

T 579.25

DIA  
est

BIBLIOTECA UCM



530532471X

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ESTUDIO MEDIANTE INGENIERÍA DE PROTEINAS DE LA AUTOLISINA LYTA  
DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

Memoria que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta:

**EDUARDO DIAZ FERNANDEZ**

Director de la Tesis

**Dr. José Luis García López**  
Investigador Científico

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Madrid, 1991

R. 21.842

*A mis padres*

*A mi hermano*

Quisiera expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han colaborado conmigo en la realización de este trabajo experimental que presento para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, y que ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

En primer lugar y de forma muy especial, deseo agradecer públicamente a mi director de tesis, el Dr. José Luis García López, sus enseñanzas, su confianza en mí, su apoyo y sus infatigables comentarios y sugerencias, que han hecho posible este trabajo. Asimismo, su profesionalidad y honradez han sido para mí, el mejor ejemplo a seguir durante estos años y han fomentado aún más mi vocación por la investigación. No quisiera olvidar tampoco la gran calidad humana de mi director, gracias a la cual el trabajo ha sido mucho más ameno, facilitando una relación de equipo de auténtica amistad.

Por otra parte, deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Rubens López, por haberme aceptado en su laboratorio, por sus valiosos consejos y por las facilidades que me ha brindado en todo momento para la realización de esta tesis. Asimismo, quiero agradecer al Dr. Ernesto García su desinteresada colaboración y sus numerosas sugerencias en distintos aspectos de este trabajo; al Dr. Pedro García la paciencia que conmigo ha demostrado, sus innumerables consejos, sus valiosas enseñanzas en muchas de las técnicas empleadas y el espíritu de orden y bien hacer que me ha infundido; y a la Dra. Concepción Ronda su ayuda y su enorme calidad humana.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, el Dr. José María Sánchez-Puelles, el Dr. Christian Croux, Alicia Romero y Jesús Miguel Sanz, su compañerismo y amistad, y de un modo muy especial a este último por su ayuda en las labores con el ordenador. La excelente asistencia técnica de Manuel Carrasco, Eloísa Cano, Juana Díaz y Remedios Galán ha facilitado en gran medida la rapidez de los trabajos.

Quiero agradecer a la Dra. Carmen Ascaso y a los Drs. Miguel Angel Peñalva, Santiago Rodríguez de Córdoba, Michel Sicard y T. A. Trautner la ayuda que me han prestado. Del mismo modo, doy las gracias a Asunción Fenoll por su amabilidad al haberme proporcionado la cepa de neumococo 101/87.

Mi agradecimiento al director del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la U.C.M., Dr. José Gavilanes, por haber facilitado la lectura de esta tesis, y al Dr. Roberto Arche por haber aceptado ser ponente de la misma.

Debo recordar aquí a todos los componentes del C.I.B. que de alguna manera han colaborado en este trabajo, particularmente a Aurelio Hurtado, Rosa Díaz, José Blanco y Eloy Blanco por el interés y ayuda prestados en las labores de delineación y fotografía.

Mi agradecimiento a Herminia Gutiérrez por la ayuda prestada en la mecanografía de esta memoria, y a los Drs. Rubens López y Ernesto García por su excelente revisión crítica de la misma.

Por último, deseo agradecer a mi familia su constante apoyo, comprensión y palabras de ánimo para conmigo.

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una Beca de Iniciación a la Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo.

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

<b>Ap</b>	: ampicilina.
<b>ATP</b>	: adenosina 5'-trifosfato.
<b>Ci</b>	: curio.
<b>Cm</b>	: cloranfenicol.
<b>CPM</b>	: cuentas por minuto.
<b>Da</b>	: daltons.
<b>dCTP</b>	: desoxicitosina 5'-trifosfato.
<b>DEAE</b>	: dietilaminoetanol.
<b>DNA</b>	: ácido desoxirribonucleico.
<b>dNTP</b>	: desoxirribonucleósido 5'-trifosfato.
<b>DOC</b>	: desoxicolato sódico.
$\Delta$	: delección.
<b>EA</b>	: etanolamina.
<b>EDTA</b>	: etiléndiaminotetraacetato
<b>Er</b>	: eritromicina.
<b>g</b>	: aceleración de la gravedad.
<b>ICDH</b>	: isocitrato-deshidrogenasa.
<b>IPTG</b>	: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.
<b>kb</b>	: 1.000 pb.
$K_m$	: constante de Michaelis.
<b>LB</b>	: medio de cultivo de Luria y Bertany.
<b>Ligasa</b>	: DNA ligasa del fago T4.
<b>LMT</b>	: agarosa de bajo punto de fusión.
<b>LTA</b>	: ácido lipoteicoico.
$M_r$	: masa molecular relativa.
<b>MIC</b>	: concentración mínima inhibidora.
<b>N</b>	: medida de la concentración celular mediante nefelometría
<b>ORF</b>	: marco de lectura abierto.
<b>PAGE</b>	: electroforesis en geles de poliacrilamida.
<b>pb</b>	: pares de bases.
<b>p/v</b>	: relación peso / volumen.
<b>R</b>	: resistencia.
<b>RBS</b>	: sitio de unión al ribosoma.
<b>RNA</b>	: ácido ribonucleico.
<b>RNAasa</b>	: ribonucleasa.
<b>S</b>	: sensibilidad.
<b>Sarkosyl</b>	: <i>N</i> -laurilsarcosinato sódico.
<b>SDS</b>	: dodecil sulfato sódico.
<b>Tc</b>	: tetraciclina.
<b>TM</b>	: tampón Tris-maleato.
<b>Tris</b>	: 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3,-diol.
<b>UFC</b>	: unidades formadoras de colonias.
<b>v/v</b>	: relación volumen / volumen.

# INDICE

Pág.

## **I. INTRODUCCION.**

<b>I. ESTRUCTURA DE LA PARED BACTERIANA.....</b>	<b>2</b>
1.1. El peptidoglicano .....	3
1.2. Evolución de la estructura del peptidoglicano .....	5
1.3. Estructura tridimensional del peptidoglicano. ....	5
1.4. Los ácidos teicoicos. ....	8
<b>2. ENZIMAS QUE DEGRADAN EL PEPTIDOGLICANO .....</b>	<b>10</b>
2.1. Autolisinas bacterianas .....	10
2.2. Funciones de las autolisinas. ....	13
2.2.1. Crecimiento de la pared celular. ....	13
2.2.2. Recambio de los polímeros de pared ( <i>turnover</i> ).....	14
2.2.3. Separación celular y motilidad.....	15
2.2.4. Transformación genética. ....	16
2.2.5. Liberación de la descendencia fágica.....	17
2.2.6. Acción de los antibióticos .....	17
2.2.6.1. Tolerancia antibiótica. ....	21
2.3. Enzimas líticas de bacteriófagos .....	23
<b>3. TRANSLOCACION DE PROTEINAS EN PROCARIOTAS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Consideraciones generales .....	25
3.2. Localización proteica en la envoltura bacteriana .....	25
3.3. Hipótesis de la secuencia señal. ....	26
3.4. El péptido señal .....	26
3.4.1. Características generales. ....	26
3.4.2. Región <i>Pre-core</i> (N-terminal). ....	28
3.4.3. Región del <i>core</i> hidrofóbico.....	28
3.4.4. Región <i>post-core</i> (C-terminal) .....	29
3.4.5. Lugar de ruptura. ....	29
3.4.6. Predicciones sobre la conformación del péptido señal .....	29

<b>3.5. Otras secuencias de señalización para la inserción y translocación de proteínas a través de membranas</b> .....	30
<b>3.6. Importancia de la proteína madura en el proceso de translocación</b> .....	32
<b>3.7. Proteínas implicadas en el mecanismo de translocación de <i>E. coli</i></b> .....	32
3.7.1. Peptidasa señal y peptidasa de péptidos señal .....	32
3.7.2. SecB, Factor <i>trigger</i> y GroEL.....	33
3.7.3. SecA y SecY .....	33
3.7.4. SecD, SecE y PrIC.....	33
3.7.5. Mutantes Lky. ....	34
<b>3.8. Translocación de proteínas en bacterias Gram-positivas</b> .....	34
<b>3.9. Modelos de translocación proteica</b> .....	34
<b>3.10. Conservación evolutiva del mecanismo de translocación</b> .....	35
<b>4. ESTUDIOS EN NEUMOCOCO</b> .....	36
<b>4.1. Visión histórica : importancia del neumococo en el desarrollo de la biología y la medicina</b> .....	36
<b>4.2. Clasificación</b> .....	36
<b>4.3. Aspectos estructurales de las envolturas de neumococo</b> . ....	37
4.3.1. Membrana plasmática.....	37
4.3.2. Pared celular .....	39
4.3.2.1. El peptidoglicano. ....	39
4.3.2.2. Los ácidos teicoicos.....	40
4.3.2.3. La colina como componente estructural de la pared celular de neumococo .....	41
4.3.3. Cápsula.....	43
<b>4.4. Factores de virulencia en neumococo</b> .....	43
<b>4.5. Aspectos genéticos</b> .....	44
<b>4.6. El sistema lítico de pared de neumococo y sus bacteriófagos</b> .....	45
4.6.1. Enzimas autolíticas de <i>S. pneumoniae</i> . ....	45
4.6.1.1. Características de la amidasa LYTA.....	46
4.6.1.1.1. Proceso de activación ( <i>conversión</i> ) de la amidasa LYTA.....	47
4.6.1.1.2. Inhibidores de la actividad catalítica de la amidasa LYTA.....	48
4.6.1.1.3. Efecto del LTA en la regulación celular de la amidasa LYTA. ....	48
4.6.1.1.4. Efecto del DOC en neumococo .....	49

4.6.1.1.5. Clonación del gen que codifica para la amidasa LYTA, gen <i>lytA</i> .....	50
4.6.1.1.6. Caracterización de mutantes en el gen <i>lytA</i> .....	51
4.6.1.1.7. Funciones de la autolisina LYTA en neumococo.....	51
4.6.1.2. Características de la glucosaminidasa.....	53
4.6.2. Enzimas líticas de pared de fagos que infectan a <i>S. pneumoniae</i> .....	54
4.6.3. Comparación de las enzimas líticas de pared de <i>S. pneumoniae</i> y de sus bacteriófagos...	56
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>60</b>

## **II. MATERIALES Y METODOS.**

<b>1. ESTIRPES BACTERIANAS, BACTERIOFAGOS Y PLASMIDOS.....</b>	<b>63</b>
<b>2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....</b>	<b>63</b>
2.1. <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. oralis</i> .....	63
2.2. <i>E. coli</i> .....	63
<b>3. DETERMINACION DEL FENOTIPO LYT (DOC).....</b>	<b>66</b>
3.1. En medio de cultivo sólido.....	66
3.2. En medio de cultivo líquido.....	67
<b>4. CURACION FENOTIPICA DE NEUMOCOCO.....</b>	<b>67</b>
<b>5. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACION GENETICA.....</b>	<b>67</b>
5.1. Transformación de <i>S. pneumoniae</i> .....	67
5.1.1. Obtención y valoración del factor de competencia.....	68
5.2. Transformación de <i>S. oralis</i> .....	68
5.3. Transformación de <i>E. coli</i> .....	68
<b>6. OBTENCION DE EXTRACTOS CRUDOS DE CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>69</b>
<b>7. TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR EN <i>E. coli</i>.....</b>	<b>69</b>
7.1. Fraccionamiento subcelular mediante choque osmótico.....	69
7.2. Fraccionamiento subcelular mediante la formación de esferoplastos.....	70
<b>8. OBTENCION DE LAS PAREDES CELULARES DE NEUMOCOCO.....</b>	<b>70</b>
8.1. Marcaje radiactivo de las paredes celulares.....	70
8.2. Aislamiento y purificación de las paredes celulares.....	71
<b>9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....</b>	<b>71</b>
9.1. Determinación de la actividad de las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo.....	71

9.1.1. Ensayo enzimático de los extractos obtenidos de <i>E. coli</i> .	71
9.1.2. Ensayo enzimático de los extractos obtenidos de <i>S. pneumoniae</i> .	72
9.1.3. Ensayo enzimático de las proteínas purificadas.	73
<b>9.2. Determinación de la actividad de la <math>\beta</math>-lactamasa y de la ICDH.</b>	<b>73</b>
<b>10. CONVERSION DE LA AMIDASA LYTA IN VIVO EN CELULAS PLASMOLISADAS DE <i>E. coli</i> CM21</b>	<b>73</b>
<b>11. OBTENCION DEL SUERO ANTI-AMIDASA LYTA. ANALISIS INMUNOCITOQUIMICO EN NEUMOCOCO Y <i>E. coli</i> CM21</b>	<b>74</b>
<b>12. PURIFICACION DE LAS ENZIMAS LITICAS DE PARED DE NEUMOCOCO Y DE SUS BACTERIOFAGOS</b>	<b>75</b>
12.1. Purificación mediante cromatografía en DEAE-celulosa.	75
12.2. Purificación de la lisozima CPL7 y de la amidasa LC7.	75
<b>13. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS</b>	<b>76</b>
<b>14. DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE LA AMIDASA LYTA.</b>	<b>76</b>
<b>15. EXTRACCION DEL DNA CROMOSOMICO DE NEUMOCOCO</b>	<b>76</b>
<b>16. PREPARACION DE PLASMIDOS.</b>	<b>77</b>
16.1. Determinación del número de copias de los plásmidos en neumococo	77
<b>17. MANIPULACION DEL DNA CON ENZIMAS DE USO COMUN EN BIOLOGIA MOLECULAR</b>	<b>78</b>
<b>18. ELECTROFORESIS DEL DNA EN GELES DE AGAROSA.</b>	<b>78</b>
<b>19. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA</b>	<b>78</b>
19.1. Geles de agarosa de bajo punto de fusión.	78
19.2. Geles de poliacrilamida	79
19.3. Técnica del GeneClean	79
<b>20. AISLAMIENTO DEL RNA</b>	<b>79</b>
<b>21. DETERMINACION DE LOS SITIOS DE INICIACION Y TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION MEDIANTE EL EMPLEO DE LA NUCLEASA SI.</b>	<b>80</b>
<b>22. SECUENCIACION DEL DNA</b>	<b>81</b>
<b>23. MUTAGENESIS DIRIGIDA.</b>	<b>81</b>
<b>24. ENSAYOS DE TRANSCRIPCION-TRADUCCION IN VITRO.</b>	<b>81</b>
<b>25. TECNICAS DE HIBRIDACION DE DNA.</b>	<b>82</b>
25.1. Técnica de Southern-blot.	82
25.2. Hibridación de DNA sobre filtros de colonias celulares.	82

<b>26. TECNICA DE WESTERN-BLOT .....</b>	<b>82</b>
<b>27. PURIFICACION DEL FAGO EJ-I .....</b>	<b>83</b>
<b>27.1. Observación al microscopio electrónico.....</b>	<b>83</b>
<b>28. OBTENCION DEL DNA DEL FAGO EJ-I .....</b>	<b>84</b>
<b>III. RESULTADOS.</b>	
<b>I. CARACTERIZACION DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCION DEL GEN <i>lytA</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>1.1. Identificación de la región promotora del gen <i>lytA</i>.....</b>	<b>86</b>
1.1.1. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción.....	86
1.1.2. Análisis de las secuencias promotoras y de la región <i>leader</i> .....	90
<b>1.2. Determinación del sitio de terminación de la transcripción en el gen <i>lytA</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>2. APLICACION DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCION DEL GEN <i>lytA</i> AL DISEÑO DE VECTORES PARA EL ANALISIS TRANSCRIPCIONAL EN BACTERIAS .....</b>	<b>97</b>
<b>2.1. Construcción de los plásmidos pLSE3 y pLSE4.....</b>	<b>97</b>
<b>2.2. Transformación de <i>S. oralis</i> con los plásmidos pLSE3 y pLSE4. ....</b>	<b>101</b>
<b>2.3. Utilización del plásmido pLSE4 como un vector para la búsqueda de promotores en bacterias. ....</b>	<b>101</b>
<b>3. REGULACION CELULAR DE LA AMIDASA LYTA. ....</b>	<b>103</b>
<b>3.1. Expresión del gen <i>lytA</i> durante el crecimiento celular de neumococo .....</b>	<b>103</b>
3.1.1. Expresión del gen <i>lytA</i> en la cepa R6 de neumococo .....	103
3.1.2. Expresión del gen <i>lytA</i> en las cepas de neumococo M31 (pED1) y M31 (pED2) .....	103
<b>3.2. Estudio de la expresión y regulación de una amidasa LYTA truncada en su extremo C-terminal.....</b>	<b>106</b>
3.2.1. Construcción del plásmido pED3 y análisis de la amidasa LYTA truncada .....	106
3.2.2. Obtención y caracterización de la cepa EM3 de <i>S. pneumoniae</i> . ....	109
<b>4. LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA AMIDASA LYTA DE NEUMOCOCO. ....</b>	<b>114</b>
<b>4.1. Localización subcelular de la amidasa LYTA mediante técnicas inmunocitoquímicas.....</b>	<b>114</b>
4.1.1. Localización inmunocitoquímica en <i>S. pneumoniae</i> .....	114
4.1.2. Localización inmunocitoquímica en <i>E. coli</i> .....	117
<b>4.2. Localización subcelular de la amidasa LYTA en <i>E. coli</i> mediante técnicas de fraccionamiento subcelular.....</b>	<b>117</b>

4.2.1. Fraccionamiento subcelular mediante choque osmótico.....	117
4.2.2. Localización subcelular mediante la formación de esferoplastos.....	120
4.2.3. <i>Conversión in vivo</i> de la amidasa LYTA en células plasmolisadas de <i>E. coli</i> CM21 .....	123
<b>4.3. Localización subcelular de la amidasa LYTA en mutantes de secreción de <i>E. coli</i>.</b> .....	125
<b>4.4. Estudio del mecanismo de secreción de la amidasa LYTA.</b> .....	125
<b>5. ENZIMAS LITICAS QUIMERICAS ENTRE LA AMIDASA LYTA Y LAS LISOZIMAS CPL1 o CPL7.</b> .....	129
<b>5.1. Enzimas líticas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL1</b> .....	129
5.1.1. Construcción de las enzimas quiméricas CLL y LCA. ....	129
5.1.2. Caracterización bioquímica de las proteínas quiméricas.....	132
5.1.3. Actividad <i>in vivo</i> de las enzimas quiméricas.....	137
<b>5.2. Enzimas líticas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL7</b> .....	141
5.2.1. Construcción de las quimeras LC7 y CL7. ....	141
5.2.2. Purificación de las enzimas quiméricas. ....	143
5.2.3. Actividad <i>in vivo</i> de las enzimas quiméricas.....	147
5.2.4. Clonación y expresión de la amidasa quimérica LC7 en <i>S. 152 pneumoniae</i> .....	152
<b>6. CLONACION Y EXPRESION EN <i>E. coli</i> DEL DOMINIO N-TERMINAL DE LA AMIDASA LYTA.</b> .....	157
<b>6.1. Construcción del plásmido pGL300.</b> .....	157
<b>6.2. Análisis de los extractos de <i>E. coli</i> RB791 (pGL300).</b> .....	159
<b>7. CARACTERIZACION DEL SISTEMA LITICO DE LA CEPA CLINICA ATIPICA <i>S. pneumoniae</i> 101/87.</b> .....	162
<b>7.1. Aislamiento y procedencia de la cepa 101/87.</b> .....	162
<b>7.2. Características fisiológicas de la cepa 101/87</b> .....	162
7.2.1. Crecimiento en medio de cultivo CY.....	162
7.2.2. Respuesta al tratamiento con detergentes. ....	164
7.2.3. Experimentos de transformación genética .....	164
7.2.4. Infección con bacteriófagos de neumococo. ....	165
7.2.5. Determinación <i>in vitro</i> de los niveles de actividad hidrolítica de pared.....	165
7.2.6. Análisis de los extractos celulares mediante <i>Western-blot</i> .....	167
7.2.7. Efecto del desoxicolato sobre la actividad hidrolítica de pared en ensayos <i>in vitro</i> .....	167
<b>7.3. Clonación y expresión en <i>E. coli</i> del gen <i>lytA101</i> de <i>S. pneumoniae</i> 101/87.</b> .....	167

