprotonación de la H228 podría acelerar la liberación del producto (PC) del sitio activo, explicando así la dependencia de la k_{cat} de un segundo grupo con un pK_a en torno a 8,5. El colapso hacia el producto del intermedio penta-coordinado formado durante la hidrólisis del sustrato natural, TA y LTA requiere la protonación del residuo de N-acetil-galactosamina del (lipo)teicoico por un ácido general. 'A priori', no existe un residuo obvio en la estructura Pce:PC o en el modelo Pce:NPPC, que pudiese ejercer dicha acción, aunque la red de puentes de hidrógeno establecida entre los residuos H87-agua-D181, conservada en la glioxalasa II, podría actuar como un de captación de protones en las proximidades del sitio activo para transferirlos hacia el grupo saliente. En el mecanismo propuesto para la anhidrasa carbónica se ha descrito un sistema de este tipo, en el que la transferencia de un protón del fondo de la cavidad catalítica

a la superficie es un proceso mediado por grupos de la proteína no implicados en el centro catalítico y por moléculas de tampón (Silverman y Tu, 1986). Otra posibilidad sería que uno de los átomos de cinc actuase como ácido general coordinando el grupo saliente. Sin embargo, la distancia entre el oxígeno del enlace a hidrolizar y los cationes Zn^{2+} en el modelo Pce:NPPC es demasiado grande ($\cong 4,4 \text{ \AA}$) para un enlace Zn-O, por lo que la primera posibilidad parece la más probable.

Teniendo cuenta las informaciones cinética y estructural, el mecanismo que se propone en la hidrólisis de NPPC por Pce es el siguiente (Fig. 5.4):

En primer lugar, se uniría el sustrato al centro activo mediante interacciones electrostáticas entre el grupo fosfato del sustrato y los iones cinc, siendo este proceso asistido por el D89 y el W123, que se encargarían de estabilizar el residuo de colina. A continuación, los oxígenos libres del fosfato se unirían a los átomos de cinc, haciendo que el fósforo sea más susceptible al ataque debido a la polarización del fosfato. Por otra parte, la molécula de agua, orientada mediante un puente de hidrógeno con el D89 y, probablemente, también con el D203, se posiciona en línea con el enlace éster que va a ser hidrolizado y produce el ataque sobre el átomo de fósforo. El intermedio es estabilizado por las interacciones con los iones cinc y con la H228, y tras la formación de los productos de reacción las repulsiones entre la PC y el *p*-nitrofenolato facilitarían la liberación de este último del centro activo, que iría seguida de la disociación de la PC. De acuerdo con este mecanismo, la unión del NPPC favorecería la ionización cooperativa de la molécula de agua unida al metal y al D89 (agua-cinc-D89), disminuyendo su pK_a a un valor de 5,3 y estabilizando la forma monoprotónada del complejo enzima-sustrato (SEH) a pH neutro. Por el contrario, la unión del sustrato disminuye el valor de la constante del segundo proceso de deprotonación que, aunque aumenta la constante de hidrólisis, incrementa significativamente la K_m , haciendo que la eficacia catalítica sea máxima en torno a pH 7,4 (Fig. 4.8).

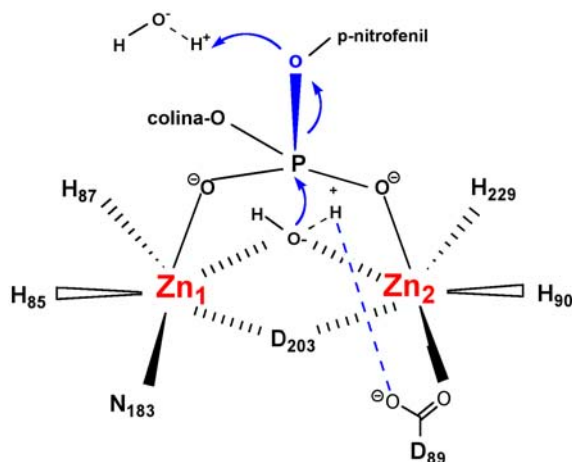


Figura 5.4. Mecanismo propuesto para la hidrólisis del NPPC por Pce.

5.2.3. INFLUENCIA DE LOS METALES Y DE SUS ESFERAS DE COORDINACIÓN EN EL MANTENIMIENTO DEL SITIO ACTIVO

Las interacciones que mantienen la estructura del centro binuclear no se restringen a los residuos directamente implicados en la coordinación de los átomos de cinc, sino que se extienden hasta esferas de coordinación superior. Así, la H90 se encuentra a distancia de puente de hidrógeno de otros ligandos del cinc como el D203 y el D89 que, a su vez, forman puentes de hidrógeno con la H85 y la H229, respectivamente, generando a una compleja red de coordinación entre los ligandos de los dos átomos de cinc. Por otro lado, el Zn2 forma parte de otra red de interacciones que comprende los residuos H229 y D19, siendo éste último el responsable de formar un puente salino con K225 e interactuar con la T252 (Fig 5.5). Además, la H90 es un aminoácido importante a la hora de establecer contactos con residuos altamente conservados en la familia, como son el D33 y la T84 (Cameron *et al.*, 1999; de la Sierra-Gallay *et al.*, 2005). Así, mutaciones en el D33 de la Rnasa Z inactivan la enzima lo que refleja la importancia del papel que desempeña en la arquitectura del centro catalítico en su conformación activa (de la Sierra-Gallay *et al.*, 2005).

Las interacciones secundarias con grupos capaces de formar puentes de hidrógeno (grupos orientadores) puede ser crítica para la formación y estabilización de los sitios de unión al cinc (Argos *et al.*, 1978). Este hecho hace que al generar el mutante H90A, no sólo se

produzca un cambio drástico en uno de los ligandos del Zn₂ sino que, además, se altere una amplia y compleja red de interacciones que abarca, en algunos casos, hasta la tercera esfera de coordinación del centro bimetálico.

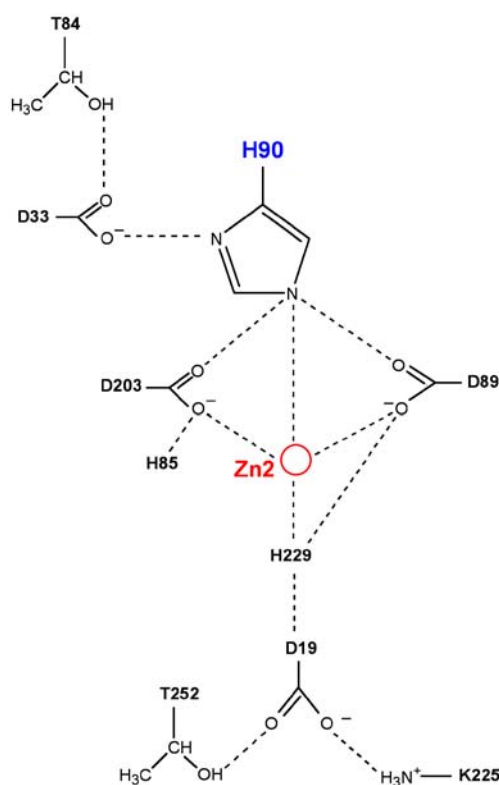


Figura 5.5. Red de coordinación de la H90.

La desestabilización del módulo catalítico que muestra la curva de desnaturalización del mutante H90A, con una disminución de $\cong 10^{\circ}\text{C}$ en la T_m (Fig.4.11), y la caída drástica que se produce en los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m (88% y 99% respectivamente) con respecto a Pce silvestre, refleja el gran cambio introducido en la arquitectura del sitio activo tras la mutación. Es interesante que, a pesar del cambio de aminoácidos, el mutante H90A tenga todavía la capacidad de unir los dos átomos de cinc a pH neutro/básico (Tabla 4.8), aunque la caída en la afinidad hacia el metal se pone de manifiesto por la pérdida de casi un equivalente de cinc a pH ácido como consecuencia de la dependencia de la constante de unión con el estado de protonación de las histidinas y carboxilatos que completan la esfera de coordinación del Zn₂. Un efecto similar se ha descrito para la metalo- β -lactamasa IMP-1 de *Serratia marcescens*

(Yamaguchi *et al.*, 2005), en la que la mutación del D210 (ligando del Zn²⁺) a alanina aumenta de la constante de disociación en un factor 3, aunque es capaz de mantener los dos átomos de cinc unidos. La pérdida de los dos átomos de cinc no solo produce la inactivación de Pce, sino que disminuye drásticamente la estabilidad del módulo catalítico como se refleja en la caída de aproximadamente 30°C que se produce en la temperatura de desnaturalización del mismo (Fig. 4.11). Este efecto da cuenta, nuevamente, de la relevancia de los contactos que se establecen entre los cationes Zn²⁺, sus ligandos, y los residuos que constituyen las segunda y tercera esferas de coordinación del centro activo.

5.3. RECONOCIMIENTO DE LA PARED BACTERIANA POR Pce

El reconocimiento de la pared bacteriana por Pce viene determinado por varios factores. En primer lugar, la estructura del CBM en forma de prisma triangular y la disposición de los sitios de unión a colina (Fig. 4.33) indican que Pce podría unir hasta tres cadenas diferentes de ácido teicoico. Una de ellas se situaría en la cara próxima al sitio activo y actuaría como sustrato, mientras que las otras dos mantendrían la enzima anclada a la pared celular. En segundo lugar, la interfaz generada entre los módulos es muy importante para el reconocimiento '*in vivo*' de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos ya que extiende la superficie de reconocimiento del centro activo hasta la tercera repetición del CBM, localizada a una distancia de 22Å del sitio activo, manteniendo el carácter fuertemente ácido del mismo.

El modelo Pce:teicoico representado en la Figura 4.41 muestra cómo los contactos entre la enzima y el sustrato, además de prolongarse hasta la repetición p3 del CBM, pueden extenderse hasta el sitio formado entre las repeticiones p5-p6. El conjunto de todas las interacciones creadas contribuiría a facilitar la orientación del residuo de 6-fosforilcolina-N-acetilgalactosamina en el sitio catalítico. Es interesante destacar cómo la pérdida de los residuos implicados en la unión de colina de la repetición p8 impide la creación de contactos adicionales entre esta cadena de teicoico y el CBM. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, es evidente que la disposición de ambos módulos es fundamental para la orientación y el reconocimiento del sustrato natural y, por tanto, que la organización modular de Pce es determinante para su actividad '*in vivo*'. En este sentido, estudios realizados con el N-terminal de Pce asilado muestran una actividad similar a la de la enzima completa frente a

sustratos solubles, aunque es prácticamente inactivo frente a paredes celulares de neumococo (de las Rivas, 2002). Por tanto, el CBM asiste a la orientación del sustrato en el centro activo, a la vez que mantiene a la proteína en contacto con los (lipo)TAs. Los resultados de este trabajo aportan, por primera vez, evidencias estructurales sobre el papel determinante que desempeña la organización modular de las mureín hidrolasas de neumococo en la actividad enzimática sobre paredes intactas.

Las fuertes interacciones existentes entre el módulo catalítico y la región N-terminal del CBM, reforzadas por la coordinación de los dos iones calcio, hace posible la asignación de la segunda transición (Fig. 4.10) observada durante la desnaturalización térmica de Pce a esta región de la proteína, particularmente cuando se considera su fuerte dependencia con la estabilidad del módulo catalítico (Fig. 4.11). En consecuencia, la transición observada en torno a 44.7 °C reflejaría la desnaturalización del resto de la estructura que forma el CBM.

Otra peculiaridad del CBM de Pce es la presencia de dos sitios adicionales de unión a colina no canónicos. La gran accesibilidad del sitio situado en la parte posterior del módulo catalítico (Figs. 4.38a y 4.41b), y la identificación de una molécula de Bis-Tris unida, sugiere la posibilidad de que pueda participar en fenómenos de agregación celular o la formación de 'biofilms' al interactuar con residuos de PC expuestos en la superficie de otros neumococos, y/o el reclutamiento de compuestos del hospedador que contuvieran PC. Por otra parte, su disposición espacial permitiría aumentar el número de posibles residuos de colina reconocidos a través de la cara del CBM situada en la parte posterior del sitio catalítico (Fig. 4.11b). El segundo sitio no canónico extiende el plegamiento de tipo solenoide del CBM hasta el extremo C-terminal, lo que indica que esta nueva adquisición podría optimizar el reconocimiento de las moléculas de PC de la pared celular (Fig. 4.38b). En resumen, mientras que la cara del CBM que prolonga la cavidad del sitio catalítico sólo tendría capacidad para reconocer tres residuos de colina, uno de ellos unido al sitio activo, la presencia de los sitios no canónicos podría incrementar hasta cuatro el número de residuos de colina presentes sobre cada una de las otras dos caras del CBM de Pce.