7.3.1. Clonación y secuenciación del gen <i>lytA101</i> .....	169
7.3.2. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína LYTA101 .....	173
<b>7.4. Clonación y expresión del gen <i>lytA101</i> en <i>S. pneumoniae</i> M31 .....</b>	<b>173</b>
<b>7.5. Caracterización de una delección en el DNA de la cepa 101/87. ....</b>	<b>177</b>
<b>7.6. Clonación y expresión en <i>E. coli</i> de un segundo gen lítico de pared de <i>S. pneumoniae</i> 101/87, gen <i>ejl</i> .....</b>	<b>180</b>
7.6.1. Identificación de una segunda secuencia homóloga al gen <i>lytA</i> en el cromosoma de la cepa 101/87 .....	180
7.6.2. Clonación en <i>E. coli</i> de los fragmentos de restricción <i>Bcl</i> I (1,1 kb) y <i>Eco</i> RI (1,4 kb) del DNA de la cepa 101/87 que hibridan con el gen <i>lytA</i> .....	183
7.6.3. Secuenciación del inserto clonado en el plásmido pNE103.....	183
7.6.4. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína EJL. ....	186
<b>7.7. Expresión de las amidasas LYTA101 y EJL en <i>S. pneumoniae</i> 101/87.....</b>	<b>188</b>
<b>7.8. Comparación de las secuencias de nucleótidos, y de las secuencias de aminoácidos derivadas, de los genes <i>lytA</i>, <i>lytA101</i>, <i>ejl</i> y <i>hbl</i> .....</b>	<b>188</b>
<b>7.9. Determinación del mapa físico del gen <i>ejl</i> en el cromosoma de la cepa 101/87. ....</b>	<b>192</b>
<b>7.10. Caracterización de un fago atemperado de <i>S. pneumoniae</i> 101/87 .....</b>	<b>197</b>
7.10.1. Tratamiento de <i>S. pneumoniae</i> 101/87 con mitomicina C .....	197
7.10.2. Aislamiento y purificación del fago EJ-1 .....	197
7.10.3. Características estructurales del fago EJ-1 .....	199
7.10.4. Características fisiológicas del fago EJ-1 .....	199
7.10.5. Características del DNA del fago EJ-1 .....	203
<b>7.11. Demostración del origen fágico del gen <i>ejl</i>. ....</b>	<b>203</b>
 <b>IV. <u>DISCUSION.</u></b>	
<b>1. CARACTERIZACION DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCION DEL GEN <i>lytA</i> .....</b>	<b>209</b>
<b>2. REGULACION CELULAR DE LA AMIDASA LYTA. ....</b>	<b>213</b>
<b>3. RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN LA AMIDASA LYTA .....</b>	<b>219</b>
<b>4. CARACTERIZACION DEL SISTEMA LITICO DE LA CEPA 101/87 .....</b>	<b>225</b>
 <b>V. <u>CONCLUSIONES.</u></b> .....	<b>236</b>
 <b>VI. <u>BIBLIOGRAFIA.</u></b> .....	<b>240</b>

**I. INTRODUCCION**

## **I. ESTRUCTURA DE LA PARED BACTERIANA.**

Las bacterias, al igual que otros microorganismos, han desarrollado una estructura protectora continua que constituye un exoesqueleto integrado por distintos glicopéptidos y heteropolisacáridos que les permite sobrevivir en los ecosistemas naturales. En el caso de las eubacterias este esqueleto está formado por una o varias capas de un glicopéptido que recibe el nombre de peptidoglicano, mureína o mucopéptido (los micoplasmas y arqueobacterias no poseen peptidoglicano).

El reconocimiento del peptidoglicano como envoltura celular continua alrededor de la membrana plasmática se puso de manifiesto durante la mitad de la década de los sesenta (Weidel y Pelzer, 1964) y su función es el mantenimiento de la viabilidad celular bajo las condiciones ambientales normales (con una diferencia de presión entre el interior y exterior de la célula de más de 20 atmósferas), confiriendo al mismo tiempo la morfología típica a cada especie bacteriana (cocos, bacilos, etc.) y restringiendo la difusión de solutos.

En todas las bacterias Gram-positivas el mantenimiento de la forma y la protección de la membrana plasmática es asumida exclusivamente por el gran número de capas que posee el peptidoglicano de la pared celular, cuyo espesor varía de 15 a 40 nm según las especies. La pared celular de las bacterias Gram-positivas representa del 15 al 30% del peso seco de la bacteria. Contrariamente a las bacterias Gram-positivas, todas las bacterias Gram-negativas han desarrollado una estructura del peptidoglicano más simple; aunque tradicionalmente era considerada como una monocapa, estudios más recientes parecen indicar que también tiene un ligero carácter multilaminar (Labischinski y cols., 1985).

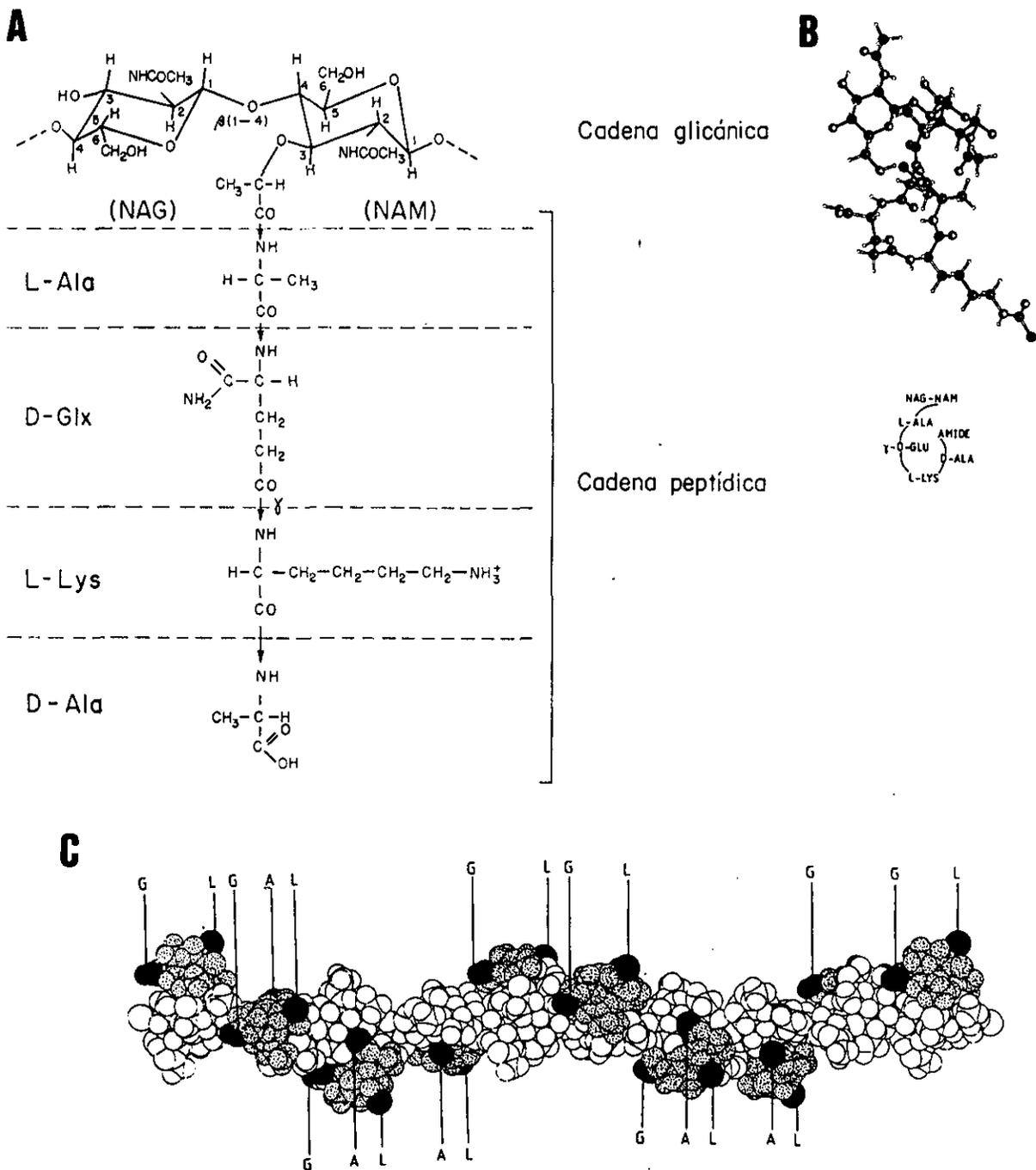
El análisis de secciones ultrafinas de bacterias Gram-negativas revela la existencia de una envoltura celular más compleja que la observada en bacterias Gram-positivas. La envoltura de las bacterias Gram-negativas consta, desde el interior al exterior de la célula, de tres capas bien diferenciadas entre sí tanto estructural como funcionalmente: (i) la membrana interna; (ii) la capa de peptidoglicano y (iii) la membrana externa, esencialmente una barrera de permeabilidad selectiva que desempeña funciones de relación con el medio de cultivo que rodea a la bacteria y de protección frente a sustancias químicas que pudieran ser nocivas (Nikaido y Vaara, 1985). La membrana externa, unida covalentemente al peptidoglicano, contribuye asimismo a la resistencia mecánica de la propia pared. La capa de peptidoglicano de las bacterias Gram-negativas es discontinua en ciertas áreas que corresponden a zonas de adhesión entre la membrana plasmática y la membrana externa (Bayer, 1975).

### 1.1. El peptidoglicano.

Los peptidoglicanos bacterianos se componen de cadenas glicánicas unidas entre sí mediante cadenas peptídicas (Figura 1 A). La estructura glicánica está constituida por cadenas lineales con residuos piranósidos alternantes de 2-N-acetilamino-2-desoxi-D-glucosa (N-acetilglucosamina) y 2-N-acetilamino-3-O-(D-1-carboxietil)-2-desoxi-D-glucosa (ácido N-acetilmurámico), unidos entre sí por enlaces glicosídicos  $\beta$  1,4. Se trata de una estructura análoga a la de la quitina en la que cada residuo alternante de N-acetilglucosamina contiene unido al carbono 3 un grupo lactilo. A veces los grupos acetilo se encuentran sustituidos y aparecen acil y glicosil derivados. El ácido N-acetilmurámico puede estar acetilado o fosforilado en el carbono en posición 6, lo que permite la formación de puentes de hidrógeno con cadenas glicánicas adyacentes; estas modificaciones pueden darse a lo largo del crecimiento del cultivo bacteriano.

En la mayoría de los peptidoglicanos estudiados todos los grupos D-lactilo del ácido murámico se encuentran sustituidos por péptidos (Schleiffer y Kandler, 1972; Ghuyssen, 1977). Sin embargo, en unas pocas especies como *Micrococcus luteus* y Micrococáceas relacionadas, alrededor del 30-40% de los residuos de ácido N-acetilmurámico no se encuentran unidos a sustituyentes peptídicos. Unidas al grupo carboxilo del ácido murámico existen cadenas de cuatro aminoácidos L-alanil-D-glutamil-L-R<sub>3</sub>-D-alanina, que a veces son sólo de tres aminoácidos por pérdida de la D-alanina terminal. El residuo L-R<sub>3</sub> puede ser un aminoácido neutro (L-alanina, L-homoserina), ácido (L-glutámico) o básico (ácido L-diaminobutírico, L-ornitina, L-lisina, ácido mesodiaminopimélico). La D-alanina terminal puede ser sustituida por L-serina o glicina. El grupo  $\alpha$ -carboxilo del ácido D-glutámico puede permanecer libre, amidado, sustituido por una glicina C-terminal o por una glicinamida. También puede encontrarse el ácido treo-3-hidroxi-glutámico sustituyendo al ácido D-glutámico. Las uniones entre los péptidos se producen en  $\alpha$ , excepto en el enlace entre el ácido D-glutámico y el residuo L-R<sub>3</sub> que tiene lugar en posición  $\gamma$  (Figura 1 A). La secuencia alternante L-D-L-D del esqueleto peptídico (Figura 1 A) le permite adquirir una conformación espacial en anillo (apartado 1.3.) y lo hace, al mismo tiempo, resistente a la mayoría de las proteasas y susceptible a la acción de los antibióticos que actúan sobre las uniones entre D-aminoácidos.

Las unidades peptídicas que se encuentran unidas a las cadenas glicánicas pueden a su vez unirse entre sí mediante los denominados puentes interpeptídicos. Basándose en la composición y localización de estos puentes el peptidoglicano ha sido clasificado en cuatro tipos principales (Ghuyssen, 1977). La unión entre dos unidades peptídicas se establece siempre entre la D-alanina C-terminal de un péptido y el grupo  $\epsilon$ -amino del aminoácido básico L-R<sub>3</sub> (tipos I, II, III) o el grupo  $\alpha$ -carboxilo del ácido D-glutámico (tipo IV) de otra unidad peptídica.



**Figura I.** Estructura de una cadena de peptidoglicano.

**Panel A.** Estructura primaria de la cadena de peptidoglicano (cadena glicánica y cadena peptídica). Las abreviaturas utilizadas son : NAG, *N*-acetilglucosamina; NAM, *N*-acetilmurámico. Los aminoácidos de la cadena peptídica se indican en código de tres letras. D-Glx, indica que el grupo  $\alpha$ -carboxilo del ácido D-glutámico se encuentra amidado (isoglutamina).  $\tau$ , significa que el enlace peptídico tiene lugar con el grupo  $\tau$ -carboxilo de la isoglutamina.

**Panel B.** Conformación más probable para la unidad de disacárido-tetrapéptido.

**Panel C.** Representación esquemática de una cadena de peptidoglicano compuesta de diez unidades repetidas de disacárido-tetrapéptido. La cadena glicánica se representa con círculos blancos. La cadena peptídica se representa con círculos punteados. Los grupos que intervienen en los enlaces interpeptídicos se indican con círculos negros : A, grupo  $\alpha$ -carboxilo de la D-alanina terminal; L, grupo  $\epsilon$ -amino de la cadena lateral de la L-lisina; G, grupo  $\alpha$ -carboxilo del ácido D-glutámico.

Los paneles B y C están tomados de Barnickel y cols. (1983).

La proporción de unidades peptídicas que se encuentran formando parte de enlaces cruzados varía según la especie. El microorganismo en el que se ha encontrado mayor proporción de unidades peptídicas formando parte de enlaces cruzados (90%) es *Staphylococcus aureus*. Por el contrario, muchos peptidoglicanos del tipo I (el de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y, probablemente, la mayoría de los peptidoglicanos de bacterias Gram-negativas), y el de *M. luteus*, sólo poseen un índice de enlaces cruzados de un 20-25% (Nauman y cols., 1982)

El peptidoglicano como tal tiene importantes propiedades antigénicas, así como efectos piro y sofrogénicos (Salton, 1983).

## **1.2. Evolución de la estructura del peptidoglicano.**

El peptidoglicano más frecuente es el de tipo I, con el ácido diaminopimélico en la posición R<sub>3</sub> de la unidad peptídica. El puente interpeptídico es directo mediante un enlace cruzado (D)-alanil-D-ácido mesodiaminopimélico. Se encuentra en los bacilos Gram-positivos, probablemente en todas las bacterias Gram-negativas y en los procariotas más evolucionados como mixobacterias y cianobacterias (Jurgens y Wecknesser, 1985). La enorme complejidad y diversificación en la estructura primaria, brevemente descritas en el apartado anterior, sólo ha sido encontrada en las bacterias Gram-positivas. Si se acepta la idea de que los avances filogenéticos se manifiestan por la simplificación y pérdida de variabilidad (fijación), la complejidad de los peptidoglicanos de las bacterias Gram-positivas debe representar un estadio primitivo en la evolución. De acuerdo con esto, el peptidoglicano que contiene el ácido mesodiaminopimélico formando enlaces cruzados directos no sería sólo el más ventajoso sino también el más avanzado evolutivamente.