Las interacciones entre las moléculas de colina y sus sitios de unión son de tipo hidrofóbico y electrostático (catión- π), como ocurre en C-LytA y en Cpl-1 (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003) y de carácter poco energético como muestran los valores de ΔG calculados a partir las constantes de afinidad estimadas por ITC ($\Delta G_1 = -4,7 \pm 0,1$ kcal \cdot mol⁻¹ y

$\Delta G_2 = -3,6 \pm 0,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). En general, el proceso de reconocimiento de la pared por el CBM está potenciado por la creación de interacciones múltiples y poco energéticas (Medrano *et al.*, 1996; Monterroso, 2003) que facilitan la rotura y creación de nuevos enlaces y, por tanto, la difusión de las CBPs a través de la superficie celular sin necesidad de que la proteína se disocie completamente de la misma. Desde un punto de vista estructural podrían existir hasta 4 clases diferentes de sitios de unión a colina en Pce: el catalítico, los dos sitios no canónicos y los localizados en entre las repeticiones del CBM. El análisis de la curva de unión a colina generada por ITC es consistente con la presencia de dos clases de sitios de unión: la primera de ellas incluiría dos sitios aproximadamente equivalentes en cuanto a afinidad, mientras que la segunda (menor afinidad) incluiría hasta ocho sitios de unión. Aunque el mejor ajuste de la curva experimental se ha obtenido asumiendo un número total de sitios de unión igual a 10, lo que supone uno menos que el número de sitios posibles de acuerdo con la estructura, no se puede excluir que exista un sitio adicional, quizás con menor afinidad hacia colina. La constante de inhibición de la hidrólisis de NPPC por colina (0,94 mM; de las Rivas *et al.*, 2002) es del orden de los valores encontrados para los sitios de baja afinidad, por lo que la de mayor afinidad podría corresponder a la unión de colina a los dos sitios no canónicos. En este sentido, la presencia de un cuarto residuo aromático en la cavidad conformada entre la repetición p10 y la horquilla β de la cola C-terminal podría contribuir a potenciar el reconocimiento de colina.

El carácter multivalente de los complejos formados por la pared celular y las mureínas hidrolasas cuyos CBMs contienen seis repeticiones se ve potenciado por su capacidad para dimerizar, siendo este proceso favorecido en presencia de colina (Usobiaga *et al.*, 1996; Sáiz *et al.*, 2002; Varea *et al.*, 2005; Monterroso *et al.*, 2005). Los estudios de ultracentrifugación analítica muestran que Pce se comporta en disolución como un monómero en presencia y en ausencia de colina. Este hecho podría indicar que el aumento del número de repeticiones que conforman el CBM de Pce puede constituir un mecanismo alternativo a la dimerización en la optimización del reconocimiento de la pared. Un comportamiento parecido se ha encontrado en LytC, la lisozima codificada por neumococo, cuyo CBM contiene 11 repeticiones, aunque en este caso la proteína se encuentra completamente agregada en ausencia de colina (Monterroso *et al.*, 2005).

Una de las características funcionales más debatidas ha sido la capacidad limitada de Pce para hidrolizar un número limitado de residuos de PC de la pared celular (Höltje y Tomasz,

1974; de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001). Entre las hipótesis planteadas se encontraba la posibilidad de que la unión fuerte a la pared celular, a través del CBM, protegiese a los residuos de PC de su hidrólisis. Otras opciones sugerían la posible especificidad de la enzima para hidrolizar uno de los dos residuos de PC presentes en cada subunidad de TA o los localizados al final de las cadenas de TA y LTA. La estructura de Pce (Fig. 4.41) muestra que la disposición modular y la configuración del sitio activo son determinantes en la función de la enzima, de manera que solamente los residuos localizados al final de las cadenas de TAs pueden acceder al mismo. Por tanto, Pce podría modular la distribución espacial de los residuos de PC terminales, hidrolizando aquellos que facilitan el reconocimiento de la bacteria por el sistema inmune del hospedador, pero preservando los que son necesarios para el normal crecimiento de la bacteria y la interacción con las células epiteliales durante los procesos de colonización e internalización.

5.4. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS SUSTRATOS E IMPLICACIONES FUNCIONALES. PAPEL DE Pce EN LA PATOGENICIDAD

Los datos recogidos en la literatura mostraban que Pce era activa frente a la pared celular de neumococo y determinados sustratos solubles de pequeño tamaño como *p*-nitrofenilfosforilcolina (NPPC) y CDP-colina (de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001). Así pues, la hidrólisis de la *n*-dodecilmfosforilcolina, detergente empleado durante el proceso de cristalización de la enzima, abría la posibilidad de que la Pce fuese activa frente a otros tipos de compuestos que incluyeran PC en su composición. En este sentido, la eficacia de Pce para hidrolizar la molécula PAF en condiciones lejanas a las del máximo de actividad (80% tras 5 horas de incubación a pH 5,5) demuestra su capacidad para degradar compuestos del hospedador. La relevancia fisiológica del PAF se debe a su actuación como mediador en diversos procesos entre los que se pueden detallar los siguientes: respuesta inflamatoria aguda, agregación plaquetaria y secreción, aumento en la permeabilidad vascular, asma, anafilaxis cardiaca, pancreatitis, y estimulación de macrófagos y neutrófilos (O'Flaherty y Wykle, 1989; Chao y Olson, 1993). Como se ha mencionado anteriormente, el sitio catalítico de Pce accedería a la superficie de la pared celular para hidrolizar los residuos de PC localizados al final de las cadenas de los ácidos teicoicos. Esta localización externa de la enzima facilitaría la

hidrólisis del PAF que circula por el torrente sanguíneo, sugiriendo una nueva función de Pce en la patogenicidad de la bacteria.

Los residuos de PC en la superficie de la pared celular ejercen un papel crítico en la patogenicidad de neumococo a varios niveles. En primer lugar, como se explicó en la introducción, neumococo tiene un requerimiento nutricional absoluto por colina. Muy recientemente, se han construido mutantes que no incorporan colina a la pared celular y que muestran, además, una incapacidad total para metabolizar dicho aminoalcohol aunque esté presente en el medio de crecimiento (Kharat y Tomasz, 2006). Estos mutantes (D39*Cho-lic*) muestran una drástica reducción en la virulencia, a pesar de estar capsulados, y un bloqueo de la colonización nasofaríngea *'in vivo'* e *'in vitro'*, además de una rápida eliminación de la bacteria del torrente sanguíneo en animales inoculados por vía intravenosa (Kharat y Tomasz, 2006). Este último hecho podría estar relacionado con el papel desempeñado por PspA en la prevención de la fagocitosis (Neeleman *et al.*, 1999), ya que se excreta al medio en condiciones en las que no puede anclarse a la pared celular (Yother *et al.*, 1994). Por tanto, la ausencia de PC de la pared celular tiene múltiples consecuencias directas en la capacidad infectiva y en la patogenicidad de la bacteria.

En segundo lugar, neumococo estimula, *'in vitro'*, la diferenciación policlonal de las células B en la secreción de anticuerpos si las bacterias contienen colina en la pared celular, pero pierden esta capacidad cuando dicho aminoalcohol es reemplazado por etanolamina. Por otra parte, las moléculas de PC interactúan con los receptores celulares del PAF (PAFr), produciendo la internalización de la bacteria (Cundell *et al.*, 1995) que, en la mayoría de los casos ($\cong 70\%$) se produce mediante transcitosis en vacuolas (McCullers y Tuomanen, 2001), siendo las variantes transparentes más fácilmente transcitositadas (Ring *et al.*, 1998). El hecho de que estas variantes contengan más cantidad de ácidos (lipo)teicoicos y, por consiguiente, de PC se relaciona también con una mayor capacidad de colonización de la nasofaringe que las variantes opacas (Weiser *et al.*, 1994).

Todo ello sugiere una regulación de los residuos de PC relacionada con las diferentes etapas que tienen lugar en el transcurso de la infección. En este sentido, se ha descrito que la expresión de Pce aumenta durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que los niveles de otras CBPs no parecen variar. La expresión de genes en fases tardías de crecimiento se relaciona en otros microorganismos con proteínas implicadas en la virulencia y en la capacidad

de adaptación al medio (Chakrabarti y Misra, 2000; Gertz *et al.*, 2000). Otro hecho que apoya esta compleja regulación de la PC presente en la pared celular es la interacción de los residuos de PC con la proteína C-reactiva humana (CRP; Mold *et al.*, 1982) durante la inflamación. La CRP forma parte del sistema de defensa del hospedador y es una proteína sérica cuya concentración aumenta enormemente en condiciones de daño e inflamación tisular. Cuando la CRP se encuentra unida a los residuos de PC es reconocida por la proteína C1q que activa la vía clásica del complemento. Además, es capaz de activar la vía alternativa del complemento, mediante interacciones secundarias con el factor H, e inducir los fenómenos de opsonización y fagocitosis por macrófagos (Szalai *et al.*, 1996; Hirschfield y Pepys, 2003). El reconocimiento de PC por la CRP es dependiente de calcio y, debido a su estructura pentamérica, el anclaje óptimo a la pared requiere el reconocimiento simultáneo de cinco residuos accesibles de PC (Fig. 5.6) que se unen a la cavidad hidrofóbica de cada subunidad e interaccionan con un residuo aromático y otro ácido (Tabla 5.2). En la fijación intervienen, también, los contactos establecidos entre los oxígenos del fosfato y los cationes Ca^{2+} (Thompson *et al.*, 1999), cuya localización es curiosamente equivalente a los átomos de cinc en Pce, lo que da lugar a un reconocimiento similar de la PC (Tabla 5.2 y Fig. 4.35).

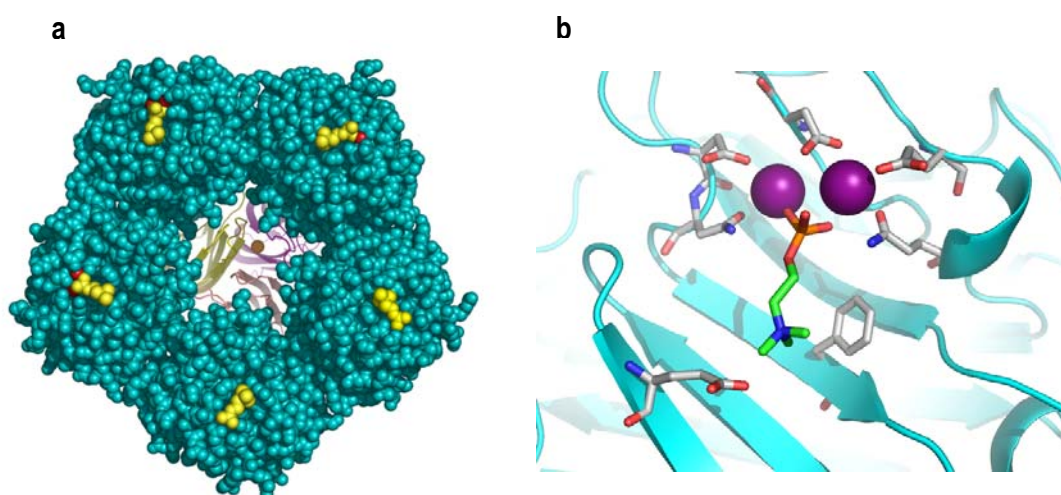


Figura 5.6. Estructura tridimensional de la proteína CRP y del sitio de unión a PC. **a.** Estructura pentamérica de la CRP (azul) interaccionando con 5 residuos de PC (amarillo) y con la proteína C1q (al fondo sombreada). **b.** Los átomos de calcio se muestran en morado; los ligandos del metal y residuos implicados en la interacción con PC se representan en bastones.

Tabla 5.2. Residuos implicados en el reconocimiento de PC por Pce (sitio activo) y CRP

	Pce	CRP
Cationes	Zn ²⁺	Ca ²⁺
Residuos aromáticos	W123	F66
Residuos ácidos	D89	E81

Por tanto, una modificación de la distribución espacial de los residuos externos de la pared celular mediante la acción selectiva de Pce podría impedir una unión eficiente de la CRP humana, ayudando a la bacteria a eludir el sistema de defensa del hospedador, manteniendo al mismo tiempo los residuos necesarios para garantizar la unión de las CBPs y la interacción con los receptores del PAF, que es necesaria para la invasión e internalización de neumococo (Fig. 5.7).