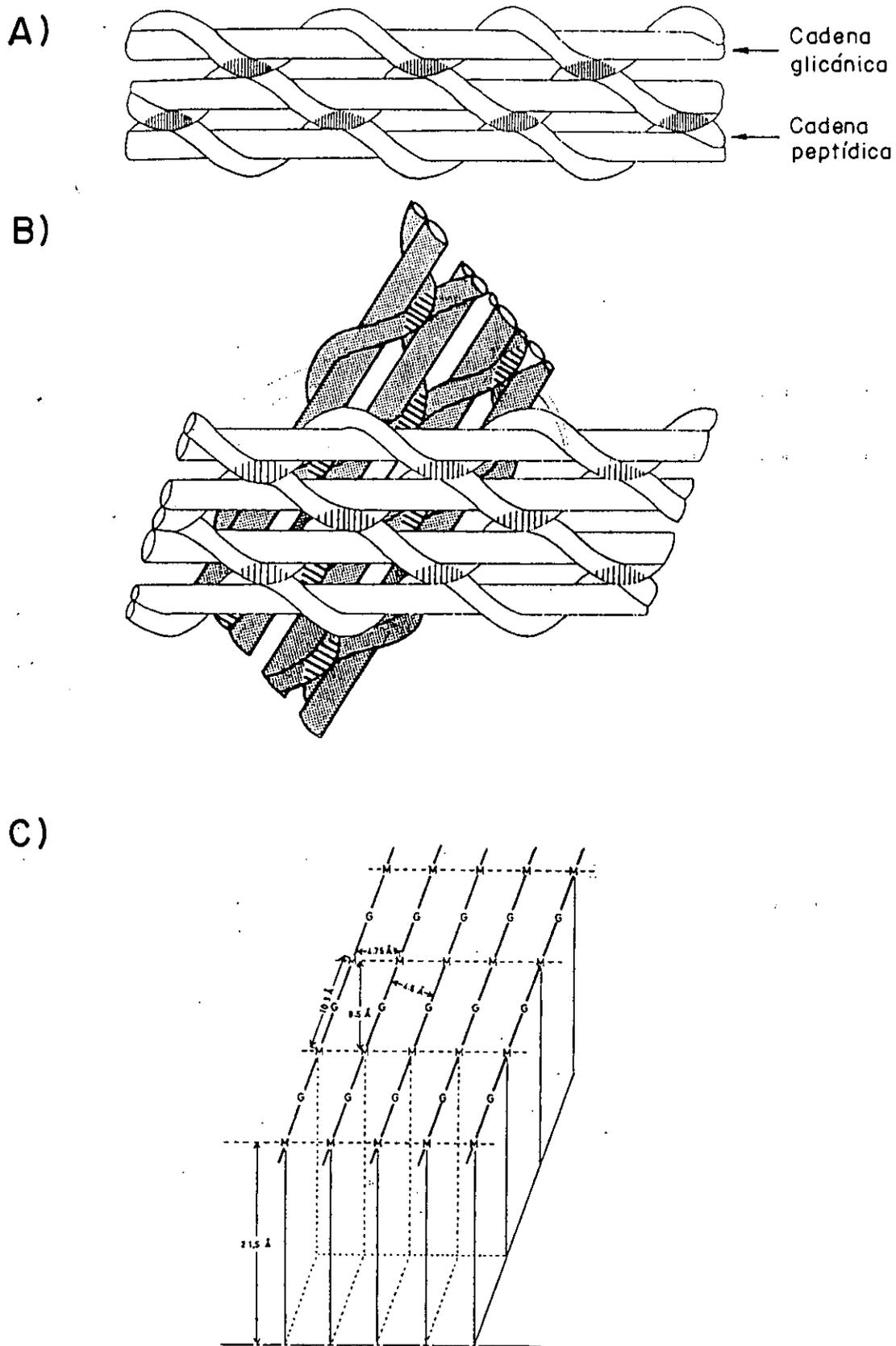
## **1.3. Estructura tridimensional del peptidoglicano.**

A pesar de que la estructura primaria del peptidoglicano se conoce bastante bien, su estructura tridimensional todavía no se encuentra bien definida. El modelo propuesto por Weidel y Pelzer (1964) que sugiere que el peptidoglicano constituye una macromolécula que rodea completamente a la célula es todavía en esencia válido. Sin embargo, la idea tal y como fue planteada originalmente puede dar la falsa impresión de la existencia de enormes cadenas glicánicas conectadas entre sí. En realidad, tanto las cadenas glicánicas como las unidades peptídicas presentan muchos grupos terminales. La longitud media de las cadenas glicánicas establecida para varios peptidoglicanos oscila alrededor de los 35 disacáridos (Beveridge, 1981; Glauner y Schwarz, 1983), lo que, teniendo en cuenta las dimensiones de los aminoazúcares en la

configuración más favorecida del peptidoglicano (Formanek, 1983), supone una longitud media aproximada de 35 nm. En *E. coli* la cadena glicánica termina en la forma 1,6 anhidra del ácido *N*-acetilmurámico.

La cadena peptídica unida al ácido *N*-acetilmurámico adopta, en su conformación más estable, una estructura tridimensional en anillo (hélice 2.27) con la alanina C-terminal próxima al primer residuo de dicha cadena (Figura 1 B). Esta estructura se ve favorecida tanto por la alternancia entre las formas D y L de los residuos que constituyen el péptido como por el enlace peptídico en posición  $\tau$  del ácido glutámico. Esta disposición de la cadena peptídica le permite interactuar mediante puentes de hidrógeno con la cadena glicánica (Barnickel y cols., 1983), que adquiere una conformación como la que se representa en la Figura 1 C. Se trata de una disposición helicoidal del esqueleto glicánico y, por lo tanto, de los péptidos que interactúan con él, en donde el número de unidades disacarídicas por vuelta de hélice es variable (cinco por término medio). Los grupos que intervienen en la formación de enlaces cruzados con otras cadenas peptídicas se localizan en la superficie de la molécula en disposición helicoidal, y son la principal causa de cohesión en la malla del peptidoglicano pues representan la única unión covalente entre las hebras glicánicas (Barnickel y cols., 1983). Como consecuencia del giro entre unidades disacarídicas adyacentes, los péptidos se proyectan en diferentes orientaciones respecto a la cadena glicánica, de tal forma que para el enlace cruzado entre dos de estas cadenas que se encuentren en el mismo plano y adyacentes sólo podrán participar aquellos péptidos que estén enfrentados espacialmente. Los péptidos que no se disponen en el plano de una capa de mureína no pueden participar en uniones cruzadas dentro de dicha capa, y son los encargados de establecer enlaces con otras capas del peptidoglicano. Por ello, las bacterias Gram-positivas presentan un porcentaje de enlaces interpeptídicos superior al presentado por las bacterias Gram-negativas. Una malla bidimensional de mureína continua y entrecruzada sólo es posible si las cadenas glicánicas se disponen empaquetadas en paralelo y ligeramente rotadas unas respecto a otras (Figura 2 A) (Labischinski y cols., 1985). En las bacterias Gram-positivas las capas de mureína se disponen formando un ángulo de  $60^\circ$  con las capas adyacentes, lo que permite un máximo de conexiones interpeptídicas y la aparición de oligómeros peptídicos (Figura 2 B). Según Formanek (1983), una célula de la malla tridimensional del peptidoglicano tendría las dimensiones que se detallan en la Figura 2 C.

Según estos modelos el sáculo de mureína cumpliría sus dos requisitos básicos: rigidez, debida a la cadena glicánica, y flexibilidad, conferida por el componente peptídico. Como resultado de fuerzas mecánicas la conformación girada de la cadena peptídica puede pasar a extendida, lo que produce incrementos de más del 200% en la distancia que separa a dos cadenas glicánicas adyacentes. La estructura del peptidoglicano puede calificarse de paracristalina, con



**Figura 2.** Modelo de la estructura tridimensional del peptidoglicano.

**Panel A.** Disposición paralela de las cadenas de peptidoglicano en una capa de mureína. Las regiones en las que se producen los enlaces cruzados se señalan con una zona sombreada.

**Panel B.** Representación esquemática de dos capas adyacentes de mureína.

Los paneles A y B están tomados de Labischinski y cols. (1985).

**Panel C.** Representación esquemática de la malla tridimensional del peptidoglicano. Se detallan las dimensiones de cada célula, definida por la unidad disacárido-tetrapéptido. M, ácido N-acetilmurámico; N, N-acetilglucosamina. Tomado de Formanek (1983).

defectos en la red (poros) que permiten la interacción con proteínas de la pared como las enzimas autolíticas (Beveridge, 1981). El volumen de poro calculado como porcentaje del volumen total de la pared seca es de un 5% para *Bacillus megaterium*, con un radio de poro medio de 13 nm. El agua desempeña un papel fundamental en la pared celular ya que representa el 92% de su peso, confiriéndole una densidad aproximada de  $1,1 \text{ g/cm}^3$ . Las paredes celulares deshidratadas incrementan su densidad a  $1,3 \text{ g/cm}^3$  y su porosidad se reduce (Beveridge, 1981). En la región correspondiente al septo de la célula la pared celular puede presentar una estructura anular de apariencia fibrilar que se interpreta como un reflejo del crecimiento centrípeto del peptidoglicano en esta zona (Salton, 1983).

#### 1.4. Los ácidos teicoicos.

La pared celular puede aislarse como un residuo insoluble que mantiene sus características morfológicas (Shockman y Barrer, 1983). Esta preparación contiene además del peptidoglicano, que supone más del 40% de la masa de la pared bacteriana, uno o varios polímeros diferentes del peptidoglicano, tales como los ácidos teicoicos, teicurónicos, polisacáridos ácidos o neutros y, en el caso de micobacterias, lípidos complejos. Estos polímeros, en las especies estudiadas, se encuentran covalentemente unidos al peptidoglicano y, por lo tanto, en la mayoría de las bacterias Gram-positivas podemos definir la pared celular como el peptidoglicano insoluble más los polímeros unidos a él covalentemente (Rogers, 1974).

El término de ácidos teicoicos fue acuñado por Baddiley para designar los polímeros de glicerolfosfato o ribitolfosfato en los que las unidades repetidas se unen a través de enlaces fosfodiéster (Armstrong y cols., 1958). Los ácidos teicoicos sólo se han encontrado en bacterias Gram-positivas. Aunque inicialmente se pensó que éstos se unían covalentemente al peptidoglicano mediante un enlace directo entre el grupo fosfato terminal del ácido teicoico y el carbono en posición 6 del ácido murámico, se ha comprobado que, en muchas especies bacterianas, existe un compuesto intermedio implicado en dicho enlace cuya composición varía de unas bacterias a otras (Kojima y cols., 1985). Las paredes de las bacterias Gram-positivas presentan una estructura trilamelar al microscopio electrónico, con las caras interna y externa más opacas que la porción central, reflejando la disposición de los ácidos teicoicos en la pared. En *B. subtilis* por ejemplo, un 50% de los ácidos teicoicos se localiza en la cara interna y externa de la pared, el otro 50% ocupa la porción central (Beveridge, 1981).

Los ácidos teicoicos son altamente antigénicos y frecuentemente se han utilizado como sustancias grupo o tipo específicas. Son también importantes activadores de la ruta alternativa del sistema del complemento de mamíferos; forman parte de los receptores de bacteriófagos (fagos)

e intervienen como importantes moduladores de las enzimas autolíticas. Por su abundancia en grupos fosfato, son los polianiones más importantes de la pared celular y los responsables de la carga neta de ésta; los ácidos teicoicos internos forman quelatos con el magnesio y con ello contribuyen a la rigidez del peptidoglicano (Beveridge, 1981).

A veces los ácidos teicoicos se unen covalentemente a un glicolípido de la membrana plasmática y entonces reciben el nombre de ácidos lipoteicoicos. Una característica general de estos ácidos lipoteicoicos es que se intercalan en la matriz de la pared celular, desempeñando un papel básico en el control de la actividad autolítica en varios sistemas bacterianos (Höltje y Tomasz, 1975 a; Horne y Tomasz, 1985 b; Bierbaum y Sahl, 1985; Rogers y Thurman, 1985; Tsuchido y cols., 1985; Fischer, 1988). Cuando los ácidos lipoteicoicos atraviesan todo el espesor de la pared celular y son accesibles desde el exterior constituyen importantes determinantes antigénicos. Se han identificado también como cofactores esenciales en la biosíntesis de la pared celular (Manck y Glaser, 1972) y como agentes responsables de la adherencia bacteriana (Beachey y Offeck, 1976). Los ácidos lipoteicoicos son fuertemente aniónicos y por ello contribuyen al mantenimiento de una concentración de cationes óptima en la pared celular. La ruta biosintética de los ácidos lipoteicoicos parece ser distinta a la de los ácidos teicoicos de pared; así, en cultivos de *B. subtilis* que crecen en condiciones de limitación de fosfato el ácido lipoteicoico no se ve alterado mientras que el ácido teicoico se sustituye por teicurónico (los ácidos teicurónicos son polisacáridos ácidos no fosfóricos) (Archibald, 1976).

## 2. ENZIMAS QUE DEGRADAN EL PEPTIDOGLICANO.

### 2.1. Autolisinas bacterianas.

Desde las primeras observaciones realizadas pudo apreciarse que los microorganismos se lisan cuando son incubados en condiciones desfavorables y, de hecho, los autolisados fueron las primeras fuentes para obtener enzimas solubles. La autólisis debe ser considerada como una consecuencia de la desintegración de la pared bacteriana. Las **enzimas autolíticas** o **autolisinas** bacterianas son enzimas que hidrolizan uniones específicas del peptidoglicano y que, por tanto, solubilizan las paredes celulares con la consiguiente lisis de la bacteria, de ahí que en un principio se les llamase también "suicidasas". La presencia de autolisinas en las bacterias es una propiedad casi general. También se han descrito en hongos y levaduras enzimas que hidrolizan la pared celular del microorganismo que las sintetiza, comportándose de esta manera como autolisinas. En esta Tesis, sin embargo, el concepto de autolisina se aplicará exclusivamente a bacterias.

Existen cuatro tipos bioquímicamente diferenciables de enzimas autolíticas (Figura 3 A y B), que pueden clasificarse en:

i) Muramidasa (lisozimas) que hidrolizan el enlace  $\beta$  1,4 entre el ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina, liberando grupos reductores de ácido *N*-acetilmurámico.

ii)  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasas (glucosaminidasas), que liberan grupos reductores de *N*-acetilglucosamina.

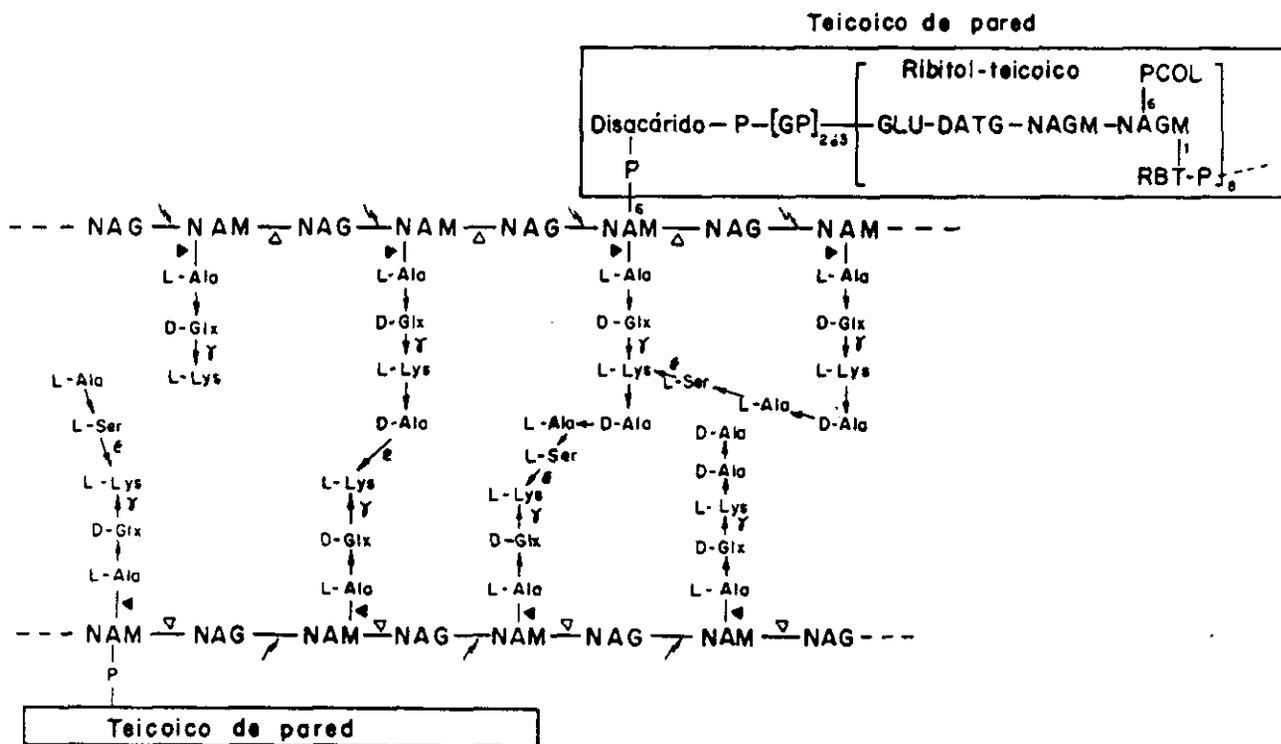
iii) *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-amidasas (amidasas) que hidrolizan el enlace amida entre la cadena glicánica y el péptido.

iv) Peptidasas, que pueden hidrolizar tanto alguno de los péptidos principales como los puentes interpeptídicos, siempre que éstos tengan lugar entre la *D*-alanina terminal y el grupo amino de una cadena peptídica contigua.

Un quinto tipo de enzimas autolíticas podrían ser la transglicosidasas, enzimas que hidrolizan el enlace  $\beta$  1,4 entre el ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina, liberando grupos reductores de ácido *N*-acetilmurámico. Aunque estas enzimas son capaces de hidrolizar el peptidoglicano *in vitro* y participan en los procesos de biosíntesis de pared, todavía no se conoce con certeza si funcionan como autolisinas *in vivo* (Goodell y Schwarz, 1985).

Las autolisinas más ampliamente distribuidas son las amidasas y las glucosaminidasas, que en la mayoría de los casos se presentan simultáneamente en el mismo organismo.

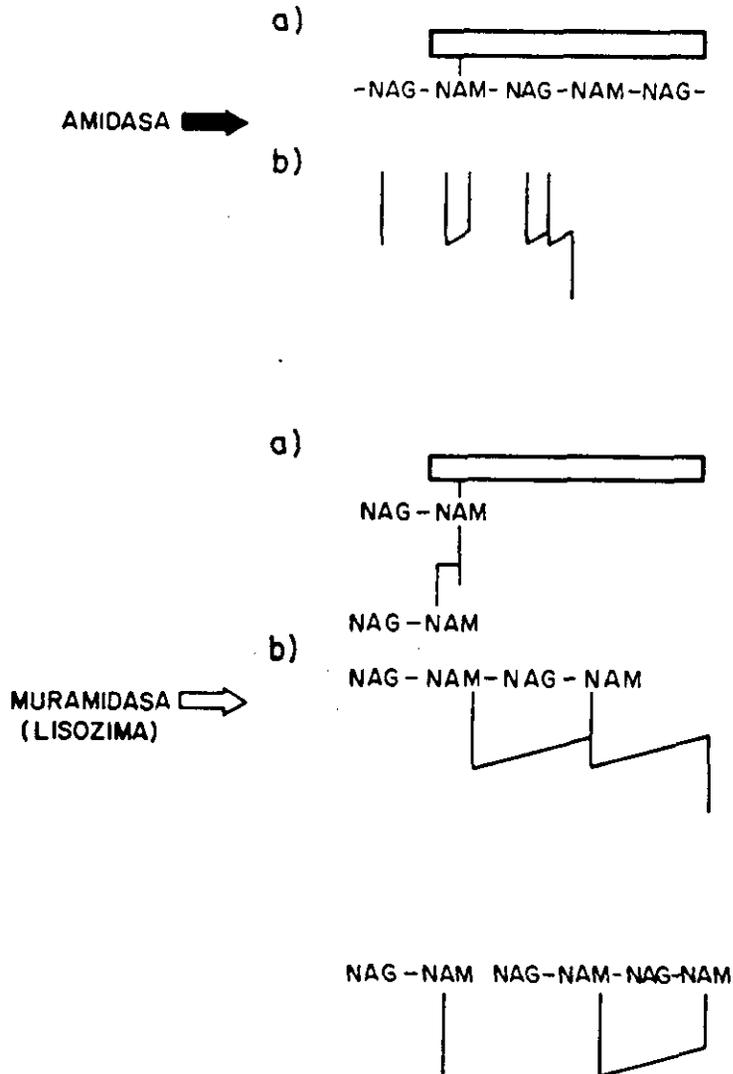
**A**



**Figura 3.** Modelo de la estructura de la pared celular de *S. pneumoniae*.

**Panel A.** Las cadenas glicánicas se representan con las letras G-M, que indican los residuos alternantes de N-acetilglucosamina (G) y ácido N-acetilmurámico (M). Los aminoácidos de las cadenas peptídicas se representan en código de tres letras según se indica en la Figura 1 A. ε, significa que el enlace peptídico se realiza con el grupo ε-amino de la L-lisina. El ácido teicoico de pared se simboliza con un rectángulo; las abreviaturas utilizadas son : P, grupo fosfato; GP, glicerolfosfato (existen dos o tres moléculas por cada molécula de ácido teicoico); GLU, glucosa; DATG, diacetamidotridesoxigalactosa; NAGM, N-acetilgalactosamina; PCOL, fosforilcolina; RBT-P, ribitolfosfato. Se estima que hay, por término medio, 8 moléculas de PCOL en cada molécula de ácido teicoico. Los números 1 y 6 representan las posiciones de los átomos de carbono que participan en los enlaces que se indican. Los enlaces sensibles a la acción de las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo se muestran con triángulos negros (sensibles a las amidasas), con triángulos blancos (sensibles a las muramidases o lisozimas), y con flechas en zig-zag (sensibles a las glucosaminidasas).

**B**



**Figura 3.** (continuación)

**Panel B.** Productos de degradación de la pared celular de neumococo cuando ésta se digiere con una amidasa (flecha negra) o con una muramidasa (flecha blanca). Los símbolos se corresponden con los detallados en el panel A. Las cadenas peptídicas se representan con trazos verticales y los puentes interpeptídicos con trazos oblicuos. Tomado de Tomasz (1981).

## **2.2. Funciones de las autolisinas.**

A pesar de la ubicuidad de las autolisinas en el mundo bacteriano, la determinación de su papel biológico está todavía sometido a fuertes controversias, aunque una distribución tan amplia hace pensar que estas enzimas deben desempeñar, no obstante, funciones de gran importancia, algunas de las cuales probablemente todavía se desconocen (Tomasz, 1984). Esto se debe en parte a que estas enzimas resultan difíciles de purificar, ya que se sintetizan en pequeña cantidad y se asocian fuertemente a su sustrato (la pared celular), lo que hace que sus propiedades bioquímicas no se conozcan bien. Además, la mayoría de las bacterias contienen más de una autolisina, lo que dificulta mucho la asignación de funciones específicas a cada una de ellas.

### **2.2.1. Crecimiento de la pared celular.**

Aunque el sáculo de mureína es esencialmente un elemento celular de resistencia mecánica, ello no implica en absoluto que se trate de una estructura metabólicamente inerte, sino que ha de experimentar profundas transformaciones que permitan el crecimiento de la célula, el mantenimiento de la forma determinada genéticamente y la formación del septo durante el proceso de división celular. Teniendo en cuenta la disposición del sáculo y su naturaleza covalentemente cerrada, es evidente que el crecimiento de la bacteria está condicionado por el crecimiento de aquél.

El crecimiento de la pared celular implica que ésta debe ser "preparada" químicamente para aceptar nuevas unidades de sus componentes. En 1964, Weidel y Pelzer postularon un modelo que, en esencia, proponía que la expansión del peptidoglicano durante el crecimiento celular requería la acción combinada y equilibrada de los procesos de síntesis y degradación. En su forma original el modelo sugería la posibilidad de que las autolisinas fueran las responsables de la creación de rupturas en la malla del peptidoglicano. Posteriormente tendría lugar la adición de nuevos bloques de pared en estos sitios siendo las enzimas de síntesis, por ejemplo las transglicosidasas, las encargadas de sellar las rupturas. Según este modelo, los mutantes defectivos en autolisina (fenotipo  $Lyt^-$ ) se comportarían como letales condicionales ya que no podrían expandir su pared, esto es, crecer, en condiciones no permisivas. El principal inconveniente para involucrar a las autolisinas en la síntesis de pared se basaba en que los mutantes  $Lyt^-$  aislados hasta entonces en varias especies, *Enterococcus hirae* (= *Streptococcus faecium*) (Pooley y cols., 1972), *S. aureus* (Chatterjee y cols., 1976), *B. licheniformis* (Forsberg y Rogers, 1974), *B. subtilis* (Fein y Rogers, 1976), *E. coli* (Leduc y cols., 1984) y *S. pneumoniae* (Lacks, 1970; Zigelboim, 1980; García y cols., 1986 a, b; López y cols., 1986), tenían unos

tiempos de duplicación similares a los de las cepas salvajes. No obstante, ninguno de los mutantes descritos carecía por completo de actividad autolítica por lo que no se podía descartar que esa actividad minoritaria tuviese una localización estratégica en la célula en lugares donde se realizase la síntesis de pared.

En la actualidad se postula un mecanismo distinto para la incorporación de los nuevos polímeros a la pared bacteriana; este mecanismo está basado en una reacción de transpeptidación en vez de en una reacción de transglicosidación (Koch, 1990). Estudios realizados con *B. subtilis* y *E. coli* han revelado que la orientación de las cadenas glicánicas es perpendicular al eje mayor de la célula (disposición en anillo) y que el crecimiento de la pared se hace intercalando nuevos anillos de peptidoglicano entre dos de los ya existentes mediante una reacción "creadora de espacios" (*space-maker*) catalizada por una "transferasa de enlaces cruzados" (*crosslink-transferase*) (Pelzer, 1983). Esta enzima tendría una actividad endopeptidasa para romper enlaces peptídicos ya formados y una actividad transpeptidasa para formar puentes interpeptídicos con los nuevos polímeros que se van incorporando. La formación del septo se explicaría por un bloqueo de la transpeptidasa en esta zona, y la separación de las células hijas se produciría gracias a la autolisina correspondiente (Tomasz, 1983). Las cepas mutantes *Lyt*<sup>-</sup> también llevarán la *crosslink-transferase* activa, lo que explicaría por qué pierden viabilidad cuando se tratan con inhibidores de la biosíntesis de la pared celular, aunque a velocidad mucho más reducida que las cepas parentales *Lyt*<sup>+</sup> (apartado 2.2.6.). Esta pérdida de viabilidad la causaría la actividad continuada de la transferasa que crearía pequeños pero irreparables cortes (al no haber incorporación de nuevos polímeros de pared) en la malla peptídica. Hasta el momento no se han aislado mutantes de la *crosslink-transferase* (Tomasz, 1983).

En el caso concreto de *S. pneumoniae*, la amidasa autolítica no es esencial para el crecimiento celular ya que mutantes defectivos para esta enzima crecen normalmente (García y cols., 1986 a, b; López y cols., 1986; Sánchez-Puelles y cols., 1986 a) (apartados 4.6.1.1.6. y 4.6.1.1.7.)

### 2.2.2. Recambio de los polímeros de pared (*turnover*).

Los polímeros que integran la pared de algunos microorganismos, tales como los bacilos, lactobacilos o estafilococos, son eliminados de la pared bacteriana y renovados en un proceso que se denomina recambio (*turnover*) (Doyle y cols., 1988). La primera parte de este proceso incluiría la solubilización de los productos presentes en la pared celular, y se ha sugerido que las autolisinas serían las encargadas de realizar esta función (Rogers y cols., 1980; Goodell y

Schwarz, 1985; Cheung y Freese, 1985), pero tampoco en este caso existen evidencias suficientes que demuestren una relación directa entre ambos fenómenos.

### 2.2.3. Separación celular y motilidad.

Los estudios realizados sobre mutantes *Lyt*<sup>-</sup> de *B. subtilis* y *S. pneumoniae* han sugerido la existencia de una relación entre esta alteración y la formación de cadenas celulares como consecuencia de no haberse completado el proceso de separación de las células hijas (Fein y Rogers, 1976; Lacks, 1970; Zigelboim, 1980; Sánchez-Puelles y cols., 1986), lo cual está de acuerdo con la función postulada para las autolisinas de no participar en el crecimiento de la pared pero sí en la fase final de la división celular, es decir, en la separación de las células hijas.

Es difícil saber qué enzima(s) es la responsable de la separación celular. Se ha comprobado que un mutante de *B. subtilis*, que posee un 60% de la actividad amidásica y únicamente un 2% de la actividad glucosaminidasa, se presenta en forma de bacilos perfectamente separados y móviles. Este hecho y otros estudios realizados posteriormente (Koch y cols., 1985) han sugerido que la amidasa podría ser la responsable de la separación de las células hijas en el proceso de división celular. En este sentido conviene señalar que no ha sido descrito ningún mutante que carezca únicamente de la amidasa. En el caso de bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, también existen evidencias preliminares que sugieren la existencia de una posible relación entre la actividad amidásica y la separación celular (Wolf-Watz y Normak, 1976). El caso concreto de *S. pneumoniae* se tratará en el apartado 4.6.1.1.7.

Una interesante característica de los mutantes *Lyt*<sup>-</sup> de *B. subtilis* es que carecen de flagelos y, por lo tanto, se presentan como formas inmóviles (Fein y Rogers, 1976; Fein, 1979). Este hecho llevó a Fein (1979) a proponer que las autolisinas estarían implicadas en la formación de "agujeros" en la pared celular para la salida del flagelo. De esta manera, los mutantes *Lyt*<sup>-</sup> serían forzosamente inmóviles. Revertientes para la motilidad lo son también para el carácter autolítico. Pooley y Karamata (1984) han comprobado que todos los mutantes *fla*<sup>-</sup> (deficientes en la formación de flagelos) poseen asimismo un fenotipo *Lyt*<sup>-</sup>. Se piensa así que el defecto en la concentración de las autolisinas en estos mutantes es debido a la existencia de un proceso regulador por parte de los genes *fla*. Por lo tanto, los mutantes tradicionalmente conocidos en esta especie como *Lyt*<sup>-</sup> no estarían afectados en el gen estructural de ninguna autolisina. Recientemente se ha determinado la secuencia del gen *flaD* y ha resultado ser idéntica a la del gen *sin*, gen que participa en el fenotipo de inhibición de la esporulación en *B. subtilis*. Se postula que el producto del gen *flaD* es una proteína de unión al DNA (Sekiguchi y cols., 1990).

#### 2.2.4. Transformación genética.

Desde los trabajos de Akrigg y cols. (1967) han sido numerosas las investigaciones que apuntan la posibilidad de que las autolisinas intervengan en el fenómeno de la competencia genética, posiblemente permitiendo el paso de las moléculas de DNA transformante a través del peptidoglicano hasta los receptores situados en la membrana subyacente. Así, se ha señalado que existe una correlación entre la tasa de autólisis y el estado competente tanto en *B. subtilis* (Young y Spizizen, 1963) como en estreptococos del grupo H (Ranhand, 1973; Horne y Tomasz, 1985 a). También se ha observado que durante el período de tiempo que precede a la aparición de la competencia aumenta la actividad de la amidasa de *B. subtilis* (Young, 1966). Sin embargo, mutantes de *B. subtilis* que carecen del 90-95% de la actividad tanto de la amidasa como de la glucosaminidasa parecen ser perfectamente transformables (Fein y Rogers, 1976).

En *S. pneumoniae* la tasa de autólisis se incrementa al añadir factor de competencia a los cultivos (Seto y Tomasz, 1975). Cuando los neumococos se resuspenden en medio hipertónico forman esferoplastos. Lacks y Neuberger (1975) han observado que la tasa de formación de esferoplastos y la competencia parecen estar relacionadas; así, mutantes genéticamente no competentes (*ntr-2*) forman esferoplastos a un ritmo lento, sin embargo otros mutantes de estas características (*ntr-9*) no muestran esta relación. Las células de neumococo crecidas en medio que contiene etanolamina (células-EA) sintetizan una forma de la amidasa de baja actividad y son incapaces de transformarse, aunque la adición de un breve pulso de colina y factor de competencia restauran la transformabilidad (Seto y cols., 1975). El hecho de que un mutante de neumococo que lleva el gen *lytA* (codifica para la principal autolisina de *S. pneumoniae*, la amidasa LYTA) delecionado, cepa M31 (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a), muestre unos niveles de transformación normales excluye la intervención de la amidasa en el proceso de transformación genética. Sin embargo, el descubrimiento de una segunda autolisina en neumococo, una glucosaminidasa (Sánchez-Puelles y cols., 1986 b; García y cols., 1989), que presenta su actividad máxima a 30 °C, temperatura a la cual se realiza el proceso de transformación genética en *S. pneumoniae* (Fox y Hotchkiss, 1957), deja abierta la posibilidad de que esta segunda enzima lítica intervenga en el desarrollo de la competencia genética.

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que, a pesar de la existencia de gran número de resultados, la evidencia experimental tanto a favor como en contra de la intervención de las autolisinas en el proceso de transformación genética dista mucho de ser concluyente.

### 2.2.5. Liberación de la descendencia fágica.

Asimismo, se ha postulado la intervención de las autolisinas en los procesos de adsorción y liberación de la descendencia fágica. En *S. pneumoniae* se sugirió la intervención de la amidasa del huésped en ambos procesos en experimentos realizados con células-EA y el bacteriófago Dp-I (McDonnell y cols., 1975). Estudios posteriores han puesto de manifiesto que la colina forma parte esencial de los receptores del fago Dp-I en este organismo (López y cols., 1982 a), y que la amidasa LYTA del huésped participa activamente en la liberación de la descendencia fágica (Ronda-Laín y cols., 1977; López y cols., 1983; García y cols., 1983 c). De forma similar, también se ha observado la participación de la amidasa del huésped en la liberación de la progenie fágica para los fagos de la serie Cp.

En el genoma del fago  $\Phi$ X174 de *E. coli* se ha demostrado la existencia de un gen responsable de la lisis celular y de la liberación de la descendencia fágica que parece actuar como activador del sistema autolítico de la célula huésped (Blassi y cols., 1984). La liberación del fago MS2 al final del ciclo lítico también parece depender de las autolisinas de la célula huésped (Höltje y Van Duin, 1984).

### 2.2.6. Acción de los antibióticos.

La inhibición de la síntesis de la pared celular puede realizarse mediante cambios en los componentes del medio de cultivo o mediante la adición de antibióticos u otras sustancias más o menos específicas. Los antibióticos que inhiben la síntesis de pared tienen un efecto bactericida, sin embargo la mayoría de los que inhiben la síntesis proteica producen un efecto bacteriostático (Rogers y cols., 1980).

Las penicilinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos pueden originar tanto cambios morfológicos en las células como pérdida de viabilidad y/o lisis celular. Estos dos últimos efectos requieren una bacteria metabólicamente activa, aunque recientemente se ha descubierto un grupo de antibióticos capaces de actuar también en ausencia de crecimiento celular (Tuomanen, 1986). El que se produzca uno u otro de estos efectos depende del tipo de antibiótico, de la dosis utilizada y del organismo con el que se trabaje. A modo de ejemplo, la benzilpenicilina presenta una MIC (concentración mínima inhibitoria) similar para tres especies diferentes de estreptococos; en *S. pneumoniae* produce una pérdida rápida de viabilidad seguida de lisis celular, en *S. sanguis* provoca sólo una lenta pérdida de viabilidad, y en *S. pyogenes* origina una rápida pérdida de viabilidad que no va acompañada de lisis celular (Horne y Tomasz, 1977). Recientemente se han caracterizado aislados clínicos de neumococo implicados en el desarrollo

de la meningitis humana y que presentan una respuesta frente a la penicilina similar a la de *S. pyogenes* (Tuomanen y cols., 1988). Esto indica que los mecanismos de muerte y lisis celular desencadenados por los antibióticos son claramente diferentes.

La diana metabólica de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son las PBP (*penicillin-binding-proteins*) (Blumberg y Strominger, 1974) y su toxicidad selectiva se debe a la similitud entre el anillo de la  $\beta$ -lactama y el dipéptido C-terminal (D-Ala-D-Ala) de las cadenas peptídicas del peptidoglicano. Las PBP intervienen en la fase final de la biosíntesis del peptidoglicano y por ello su inactivación (acilación) por el antibiótico origina una mureína con un grado de entrecruzamiento muy débil y susceptible a la ruptura osmótica y mecánica (Tipper y Strominger, 1965). Sin embargo, en la actualidad se sabe que el mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no es tan sencillo como se creía y que sus efectos irreversibles requieren el concurso de factores celulares adicionales, entre otros, las autolisinas.

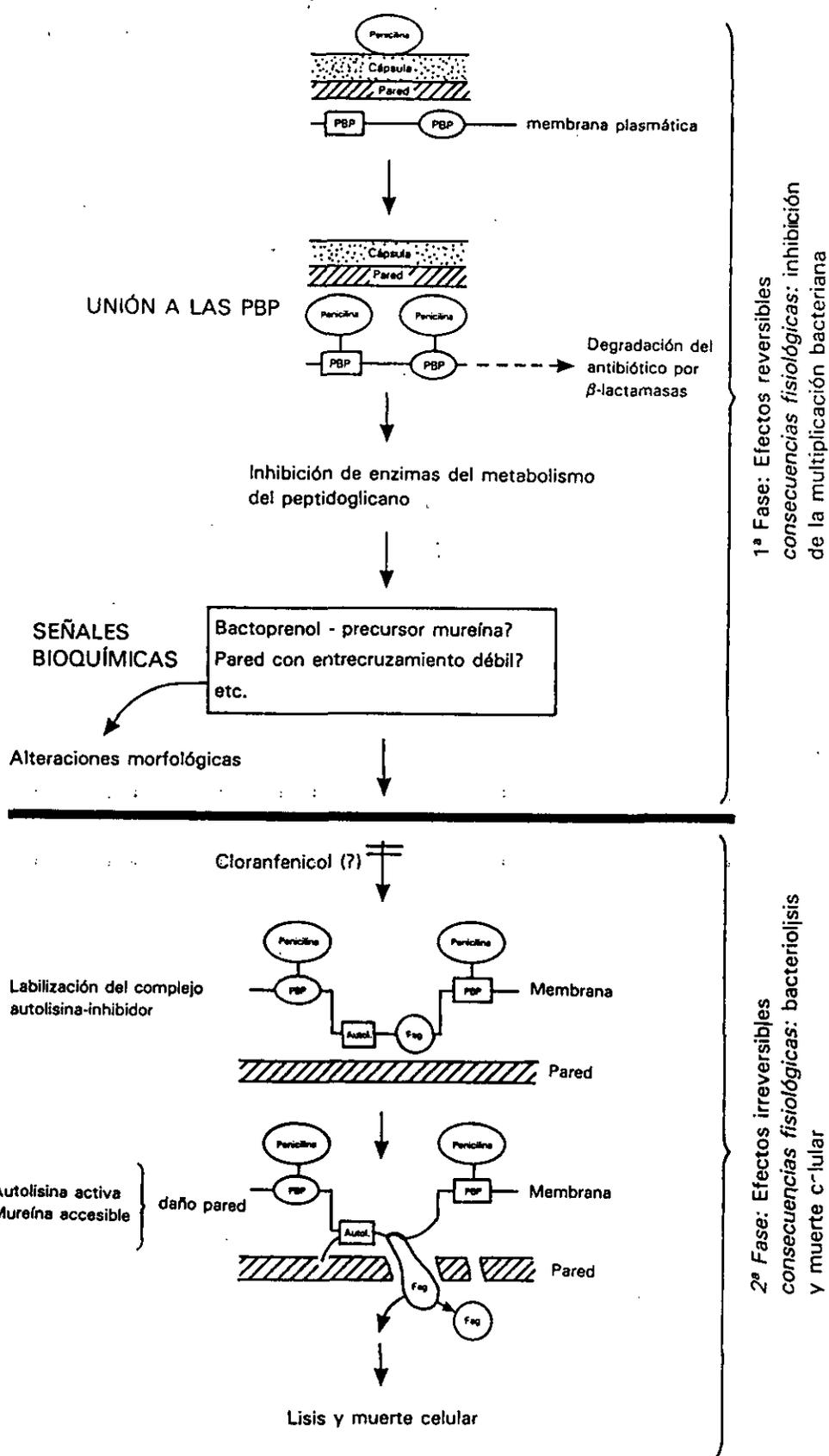
La degradación del peptidoglicano tras el tratamiento de un cultivo bacteriano con penicilina puede deberse a que este antibiótico : i) induzca un aumento en los niveles de actividad autolítica; ii) altere la estructura de la pared y la haga más susceptible al ataque por la autolisina; iii) altere la regulación de la autolisina "disparando" su actividad (modelo del *triggering*) (Tomasz y Waks, 1975; Tomasz, 1979).