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, parece crucial una fina y compleja regulación de los residuos de PC presentes en la superficie bacteriana, de la que Pce es responsable, y cuyos efectos sobre los procesos de adherencia, colonización, inflamación e invasión han sido expuestos en esta memoria. El hecho de que Pce: i) pueda hidrolizar compuestos del hospedador que contengan PC, como el PAF; ii) intervenga en una redistribución selectiva de los residuos de PC de la superficie celular, lo que podría impedir el reconocimiento por la CRP; iii) mantenga la capacidad de unión a los rPAF, sugiere una importante capacidad adaptativa de neumococo en el transcurso de la infección.

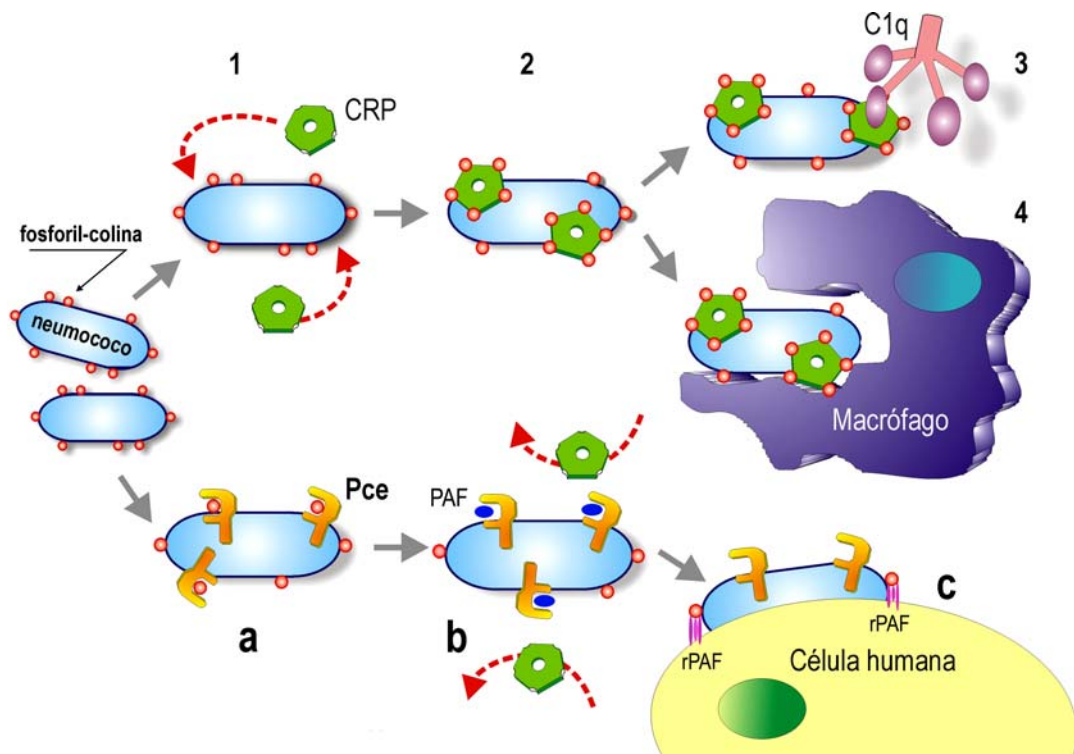


Figura 5.7. Interacción de los residuos de PC con la CRP y Pce. Efectos asociados. Cuando los residuos de PC interactúan con la CRP el neumococo es reconocido por el sistema de defensa del hospedador (1-4). En la segunda vía, la elusión del sistema de defensa se produce tras la eliminación de los residuos claves en el reconocimiento de la CRP por Pce (a-b), degradando, además, el PAF. Los residuos de PC que quedan en la superficie interactúan con las células humanas a través de los rPAF (c).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La fosforilcolín esterasa de neumococo, Pce, es una fosfodiesterasa que en disolución se encuentra en forma monomérica, y cuya actividad enzimática es dependiente de cinc. La presencia de dos equivalentes de Zn^{2+} y dos equivalentes de Ca^{2+} por mol de proteína revela que Pce es una metaloenzima. La eficacia catalítica óptima, en la hidrólisis del NPPC, se produce a pH 7,4, siendo su actividad máxima a pHs básicos. El sistema propuesto para explicar la dependencia con el pH requiere dos procesos de desprotonación. El primero da lugar a una forma activa, monoprotónada y que muestra la máxima afinidad hacia el sustrato, mientras que el segundo disminuye la eficacia catalítica. Los correspondientes valores de pK_a para las formas de la enzima unidas al sustrato son de 5,3 y 8,5.
2. Pce es una enzima bimodular que presenta un plegamiento de tipo metalo- β -lactamasa para el módulo catalítico, y de solenoide- β para el módulo de unión a colina. Las fuertes interacciones entre módulos se producen mediante un gran bucle del módulo catalítico (36-61) y las tres primeras repeticiones del CBM. Los dos átomos de calcio estructurales refuerzan la conformación de dicho bucle, participando así en la estabilización de esta región.
3. Los residuos del módulo catalítico que actúan como ligandos de los átomos de cinc son, en Pce: H85, H87, D89, H90, N183, D203, e H229. Los 4 primeros residuos siguen el motivo de secuencia HxHxDH, determinado para las enzimas que coordinan cinc pertenecientes a la familia de las metalo- β -lactamasas.
4. La gran similitud observada entre los centros catalíticos de Pce y los correspondientes a las metalo- β -lactamasas y fosfatasas permite proponer un mecanismo de hidrólisis del sustrato NPPC. El ataque nucleofílico 'en línea' sobre el átomo de fósforo del NPPC se realizaría por la molécula de agua unida al cinc, que es orientada mediante un puente de hidrógeno con el D89, siendo así la responsable del pK_a de 5,3, observado para el complejo SEH_2 . La unión del sustrato podría estar favorecida por la H228, mediante la formación de un puente de hidrógeno. Así, la desprotonación de este residuo generaría un aumento en la K_m , mientras que su efecto en la k_{cat} , grupo con un $pK_a \sim 8,5$, podría relacionarse con la liberación del producto. La

protonación del producto natural, N-acetil-galactosamina, estaría mediada por la red de puentes de hidrógeno establecida entre los residuos H87-agua-D181.

5. La presencia de la H90, como ligando de coordinación del Zn²⁺, es crucial en la actividad de la enzima y en la afinidad hacia el metal. Los residuos que forman parte de las segundas y terceras esferas de coordinación de la H90, algunos de ellos conservados en la familia, son relevantes en el mantenimiento del sitio catalítico. La actividad enzimática y la estabilidad del módulo catalítico de Pce son fuertemente dependientes de la geometría del centro bimetálico, que se ve alterada tras la sustitución de la H90 por alanina.

6. La capacidad del CBM de unir 3 cadenas diferentes de ácido teicoico, la disposición de ambos módulos, y la adquisición de 2 nuevos sitios de unión a colina, parecen determinar y optimizar el reconocimiento '*in vivo*' de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. La interfaz entre módulos es relevante para el establecimiento de los contactos entre Pce y la 6-fosforilcolina-N-acetilgalactosamina, además de colaborar en su orientación en la cavidad catalítica. La disposición y accesibilidad del sitio situado en la parte posterior del módulo catalítico indica su posible interacción con otros residuos de PC, provenientes de otros neumococos o de compuestos del hospedador.

7. La configuración del sitio activo es determinante en la función de la enzima, por lo que sólo los residuos de PC localizados al final de las cadenas de los ácidos teicoicos pueden ser hidrolizados, ($\cong 30\%$), permitiendo así que el resto sean reconocidos por otras CBPs. La localización del módulo catalítico hacia el exterior sugiere que la actuación de la enzima no se restrinja a los residuos de PC de la pared celular.

8. La hidrólisis del compuesto PAF por Pce posibilita su identificación como nuevo sustrato de la enzima, y pone de manifiesto la capacidad de la enzima para degradar compuestos del hospedador, sugiriendo una nueva función para la enzima.

9. El relevante papel que ejercen las moléculas de PC durante las diferentes etapas de la infección por neumococo, como la interacción con la CRP o los rPAF, podría implicar a Pce en el complejo proceso patogénico mediante la redistribución específica de los residuos de PC de la pared celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Argos, P., Garavito, R.M., Eventoff, W., Rossman, M.G., Branden, C.I.** (1978). Similarities in active center geometries of zinc-containing enzymes, proteases and dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **126**: 141-158.
- Auld, D.S., Larsen, K., y Vallee, B.L.** (1986). Active site residues of Carboxipeptidase A. En zinc enzymes (Bertini, I., ed.), pp 131-154. Birkhauser, Boston, MA.
- Auld, D.S.** (2001a). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals.* **14**: 271-313.
- Auld, D.S.** (2001b). Zinc sites in metalloenzymes and related proteins. En Handbook of metalloproteins (Bertini, I., ed.), pp 881-959. M.Dekker Inc., New York.
- Austrian, R.** (1953). Morphologic variation in pneumococcus. *J.Exp. Med.* **48**: 21-37.
- Bailey, S.** (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**: 760-763.
- Barnickel, G., Nauman, D., Bradaczek, H., Labischinski, H., y Giesbrecht, P.** (1983). En The target of Penicillin (Hakenbeck, R., Höltje, J.V., y Labischinski, H., eds.), pp 61-66. Berlin: W. de Gruyter.
- Behr, T., Fischer, W., Peter-Katalinic, W. y Egge, H.** (1992). The structural of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur. J. Biochem.* **207**: 1063-1075.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., y Paton, J.C.** (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**: 2324-2330.
- Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R.R., Heinz, H.P., y Zysk, G.** (2001). The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **205**: 99-104.
- Beveridge, T.J.** (1981). Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial cell wall. *Int. Rev. Cytol.* **72**: 229-317.
- Bierbaum, G., y Sahl, H. G.** (1985). Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotic PepS and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* **141**: 249-254.
- Blue, C.E., Paterson, G.K., Kerr, A.R., Berge, M., Claverys, J.P., y Mitchell, T.J.** (2003). ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infect. Immun.* **71**: 4925-4935.
- Blundell, T.L y Johnson, L.N.** (1976). Protein Chrystallography. Academic Press, New York.
- Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M., y Page, M.I.** (1998). The mechanism of catalysis and inhibition of the Bacillus Cereus zinc-dependent β -lactamase. *Biochem. J.* **331**: 703-711.
- Bracha, R., Chang, F., Fiedler, F., y Glaser, L.** (1978). Biosynthesis of teichoic acids. *Methods Enzymol.* **50**: 387-400.
- Bragg, W.L.** (1931). The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **17**:43.
- Brandts, J.F., y Lin, L-N.** (1990). Study of ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochem.* **29**: 6927-6940.

Braun, J.S., Sublett, J.E., Fregor, D., Mitchell, T.J., Cleveland, J.L., Tuomanen, E.I., y Weber, J.R. (2002). Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* **109**: 19-27.

Briese, T. y Hakenbeck, R. (1985). Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur. J. Biochem.* **146**: 417-427.

Briles, D.E., Hellingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., Mc Daniel, L.S., Benton, K.A., White, P., Prellner, K., Hermansson, A., Aerts, P.L., Van Dijk, H., y Crain, M.J. (1997). PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug. Resist.* **3**: 401-408.

Brundish, D. E. y Baddiley, J. (1968). Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem. J.* **110**: 573-582.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., y Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR System (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**: 905-921.

Cameron, A.D., Ridderström, M., Olin, B., y Mannervik, B. (1999). Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* **7**: 1067-1078.

Chakrabarti, S. K. y Misra, T. K. (2000). SarA represses *agr* operon expression in a purified in vitro *Staphylococcus aureus* transcription system. *J. Bacteriol.* **182**: 5893-5897.

Chao, W., y Olson, M. (1993). Platelet activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* **292**: 617-629.

Chervenka, C.H. (1969). En: A Manual of Methods for the Analytical Ultracentrifuge. Spinko Division Beckman Instruments, Palo Alto.

Chiavolini, D., Memmi, G., Maggi, T., Iannelli, F., Pozzi, G., y Oggioni, M.R. (2003). The three extra-cellular zinc metalloproteinases of *Sptreptococcus penumoniae* have a different impact on virulence in mice. *BMC Microbiol.* **3**: 14.

Christianson, D.W., y Cox, J.D. (1999). Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzyme. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 33-57.

Cleland, W. (1977). Determining the chemical Mechanism of the Enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzym. Relat. Areas. Mol. Biol.* **45**: 273-387.

Cleland, W. (1982). The use of pH Studies to determine chemical mechanism of enzyme-catalyzed reactions. *Methods. Enzymol.* **87**: 390-405.

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**: 760-763.

Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila., y Tuomanen, E. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**: 435-438.

Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y., y Toh, H. (2001). Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* **503**: 1-6.

- Dawson, M.H.** (1933). *Proc. Soc. Exp. Biol. And. Med.* **30**: 806.
- De la Fortelle, E. y Bricogne, G.** (1997) Maximum-likelihood heavy atom parameter refinement in the MIR and MAD methods. *Methods Enzymol.* **276**: 472–494.
- De la Sierra-Gallay, I.L., Pellegrini, O., y Condon C.** (2005). Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase Rnase Z. *Nature* **433**: 657-661.
- De las Rivas, B.** (2002). Aislamiento y caracterización de nuevas proteínas de unión a colina de *Streptococcus pneumoniae*. En: Microbiología II. Universidad Complutense, Madrid.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., y García, P.** (2001). Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb. Drug. Resist.* **7**: 213-222.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., y García, P.** (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**: 4988-5000.
- Díaz, E., López, R., y García, J.L.** (1991a). Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 8125-8129.
- Díaz, E., López, R., y García, J.L.** (1991b). Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* **266**: 5464-5471.
- Dougherty, D.A., y Stauffer, D.A.** (1990). Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science.* **250**: 1558-1560.
- Dubos R.J.** (1937). Mechanism of the lysis of the pneumococci by the freezing and thawing, bile, and other agents. *J. Exp. Med.* **66**: 101-112.
- Eftink, M y Biltonen, R.** (1980). "Biological Interacting Systems" en *Biological Microcalorimetry* (Beezer, A.E., ed.), pp 343-412. Academic Press, New York.
- Fabiane, S.M., Sohi, M.K., Wan, T., Payne, D.J., Bateson, J.H., Mitchell, T. Y., y Sutton, B.J.** (1998). Crystal structure of the zinc-dependent β -lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. *Biochemistry.* **37**: 12404-12411.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G., y Romero, A.** (2002). 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.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., y Romero, A.** (2001). A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1020-1024.
- Fischer, W.** (1988). Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **29**: 233-320.
- Fischer, W.** (1993). Molecular analysis of lipid macroamphiphiles by hydrophobic interaction chromatography, exemplified with lipoteichoic acids. *Anal. Biochem.* **208**: 49-56.
- Fischer, W.** (1994). Lipoteichoic acids and lipoglycans. En *Bacterial cell wall* (Ghuysen J.M., y Hakenbeck R., eds.), pp 199-216. Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Fischer, W.** (2000). Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. En *Streptococcus pneumoniae* (Tomasz, A., ed.), pp 155-177. Mary Ann Liebert, Inc. Publishers. New York.

- Fischer, W., Behr, T., Hartman, R., Peter-Katalinic, J., y Egge, H.** (1993). Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *Eur. J. Biochem.* **215**: 851-857.
- Fischer, W., y Tomasz, A.** (1985). Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **163**: 46-54.
- Fitzgerald, P.M.D., Wu, J., K., and Toney, J.H.** (1998). Unanticipated inhibition of the metallic- β -lactamase from *Bacteriodes fragilis* by 4-mneethanesulfonic acid (MES): A Crystallographic study at 1.85Å resolution. *Biochemistry.* **37**: 6791-6800.
- Formanek, H.** (1983). En The target of penicillin. (Hakenbeck, R., Höltje, J.V., y Labischinski. H., eds.), pp 55-60. Berlin: W. de Gruyter.
- Fraza, C., Silva, G., Gomes, C.M., Matias, P., Coelho, R., Sieker, L., Macedo, S., Liu, M. Y., Oliveira, S., Teixeira, M., Xavier, A.V., Rodrigues-Pousada, C., Carrondo, M.A., y Le Gall, J.** (2000). Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1041-1045.
- Freire, E.** (1989). Statistical thermodynamic analysis of the heat capacity function associated with protein folding-unfolding transitions. *Comm. Mol. Cell. Biophys.* **6** : 123-140.
- Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., y Sanchez-Ruiz, J.M.** (1990a). Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**: 159-188.
- Freire, E., Mayorga, O. L y Straume, M.** (1990b). Isothermal titration. *Anal. Chem.* **62**: 950A.
- Freire, E., y Biltonen, R.** (1978). Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and applications to homogeneous systems. *Biopol.* **17**: 463-479.
- French, G.S., y Wilson, K.S.** (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta. Cryst.* **A34**: 517-525.
- Garau, G., Brebone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, JM., y Dideberg, O.** (2005a). A metallo- β -lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **345**: 785-795.
- Garau, G., Lemaire, D., Vernet, T., Dideberg, O., y Di Guilmi A.M.** (2005b). Crystal structure of phosphorylcoline esterase domain of the virulence factor Choline Binding Protein E from *Streptococcus pneumoniae* : new structural features among the metallo- β -lactamase superfamily. *J.Biol. Chem.* **280**: 28591-28600.
- García Bustos, J. F., Chait, B. y Tomasz, A.** (1987). Structure of the peptide network of the pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **262**: 15400-15405.
- García Bustos, J.F. y Tomasz, A.** (1990). A biological price of antibiotic resistance: major changes in peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5415-5419.
- García, J. L., García, E., Sánchez-Puelles, J. M. y López, R.** (1988a). Identification of a lytic enzyme of *Clostridium acetobutylicum* that degrades choline-containing pneumococcal cell walls. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 133-138.
- García, E., García, J. L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M., y López, R.** (1988b). Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 914-918.

- García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P. y López R.** (1985). Cloning and expresión of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 225-230.
- García, J. L., García, E. y López, R.** (1987a). Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149**: 52-56.
- García, J. L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C. y López, R.** (1987b). Cloning, purification and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J. Virol.* **61**: 2573-2580.
- García, J. L., Sánchez-Beato, A., Medrano, F.J., y López, R.** (2000). Versatility of choline-binding domain. En *Streptococcus pneumoniae* (Tomasz, A., ed.), pp 231-244, Mary Ann Liebert Inc., Larchmont, NY.
- García, P., García, J.L., García, E. y López, R.** (1986). Nucleotide sequence and expresión of the penumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene.* **43**: 265-272.
- García, P., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M., y López, R.** (1990). Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene.* **86**: 81-88.
- García, P., González, M. P., García, E., López, R. y García, J. L.** (1999a). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1275-1277.
- García, P., González, M. P., García, E., García, J. L., y López, R.** (1999b). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**: 128-138.
- Garman, E.F, y Schneider, T.R.** (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**: 211-237.
- Garrity, J.D., Carenbauer, A.L., Herron, L.R., y Crowder, MW.** (2004). Metal binding Asp-120 in metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* plays a crucial role y catalaysis. *J. Biol. Chem.* **279**: 920-927.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A. K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J. y Hecker, M.** (2000). Characterization of the sigma (B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **182**: 6983-6991.
- Giesbrecht, P., Wecke, J., y Reinicke, B.** (1976). On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. *Int. Rev. Cytol.* **44**: 225-318.
- Girard, E., Stelter, M., Vicat, J y Kahn, R.** (2003). A new class of lanthanide complexes to obtain high-phasing power heavy-atom derivatives for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* **D59**: 1914-1922.
- Glaser, L., y Lindsay, B.** (1974). The synthesis of lipoteichoic acid carrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**: 1131-1136.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E., y Masure, R.** (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 5690-5695.
- Green, G.A., Schue, V. Monteil, H.** (1995) Cloning and characterlzation of the citotoxin L-encoding gene of *Clostridium sordellii*: Homology with *Clostridium difficile* toxin B. *Gene.* **161**: 57-61
- Greenfield, S., Jones, I.L.I., y Berry, C.T.** (1964). High pressure plasmas as spectroscopy emission sources. *Analyst.* **89**: 713-720.

- Griffith, F.** (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113-159.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K., y Navia, M.A.** (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506. *Cell.* **82**: 507-522.
- Guddat, L.W., McAlphine, A.S., Hume, D., Hamilton, S., de Jersey, J., y Martin J.L.** (1999). Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. *Structure.* **7**: 757-767.
- Guiral, S., Mitchell, T., Martin, B., y Claverys, J.P.** (2005). Competence-programed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 8710-8715.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., y Chatwal, G.S.** (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 1683-1687.
- Hammerschmidt, S., Talay, S. R., Brandtzaeg, P. y Chatwal, G. S.** (1997). SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25**: 1113-1124.
- Hansen, S., Hansen, L.K., y Hough, E.** (1992). Crystal structures of phosphate, iodide and iodate-inhibited phospholipase C from *Bacillus cereus* and structural investigations of the binding of reaction products and a substrate analogue. *J. Mol. Biol.* **225**: 543-549.
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P.H., Silman, I., y Sussman, J.L.** (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 9031-9035.
- Hasegawa, T. y Haraguchi, H.** (1992). Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry. En *Fundamental properties of inductively coupled plasmas.* (Montaner, A., y Golightly, D.W., eds. 2ª Edición). VCH Publishes, New York.
- Hermoso, J.A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., y Menéndez, M.** (2003). Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure.* **11**: 1239-1249.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., y Menéndez, M.** (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 533-538.
- Hirschfield, G.M., y Pepys, M.B.** (2003). C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Q. J. Med.* **96**: 793-807.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.C., y Jenkinson, H.F.** (2001). The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **41**: 1395-1408.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A.** (1975a). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1690-1694.
- Höltje J. V., y Tomasz, A.** (1975b). Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **250**: 6072-6076.

- Höltje, J. V. y Tomasz, A. (1974). Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **249**: 7032-7034.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. (1976). Purification of the pneumococcal *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**: 4199-4207.
- Horne, D., y Tomasz, A. (1985). Pneumococcal Forssman antigen: enrichment in mesosomal membranes and specific binding to the autolytic enzyme of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **161**: 18-24.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Arnold, J., Blaszczyk, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoje, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Leflowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.-M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, c.A., Baltz, R.H., Haskunas, R., Rosteck, P.R.J., Skatrud, P.L., y Glass, J.I: (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**: 5709-5717.
- Houldsworth, S., Andrew, P.W., y Mitchell, T.J. (1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **62**: 1501-1503.
- Jancarik, J. y Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**: 409-411.
- Janecek, S., Svensson, B. y Russell, R. R. (2000). Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 53-57.
- Jedrzejak, M.J. (2001). Pneumococcal virulence factors. Structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 187-207.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. y Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* **A 47**: 110–119.
- Jonsson, S., Musher, D.M., Chapman, A., Goree, A., y Lawrence, E.C. (1985). Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* **152**: 4-13.
- Kamerling, J.P. (2000). Pneumococcal polysaccharides. A chemical view. Molecular Biology and mechanisms of disease. En *Streptococcus pneumoniae*. (Tomasz, A., ed.), pp 81-84. Mary Ann Liebert Inc., Larchmont, NY.
- Katayama, S., Dupuy, B., Garnier, T. y Cole, S. T. (1995). Rapid expansion of the physical and genetic map of the chromosome of *Clostridium perfringens* CPN 50. *J. Bacteriol.* **177**: 5680-5685.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., y Harvarstein, L.S. (2005). Choline binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**: 4338-4335.
- Kharat, A.S., y Tomasz, A. (2006). Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol. Microbiol.* **60**: 93-107.