Para el caso concreto de *S. pneumoniae* sólo los puntos ii) y iii) parecen responder a la realidad. La exposición de neumococo a la penicilina origina una pared más accesible a la degradación por la amidasa autolítica al presentar menor grado de entrecruzamiento peptídico (Nöthling y Hakenbeck, 1983).

En el modelo del *triggering* (Tomasz, 1979) se pueden distinguir dos fases (Figura 4):

a) Fase primaria (reversible). Las moléculas de penicilina u otro antibiótico  $\beta$ -lactámico alcanzan su diana celular (PBP) lo que trae consigo la inactivación de alguna de estas enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano. Como consecuencia hay una inhibición en la multiplicación bacteriana. Esta fase puede observarse en mutantes  $Lyt^-$  o en cepas  $Lyt^+$  con su actividad autolítica inhibida. En cepas  $Lyt^+$  esta fase va inmediatamente seguida de una fase secundaria.

b) Fase secundaria (irreversible). Mediante una señal bioquímica aún desconocida se originaría una alteración de la membrana plasmática que daría lugar a la disociación entre el ácido lipoteicoico (el inhibidor natural de la amidasa autolítica) y la autolisina (inhibida durante la mayor parte del ciclo celular) (Tomasz y cols., 1970; Tomasz y Waks, 1975). La disociación de este complejo se consigue *in vitro* mediante detergentes. *In vivo* quizás algún derivado del bactoprenol cause un efecto similar, aunque también podría deberse a mecanismos más complejos como la desacilación del inhibidor. La autolisina, una vez liberada de su inhibidor, produciría primero



**Figura 4.** Modelo del mecanismo de acción de la penicilina en *S. pneumoniae*. Las abreviaturas utilizadas son : PBP, proteínas de unión específica a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos; Fag, ácido lipoteicoico; Autol., autolisina. Tomado de López y cols. (1983).

cortes en la pared celular con la consiguiente pérdida de viabilidad (efecto bactericida) y después seguiría una más extensa degradación de la mureína con la correspondiente desintegración física de la bacteria (efecto bacteriolítico). Aunque es la concentración de antibiótico la que condiciona la rapidez en el comienzo de la lisis celular, la velocidad a la cual se produce esta lisis depende de la concentración de autolisina y de la velocidad de multiplicación del cultivo en el momento previo a la adición del antibiótico (Tomasz, 1979). En este modelo no se conoce con exactitud por qué la inhibición de la síntesis de mureína origina un bloqueo en la multiplicación celular, aunque se especula con la posibilidad de que un producto intermediario actúe como señal bioquímica reguladora entre biosíntesis de pared y producto citoplasmático. Entre las posibles señales reguladoras se han citado aquellas que se acumulan en algunas bacterias tratadas con penicilina, tales como el bactoprenol unido a mureína o nucleótidos del tipo ppGpp (Tomasz, 1979).

Varios datos experimentales apoyan el modelo del *triggering*. Así, cuando se tratan neumococos *Lyt*<sup>-</sup> con penicilina u otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos se observa que la bacteria continúa sintetizando durante algún tiempo ácidos teicoicos y lipoteicoicos, pero éstos en lugar de incorporarse a la pared se secretan al medio (Tomasz y Waks, 1975; Horne y cols., 1977; Waks y Tomasz, 1978; Hakenbeck y cols., 1978). Esta respuesta se caracteriza por lo siguiente:

i) Se produce sólo por inhibidores de la síntesis de pared. El cloranfenicol, la rifampicina y la mitomicina C no originan esta respuesta.

ii) La cinética y el alcance de la liberación al medio de estos polímeros es proporcional a la dosis de antibiótico utilizada y comienza inmediatamente después del tratamiento con éste, incluso antes de que se aprecie inhibición en el crecimiento.

iii) La secreción se restringe a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, tanto ya sintetizados como de nueva síntesis, y a los lípidos de membrana. En otras bacterias también se secreta material capsular, lipopolisacáridos y algunas proteínas de membrana.

iv) La liberación se suprime mediante el empleo de inhibidores de la síntesis de proteínas, lo que parece implicar un proceso activo de secreción que no puede detenerse por estabilizadores osmóticos y que no requiere actividad autolítica.

v) Es un proceso reversible. Tras la eliminación del antibiótico, el cultivo reanuda el crecimiento y cesa la secreción.

Dado que la secreción de estos componentes es proporcional al grado de inhibición de la biosíntesis del peptidoglicano, se considera que éste actúa proporcionando lugares de interacción tanto para otros polímeros de pared como para elementos lipídicos de membrana. Cuando no se sintetizan esos lugares de interacción en el peptidoglicano el exceso de los restantes componentes de superficie se secreta al medio de cultivo (Horne y cols., 1977).

En este contexto, también se ha descrito que la liberación en neumococo de la progenie del fago Dp-I (Ronda-Laín y cols., 1977), así como la autólisis de los cultivos al final de la fase estacionaria de crecimiento (Waks y Tomasz, 1978), están asimismo precedidas por la secreción del inhibidor de la autolisina (ácido lipoteicoico) al medio de cultivo, lo que dejaría a la enzima sin control y en disposición de provocar la lisis celular.

#### 2.2.6.1. Tolerancia antibiótica.

Cuando una cepa bacteriana responde al tratamiento con un antibiótico que actúa sobre la pared celular sin variar su MIC pero cambiando la respuesta bactericida (que también puede ser bacteriolítica) en bacteriostática (lenta pérdida de viabilidad y ausencia de lisis celular), se dice que esa cepa presenta el fenómeno de la tolerancia antibiótica. Este fenómeno fue descrito por primera vez en experimentos realizados *in vitro* con mutantes  $Lyt^-$  de *S. pneumoniae* (Tomasz y cols., 1970). Las primeras observaciones clínicas de la tolerancia no aparecieron hasta 1977, y se realizaron en estirpes de *S. aureus* que originaban infecciones persistentes (Sabath y cols., 1977). En la actualidad son ya más de 20 las especies en las que se ha descrito una respuesta tolerante y el aislamiento de estafilococos y estreptococos tolerantes a partir de infecciones recurrentes es un hecho cada vez más frecuente (Handwerger y Tomasz, 1985). La respuesta de las bacterias a antibióticos típicamente bacteriostáticos (cloranfenicol, eritromicina, etc.) no puede considerarse como un fenómeno de tolerancia, así como tampoco el carácter de resistencia antibiótica que se detecta en muchos aislados clínicos, si bien es frecuente la existencia de cepas que son resistentes y tolerantes al mismo tiempo. A veces los mutantes tolerantes lo son frente a unos inhibidores de la síntesis pared pero no frente a otros (Harkness e Ishiguro, 1983).

En la actualidad hay muchos datos que sugieren que la presión hospitalaria generada por tratamientos prolongados con antibióticos está en la base de la selección de cepas tolerantes, aunque la importancia clínica de la tolerancia todavía no se ha podido evaluar. Así, algunas cepas de *S. sanguis* que presentan tolerancia a la penicilina *in vitro* pueden morir rápidamente al suplementar el medio de cultivo con lisozima humana. Se ha observado también que las bacterias tolerantes a un antibiótico en presencia del mismo son más fácilmente fagocitadas, lo que explica que la mayoría de las infecciones de las que se han aislado cepas tolerantes de neumococo no sean fácilmente accesibles al sistema inmune. Por último, el efecto antibacteriano de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no se reduce a su actividad bactericida sino que la secreción de adhesinas, como el ácido lipoteicoico de neumococo, también juega un papel importante y dicha secreción se produce tanto en cepas tolerantes como en cepas no tolerantes (Tuomanen y cols., 1986).

La tolerancia puede deberse a causas genéticas (tolerancia genética) o a las condiciones de crecimiento de la bacteria (tolerancia fenotípica). Los tolerantes genéticos más frecuentes son aquéllos defectivos en su sistema autolítico, es decir, los mutantes *Lyt*<sup>-</sup>. En este caso la tolerancia puede ser revertida por la reactivación del sistema autolítico, lo que demuestra que los antibióticos son capaces de alcanzar su diana celular habitual. Los mutantes tolerantes *Lyt*<sup>-</sup> de neumococo a los que se añade amidasa obtenida de la estirpe salvaje (curación fenotípica) se vuelven susceptibles a la lisis por penicilina (Tomasz y Waks, 1975). Sin embargo, ya se han aislado en clínica mutantes tolerantes de neumococo (Liu y Tomasz, 1985) y de estafilococo (Tuomanen y cols., 1986) que contienen niveles de autolisina próximos a los de la cepa salvaje, una situación análoga a la descrita para algunas cepas de laboratorio de *S. pneumoniae* (Williamson y Tomasz, 1980). Este hecho ha sugerido la existencia en neumococo de un mecanismo controlado por un gen denominado preliminarmente *tol* y posteriormente *cid* (Moreillon y Tomasz, 1988), que puede separarse por transformación genética del gen *lytA* (codifica para la amidasa autolítica) y del carácter de resistencia antibiótica. Los mutantes en los que está presente el alelo *tol*<sup>+</sup> [fenotipo TOL<sup>+</sup>, RAP (Moreillon y Tomasz, 1988) o CID<sup>-</sup>] exhiben tasas notablemente reducidas de muerte celular aún en presencia de niveles elevados de autolisina. El empleo de mutantes en el gen *lytA* (fenotipo *Lyt*<sup>-</sup>) en los cuales se ha introducido por transformación genética el alelo *tol*<sup>+</sup> y el gen *lytA* en un plásmido multicopia ha llevado a postular que el gen *tol* estaría implicado, a través de un mecanismo aún desconocido, en el control de las dos enzimas autolíticas de neumococo, cuya actividad cooperativa estaría directamente involucrada en los efectos bactericidas causados por la penicilina (López y cols., 1990 a). Recientemente, Moreillon y cols. (1990) han postulado que en las células de neumococo expuestas a la penicilina la amidasa autolítica es responsable de una disminución de tan sólo una unidad logarítmica en el título de viables, las restantes 3 ó 4 unidades logarítmicas perdidas son debidas a un mecanismo independiente de la amidasa.

Se han descrito distintos factores que, sin interferir con el crecimiento bacteriano, pueden dar origen a una respuesta tolerante (tolerancia fenotípica), entre éstos destacan la composición y pH del medio de cultivo, así como también el tamaño del inóculo (López y cols., 1976; Venglarcik y cols., 1983). En neumococo la sustitución de la colina por su análogo etanolamina provoca la aparición de células tolerantes a la penicilina; al añadir colina de nuevo, el sistema autolítico se reactiva y la cepa se lisa. Cuando el pH del medio no permite la actuación de la autolisina la cepa se hace tolerante, pero si se vuelve al pH óptimo, se restaura la respuesta bactericida. No obstante, el efecto del pH también puede deberse a cambios en la pared celular (Moreillon y Tomasz, 1988) o a cambios en los fosfolípidos de la membrana que hagan a ésta más resistente a la lisis (López y cols., 1976).

Las bacterias con tasa de crecimiento baja o casi nula (*dormant*) fueron descritas muy tempranamente en la literatura (Hobby y cols., 1942) aunque su definición como tolerantes fenotípicos es muy reciente (Tuomanen y cols., 1986). Este tipo de tolerancia es el de mayor importancia *in vivo* ya que se da virtualmente en todas las especies bacterianas. Las bacterias en estado durmiente resisten indefinidamente la presencia de antibióticos y representan un reservorio de patógenos viables capaces de mantener la infección. Este tipo de tolerancia es la base del método de selección de mutantes auxótrofos. Recientemente se han descubierto antibióticos (imipenem, nocardicina, etc.) capaces incluso de lisar células que no están en crecimiento siempre que presenten su sistema autolítico intacto (Tuomanen, 1986; Tuomanen y cols., 1986).

### **2.3. Enzimas líticas de bacteriófagos.**

Muchos bacteriófagos poseen genes que codifican para enzimas líticas que degradan la pared celular de la bacteria huésped al final de cada ciclo lítico. Desde el punto de vista bioquímico estas enzimas se pueden clasificar en alguno de los grupos descritos anteriormente (apartado 2.1.) atendiendo al enlace que hidrolizan. Las enzimas fágicas que participan en la lisis de bacterias Gram-negativas se han estudiado con mayor detalle. Por el contrario, se posee poca información sobre las características bioquímicas de las enzimas fágicas que intervienen en la lisis inducida por fagos en el caso de las bacterias Gram-positivas. Así, hasta el momento sólo se ha determinado la secuencia de nucleótidos de las muramidases de los fagos  $\phi$ 29 (Garvey y cols., 1986), PZA (Paces y cols., 1986) y SF6 (Verma, 1986) que infectan a *B. subtilis*; de la lisina del fago  $\phi$ vML3 que infecta a *Lactococcus lactis* (Shearman y cols., 1989); de la endolisina del fago mv1 que infecta a *Lactobacillus bulgaricus* (Boizet y cols., 1990); y de las de tres muramidases (CPL1, CPL7 y CPL9) y una amidasa (HBL) codificadas por los fagos Cp-1, Cp-7, Cp-9 y HB-3, respectivamente, que infectan a *S. pneumoniae* (García y cols., 1988 a; García y cols., 1990; Romero y cols., 1990 b).

Como se ha señalado anteriormente, estas enzimas líticas son las responsables de la destrucción de la pared bacteriana al final del ciclo infectivo, lo que permite la liberación de la descendencia fágica. No obstante, se ha comprobado que a veces las enzimas líticas intervienen en las etapas iniciales de la infección como es el caso del fago  $\phi$ 6 de *Pseudomonas phaseolicola*, en el que se ha identificado una proteína estructural de la partícula fágica que facilita el paso del RNA fágico a través de la pared bacteriana pero que no interviene en el proceso de la lisis celular (Mindich y Lehman, 1979). Otras veces las enzimas líticas intervienen en procesos de maduración de las partículas fágicas, como ocurre por ejemplo con la lisina del fago  $\phi$ vML3 (Shearman y cols.,

1989). La mayor parte de las enzimas líticas fágicas son solubles y no están asociadas a las partículas víricas, aunque hay excepciones como la del caso citado anteriormente del fago  $\Phi 6$ , y las relativas a las lisinas de los fagos A-25 (Hill y Wannamaker, 1981) y C-1 (Wheeler y cols., 1980) que infectan a estreptococos de los grupos A y C respectivamente.

### **3. TRANSLOCACION DE PROTEINAS EN PROCARIOTAS.**

#### **3.1. Consideraciones generales.**

Un factor fundamental en la aparición y evolución de las células fue la capacidad para desarrollar una envoltura membranosa que permitiese reacciones de polimerización sin pérdida de los productos resultantes al medio externo. Las membranas de las células actuales retienen la propiedad de permeabilidad selectiva a ciertas moléculas que, o bien son transportadas pasivamente a favor de gradientes de concentración, o bien requieren de un proceso de transporte activo con consumo de energía e interacción con una o más proteínas de membrana. De aquí que la evolución de los sistemas de translocación celular haya ido pareja a la capacidad de integrar proteínas en las membranas y compartimentos extracitoplásmicos. Como estas proteínas se sintetizan en el citoplasma se necesita un mecanismo de translocación proteica que les permita alcanzar su localización periférica y que sea lo suficientemente específico como para que cada proteína ocupe una determinada localización en la célula (Pugsley y Schwartz, 1985).

#### **3.2. Localización proteica en la envoltura bacteriana.**

Una característica distintiva entre los dos grandes grupos de eubacterias es la presencia (Gram-negativas) o la ausencia (Gram-positivas) de una segunda membrana (membrana externa) que rodea a la membrana plasmática. Los posibles lugares de localización de las proteínas en la envoltura bacteriana son la membrana plasmática, el periplasma y la pared celular, para las bacterias Gram-positivas; añadiéndose la membrana externa en el caso de bacterias Gram-negativas.

La membrana plasmática contiene unas 300 proteínas distintas involucradas en funciones tan diversas como el transporte de electrones, la toma de nutrientes, la respiración y la biogénesis de membranas. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas contiene unas 50 proteínas diferentes involucradas en la toma de nutrientes, el metabolismo lipídico, el mantenimiento de la integridad de la pared celular y muchas participan también como receptores de fagos y colicinas. El espacio existente entre las membranas interna y externa está ocupado por la pared celular y un gel que recibe el nombre de periplasma o espacio periplásmico y que contiene unas 100 proteínas diferentes involucradas en la toma de nutrientes y en procesos catabólicos (Pugsley y Schwartz, 1985).

### **3.3. Hipótesis de la secuencia señal.**

En las bacterias las proteínas periplásmicas y de membrana externa, así como algunas proteínas de la membrana interna, son sintetizadas en el citoplasma como precursores de corta vida media que contienen una secuencia N-terminal que no se encuentra en la proteína madura y que recibe el nombre de secuencia señal o péptido señal. Los péptidos señal de proteínas procarióticas son similares a los descritos para proteínas virales y para proteínas del retículo endoplásmico (RE) de células eucarióticas (Oliver, 1985).