- Kim, J.O., y Weiser, J.N.** (1998). Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **177**: 368-377.
- Klein, R.A., Hartman, R., Egge, H., Behr, T., y Fischer, W.** (1996). The aqueous solution structure of a lipoteichoic acid from *Streptococcus pneumoniae* strain R6 containing 2,4-diamino-2,4,6-trideoxy-galactose: evidence for conformational mobility of the galactopyranose ring. *Carbohydr. Res.* **281**: 79-98.
- Knowles, J.R.** (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 877-919.
- Kobe, B., y Kajava, A.V.** (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trend. Biochem. Sci.* **25**: 509-515.
- Laemli, UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Kahn, R., Menéndez, M., y Hermoso, J.A.** (2005a). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Acta Cryst.* **F61**: 221-224.
- Lagartera, L., González, A., Hermoso, J.A., Sáiz, J.L., García, P., García, J.L., y Menéndez, M.** (2005b). Pneumococcal phosphorylcholine esterase, Pce, contains a metal binuclear center that is essential for substrate binding and catalysis. *Prot. Sci.* **14**: 3013-24.
- Larsen, K., y Auld, D.S.** (1991). Characterization of the inhibitory metal binding site in carboxipeptidase A. *Biochemistry.* **30**: 2613-2618.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. y Thornton, J.M.** (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., y Pelletier, S.L.** (1992). En: Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry & Polymer Science (Harding, S.E., Horton, H.C., Rowe, A.J., eds.) pp 90-125, Royal Society of Chemistry, London.
- Lazarevic, V., y Karamata, D.** (1995). The *tagGH* operon of *Bacillus subtilis* 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichoic acids. *Mol. Microbiol.* **16**: 345-355.
- Leavitt, S., y Freire, E.** (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Op. Struct. Biol.* **11**: 560-566.
- Leslie, A.G.W.** (1987). Profile fitting. In Proceedings of the CCP4 Study Weekend (Machin, J.R. y Papiz, M.Z., eds.) pp 39-50, Warrington: SERC Daresbury Laboratory.
- Lin, L-N., Mason, A. B., Woodworth, R. C y Brandts, J.** (1991). Calorimetric studies of the binding of ferric ions to ovotransferrin and interactions between binding sites. *Biochemistry.* **30**: 11660-11669.
- Lipscomb, W.N., y Sträter, N.** (1996). Recent advances in zinc enzymology. *Chem Rev.* **96**: 2375-2433.
- López, R., García, E., García, P., Ronda, C., y Tomasz, A.** (1982). Choline containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **151**: 1581-1590.

- López, R., Sánchez-Puelles, J.M., García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P.** (1986). Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **204** : 237-242.
- López, R., y García, E.** (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553-580.
- Mann, B., Orihuela, C., Antikainen, K., Gao, G., Sublett, J., Korhoen, T.K., y Tuomanen, E.** (2006). Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. *Infect. Immun.* **74**: 821-829.
- Massova I., y Mobashery S.** (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Ag.Chemother.* **42**: 1-17.
- Mathews, B. W.** (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**: 491-497.
- McCullers, J.A., y Tuomanen, E.** (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front. Biosci.* **1**: 877-889.
- McPherson, A.** (1982). Preparation and analysis of protein crystals. Wiley-Interscience Publications. pp 82-159.
- Medrano, F.J., Gasset, M., López-Zumel, C., Usobiaga, P., García, J.L., y Menéndez, M.** (1996). Structural characterization of the unligated and choline-bound forms of the major pneumococcal autolysin LytA amidase. *J. Biol. Chem.* **271**: 29152-29161.
- Michaelis, L., y Menten, M. L.** (1919). The kinetics of invertin action. *Biochemistry.* **49**: 333-349.
- Minton, A.P.** (1994). Modern analytical ultracentrifugation (Schuester, T.H., Lave, T.H., eds.), pp 81-93, Birkhäuser, Boston.
- Mitchell., T.** (2003). The pathogenesis of *Streptococcal* infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev.* **1**: 219-230.
- Mold, C., Rodgers, C.P., Kaplan, R.L., y Gewurz, H.** (1982). Binding of human C-reactive protein to bacteria. *Infect. Immun.* **38**: 392-395.
- Monterroso, B.** (2003). Estructura y plegamiento de LytC y Cpl-1, dos enzimas que hidrolizan la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*. En: Química-Física II. Universidad Complutense, Madrid.
- Monterroso, B., Lopez-Zumel, C., García, J.L., Sáiz, J.L., García, P., Campillo, N.E., y Menéndez, M.** (2005). Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme. *Biochem. J.* **391**: 41-49.
- Murshudov, G.N.** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**: 240–255.
- Musher, D. M.** (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 801-807.
- Neeleman, C., Geelen, S.P., Aerts, P.C., Daha, M.R., Mollnes, T.E., Roord, J.J., Posthuma, G., van Dijk, H., y Fleer, A.** (1999). Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect Immun.* **67**: 4517-4524.

- Novak, R., y Tuomanen, E.** (1999). Pathogenesis of the pneumococcal pneumoniae. *Semin. Respir. Infect.* **14**: 209-217.
- O'Flaherty, J.T., y Wykle, R.L.** (1989). In *Platelet Activating Factor and Human Disease* (Barnes, P.J., Page, C.P., y Henson, P., eds.), pp 117-137. Blackwell Scientific, Oxford.
- Oggioni, M.R., Memmi, G., Maggi, T., Chiavolini, D., Iannelli, F., y Pozzi, G.** (2003). Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol. Microbiol.* **49**: 795-805.
- OMS.** (1997). *Vaccine research and development: report of the technical review group meeting*. Geneva: World Health Organization.
- Paton, J.C., y Ferrante, A.** (1983). Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect. Immun.* **41**: 1212-1216.
- Paton, J.C., y Morona, J.K.** (2000). *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. In: Gram-positive pathogens. (Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., y Rood, J.I., eds.) ASM press, Washington D.C.
- Patterson, A.L.** (1935). A direct method for the determination of components of interatomic distances in crystal. *Z. Krist.* **90**: 517-542.
- Pelzer, H.** (1983). En The target of Penicillin. (Hakenbeck, R., Höltje, J.V., y Labischinski, H., eds.), pp 105-111. Berlin: W. de Gruyter.
- Privalov, P.** (1979). Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.* **33**: 167-241.
- Rasia, R.M., y Vila, A.J.** (2003). Exploring the role of the binding affinity of a second zinc equivalent in *B. Cereus* metallo- β -lactamase. *Biochem.* **41**: 1853-1860.
- Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., García Bustos, J. F., Hoffmann, M. K., y Tuomanen, E.** (1989). Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun.* **57**: 1890-1893.
- Rogers, H. J., y Thurman, P.** (1985). The effect of cerulenin on the morphogenesis and autolytic activity of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 591-599.
- Ronda, C., García, J. L. y López, R.** (1991). Teichoic acid choline esterase, a novel hydrolytic activity in *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 289-294.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Orqvist, A. y Masure, R.** (1997). Contribution of novel choline-binding protein to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819-829.
- Rubins, J.B., Charboneau, D., Fasching, C., Berry, A.M., Paton, S.C., Alexander, J.E., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., y Janoff, E.N.** (1996). Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumoniae. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* **153**: 1339-1346.
- Sáiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, J.L., Iborra, I., García, J.L., Laynez, J., y Menéndez, M.** (2002). Characterization of Ejl, the cell wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ejl-1. *Prot. Sci.* **11**: 1788-1799.

- Salton, M.R.J.** (1994). The bacterial cell envelope. A historical perspective. En *Bacterial cell wall*. (Ghuysen, J.M., y Hakenbeck, R., eds.) pp 1-22. Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Sánchez-Beato, A. R.** (1995a). Tesis Doctoral. Caracterización molecular de genes de *Clostridium acetobutylicum* y *Streptococcus pneumoniae* que codifican para proteínas con dominios de unión a colina. En: *Microbiología II*. Universidad Complutense, Madrid.
- Sánchez-Beato, A. R., Ronda, C. y García, J. L.** (1995b). Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain. Molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J. Bacteriol.* **177**: 1098-1103.
- Sánchez-Beato, A.R., López, R., y García, J.L.** (1998). Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* **164**: 207-214.
- Sánchez-Puelles, J. M., Ronda, C., García, J. L., García, P., López, R. y García, E.** (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289-293.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., y García, E.** (1990). Cloning and Expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene.* **89**: 69-75.
- Sánchez-Ruiz, J.M.** (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys.J.* **61**: 921-935.
- Sanchez-Ruiz, J.M.** (1995). Differential scanning calorimetry of proteins. En *Subcellular Biochemistry; Proteins: Structure, Function and Genetics*. (Biswas, B. B., y Siddartha, R., eds.), pp 133-176, Plenum Press, New York.
- Sanz, J.M., García, J.L., Laynez, J.L., Usobiaga, P., y Menéndez, M.** (1993). Thermal stability and cooperative domains of Cpl-1 lysozyme and its NH₂- and COOH-terminal modules. Dependence on choline binding. *J. Biol. Chem.* **268**: 6125-6130.
- Sanz, J.M., García, P., y García, J.L.** (1992). Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol. Microbiol.* **6**: 921-931.
- Sanz, J.M., López, R., y García, J.L.** (1988). Structural requirements of choline derivatives for "conversion" of pneumococcal amidase. *FEBS Lett.* **232**: 308-312.
- Schilling, O., Wenzel, N., Naylor, N., Vogel, A., Crowder, M., Makaroff, C., y Meyer-Klaucke, W.** (2003). Flexible metal binding of the metallo- β -lactamase domain: Glyoxalase II incorporates iron, manganese and zinc in vivo. *Biochemistry.* **42**: 11777-11786.
- Schleifer, K.H., y Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Severin, E, y Tomasz, A.** (1996). Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **178**: 168-174.
- Severin, E., Horne, D. y Tomasz, A.** (1997). Autolysis and cell wall degradation in a choline-independent strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug. Resist.* **3**: 391-400.
- Shan, F.** (1990). Pneumococcus and influenza. *Lancet.* **335**: 898-901.

- Shankar, K., y Bard, R.C.** (1952). The effect of metallic ions on the growth and morphology of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **63**: 279-290.
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R., y García, P.** (1997). The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.* **25**: 717-725.
- Sheldrick, G.M.** (1998) Direct Methods for Solving Macromolecular Structures. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp 401–411.
- Siboo, I.R., Bensing, B.A., y Sullam, P.M.** (2003). Genomic characterization of SM1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus mitis*. *J. Bacteriol.* **185**: 6968-6975.
- Silverman, D.N., y Tu, C.K.** (1986). Molecular basis of the oxygen exchange from CO₂ catalyzed by carbonic anhydrase III from bovine skeletal muscle. *Biochemistry.* **25**: 8402-8408.
- Smith, B.L., y Hostetter, M.K.** (2000). C3 as substrate for adhesion of *S.pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **182**: 497-508.
- Sørensen, U. B. S., Blom, J., Birch-Andersen, A., y Henrichsen, J.** (1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* **56**: 1890-1896.
- Sträter, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H., y Krebs, B.** (1995). Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science.* **268**: 1489-1492.
- Swiatlo, E., Champlin, F. R., Holman, S. C., Wilson, W. W. y Watt, J. M.** (2002). Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Inf. Immun.* **70**: 412-415.
- Szalai, A.J., Briles, D.E., y Volanakis, J.E.** (1996). Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *S.pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 4850-4853.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, r.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayan, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hanse, C.L., McDonald, L.A., Feldlyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Ilt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougerty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., y Fraser, C.M.** (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* **293**: 498-506.
- Thompson, D., Pepys, M.B., y Wood, S.P.** (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* **7**: 169-177.
- Tilled, W.S., Goebel, W.F., y Avery, O.T.** (1930). Chemical and immunological properties of a species-specific carbohydrate of pneumococci. *J. Exp. Med.* **52**: 895-900.
- Todd, M.J., y Gómez, J.** (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?. *Anal. Biochem.* **296**: 179-187.
- Tomasz, A.** (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science.* **157**: 694-697.
- Tomasz, A.** (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability and loss of autolysin. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* **59**: 86-93.