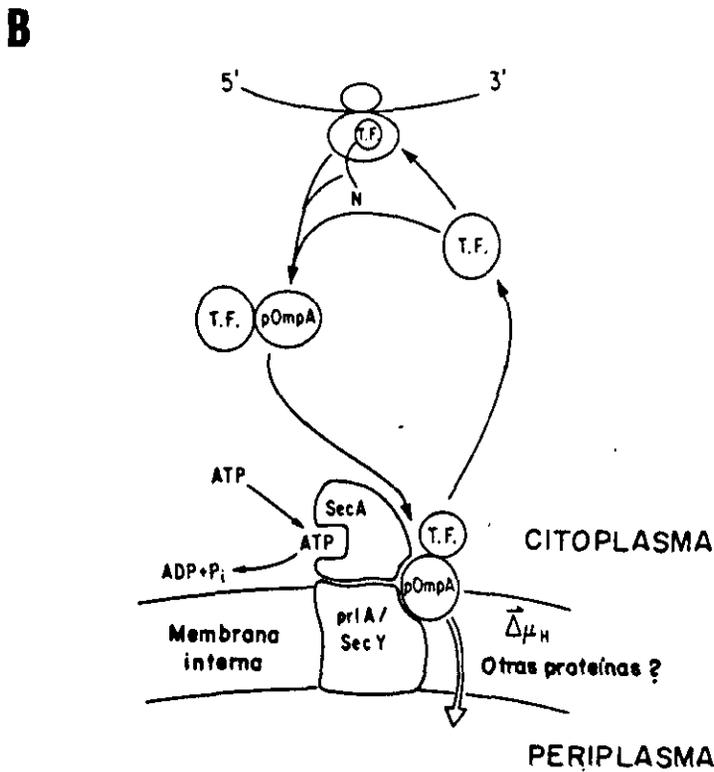
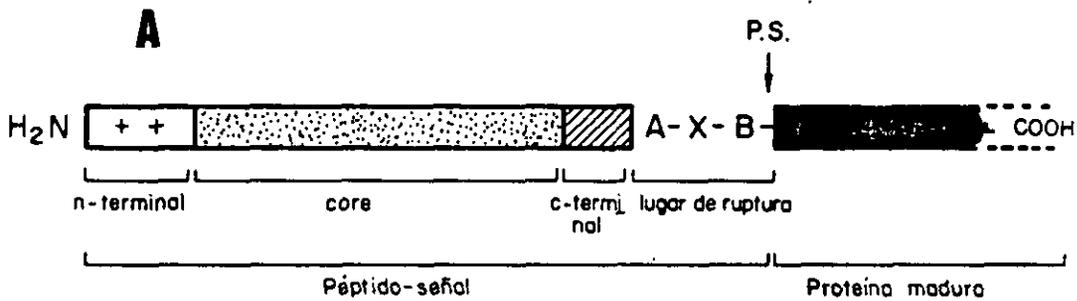
Blobel y Dobberstein (1975) postularon la hipótesis señal en base a estudios *in vitro* sobre la translocación de proteínas en el RE de las células eucarióticas. En resumen, y a la luz de los conocimientos actuales (Briggs y Gierasch, 1986; Saier y cols., 1989; Hurtley, 1990), esta hipótesis propugna que una vez sintetizados los 80 primeros aminoácidos de la proteína que va a ser a translocada el péptido señal ya traducido es capaz de interactuar con la partícula de reconocimiento del péptido señal (SRP), un complejo formado por 6 polipéptidos y un RNA de 300 nucleótidos, lo que ocasiona una parada en la traducción. El complejo RNA mensajero-ribosoma-péptido nascente-SRP se dirige hacia la membrana del RE en donde interactúa con un receptor (proteína *docking*) produciéndose la reanudación de la síntesis proteica. Otras proteínas del RE (riboforinas) unen el ribosoma a la membrana del RE; al mismo tiempo el péptido señal interactúa con una glicoproteína transmembrana que actúa como receptor de secuencias señal (SSR). Por último, una o más proteínas de membrana forman un poro a través de la bicapa y se produce la translocación cotraduccional del precursor en un proceso que consume ATP. Durante o después de la translocación una proteasa (peptidasa señal) escinde el péptido señal y la proteína madura resultante ya puede adquirir su conformación nativa; el péptido señal es después digerido por una peptidasa específica.

### **3.4. El péptido señal.**

#### **3.4.1. Características generales.**

Un péptido señal típico tiene una longitud que varía entre 15 y 30 aminoácidos y está formado por un *core hidrofóbico* (de 8 a 14 aminoácidos por término medio), una *región pre-core* (región N-terminal hidrofílica que precede al *core*), una *región post-core* (región C-terminal), y un lugar de ruptura, a continuación de la *región post-core* (Figura 5 A) (Briggs y Gierasch, 1986).

El límite máximo de longitud para el péptido señal todavía no se conoce con certeza. Entre las secuencias señal de proteínas procarióticas, en general más largas que las de proteínas



**Figura 5. Secreción de proteínas en *E. coli*.**

**Panel A.** Representación esquemática del péptido señal. P.S., representa el sitio de procesamiento del péptido señal por la peptidasa señal. A- X- B, representan los aminoácidos que ocupan las posiciones -3 y -1 de la proteína precursora (Perlman y Halvorson, 1983). ++, significa que la carga neta positiva más frecuente en la región N-terminal de los péptidos señal de procariontas es +2.

**Panel B.** Modelo para la translocación de proteínas en *E. coli*.

En este modelo se representa la translocación de la proteína proOmpA de *E. coli* a través de la membrana plasmática. T.F., indica el factor trigger. SecA y PrIA/SecY son otras proteínas involucradas en el proceso. Tomado de Lill y cols. (1989).

eucarióticas, las pertenecientes a bacterias Gram-positivas son las de mayor longitud (hasta 44 aminoácidos); si bien las mayores secuencias señal se han descrito para glicoproteínas de la envoltura viral. El número mínimo de aminoácidos que forman parte de un péptido señal parece ser de 13 (Oliver, 1985; Briggs y Gierasch, 1986).

#### 3.4.2. Región Pre-core (N-terminal).

El límite entre la región *pre-core* y la región del *core* lo marca el último residuo cargado, el último residuo polar de gran tamaño, o bien el último par de residuos polares de pequeño tamaño. La principal característica de esta región es su carga neta positiva (generalmente +2), aunque a veces la presencia de algún aminoácido ácido reduce este valor. Se ha sugerido que la función de esta región sería la de interaccionar electrostáticamente con la carga negativa de los fosfolípidos de la cara interna de la membrana, el paso inicial para la translocación del precursor (Briggs y Gierasch, 1986).

#### 3.4.3. Región del core hidrofóbico.

Su principal característica es la hidrofobicidad. El final de esta región viene marcado por la presencia de residuos capaces de romper una  $\alpha$ -hélice o una  $\beta$ -lámina y formar un giro  $\beta$ , o sea, aminoácidos del tipo de la serina, glicina, prolina, asparagina y tirosina. Es de destacar la baja proporción de pares alanina-alanina. Se han propuesto dos posibles funciones para esta región, una sería interaccionar específicamente con las proteínas que reconocen el péptido señal (lo que no está muy de acuerdo con el hecho de que el *core* presente gran heterogeneidad en la secuencia de aminoácidos de unos péptidos señal a otros), la otra sería insertarse en la bicapa lipídica dada su gran hidrofobicidad. Esta segunda función parece ser la más plausible (Oliver, 1985; Briggs y Gierasch, 1986).

Las secuencias de anclaje a membrana, características de las proteínas integrales de membrana, presentan también una región de aminoácidos hidrofóbicos consecutivos pero ésta suele tener alrededor de 25 residuos en vez de los 12 que normalmente caracterizan al *core* hidrofóbico de los péptidos señal. Las secuencias de anclaje suelen localizarse hacia la región C-terminal de la proteína y se disponen en la membrana con una "orientación-cabeza" (su extremo C-terminal hacia el citoplasma), en contraposición a la "orientación-cola" del péptido señal (extremo N-terminal hacia el citoplasma) (Wickner y Lodish, 1985).

Una serie de estudios genéticos han puesto de manifiesto que deleciones en la región del *core* pueden resultar en una pérdida de la capacidad de translocación de la proteína en cuestión. Lo

que todavía no se conoce bien es si el defecto se debe a un cambio conformacional de esta región o a un cambio en su longitud o hidrofobicidad general (Oliver, 1985; Briggs y Gierasch, 1986).

#### 3.4.4. Región *post-core* (C-terminal).

Los últimos residuos de la secuencia señal, generalmente 6 en proteínas procarióticas, son más polares que los de la región del *core* y definen la región *post-core* al final de la cual se localiza el lugar de ruptura por la peptidasa señal. Esta región presenta menor variabilidad que las dos regiones anteriores, tanto en longitud como en secuencia de aminoácidos. Los residuos de serina, prolina y glicina son muy frecuentes en esta región por lo que tiende a adoptar una estructura secundaria del tipo giro  $\beta$  que facilite el acceso de la peptidasa señal al lugar de ruptura (Briggs y Gierasch, 1986).

#### 3.4.5. Lugar de ruptura.

Viene definido por los tres últimos aminoácidos del péptido señal y cumple la regla "A-X-B" ó "-3,-1" (Perlman y Halvorson, 1983), según la cual los aminoácidos que ocupan las posiciones -3 y -1 (siendo +1 el primer aminoácido de la proteína madura) deben presentar cadenas laterales pequeñas y sin carga, capaces de permitir la interacción con la peptidasa señal; el aminoácido más frecuente de esta región es la alanina. A veces ocurre la ruptura en dos lugares distintos del péptido señal que, por supuesto, cumplen la regla -3,-1, lo que ocasiona heterogeneidad N-terminal en las proteínas maduras. También se conocen mutaciones en el péptido señal que permiten la translocación del precursor pero no su procesamiento, demostrando al mismo tiempo que se trata de dos procesos distintos (Briggs y Gierasch, 1986).

#### 3.4.6. Predicciones sobre la conformación del péptido señal.

Parece obvio que la secuencia señal deberá estar sometida a toda una serie cambios conformacionales que le permitan realizar todas las funciones que se le han asignado, tales como el reconocimiento de proteínas, la interacción con membranas y componentes de éstas, permitir la translocación del precursor y presentar especificidad de corte para la peptidasa señal.

Si se aplican las predicciones de Chou-Fasman (1978) la conformación secundaria más probable para el *core hidrofóbico* es la de  $\alpha$ -hélice o la de  $\beta$ -lámina, las mismas conformaciones que se encuentran en el interior hidrofóbico de las proteínas globulares ya que permiten la formación

de puentes de hidrógeno internos que estabilizan la estructura. Aunque todavía no se conoce con certeza el espesor de la bicapa lipídica en el lugar de la inserción del *core*, hay datos estructurales que sugieren un adelgazamiento diferencial en esta zona por un cambio en la orientación de las colas de los fosfolípidos. Actualmente se piensa que la unión electrostática del péptido señal a la membrana, mediante interacción entre las cargas positivas de la región *pre-core* y las cargas negativas de los fosfolípidos, induce en aquél una conformación en  $\beta$ -lámina que se transforma en  $\alpha$ -hélice cuando se produce su inserción en la bicapa. Mutaciones que alteren la conformación del *core* hidrofóbico tienen importantes efectos negativos en la función del péptido señal. La región *post-core* adopta una conformación de giro  $\beta$  y alteraciones que impidan tal conformación también impiden el procesamiento del péptido señal. La región *pre-core* no parece tener ninguna conformación de preferencia (Pugsley y Schwartz, 1985; Briggs y Gierasch, 1986).

Se han realizado estudios biofísicos e inmunológicos sobre el péptido señal y sus posibles conformaciones que sugieren para éste una localización en la superficie proteica, y que revelan la existencia de grandes similitudes entre las conformaciones de las secuencias señal y de las regiones de unión a la bicapa lipídica de las proteínas integrales de membrana (Briggs y Gierasch, 1986).

### **3.5. Otras secuencias de señalización para la inserción y translocación de proteínas a través de membranas.**

Toda proteína que vaya a ser translocada a través de la membrana necesitará una señal que le permita ser reconocida por el sistema de translocación y que la transloque. Aunque el péptido señal fue la primera secuencia de señalización conocida y la más estudiada, en la actualidad se conocen otras estructuras proteicas que también cumplen esa función: la secuencia señal anfipática y la secuencia de anclaje a membrana (Saier y cols., 1989).

Las secuencias señal anfipáticas fueron descritas primeramente para proteínas mitocondriales pero ya se han encontrado también en proteínas de bacterias (en las permeasas de azúcares localizadas en la membrana plasmática, en la proteína de la cubierta del fago Pf3 y en bacterio- y halo-rodopsinas de arqueobacterias). Se trata de estructuras secundarias en  $\alpha$ -hélice con los residuos hidrofóbicos agrupados en una cara de la hélice y los residuos hidrofílicos agrupados en la otra, suelen ir seguidas de aminoácidos que rompen la estructura de  $\alpha$ -hélice tales como la glicina, prolina y/o cisteína. Al igual que ocurría con los péptidos señal, no presentan secuencia consenso. Normalmente se localizan en posición N-terminal de la molécula, pero también se han encontrado como secuencias señal internas, o incluso en posición C-terminal de la molécula, como ocurre con la hemolisina de *E. coli* (Koronakis y cols., 1989). Aunque para la mayoría de

las proteínas mitocondriales la hélice anfipática no se procesa, en las proteínas de procariotas no sucede así (Saier y cols., 1989).

Las secuencias de anclaje a membrana o secuencias stop son secuencias hidrofóbicas no procesables que se localizan en las proteínas integrales de membrana y que cuando se insertan en la bicapa lipídica anclan la proteína a ésta. Cuando el péptido señal no sufre procesamiento (proceso que depende en gran medida de constricciones estructurales impuestas por las regiones flanqueantes de la proteína) mantiene al precursor anclado a la membrana y funciona entonces como una secuencia de anclaje. De hecho, las proteínas integrales de membrana que poseen varios segmentos transmembrana presentan una alternancia de secuencias señal no procesables (péptido señal o hélice anfipática) y secuencias de anclaje. Así, se ha sugerido que la peptidasa señal habría surgido en el transcurso de la evolución para permitir que algunas proteínas ancladas a la membrana alcanzasen el espacio periplásmico (Pugsley y Schwartz, 1985; Saier y cols., 1989).

La carga neta que presentan las regiones flanqueantes de las secuencias de señalización influye mucho en la orientación de dicha secuencia en la membrana de la célula. Las proteínas transmembrana con segmentos hidrofílicos en ambientes acuosos presentan un acúmulo de cargas positivas en los segmentos que se localizan en el citoplasma, mientras que en los segmentos expuestos al periplasma hay un predominio de cargas negativas. Análogamente, la región del péptido señal con carga neta positiva (región *pre-core*) se retiene en la cara citoplásmica de la membrana, mientras que la región *post-core* cargada negativamente (o al menos sin cargas positivas) se transloca a la cara periplásmica; entre ambas regiones se localiza la región apolar que es la que se integra en la membrana (Saier y cols., 1989).

Las proteínas del periplasma y la membrana externa poseen un péptido señal N-terminal procesable, sin embargo, la mayoría de las proteínas integrales de la membrana plasmática o llevan un péptido señal N-terminal que no se procesa o carecen de toda estructura que recuerde a un péptido señal, en este último caso algunas proteínas presentan una hélice anfipática como señal para la inserción en la membrana. Hay otros casos, como por ejemplo el de la nitrato reductasa, en los que el mecanismo de inserción en la membrana se debe a una modificación post-traducciona, posiblemente la unión de ácidos grasos (Pugsley y Schwartz, 1985; Saier y cols., 1989).

Se ha descrito también la existencia de secuencias señal internas que permiten la secreción de la proteína al periplasma, el caso más estudiado es el de la ovoalbúmina (Pugsley y Schwartz, 1985); otros casos conocidos hacen referencia a péptidos señal internos contruidos artificialmente mediante la fusión de una secuencia que no funciona como péptido señal al péptido señal N-terminal de otra proteína (Briggs y Gierasch, 1986).

Hay toda una serie de proteínas bacterianas que se secretan al medio de cultivo, bacteriocinas, hemolisinas, proteasas, etc., y que requieren complejos mecanismos de translocación que involucran a otras proteínas específicas para tal mecanismo, en estos casos tampoco se detecta la existencia de un péptido señal en dichas proteínas (Holland y cols., 1986; de Graaf y Oudega, 1986).

Un caso anómalo de secreción en procariotas es la "pseudosecreción" de la cloranfenicol-acetil-transferasa de *E. coli* en *B. subtilis* (Le Grice y cols., 1987) y la secreción de la proteína S de *Myxococcus xanthus* (Pugsley y Schwartz, 1985).

### **3.6. Importancia de la proteína madura en el proceso de translocación.**

Aunque al principio se creía que toda la información para la translocación de la proteína residía en el péptido señal, hoy se sabe que ciertas regiones de la proteína madura son también importantes para este proceso. Estas regiones pueden funcionar como secuencias de anclaje a membranas, como señales internas de localización en membrana plasmática, periplasma o membrana externa, o como secuencias necesarias para interactuar con el péptido señal N-terminal y originar así una conformación en el precursor susceptible de translocación (Briggs y Gierasch, 1986).

Sin embargo, las señales para una correcta localización de la proteína no tienen por que residir exclusivamente en la secuencia primaria del polipéptido, la modificación post-traducciona, como por ejemplo la unión de ácidos grasos a la cisteína N-terminal de las lipoproteínas o los lisilaldehídos de las porinas de membrana externa, es otro mecanismo que contribuye en gran medida a la localización proteica (Pugsley y Schwartz, 1985).

### **3.7. Proteínas implicadas en el mecanismo de translocación de *E. coli*.**

#### **3.7.1. Peptidasa señal y peptidasa de péptidos señal.**

La peptidasa señal es la enzima encargada de escindir (procesar) el péptido señal del resto de la proteína. Es una endoproteasa que reconoce la estructura secundaria en giro  $\beta$  de la región *post-core* del péptido señal. En *E. coli* se han descrito al menos dos enzimas diferentes, ambas son proteínas integrales de la membrana plasmática con sus centros catalíticos en la cara periplásmica de la bicapa lipídica. El procesamiento del péptido señal puede ser importante para una buena translocación, para activar la proteína madura y/o para permitir la oligomerización de proteínas que requieren este proceso (Pugsley y Schwartz, 1985; Briggs y Gierasch, 1986).

Para digerir el péptido señal que ha sido procesado *E. coli* posee las peptidasas de péptidos señal: la proteasa IV de la membrana interna y dos proteasas citoplásmicas (Briggs y Gierasch, 1986).

### 3.7.2. SecB, Factor trigger y GroEL.

Las tres son proteínas solubles que se unen al precursor proteico que va a ser translocado para ponerlo en contacto con la maquinaria de secreción de la membrana plasmática e impedir su plegamiento en la conformación nativa no susceptible de translocación. Recientemente se ha determinado que SecB es también un componente del factor citoplásmico 12 S de *E. coli*, factor que provoca una parada en la síntesis de la proteína de modo análogo a como funciona el SRP de los eucariotas (apartado 3.3.). A este respecto, RNAs homólogos al que se encuentra formando parte del SRP eucariótico se han identificado ya en bacterias y arqueobacterias (Saier y cols., 1989).

### 3.7.3. SecA y SecY.

La proteína SecA es una proteína periférica de membrana localizada en la cara interna de la membrana plasmática. Interviene en el procesamiento, secreción y/o inserción en la membrana de casi todas las proteínas de la célula. Presenta actividad ATPásica y parece ser la responsable de acoplar la hidrólisis del ATP al mecanismo de translocación (Saier y cols., 1989; Lill y cols., 1989).

SecY o PrlA es una proteína integral de la membrana plasmática, por lo que presenta gran hidrofobicidad. Interacciona con SecA y con la secuencia señal de las proteínas que se translocan. Es una proteína indispensable para la translocación y se cree que su función es la de formar un poro proteico en el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica (Saier y cols., 1989; Hurtley, 1990).

### 3.7.4. SecD, SecE y PrlC.

SecD y SecE son proteínas integrales de membrana cuya función todavía no se conoce con certeza. Por el contrario, PrlC no es una proteína esencial para la translocación y parece intervenir en una ruta de secreción alternativa (Saier y cols., 1989).

### 3.7.5. Mutantes Lky.

Aunque no se trate de un componente del aparato de secreción de *E. coli* es importante mencionar aquí la existencia de los mutantes Lky de *E. coli* K-12, ya que es de gran interés biotecnológico el empleo de cepas que permiten la secreción al medio de cultivo del producto clonado. En estos mutantes se incrementa notablemente la permeabilidad de la membrana externa sin que ello suponga una disminución apreciable de la viabilidad celular. La causa de ese incremento en la permeabilidad es la pérdida en el contenido de lipoproteína (mutantes *lpp*), o el cambio en la composición y contenido en lipopolisacárido (mutantes *tolA*, *tolB* y *rfa*); y su consecuencia es la liberación de algunas proteínas periplásmicas al medio de cultivo. Sin embargo, la barrera de permeabilidad de la membrana externa no desaparece por completo pues los mutantes no liberan proteínas periplásmicas indiscriminadamente (Pugsley y Schwartz, 1985; Fognini-Lefebvre y cols., 1987).

### 3.8. Translocación de proteínas en bacterias Gram-positivas.

La translocación de proteínas en *B. subtilis*, dejando al margen la secreción de proteínas al medio de cultivo, parece ser similar a la descrita para *E. coli*, de nuevo fundamentada en la existencia de un péptido señal. Caulfield y cols. (1985) han identificado en el citoplasma de *B. subtilis* una partícula formada por 4 proteínas que interviene en la translocación proteica y que sería equivalente al SRP de eucariotas, se le ha llamado *complejo S*. En *S. aureus* también se ha descrito un complejo similar (Saier y cols., 1989).

En *B. subtilis* también se conocen mutantes de translocación que podrían ser similares a los descritos para *E. coli*. Los mejor caracterizados hasta la fecha son los *Sec<sup>-</sup>*, los *sacU* y los *sacQ* (Pugsley y Schwartz, 1985).

### 3.9. Modelos de translocación proteica.

Actualmente existen varios modelos para explicar la translocación proteica en procariontes (Briggs y Gierasch, 1986). En todos ellos los tres aspectos clave son: la naturaleza del lugar de translocación, el acoplamiento o no de la translocación con la síntesis proteica, y la fuente energética para la translocación.

A la luz de los conocimientos actuales es muy probable que el complejo de translocación proteica en la membrana esté formado tanto por lípidos como por proteínas. En el retículo endoplásmico de las células eucarióticas la translocación proteica es mayoritariamente

cotraduccional aunque ya se conocen algunos casos de translocación post-traduccional; en bacterias las proteínas se pueden translocar bien cotraduccionalmente bien post-traduccionalmente o de las dos formas. Pero aún en el caso de que la translocación sea cotraduccional, sólo comienza cuando la proteína se ha sintetizado en un porcentaje elevado de su longitud total, es decir, que dominios enteros pueden translocarse después de su síntesis en un sistema de translocación cotraduccional. El procesamiento del péptido señal puede ser también cotraduccional y/o post-traduccional. En cualquier caso, los resultados de que se dispone parecen indicar que existen mecanismos alternativos de translocación dependiendo del organismo con el que se trabaje, de la proteína en estudio, y del procedimiento experimental utilizado. Tanto en procariotas como en eucariotas es necesaria una fuente energética para que la translocación pueda tener lugar, y en ambos casos es el ATP esa fuente energética, si bien en procariotas la fuerza motora de protones también parece desempeñar un importante papel, por lo menos para ciertas proteínas. Cuando el proceso es cotraduccional la propia elongación de la cadena polipeptídica naciente en los ribosomas puede ayudar a la translocación y al mantenimiento de una conformación desplegada en el precursor (Briggs y Gierasch, 1986; Saier y cols., 1989).

Un modelo gráfico que podría resumir lo que se conoce hasta el momento sobre la translocación de proteínas a través de membranas en procariotas se presenta en la Figura 5 B.

### **3.10. Conservación evolutiva del mecanismo de translocación.**

Dos tipos de datos experimentales apoyan la idea sobre la conservación evolutiva del mecanismo de translocación:

i) La maquinaria de secreción bacteriana puede translocar y procesar correctamente proteínas de origen eucariótico y viceversa (Saier y cols., 1989).

ii) A pesar de la poca similitud en la secuencia de aminoácidos de los péptidos señal hasta ahora secuenciados, todos muestran, a grandes rasgos, las mismas características estructurales (apartado 3.4.). Por ello es posible intercambiar el péptido señal de una proteína por el de otra y que la translocación y el procesamiento no sufran ninguna alteración. Sin embargo, hay una restricción a este intercambio: las proteínas solubles no pueden localizarse en la membrana por el mero hecho de fusionarles una secuencia señal de una proteína de membrana y, recíprocamente, no se puede localizar una proteína de membrana en un compartimento soluble por el mero hecho de haberle fusionado un péptido señal de una proteína soluble. Se podría concluir entonces que la característica común y conservada en las secuencias señal es su capacidad para interactuar con las membranas y realizar sus funciones adoptando diferentes conformaciones según el ambiente molecular en el que se encuentren en cada momento (Briggs y Gierasch, 1986).

## **4. ESTUDIOS EN NEUMOCOCO.**

### **4.1. Visión histórica : importancia del neumococo en el desarrollo de la biología y la medicina.**

La bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumonoco) se aisló por primera vez en el año 1881 por los científicos Sternberg (en los Estados Unidos) y Pasteur (en Francia) de muestras de saliva humana. Al año siguiente se identificó este microorganismo como el agente productor de la neumonía, en un trabajo en el que se describe por primera vez la tinción de Gram para bacterias. A comienzos de este siglo Neufeld descubrió la acción lítica de las sales biliares (desoxicolato) sobre neumococo (Neufeld, 1900) y la reacción de hinchamiento capsular (*quellung*), que se han convertido en dos de las pruebas de diagnóstico habitualmente utilizadas en clínica para la identificación de neumococos. El estudio de la cápsula y la pared celular de neumococo ha sido de gran utilidad para el desarrollo de la inmunología, ya que ha permitido el análisis de las defensas celular y humoral contra la infección bacteriana así como la caracterización del primer antígeno polisacárido (el ácido teicoico de la pared celular de neumococo). También ha sido neumococo la primera bacteria en la que se ha estudiado la naturaleza enzimática de la lisis bacteriana (Dubos, 1937). En 1912 Morgenroth y Kaufmann describen en neumococo el primer caso de resistencia *in vivo* a una droga antibacteriana, la optoquina (un derivado de la quinina). Sin embargo, de todas las aportaciones a la biología y la medicina derivadas del estudio de neumococo, la de mayor trascendencia fue la que permitió la explicación del fenómeno de transformación genética (Griffith, 1928) y que culminó con el descubrimiento del DNA como la base de la información genética en los organismos, descubrimiento que ha sido la piedra angular para el nacimiento y desarrollo de la Genética Molecular (Avery y cols., 1944). Para una revisión de todos los aspectos mencionados en este apartado ver Austrian (1981).

### **4.2. Clasificación.**

*S. pneumoniae* es una especie constituida por bacterias Gram-positivas, de 1,2-1,8  $\mu\text{m}$  de longitud y con 0,5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, de forma oval y con la extremidad distal lanceolada (Figura 19 A). Estas bacterias normalmente se presentan en forma diploidea, de ahí el nombre de *Diplococcus pneumoniae* con el que se denominó primeramente a esta especie, o como cortas cadenas, según las condiciones de crecimiento. Neumococo es un componente habitual de la flora bacteriana del tracto respiratorio superior del hombre y la casi totalidad de los aislados clínicos son formas capsuladas (Tomasz, 1981). Cuando se multiplica en agar-sangre forma

colonias de aspecto mucoso rodeadas de una zona decolorada de color verdoso ( $\alpha$ -hemolisis). En condiciones anaerobias, sin embargo, puede observarse una zona de  $\beta$ -hemolisis alrededor de las colonias debida a la acción de la neumolisina.

Las tres pruebas de diagnóstico habitualmente utilizadas en clínica para diferenciar a neumococo de otros estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos son: i) la solubilidad de neumococo frente a las sales biliares (desoxicolato) debida a la actuación incontrolada de la principal enzima autolítica de *S. pneumoniae*; ii) la sensibilidad de neumococo frente a la optoquina (el resto de los estreptococos son resistentes a este derivado de la quinina); iii) la reacción de hinchamiento capsular (*quellung*) con antisueros específicos. Para una revisión reciente de todos estos aspectos ver García (1990). Sin embargo, cada vez es más frecuente en los análisis clínicos de identificación el uso de sondas de DNA específicas de neumococo (Fenoll y cols., 1990).

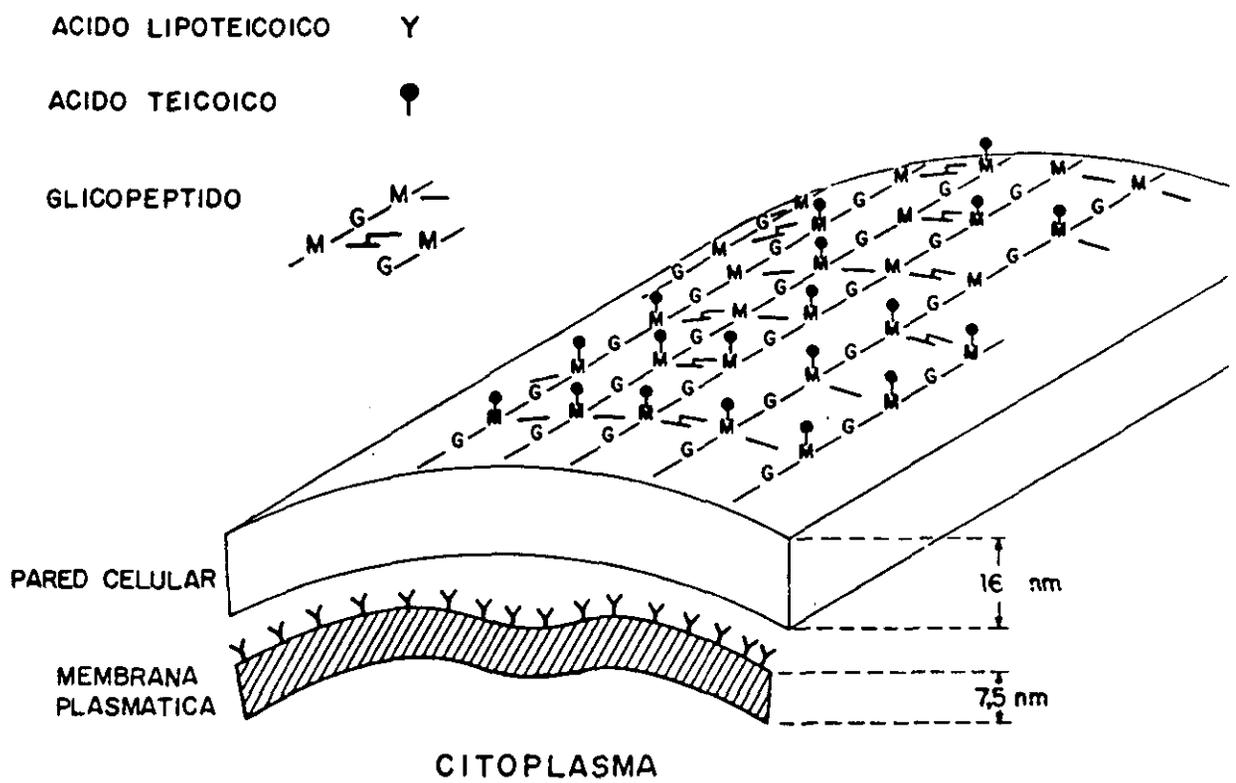
Se conocen 83 serotipos de neumococo que, contrariamente a los estreptococos que son clasificados en base a los antígenos de la pared celular (clasificación de Lancefield), se diferencian por los polisacáridos que constituyen la cápsula. Los 83 serotipos se agrupan en 46 grupos, si bien hay serotipos con antígenos comunes y que pertenecen a distintos grupos (Lund y Henrichsen, 1978). La cepa R6 de *S. pneumoniae*, una de las cepas rugosas (carentes de cápsula) más utilizadas en el laboratorio, pertenece al Tipo II y deriva de la cepa lisa (capsulada) D39 (Avery cols., 1944). En nuestro laboratorio la cepa R6 es la que se emplea como cepa tipo.

### **4.3. Aspectos estructurales de las envolturas de neumococo.**

#### **4.3.1. Membrana plasmática.**

En cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico la membrana plasmática de neumococo posee la típica estructura trilamelar, con un espesor aproximado de 7,5 nm (Figura 6) y con una composición lipídica en la que destacan los glicolípidos, el fosfatidilglicerol, la cardiolipina y los lípidos neutros (Horne y cols., 1977; Tomasz, 1981). Las proteínas de la membrana plasmática de neumococo caracterizadas hasta la fecha están relacionadas con la unión de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (PBP), así como implicadas en el proceso de transformación genética (Tomasz, 1981). También se ha sugerido que algunas proteínas codificadas por el operón *ami* (Alloing y cols., 1990) y la proteína Mal X (Martin y cols., 1989) se localizan en la membrana.

*S. pneumoniae* presenta competencia natural para la transformación genética. Esta competencia es un estado fisiológico inducido por una proteína específica (factor de competencia) cuya  $M_r$  es de 8.000-10.000 y que presenta gran abundancia de aminoácidos cargados positivamente. Esta proteína se detecta en la superficie de las células y en el medio de



**Figura 6.** Representación esquemática de la membrana plasmática y la pared celular de *S. pneumoniae*.  
Modificado de Tomasz (1981).

crecimiento cuando los cultivos alcanzan una concentración celular crítica, alrededor de  $2,1 \times 10^8$  UFC/ml (Tomasz, 1981). En la membrana plasmática de las células existe una proteína que funciona como receptor del factor de competencia (Tomasz, 1981). Las proteínas implicadas en la unión del DNA exógeno durante el proceso de transformación genética también se localizan en la membrana plasmática de neumococo (Tomasz, 1981), así como la endonucleasa encargada de digerir una de las dos hebras del DNA transformante, requisito indispensable para la entrada de este DNA en la célula (Lacks y Neuberger, 1975; Puyet y cols., 1990).

La membrana plasmática de neumococo forma con frecuencia complejas invaginaciones (mesosomas). Cuando las células se crecen en medio hipertónico de sacarosa se observan al microscopio electrónico numerosos y estrechos contactos entre la pared celular y la membrana (Tomasz, 1981). En la cara externa de la membrana plasmática se localiza el ácido lipoteicoico o antígeno de Forssman (Figura 6) (apartado 4.3.2.3.).

#### 4.3.2. Pared celular.

La pared celular de neumococo está compuesta del peptidoglicano y de los ácidos teicoicos de pared a él asociados (Tomasz, 1981). Su espesor oscila alrededor de los 14-16 nm, equivalente a unas 8 capas de peptidoglicano de 2 nm de espesor cada una (Figura 6) (Tomasz, 1981). Unidas a la pared celular se localizan una serie de proteínas que se introducen en la cápsula pero que pueden ser reconocidas por antisueros específicos, lo que sugiere que o bien alcanzan el exterior celular o que, al menos en ciertas cepas, la cápsula es lo suficientemente laxa como para permitir el paso de los anticuerpos. Un ejemplo de tales proteínas es la denominada proteína A (PspA) cuya  $M_r$  es de 84.000 en la cepa R6 (McDaniel y cols., 1987).

##### 4.3.2.1. El peptidoglicano.

Utilizando técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar los productos de degradación enzimática de las paredes celulares de neumococo, se ha determinado que aproximadamente el 60%-70% de las lisinas presentes forman parte de enlaces cruzados entre unidades peptídicas (Laitinen y Tomasz, 1990; García-Bustos y Tomasz, 1990). Las principales fracciones peptídicas resultantes de la solubilización de la pared celular por la amidasa autolítica de neumococo, y que representan el 77% de los péptidos de pared, son : la fracción de monómeros (3 distintos), la fracción de dímeros (5 distintos) y la fracción de trímeros (3 distintos). Todos los residuos  $\alpha$ -carboxilo del ácido glutámico se encuentran amidados (isoglutamina) (Figura 1 A) por lo que no participan en los enlaces peptídicos cruzados entre

hebras glicánicas, aunque sí estabilizan la malla del peptidoglicano mediante la formación de puentes de hidrógeno. El principal péptido monomérico es un tripéptido en lugar del clásico tetrapéptido, lo que puede ser un reflejo de una alta actividad D,D y D,L-carboxipeptidásica (García-Bustos y cols., 1987). Se han encontrado dos tipos diferentes de puentes interpeptídicos, uno de ellos es un puente cruzado alanina-serina o alanina-alanina entre la alanina en posición 4 de la unidad peptídica donadora y la lisina en posición 3 del péptido aceptor (peptidoglicano tipo A3 $\alpha$ ); en el segundo tipo el puente interpeptídico se establece a través de un enlace directo (peptidoglicano tipo A1 $\alpha$ ) (Figura 3 A) (García-Bustos y cols., 1987; García-Bustos y Tomasz, 1990). Además de la alanina, isoglutamina, lisina y serina, en la pared de neumococo se han encontrado otros dos aminoácidos minoritarios, la glicina y el ácido aspártico (Fischer y Tomasz, 1985). En mutantes resistentes a penicilina el contenido en alanina se incrementa considerablemente y con ello la hidrofobicidad general de la trama peptídica, aumentando también el número de enlaces cruzados indirectos (tipo A3 $\alpha$ ) y la frecuencia de residuos de lisina que presentan cadenas laterales de alanina-serina o alanina-alanina (García-Bustos y cols., 1988; García-Bustos y Tomasz, 1990). Sin embargo, el porcentaje global de enlaces cruzados es similar en cepas de neumococo resistentes y susceptibles a la penicilina. La alteración en la estructura del peptidoglicano de neumococo cotransforma con el carácter de resistencia a la penicilina (García-Bustos y cols., 1988; García-Bustos y Tomasz, 1990).