- Tomasz, A.** (1970). Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.* **101**: 860-871.
- Tomasz, A. y Westphal, M.** (1971). Abnormal autolytic enzyme in pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 2627-2630.
- Tomasz, A., Westphal, M., Briles, E.B., y Fletcher, P.** (1975). On the physiological functions of teichoic acids. *J. Supramol. Struct.* **3**: 1-16.
- Toney, J.H., Fitzgerald, P.M.D., Grover-Sharma, N., Olson, S.H., May, W.J., Sundelof, J.G., Vanderwall, D.E., Cleary, K.A., Grant, S.K., Wu, J.K., Kozarich, J.W., Pompliano, D.L., y Hammond, G.G.** (1998). Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteriodes fragilis* metallo- β -lactamase. *Chem. Biol.* **5**: 185-196.
- Tripton, K.F., y Dixon, H.B.** (1979). Effects of pH on enzymes. En *Methods in Enzymology*. (Purich, D.P., eds.) 63:183-234, Academic Press, New York.
- Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C., y Jennings, M.P.** (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidase stress. *Infect. Immun.* **68**: 2819-2826.
- Tsuchido, T., Hiraoka, T., Tanako, M. Y., y Thurman, P. F.** (1985). Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids. *J. Bacteriol.* **162**: 42-46.
- Tu, A.H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., y Szalai, A.J.** (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **67**: 4720-4724.
- Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B., y Zak, O.** (1985a). The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* **151**: 535-540.
- Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., y Tomasz, A.** (1985b). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* **151**: 859-868.
- Tuomanen, E., Rich, R., y Zak, O.** (1987). Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**: 869-874.
- Ullah, J.H., Walsh, T.R., Taylor, I.A., Emery, D.C., Verma, C.S., Gamblin, S.J., y Spencer, J.** (1998). The crystal structure of the L1 metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 125-136.
- Umeda, A., Yokoyama, S., Arizono, T. y Amako, K.** (1992). Location of peptidoglycan and teichoic acid on the cell wall surface of *Staphylococcus aureus* as determined by immunoelectron microscopy. *J. Electron Microsc.* **41**: 46-52.
- Usobiaga, P., Medrano, F.J., Gasset, M., García, J.L., Sáiz, J.L., Rivas, G., Laynez, J., y Menéndez, M.** (1996). Structural Organization of the Major Autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 6832-6838.
- Valladares, M.H., Felici, A., Weber, G., Adolph, H.W., Zeppezauer, M., Rossolini, G.M., Amicosante, G., Frère, J.M., y Galleni M.** (1997). Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo- β -lactamase activity and stability. *Biochemistry.* **36**: 11534-11541.
- VanDuyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., y Clardy, J.** (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**: 105-124.

- Varea, J., Monterroso, B., Saiz, J.L., García, J., López-Zumel, C., García, P y Menéndez, M.** (2004). Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci. *J. Biol. Chem.* **279**: 43697-43707.
- Varea, J., Sáiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Medrano, F.J., Arrondo, J.L.R., Iloro, I., Laynez, J., García, J.L., y Menéndez, M.** (2000). Do Sequence Repeats Play an Equivalent Role in the Choline-binding Module of Pneumococcal LytA Amidase?. *J. Biol. Chem.* **275**: 26842-26855.
- Vollmer, W. y Tomasz, A.** (2001). Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1610–1622.
- Vollmer, W., y Tomasz, A.** (2000). The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 20496-20501.
- Wang, Z., Fast, W., Valentine, AM., y Benkovic, J.** (1999). Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**: 614-622.
- Webb, M.** (1951). The influence of magnesium on cell division. The effect of magnesium on the growth of bacteria in chemically-defined media of varying complexity. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 485-495.
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., y Masure, H.R.** (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **62**: 2582-2589.
- Wenzel, N.F., Carenbauer, A.L., Pfiester, M.P., Schilling, O., Meyer-Klaucke, W., Makaroff, C.A., y Crowder, M.W.** (2004). The binding of iron and zinc to glyoxalase II occurs exclusively as di-metal centers and is unique within the metallo- β -lactamase family. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**: 429-438.
- Wilcox, D.E.** (1996). Binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.* **96**: 2435-2458.
- Wiseman, T., Willinston, S., Brandts, J y Lin, L-N.** (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**: 131-137.
- Wren, B.W.** (1991). A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeats sequences. *Mol. Microbiol.* **5**: 797-803.
- Yamaguchi, Y., Kuroki, T., Yasuzawa, H., Higashi, T., Jin, W., Kawanami, A., Yamagata, Y., Arakawa, Y., Goto, M., y Kurosaki, H.** (2005). Probing the role of Asp-120 (81) of metallo- β -lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **280**: 20824-20832.
- Yeung, M.K., y Mattingly, S.J.** (1986). Covalent linkage of the type- and group- specific antigens to the peptide moiety of the peptidoglycan of serotype III group B *Streptococcus*. *Curr. Microbiol.* **14**: 205-211.
- Yother, J.** (2004). Capsules. En *The pneumococcus*. (Tuomanen, E., Mitchell, T., Morrison, D.A., y Spratt, B.G., eds.), pp. 30-48. Washington: ASM Press.
- Yother, J., Leopold, K., White, J., y Fischer, W.** (1998). Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J. Bacteriol.* **180**: 2093-2101.
- Yother, J., y White, J.** (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J. Bacteriol.* **176**: 2976-2985.

- Argos, P., Garavito, R.M., Eventoff, W., Rossman, M.G., Branden, C.I.** (1978). Similarities in active center geometries of zinc-containing enzymes, proteases and dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **126**: 141-158.
- Auld, D.S., Larsen, K., y Vallee, B.L.** (1986). Active site residues of Carboxipeptidase A. En zinc enzymes (Bertini, I., ed.), pp 131-154. Birkhauser, Boston, MA.
- Auld, D.S.** (2001a). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals.* **14**: 271-313.
- Auld, D.S.** (2001b). Zinc sites in metalloenzymes and related proteins. En Handbook of metalloproteins (Bertini, I., ed.), pp 881-959. M.Dekker Inc., New York.
- Austrian, R.** (1953). Morphologic variation in pneumococcus. *J.Exp. Med.* **48**: 21-37.
- Bailey, S.** (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**: 760-763.
- Barnickel, G., Nauman, D., Bradaczek, H., Labischinski, H., y Giesbrecht, P.** (1983). En The target of Penicillin (Hakenbeck, R., Höltje, J.V., y Labischinski, H., eds.), pp 61-66. Berlin: W. de Gruyter.
- Behr, T., Fischer, W., Peter-Katalinic, W. y Egge, H.** (1992). The structural of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur. J. Biochem.* **207**: 1063-1075.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., y Paton, J.C.** (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**: 2324-2330.
- Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R.R., Heinz, H.P., y Zysk, G.** (2001). The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **205**: 99-104.
- Beveridge, T.J.** (1981). Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial cell wall. *Int. Rev. Cytol.* **72**: 229-317.
- Bierbaum, G., y Sahl, H. G.** (1985). Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotic PepS and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* **141**: 249-254.
- Blue, C.E., Paterson, G.K., Kerr, A.R., Berge, M., Claverys, J.P., y Mitchell, T.J.** (2003). ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infect. Immun.* **71**: 4925-4935.
- Blundell, T.L y Johnson, L.N.** (1976). Protein Chrystallography. Academic Press, New York.
- Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M., y Page, M.I.** (1998). The mechanism of catalysis and inhibition of the Bacillus Cereus zinc-dependent β -lactamase. *Biochem. J.* **331**: 703-711.
- Bracha, R., Chang, F., Fiedler, F., y Glaser, L.** (1978). Biosynthesis of teichoic acids. *Methods Enzymol.* **50**: 387-400.
- Bragg, W.L.** (1931). The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **17**:43.
- Brandts, J.F., y Lin, L-N.** (1990). Study of ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochem.* **29**: 6927-6940.

Braun, J.S., Sublett, J.E., Fregor, D., Mitchell, T.J., Cleveland, J.L., Tuomanen, E.I., y Weber, J.R. (2002). Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* **109**: 19-27.

Briese, T. y Hakenbeck, R. (1985). Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur. J. Biochem.* **146**: 417-427.

Briles, D.E., Hellingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., Mc Daniel, L.S., Benton, K.A., White, P., Prellner, K., Hermansson, A., Aerts, P.L., Van Dijk, H., y Crain, M.J. (1997). PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug. Resist.* **3**: 401-408.

Brundish, D. E. y Baddiley, J. (1968). Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem. J.* **110**: 573-582.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., y Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR System (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**: 905-921.

Cameron, A.D., Ridderström, M., Olin, B., y Mannervik, B. (1999). Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* **7**: 1067-1078.

Chakrabarti, S. K. y Misra, T. K. (2000). SarA represses *agr* operon expression in a purified in vitro *Staphylococcus aureus* transcription system. *J. Bacteriol.* **182**: 5893-5897.

Chao, W., y Olson, M. (1993). Platelet activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* **292**: 617-629.

Chervenka, C.H. (1969). En: A Manual of Methods for the Analytical Ultracentrifuge. Spinko Division Beckman Instruments, Palo Alto.

Chiavolini, D., Memmi, G., Maggi, T., Iannelli, F., Pozzi, G., y Oggioni, M.R. (2003). The three extra-cellular zinc metalloproteinases of *Sptreptococcus penumoniae* have a different impact on virulence in mice. *BMC Microbiol.* **3**: 14.

Christianson, D.W., y Cox, J.D. (1999). Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzyme. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 33-57.

Cleland, W. (1977). Determining the chemical Mechanism of the Enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzym. Relat. Areas. Mol. Biol.* **45**: 273-387.

Cleland, W. (1982). The use of pH Studies to determine chemical mechanism of enzyme-catalyzed reactions. *Methods. Enzymol.* **87**: 390-405.

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**: 760-763.

Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila., y Tuomanen, E. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**: 435-438.

Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y., y Toh, H. (2001). Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* **503**: 1-6.

- Dawson, M.H.** (1933). *Proc. Soc. Exp. Biol. And. Med.* **30**: 806.
- De la Fortelle, E. y Bricogne, G.** (1997) Maximum-likelihood heavy atom parameter refinement in the MIR and MAD methods. *Methods Enzymol.* **276**: 472–494.
- De la Sierra-Gallay, I.L., Pellegrini, O., y Condon C.** (2005). Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase Rnase Z. *Nature* **433**: 657-661.
- De las Rivas, B.** (2002). Aislamiento y caracterización de nuevas proteínas de unión a colina de *Streptococcus pneumoniae*. En: Microbiología II. Universidad Complutense, Madrid.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., y García, P.** (2001). Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb. Drug. Resist.* **7**: 213-222.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., y García, P.** (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**: 4988-5000.
- Díaz, E., López, R., y García, J.L.** (1991a). Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 8125-8129.
- Díaz, E., López, R., y García, J.L.** (1991b). Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* **266**: 5464-5471.
- Dougherty, D.A., y Stauffer, D.A.** (1990). Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science.* **250**: 1558-1560.
- Dubos R.J.** (1937). Mechanism of the lysis of the pneumococci by the freezing and thawing, bile, and other agents. *J. Exp. Med.* **66**: 101-112.
- Eftink, M y Biltonen, R.** (1980). "Biological Interacting Systems" en *Biological Microcalorimetry* (Beezer, A.E., ed.), pp 343-412. Academic Press, New York.
- Fabiane, S.M., Sohi, M.K., Wan, T., Payne, D.J., Bateson, J.H., Mitchell, T. Y., y Sutton, B.J.** (1998). Crystal structure of the zinc-dependent β -lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. *Biochemistry.* **37**: 12404-12411.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G., y Romero, A.** (2002). 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.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., y Romero, A.** (2001). A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1020-1024.
- Fischer, W.** (1988). Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **29**: 233-320.
- Fischer, W.** (1993). Molecular analysis of lipid macroamphiphiles by hydrophobic interaction chromatography, exemplified with lipoteichoic acids. *Anal. Biochem.* **208**: 49-56.
- Fischer, W.** (1994). Lipoteichoic acids and lipoglycans. En *Bacterial cell wall* (Ghuysen J.M., y Hakenbeck R., eds.), pp 199-216. Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Fischer, W.** (2000). Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. En *Streptococcus pneumoniae* (Tomasz, A., ed.), pp 155-177. Mary Ann Liebert, Inc. Publishers. New York.

- Fischer, W., Behr, T., Hartman, R., Peter-Katalinic, J., y Egge, H.** (1993). Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *Eur. J. Biochem.* **215**: 851-857.
- Fischer, W., y Tomasz, A.** (1985). Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **163**: 46-54.
- Fitzgerald, P.M.D., Wu, J., K., and Toney, J.H.** (1998). Unanticipated inhibition of the metallic- β -lactamase from *Bacteriodes fragilis* by 4-mneethanesulfonic acid (MES): A Crystallographic study at 1.85Å resolution. *Biochemistry.* **37**: 6791-6800.
- Formanek, H.** (1983). En The target of penicillin. (Hakenbeck, R., Höltje, J.V., y Labischinski. H., eds.), pp 55-60. Berlin: W. de Gruyter.
- Fraza, C., Silva, G., Gomes, C.M., Matias, P., Coelho, R., Sieker, L., Macedo, S., Liu, M. Y., Oliveira, S., Teixeira, M., Xavier, A.V., Rodrigues-Pousada, C., Carrondo, M.A., y Le Gall, J.** (2000). Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1041-1045.
- Freire, E.** (1989). Statistical thermodynamic analysis of the heat capacity function associated with protein folding-unfolding transitions. *Comm. Mol. Cell. Biophys.* **6** : 123-140.
- Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., y Sanchez-Ruiz, J.M.** (1990a). Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**: 159-188.
- Freire, E., Mayorga, O. L y Straume, M.** (1990b). Isothermal titration. *Anal. Chem.* **62**: 950A.
- Freire, E., y Biltonen, R.** (1978). Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and applications to homogeneous systems. *Biopol.* **17**: 463-479.
- French, G.S., y Wilson, K.S.** (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta. Cryst.* **A34**: 517-525.
- Garau, G., Brebone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, JM., y Dideberg, O.** (2005a). A metallo- β -lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **345**: 785-795.
- Garau, G., Lemaire, D., Vernet, T., Dideberg, O., y Di Guilmi A.M.** (2005b). Crystal structure of phosphorylcoline esterase domain of the virulence factor Choline Binding Protein E from *Streptococcus pneumoniae* : new structural features among the metallo- β -lactamase superfamily. *J.Biol. Chem.* **280**: 28591-28600.
- García Bustos, J. F., Chait, B. y Tomasz, A.** (1987). Structure of the peptide network of the pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **262**: 15400-15405.
- García Bustos, J.F. y Tomasz, A.** (1990). A biological price of antibiotic resistance: major changes in peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5415-5419.
- García, J. L., García, E., Sánchez-Puelles, J. M. y López, R.** (1988a). Identification of a lytic enzyme of *Clostridium acetobutylicum* that degrades choline-containing pneumococcal cell walls. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 133-138.
- García, E., García, J. L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M., y López, R.** (1988b). Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 914-918.

- García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P. y López R.** (1985). Cloning and expresión of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 225-230.
- García, J. L., García, E. y López, R.** (1987a). Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149**: 52-56.
- García, J. L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C. y López, R.** (1987b). Cloning, purification and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J. Virol.* **61**: 2573-2580.
- García, J. L., Sánchez-Beato, A., Medrano, F.J., y López, R.** (2000). Versatility of choline-binding domain. En *Streptococcus pneumoniae* (Tomasz, A., ed.), pp 231-244, Mary Ann Liebert Inc., Larchmont, NY.
- García, P., García, J.L., García, E. y López, R.** (1986). Nucleotide sequence and expresión of the penumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene.* **43**: 265-272.
- García, P., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M., y López, R.** (1990). Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene.* **86**: 81-88.
- García, P., González, M. P., García, E., López, R. y García, J. L.** (1999a). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1275-1277.
- García, P., González, M. P., García, E., García, J. L., y López, R.** (1999b). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**: 128-138.
- Garman, E.F, y Schneider, T.R.** (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**: 211-237.
- Garrity, J.D., Carenbauer, A.L., Herron, L.R., y Crowder, MW.** (2004). Metal binding Asp-120 in metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* plays a crucial role y catalaysis. *J .Biol. Chem.* **279**: 920-927.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A. K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J. y Hecker, M.** (2000). Characterization of the sigma (B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **182**: 6983-6991.
- Giesbrecht, P., Wecke, J., y Reinicke, B.** (1976). On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. *Int. Rev. Cytol.* **44**: 225-318.
- Girard, E., Stelter, M., Vicat, J y Kahn, R.** (2003). A new class of lanthanide complexes to obtain high-phasing power heavy-atom derivatives for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* **D59**: 1914-1922.
- Glaser, L., y Lindsay, B.** (1974). The synthesis of lipoteichoic acid carrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**: 1131-1136.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E., y Masure, R.** (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 5690-5695.
- Green, G.A., Schue, V. Monteil, H.** (1995) Cloning and characterlzation of the citotoxin L-encoding gene of *Clostridium sordellii*: Homology with *Clostridium difficile* toxin B. *Gene.* **161**: 57-61
- Greenfield, S., Jones, I.L.I., y Berry, C.T.** (1964). High pressure plasmas as spectroscopy emission sources. *Analyst.* **89**: 713-720.

- Griffith, F.** (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113-159.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K., y Navia, M.A.** (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506. *Cell.* **82**: 507-522.
- Guddat, L.W., McAlphine, A.S., Hume, D., Hamilton, S., de Jersey, J., y Martin J.L.** (1999). Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. *Structure.* **7**: 757-767.
- Guiral, S., Mitchell, T., Martin, B., y Claverys, J.P.** (2005). Competence-programed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 8710-8715.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., y Chatwal, G.S.** (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 1683-1687.
- Hammerschmidt, S., Talay, S. R., Brandtzaeg, P. y Chatwal, G. S.** (1997). SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25**: 1113-1124.
- Hansen, S., Hansen, L.K., y Hough, E.** (1992). Crystal structures of phosphate, iodide and iodate-inhibited phospholipase C from *Bacillus cereus* and structural investigations of the binding of reaction products and a substrate analogue. *J. Mol. Biol.* **225**: 543-549.
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P.H., Silman, I., y Sussman, J.L.** (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 9031-9035.
- Hasegawa, T. y Haraguchi, H.** (1992). Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry. En *Fundamental properties of inductively coupled plasmas.* (Montaner, A., y Golightly, D.W., eds. 2ª Edición). VCH Publishes, New York.
- Hermoso, J.A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., y Menéndez, M.** (2003). Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure.* **11**: 1239-1249.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., y Menéndez, M.** (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 533-538.
- Hirschfield, G.M., y Pepys, M.B.** (2003). C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Q. J. Med.* **96**: 793-807.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.C., y Jenkinson, H.F.** (2001). The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **41**: 1395-1408.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A.** (1975a). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1690-1694.
- Höltje J. V., y Tomasz, A.** (1975b). Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **250**: 6072-6076.

- Höltje, J. V. y Tomasz, A. (1974). Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **249**: 7032-7034.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. (1976). Purification of the pneumococcal *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**: 4199-4207.
- Horne, D., y Tomasz, A. (1985). Pneumococcal Forssman antigen: enrichment in mesosomal membranas and specific binding to the autolytic enzyme of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **161**: 18-24.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Arnold, J., Blaszczyk, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoje, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Leflowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.-M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, c.A., Baltz, R.H., Haskunas, R., Rosteck, P.R.J., Skatrud, P.L., y Glass, J.I: (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**: 5709-5717.
- Houldsworth, S., Andrew, P.W., y Mitchell, T.J. (1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **62**: 1501-1503.
- Jancarik, J. y Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**: 409-411.
- Janecek, S., Svensson, B. y Russell, R. R. (2000). Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 53-57.
- Jedrzejak, M.J. (2001). Pneumococcal virulence factors. Structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 187-207.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. y Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* **A 47**: 110–119.
- Jonsson, S., Musher, D.M., Chapman, A., Goree, A., y Lawrence, E.C. (1985). Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* **152**: 4-13.
- Kamerling, J.P. (2000). Pneumococcal polysaccharides. A chemical view. Molecular Biology and mechanisms of disease. En *Streptococcus pneumoniae*. (Tomasz, A., ed.), pp 81-84. Mary Ann Liebert Inc., Larchmont, NY.
- Katayama, S., Dupuy, B., Garnier, T. y Cole, S. T. (1995). Rapid expansion of the physical and genetic map of the chromosome of *Clostridium perfringens* CPN 50. *J. Bacteriol.* **177**: 5680-5685.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., y Harvarstein, L.S. (2005). Choline binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**: 4338-4335.
- Kharat, A.S., y Tomasz, A. (2006). Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol. Microbiol.* **60**: 93-107.

- Kim, J.O., y Weiser, J.N.** (1998). Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **177**: 368-377.
- Klein, R.A., Hartman, R., Egge, H., Behr, T., y Fischer, W.** (1996). The aqueous solution structure of a lipoteichoic acid from *Streptococcus pneumoniae* strain R6 containing 2,4-diamino-2,4,6-trideoxy-galactose: evidence for conformational mobility of the galactopyranose ring. *Carbohydr. Res.* **281**: 79-98.
- Knowles, J.R.** (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 877-919.
- Kobe, B., y Kajava, A.V.** (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trend. Biochem. Sci.* **25**: 509-515.
- Laemli, UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Kahn, R., Menéndez, M., y Hermoso, J.A.** (2005a). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Acta Cryst.* **F61**: 221-224.
- Lagartera, L., González, A., Hermoso, J.A., Sáiz, J.L., García, P., García, J.L., y Menéndez, M.** (2005b). Pneumococcal phosphorylcholine esterase, Pce, contains a metal binuclear center that is essential for substrate binding and catalysis. *Prot. Sci.* **14**: 3013-24.
- Larsen, K., y Auld, D.S.** (1991). Characterization of the inhibitory metal binding site in carboxipeptidase A. *Biochemistry.* **30**: 2613-2618.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. y Thornton, J.M.** (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., y Pelletier, S.L.** (1992). En: Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry & Polymer Science (Harding, S.E., Horton, H.C., Rowe, A.J., eds.) pp 90-125, Royal Society of Chemistry, London.
- Lazarevic, V., y Karamata, D.** (1995). The *tagGH* operon of *Bacillus subtilis* 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichoic acids. *Mol. Microbiol.* **16**: 345-355.
- Leavitt, S., y Freire, E.** (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Op. Struct. Biol.* **11**: 560-566.
- Leslie, A.G.W.** (1987). Profile fitting. In Proceedings of the CCP4 Study Weekend (Machin, J.R. y Papiz, M.Z., eds.) pp 39-50, Warrington: SERC Daresbury Laboratory.
- Lin, L-N., Mason, A. B., Woodworth, R. C y Brandts, J.** (1991). Calorimetric studies of the binding of ferric ions to ovotransferrin and interactions between binding sites. *Biochemistry.* **30**: 11660-11669.
- Lipscomb, W.N., y Sträter, N.** (1996). Recent advances in zinc enzymology. *Chem Rev.* **96**: 2375-2433.
- López, R., García, E., García, P., Ronda, C., y Tomasz, A.** (1982). Choline containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **151**: 1581-1590.

- López, R., Sánchez-Puelles, J.M., García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P.** (1986). Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **204** : 237-242.
- López, R., y García, E.** (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553-580.
- Mann, B., Orihuela, C., Antikainen, K., Gao, G., Sublett, J., Korhoen, T.K., y Tuomanen, E.** (2006). Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. *Infect. Immun.* **74**: 821-829.
- Massova I., y Mobashery S.** (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Ag.Chemother.* **42**: 1-17.
- Mathews, B. W.** (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**: 491-497.
- McCullers, J.A., y Tuomanen, E.** (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front. Biosci.* **1**: 877-889.
- McPherson, A.** (1982). Preparation and analysis of protein crystals. Wiley-Interscience Publications. pp 82-159.
- Medrano, F.J., Gasset, M., López-Zumel, C., Usobiaga, P., García, J.L., y Menéndez, M.** (1996). Structural characterization of the unligated and choline-bound forms of the major pneumococcal autolysin LytA amidase. *J. Biol. Chem.* **271**: 29152-29161.
- Michaelis, L., y Menten, M. L.** (1919). The kinetics of invertin action. *Biochemistry.* **49**: 333-349.
- Minton, A.P.** (1994). Modern analytical ultracentrifugation (Schuester, T.H., Lave, T.H., eds.), pp 81-93, Birkhäuser, Boston.
- Mitchell., T.** (2003). The pathogenesis of *Streptococcal* infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev.* **1**: 219-230.
- Mold, C., Rodgers, C.P., Kaplan, R.L., y Gewurz, H.** (1982). Binding of human C-reactive protein to bacteria. *Infect. Immun.* **38**: 392-395.
- Monterroso, B.** (2003). Estructura y plegamiento de LytC y Cpl-1, dos enzimas que hidrolizan la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*. En: Química-Física II. Universidad Complutense, Madrid.
- Monterroso, B., Lopez-Zumel, C., García, J.L., Sáiz, J.L., García, P., Campillo, N.E., y Menéndez, M.** (2005). Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme. *Biochem. J.* **391**: 41-49.
- Murshudov, G.N.** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**: 240–255.
- Musher, D. M.** (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 801-807.
- Neeleman, C., Geelen, S.P., Aerts, P.C., Daha, M.R., Mollnes, T.E., Roord, J.J., Posthuma, G., van Dijk, H., y Fleer, A.** (1999). Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect Immun.* **67**: 4517-4524.

- Novak, R., y Tuomanen, E.** (1999). Pathogenesis of the pneumococcal pneumoniae. *Semin. Respir. Infect.* **14**: 209-217.
- O'Flaherty, J.T., y Wykle, R.L.** (1989). In *Platelet Activating Factor and Human Disease* (Barnes, P.J., Page, C.P., y Henson, P., eds.), pp 117-137. Blackwell Scientific, Oxford.
- Oggioni, M.R., Memmi, G., Maggi, T., Chiavolini, D., Iannelli, F., y Pozzi, G.** (2003). Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol. Microbiol.* **49**: 795-805.
- OMS.** (1997). *Vaccine research and development: report of the technical review group meeting*. Geneva: World Health Organization.
- Paton, J.C., y Ferrante, A.** (1983). Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect. Immun.* **41**: 1212-1216.
- Paton, J.C., y Morona, J.K.** (2000). *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. In: Gram-positive pathogens. (Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferreti, J.J., Portnoy, D.A., y Rood, J.I., eds.) ASM press, Washington D.C.
- Patterson, A.L.** (1935). A direct method for the determination of components of interatomic distances in crystal. *Z. Krist.* **90**: 517-542.
- Pelzer, H.** (1983). En The target of Penicillin. (Hakenbeck, R., Höltje, J.V., y Labischinski. H., eds.), pp 105-111. Berlin: W. de Gruyter.
- Privalov, P.** (1979). Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.* **33**: 167-241.
- Rasia, R.M., y Vila, A.J.** (2003). Exploring the role of the binding affinity of a second zinc equivalent in *B. Cereus* metallo- β -lactamase. *Biochem.* **41**: 1853-1860.
- Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., García Bustos, J. F., Hoffmann, M. K., y Tuomanen, E.** (1989). Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun.* **57**: 1890-1893.
- Rogers, H. J., y Thurman, P.** (1985). The effect of cerulenin on the morphogenesis and autolytic activity of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 591-599.
- Ronda, C., García, J. L. y López, R.** (1991). Teichoic acid choline esterase, a novel hydrolytic activity in *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 289-294.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Orqvist, A. y Masure, R.** (1997). Contribution of novel choline-binding protein to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819-829.
- Rubins, J.B., Charboneau, D., Fasching, C., Berry, A.M., Paton, S.C., Alexander, J.E., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., y Janoff, E.N.** (1996). Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumoniae. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* **153**: 1339-1346.
- Sáiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, J.L., Iborra, I., García, J.L., Laynez, J., y Menéndez, M.** (2002). Characterization of Ejl, the cell wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ej-1. *Prot. Sci.* **11**: 1788-1799.

- Salton, M.R.J.** (1994). The bacterial cell envelope. A historical perspective. En *Bacterial cell wall*. (Ghuysen, J.M., y Hakenbeck, R., eds.) pp 1-22. Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Sánchez-Beato, A. R.** (1995a). Tesis Doctoral. Caracterización molecular de genes de *Clostridium acetobutylicum* y *Streptococcus pneumoniae* que codifican para proteínas con dominios de unión a colina. En: *Microbiología II*. Universidad Complutense, Madrid.
- Sánchez-Beato, A. R., Ronda, C. y García, J. L.** (1995b). Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain. Molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J. Bacteriol.* **177**: 1098-1103.
- Sánchez-Beato, A.R., López, R., y García, J.L.** (1998). Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* **164**: 207-214.
- Sánchez-Puelles, J. M., Ronda, C., García, J. L., García, P., López, R. y García, E.** (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289-293.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., y García, E.** (1990). Cloning and Expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene.* **89**: 69-75.
- Sánchez-Ruiz, J.M.** (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys.J.* **61**: 921-935.
- Sanchez-Ruiz, J.M.** (1995). Differential scanning calorimetry of proteins. En *Subcellular Biochemistry; Proteins: Structure, Function and Genetics*. (Biswas, B. B., y Siddartha, R., eds.), pp 133-176, Plenum Press, New York.
- Sanz, J.M., García, J.L., Laynez, J.L., Usobiaga, P., y Menéndez, M.** (1993). Thermal stability and cooperative domains of Cpl-1 lysozyme and its NH₂- and COOH-terminal modules. Dependence on choline binding. *J. Biol. Chem.* **268**: 6125-6130.
- Sanz, J.M., García, P., y García, J.L.** (1992). Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol. Microbiol.* **6**: 921-931.
- Sanz, J.M., López, R., y García, J.L.** (1988). Structural requirements of choline derivatives for "conversion" of pneumococcal amidase. *FEBS Lett.* **232**: 308-312.
- Schilling, O., Wenzel, N., Naylor, N., Vogel, A., Crowder, M., Makaroff, C., y Meyer-Klaucke, W.** (2003). Flexible metal binding of the metallo- β -lactamase domain: Glyoxalase II incorporates iron, manganese and zinc in vivo. *Biochemistry.* **42**: 11777-11786.
- Schleifer, K.H., y Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Severin, E, y Tomasz, A.** (1996). Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **178**: 168-174.
- Severin, E., Horne, D. y Tomasz, A.** (1997). Autolysis and cell wall degradation in a choline-independent strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug. Resist.* **3**: 391-400.
- Shan, F.** (1990). Pneumococcus and influenza. *Lancet.* **335**: 898-901.

- Shankar, K., y Bard, R.C.** (1952). The effect of metallic ions on the growth and morphology of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **63**: 279-290.
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R., y García, P.** (1997). The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.* **25**: 717-725.
- Sheldrick, G.M.** (1998) Direct Methods for Solving Macromolecular Structures. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp 401–411.
- Siboo, I.R., Bensing, B.A., y Sullam, P.M.** (2003). Genomic characterization of SM1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus mitis*. *J. Bacteriol.* **185**: 6968-6975.
- Silverman, D.N., y Tu, C.K.** (1986). Molecular basis of the oxygen exchange from CO₂ catalyzed by carbonic anhydrase III from bovine skeletal muscle. *Biochemistry.* **25**: 8402-8408.
- Smith, B.L., y Hostetter, M.K.** (2000). C3 as substrate for adhesion of *S.pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **182**: 497-508.
- Sørensen, U. B. S., Blom, J., Birch-Andersen, A., y Henrichsen, J.** (1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* **56**: 1890-1896.
- Sträter, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H., y Krebs, B.** (1995). Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science.* **268**: 1489-1492.
- Swiatlo, E., Champlin, F. R., Holman, S. C., Wilson, W. W. y Watt, J. M.** (2002). Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Inf. Immun.* **70**: 412-415.
- Szalai, A.J., Briles, D.E., y Volanakis, J.E.** (1996). Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *S.pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 4850-4853.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, r.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayan, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hanse, C.L., McDonald, L.A., Feldlyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Ilt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougerty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., y Fraser, C.M.** (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* **293**: 498-506.
- Thompson, D., Pepys, M.B., y Wood, S.P.** (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* **7**: 169-177.
- Tilled, W.S., Goebel, W.F., y Avery, O.T.** (1930). Chemical and immunological properties of a species-specific carbohydrate of pneumococci. *J. Exp. Med.* **52**: 895-900.
- Todd, M.J., y Gómez, J.** (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?. *Anal. Biochem.* **296**: 179-187.
- Tomasz, A.** (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science.* **157**: 694-697.
- Tomasz, A.** (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability and loss of autolysin. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* **59**: 86-93.

- Tomasz, A.** (1970). Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.* **101**: 860-871.
- Tomasz, A. y Westphal, M.** (1971). Abnormal autolytic enzyme in pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 2627-2630.
- Tomasz, A., Westphal, M., Briles, E.B., y Fletcher, P.** (1975). On the physiological functions of teichoic acids. *J. Supramol. Struct.* **3**: 1-16.
- Toney, J.H., Fitzgerald, P.M.D., Grover-Sharma, N., Olson, S.H., May, W.J., Sundelof, J.G., Vanderwall, D.E., Cleary, K.A., Grant, S.K., Wu, J.K., Kozarich, J.W., Pompliano, D.L., y Hammond, G.G.** (1998). Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteriodes fragilis* metallo- β -lactamase. *Chem. Biol.* **5**: 185-196.
- Tripton, K.F., y Dixon, H.B.** (1979). Effects of pH on enzymes. En *Methods in Enzymology*. (Purich, D.P., eds.) 63:183-234, Academic Press, New York.
- Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C., y Jennings, M.P.** (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidase stress. *Infect. Immun.* **68**: 2819-2826.
- Tsuchido, T., Hiraoka, T., Tanako, M. Y., y Thurman, P. F.** (1985). Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids. *J. Bacteriol.* **162**: 42-46.
- Tu, A.H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., y Szalai, A.J.** (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **67**: 4720-4724.
- Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B., y Zak, O.** (1985a). The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* **151**: 535-540.
- Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., y Tomasz, A.** (1985b). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* **151**: 859-868.
- Tuomanen, E., Rich, R., y Zak, O.** (1987). Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**: 869-874.
- Ullah, J.H., Walsh, T.R., Taylor, I.A., Emery, D.C., Verma, C.S., Gamblin, S.J., y Spencer, J.** (1998). The crystal structure of the L1 metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 125-136.
- Umeda, A., Yokoyama, S., Arizono, T. y Amako, K.** (1992). Location of peptidoglycan and teichoic acid on the cell wall surface of *Staphylococcus aureus* as determined by immunoelectron microscopy. *J. Electron Microsc.* **41**: 46-52.
- Usobiaga, P., Medrano, F.J., Gasset, M., García, J.L., Sáiz, J.L., Rivas, G., Laynez, J., y Menéndez, M.** (1996). Structural Organization of the Major Autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 6832-6838.
- Valladares, M.H., Felici, A., Weber, G., Adolph, H.W., Zeppezauer, M., Rossolini, G.M., Amicosante, G., Frère, J.M., y Galleni M.** (1997). Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo- β -lactamase activity and stability. *Biochemistry.* **36**: 11534-11541.
- VanDuyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., y Clardy, J.** (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**: 105-124.

- Varea, J., Monterroso, B., Saiz, J.L., García, J., López-Zumel, C., García, P y Menéndez, M.** (2004). Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci. *J. Biol. Chem.* **279**: 43697-43707.
- Varea, J., Sáiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Medrano, F.J., Arrondo, J.L.R., Iloro, I., Laynez, J., García, J.L., y Menéndez, M.** (2000). Do Sequence Repeats Play an Equivalent Role in the Choline-binding Module of Pneumococcal LytA Amidase?. *J. Biol. Chem.* **275**: 26842-26855.
- Vollmer, W. y Tomasz, A.** (2001). Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1610–1622.
- Vollmer, W., y Tomasz, A.** (2000). The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 20496-20501.
- Wang, Z., Fast, W., Valentine, AM., y Benkovic, J.** (1999). Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**: 614-622.
- Webb, M.** (1951). The influence of magnesium on cell division. The effect of magnesium on the growth of bacteria in chemically-defined media of varying complexity. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 485-495.
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., y Masure, H.R.** (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **62**: 2582-2589.
- Wenzel, N.F., Carenbauer, A.L., Pfiester, M.P., Schilling, O., Meyer-Klaucke, W., Makaroff, C.A., y Crowder, M.W.** (2004). The binding of iron and zinc to glyoxalase II occurs exclusively as di-metal centers and is unique within the metallo- β -lactamase family. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**: 429-438.
- Wilcox, D.E.** (1996). Binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.* **96**: 2435-2458.
- Wiseman, T., Willinston, S., Brandts, J y Lin, L-N.** (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**: 131-137.
- Wren, B.W.** (1991). A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeats sequences. *Mol. Microbiol.* **5**: 797-803.
- Yamaguchi, Y., Kuroki, T., Yasuzawa, H., Higashi, T., Jin, W., Kawanami, A., Yamagata, Y., Arakawa, Y., Goto, M., y Kurosaki, H.** (2005). Probing the role of Asp-120 (81) of metallo- β -lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **280**: 20824-20832.
- Yeung, M.K., y Mattingly, S.J.** (1986). Covalent linkage of the type- and group- specific antigens to the peptide moiety of the peptidoglycan of serotype III group B *Streptococcus*. *Curr. Microbiol.* **14**: 205-211.
- Yother, J.** (2004). Capsules. En *The pneumococcus*. (Tuomanen, E., Mitchell, T., Morrison, D.A., y Spratt, B.G., eds.), pp. 30-48. Washington: ASM Press.
- Yother, J., Leopold, K., White, J., y Fischer, W.** (1998). Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J. Bacteriol.* **180**: 2093-2101.
- Yother, J., y White, J.** (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J. Bacteriol.* **176**: 2976-2985.