En neumococo el peptidoglicano de nueva síntesis tiene un bajo contenido en enlaces cruzados (35%), sin embargo en el transcurso de un corto período de tiempo sufre un proceso de maduración que eleva dicho porcentaje al 60%. El proceso de maduración consiste en reacciones de transpeptidación que incorporan disacáridos pentapéptidos de nueva síntesis a los monómeros peptídicos ya existentes en la pared. La transpeptidación requiere un tripéptido como aceptor y un pentapéptido como donador, resultando en un dímero tri-tetrapéptido que incrementa el contenido en enlaces cruzados del peptidoglicano (Laitinen y Tomasz, 1990).

#### 4.3.2.2. Los ácidos teicoicos.

Los ácidos teicoicos de pared (polisacárido C) son un complejo polisacárido fosforilado, polirribitolfosfato, que representa el 40%-50% del peso seco de la pared. Aunque la disposición espacial de los ácidos teicoicos no se conoce todavía, es evidente que un porcentaje de ellos se localiza en la cara externa de la pared celular ya que neumococos intactos se pueden aglutinar con antisuero frente al polisacárido C y con proteínas del mieloma dirigidas contra los residuos de colina-fosfato. El polisacárido C también reacciona con la proteína C reactiva (una  $\beta$ -globulina del plasma humano) e induce la activación de la ruta clásica del sistema del complemento

(Tomasz, 1981). Mediante técnicas inmunocitoquímicas se ha podido determinar que los residuos de ácido teicoico son accesibles desde ambos lados de la pared celular (Sorensen y cols., 1988). La Figura 3 A representa esquemáticamente la estructura química de la pared celular de neumococo. Se estima que debe existir, por término medio, una cadena de ácido teicoico de pared por cada tetradisacárido tetrapéptido (Figura 3 A) (García-Bustos y Tomasz, 1987).

#### 4.3.2.3. La colina como componente estructural de la pared celular de neumococo.

*S. pneumoniae* posee un requerimiento nutricional absoluto por el aminoalcohol colina, de tal manera que la eliminación de esta sustancia del medio de cultivo provoca la detención de la multiplicación celular (Tomasz, 1967). Esta dependencia de colina permitió el descubrimiento de que los ácidos teicoicos presentes en la pared celular de neumococo contienen este aminoalcohol en su composición. Los sustituyentes de fosforilcolina se encuentran unidos al átomo de carbono en posición 6 de los residuos no acetilados de galactosamina (Jennings y cols., 1980). Se estima que hay, por término medio, ocho unidades repetidas de fosforilcolina por cada molécula de ácido teicoico (Figura 3 A) (García-Bustos y Tomasz, 1987). El 85% de la colina macromolecular presente en la célula de neumococo se encuentra formando parte del ácido teicoico (polisacárido C) (Brundish y Baddiley, 1968; Mosser y Tomasz, 1970). El 15% restante se localiza en el ácido lipoteicoico o LTA, que también recibe el nombre de antígeno de Forssman (Fag) (Briles y Tomasz, 1973). El LTA es un polímero de ribitolfosfato unido a un triglicérido de la cara externa de la membrana plasmática a través de un puente disacárido; se encuentra en la célula en menor proporción que el ácido teicoico y desempeña un papel fundamental en el control de la principal autolisina de neumococo (Höltje y Tomasz, 1975 a; Briles y Tomasz, 1975). El requerimiento nutricional de *S. pneumoniae* por la colina puede satisfacerse mediante el empleo de medios de cultivo que contengan análogos estructurales como la etanolamina (EA), la *N,N*-dimetilamino-etanolamina y otra serie de aminoalcoholes (Tomasz, 1968; Tomasz y cols., 1975; Sanz y cols., 1988). Sin embargo, *S. pneumoniae* es incapaz de llevar a cabo la metilación de la etanolamina para originar colina (trimetiletanolamina) en los ácidos teicoicos cuando se cultiva en un medio definido que contiene etanolamina en lugar de colina (medio Cden-EA) (Tomasz, 1968). Esta sustitución de la colina por la etanolamina en la pared celular trae consigo importantes alteraciones fisiológicas en las células de neumococo (células-EA), tales como : la no separación de las células hijas y, con ello, un encadenamiento ilimitado; la ausencia de autólisis y de lisis inducida por los detergentes y antibióticos  $\beta$ -lactámicos; y la no infección por fagos. Estas alteraciones son consecuencia de dos defectos primarios:

i) Las paredes celulares de las células-EA son totalmente resistentes a la actividad degradativa de las autolisinas de neumococo (Mosser y Tomasz, 1970; Sánchez-Puelles y cols., 1986 b). Esta resistencia no es debida a alteraciones en la composición química, si se exceptúa la presencia de etanolamina en lugar de colina, o en la estructura de la pared celular, pues se ha demostrado que las paredes celulares que contienen etanolamina o colina dan lugar a los mismos tipos de productos de digestión cuando se degradan con la muramidasa del hongo *Chalara* (= *Chalaropsis*) (Höltje y Tomasz, 1975 b). Además, la conversión *in vitro* de los residuos de etanolamina en colina mediante metilación con yoduro de metilo sensibiliza de nuevo a la pared celular frente a la amidasa autolítica de neumococo, la principal autolisina de esta bacteria. Esto indica que, por lo que se refiere a la susceptibilidad a la amidasa, la única diferencia relevante entre las paredes celulares que contienen etanolamina y aquéllas que contienen colina es el componente aminoalcohólico (Höltje y Tomasz, 1975 b).

ii) Las células-EA contienen una enzima autolítica de baja  $M_r$  (36.000) y actividad muy reducida (forma E), que puede activarse (*convertirse*) en la enzima de alto peso molecular ( $M_r > 500.000$ ) y catalíticamente activa (forma C), con paredes que contienen colina (Tomasz y Westphal, 1971).

Todas las propiedades anómalas mostradas por las células-EA desaparecen mediante la adición de colina a los cultivos de neumococo que contienen etanolamina, para lo cual basta que el cultivo se encuentre en una fase de multiplicación activa que permita la incorporación celular de la colina (Tomasz, 1968). Las unidades nacientes de ácido teicoico que contienen colina se unen a unidades de peptidoglicano sintetizado simultáneamente (Tomasz y cols., 1975), y estos complejos se incorporan a la pared celular exclusivamente en la región ecuatorial de la misma (Briles y Tomasz, 1970; López y cols., 1982 a). Durante el crecimiento celular, se segregan de forma simétrica y pasan intactos a las células hijas. No se ha observado recambio (*turnover*) de estos complejos, de forma análoga a como ocurre en *S. faecalis* y al contrario de lo que se ha descrito para *B. subtilis* (Tomasz y cols., 1975).

La aparición de unidades de pared que contienen colina tiene dos consecuencias bioquímicas importantes (Tomasz y cols., 1975) : i) la región ecuatorial de la pared celular de neumococo se vuelve sensible a la autolisina; ii) la forma C de la autolisina, catalíticamente activa, reaparece en la célula (ya sea a través de la síntesis *de novo* o por conversión *in vivo* de la forma E presente en las células-EA a la forma C). A los 10 minutos de la adición de la colina al medio de cultivo reaparece la sensibilidad a la lisis inducida por detergentes. La desaparición de las largas cadenas que forman las células-EA y la formación de "diplos", sólo se completa después de un período de tiempo comprendido entre 5 y 6 horas (Tomasz, 1968; Tomasz y cols., 1975).

La incorporación del peptidoglicano y del ácido teicoico en la pared celular está coordinada, de forma que es necesario que el peptidoglicano nascente establezca enlaces cruzados con el ya existente (es decir, pase del estado soluble al insoluble) para que los ácidos teicoicos de pared puedan interactuar con esta estructura (Fischer y Tomasz, 1984). Si se inhibe la actividad transpeptidasa no hay incorporación ni de peptidoglicano ni de ácidos teicoicos de nueva síntesis, secretándose ambos al medio de cultivo (apartado 2.2.6.). Un elemento de control en la síntesis de estos polímeros es la presencia o ausencia de colina en el medio de cultivo, ya que la ausencia de este aminoalcohol impide la síntesis del peptidoglicano. Se ha especulado con la posibilidad de que el bactoprenol unido a los polímeros de ácido teicoico sin colina no pueda ser accesible al muramil-pentapéptido durante la biosíntesis del peptidoglicano (Fischer y Tomasz, 1984; Fischer y Tomasz, 1985). Sin embargo, aunque se inhiba la biosíntesis del peptidoglicano por el tratamiento con antibióticos la biosíntesis de los ácidos teicoicos continúa, si bien éstos se secretan al medio de cultivo (apartado 2.2.6.).

#### 4.3.3. Cápsula.

El espesor de la cápsula de neumococo varía entre 200 y 400 nm dependiendo de las estirpes. Aunque no se conoce con precisión si la cápsula se encuentra unida a la pared celular por algún tipo de interacción, recientemente se ha descrito que, al menos en algunos tipos capsulares, ésta puede unirse al peptidoglicano mediante enlaces covalentes. La cápsula es de naturaleza polisacáridica y también recibe el nombre de *sustancia SSS* (*specific soluble substance*). Es el principal factor de virulencia de neumococo y el que se emplea para la clasificación de esta especie (apartado 4.2.). En ocasiones se observa la aparición de mutantes no capsulados denominados R (*rough*), en contraste con las cepas capsuladas o S (*smooth*).

#### 4.4. Factores de virulencia en neumococo.

La cápsula representa el principal factor de patogenicidad de *S. pneumoniae* debido a sus propiedades antifagocitarias que hacen que, en ausencia de anticuerpos específicos, las cepas capsuladas no sean fagocitadas y se comporten como virulentas, mientras que las estirpes no capsuladas son fagocitadas rápidamente. Los polisacáridos capsulares activan la ruta clásica del sistema del complemento cuando interactúan con el anticuerpo correspondiente, con la consiguiente liberación de histamina por los mastocitos y la opsonización de la bacteria (Winkelstein, 1981). Sin embargo, cada día es más evidente que neumococo produce un cierto número de sustancias tóxicas que parecen colaborar de manera importante en su virulencia

(García, 1990). Entre éstas se encuentran los ácidos teicoicos de la pared celular (polisacárido C); la principal enzima autolítica, amidasa LYTA, (apartado 4.6.1.1.); la neumolisina; la neuraminidasa; la proteína A de superficie (PspA); y la proteasa específica de inmunoglobulinas A1.

A pesar del desarrollo que ha conseguido la terapia antibiótica, neumococo continúa siendo una de las bacterias patógenas de mayor importancia para el hombre. *S. pneumoniae* causa enfermedades tan importantes como neumonía, meningitis, otitis media, septicemias, conjuntivitis, pericarditis, y artritis. La aparición de cepas resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos supone una preocupación adicional dado que estos antibióticos son los más utilizados para combatir las infecciones causadas por neumococo (Klugman, 1990). En la actualidad se utiliza a nivel clínico una vacuna contra la infección por neumococo compuesta de polisacáridos pertenecientes a los 23 tipos capsulares más frecuentes. No obstante, presenta una serie de limitaciones ya que es ineficaz en la población infantil (uno de los grupos de riesgo más importante), el título de anticuerpos decae con relativa rapidez (especialmente en las personas de edad avanzada) y una dosis de recuerdo no incrementa la respuesta inmunitaria de forma significativa (Austrian, 1989). El reciente desarrollo de vacunas basadas en polisacáridos capsulares acoplados a proteínas podría solucionar dos de los anteriores problemas: la protección en individuos jóvenes y la memoria inmunológica (Jennings, 1990).

#### **4.5. Aspectos genéticos.**

A pesar de la importancia que *S. pneumoniae* ha tenido en el desarrollo de la biología (apartado 4.1.) y de ser el microorganismo que posibilitó el descubrimiento del DNA, el tamaño (2.270 kb) y el mapa genético de su genoma se conocen desde hace tan sólo unos pocos meses (Gasc y cols., 1990) y sólo un pequeño número de sus genes han sido secuenciados. Entre éstos se encuentra el gen *malM* completo y porciones de los genes *malX* y *malP*, los tres codifican proteínas implicadas en el metabolismo de la maltosa (Lacks y cols., 1982); el gen *lytA*, que codifica para la amidasa autolítica LYTA (García y cols., 1986 c); los genes *dpnB*, *dpnA* y *dpnM* que codifican para la endonucleasa y las dos metilasas del sistema de restricción DpnII (Lacks y cols., 1986 b); los genes *dpnC* y *dpnD* que codifican para el sistema de restricción DpnI (Lacks y cols., 1986 b); el gen que codifica para la neumolisina (Walker y cols., 1987); los genes *hexA* (Priebe y cols., 1988) y *hexB* (Prudhomme y cols., 1989), que codifican proteínas involucradas en procesos de reparación de regiones monocatenarias en el DNA; los genes *sulA* (López y cols., 1987), *sulD* (López y cols., 1990 b), *sulB* y *sulC* (M. Espinosa, comunicación personal), que codifican proteínas que participan en la biosíntesis del folato; los seis genes que constituyen el locus *ami*, implicados en el transporte de oligopéptidos a través de la membrana (Alloing y cols.,

1990); el gen *polA*, que codifica para la DNA polimerasa I (López y cols., 1989); el gen *exoA* que codifica para la principal exonucleasa de neumococo (Puyet y cols., 1989); el gen *recP*, que codifica para una proteína que interviene en procesos de recombinación genética (Radnis y cols., 1990); y el gen *endA* que codifica para la principal endonucleasa de neumococo (Puyet y cols., 1990). De todos ellos, sólo una unidad de transcripción se había caracterizado completamente, la del gen *pol A* (López y cols., 1989). Una de las razones que explica este escaso desarrollo de la genética de neumococo es la inestabilidad plasmídica que se origina como consecuencia de la clonación en *E. coli* de muchos de los genes antes mencionados (Chen y Morrison, 1987). Esta inestabilidad se ha atribuido a la presencia de promotores fuertes en los fragmentos clonados (Stassi y cols., 1981; Stassi y Lacks, 1982). Para tratar de evitar este problema se han construido plásmidos de *E. coli* con eficientes terminadores de la transcripción (Chen y Morrison, 1988); aunque esta estrategia tuvo éxito para la clonación de algunos genes, otros (*malX* y *amiA*) seguían causando inestabilidad en los plásmidos. Recientemente, Martin y cols., (1989) han demostrado que son los productos codificados por los genes *malX* y *amiA*, y no los promotores de estos genes, los responsables de los problemas que surgen a la hora de clonar estos genes en *E. coli*. Por el contrario, otros genes de neumococo, como los genes *polA* y *lytA*, se han clonado en *E. coli* sin ocasionar ningún problema de inestabilidad en el plásmido vector.

Dado que hasta hace muy poco tiempo sólo se conocía el promotor de un gen de neumococo, el del gen *polA* (López y cols., 1989), las características generales de la regulación génica en *S. pneumoniae* son prácticamente desconocidas. Recientemente, Morrison y Jaurin (1990) han clonado al azar en un plásmido de *E. coli* para búsqueda de promotores 17 fragmentos de DNA de neumococo con actividad promotora. El análisis y la comparación de las secuencias de nucleótidos de los 17 fragmentos reveló que todos ellos tenían unas regiones -10 y -35 similares a las que presentan los promotores de *E. coli* reconocidos por la subunidad  $\sigma_{70}$  de la RNA polimerasa, y cuya secuencia consenso es TTGACA-17 pb-TATAAT (Hawley y McClure, 1983). Otra característica de estos 17 fragmentos de neumococo con actividad promotora en *E. coli* es que en su región -44 (Galas y cols., 1985) se localiza la secuencia, AAAA, secuencia que también se encuentra en los promotores de otras bacterias Gram-positivas (Graves y Rabinowitz, 1986).

#### **4.6. El sistema lítico de pared de neumococo y sus bacteriófagos.**

##### **4.6.1. Enzimas autolíticas de *S. pneumoniae*.**

En *S. pneumoniae* se han descrito, hasta la fecha, dos enzimas autolíticas, una *N*-acetil-muramil-L-alanil amidasa (amidasa LYTA) (Howard y Gooder, 1974), que fue la primera que se descubrió y es la mayoritaria en la célula, y una endo- $\beta$ -1,4-*N*-acetil glucosaminidasa (Sánchez-Puelles y cols., 1986 b; García y cols., 1989).

#### 4.6.1.1. Características de la amidasa LYTA

La autolisina LYTA de neumococo fue caracterizada por primera vez por Howard y Gooder (1974) como una *N*-acetil-muramil-L-alanil amidasa (Figura 3 B). Al año siguiente Høltje y Tomasz (1975) la purificaron a homogeneidad electroforética y determinaron para ella una  $M_r$  de 36.000.

La característica más relevante de la amidasa LYTA es que su actividad catalítica requiere la presencia de residuos de colina en los ácidos teicoicos de la pared celular, el sustrato natural de esta enzima (apartado 4.3.2.3.). La colina actúa como un ligando alostérico esencial para la unión física (adsorción) de las moléculas de autolisina a su sustrato condicionando un posicionamiento correcto de la enzima para realizar la catálisis (Giudicelli y Tomasz, 1984 a). Cuando la colina de la pared celular de neumococo se sustituye por análogos estructurales como la etanolamina, la amidasa LYTA es incapaz de hidrolizar dicha pared (apartado 4.3.2.3.). Este comportamiento es debido a que las paredes que contienen etanolamina carecen de ligandos de adsorción específicos para la enzima (Giudicelli y Tomasz, 1984 a). El requerimiento de colina parece ir ligado a la naturaleza insoluble del sustrato. Así, cuando las paredes celulares de neumococo se solubilizan por tratamiento con la muramidasa MI de *Streptomyces globisporus*, los muropéptidos resultantes son hidrolizados por la amidasa LYTA tanto si contienen colina como si presentan etanolamina en sus ácidos teicoicos (García-Bustos y Tomasz, 1987).

Recientemente se ha sugerido la existencia de un único sitio de unión de la colina en la molécula de amidasa LYTA. La colina unida a la enzima no se libera mediante diálisis, precipitación con TCA o sulfato amónico, o por filtración en gel. Sin embargo, la colina no establece enlaces covalentes con la enzima, ya que se libera mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS o por almacenamiento de la proteína a 0 °C (Markiewicz y Tomasz, 1990).

Se ha postulado que el movimiento de la enzima a través de la pared celular se llevaría a cabo mediante la liberación de fragmentos solubles de peptidoglicano y posterior interacción con residuos de colina insolubles adyacentes al fragmento previamente solubilizado (Markiewicz y Tomasz, 1990).

El mecanismo de degradación de la pared celular por la amidasa autolítica de neumococo no es el mismo en condiciones *in vitro* que *in vivo*. *In vitro* la enzima es capaz de hidrolizar casi todos los enlaces muramil-L-alanina del peptidoglicano; *in vivo* sólo algunos de estos enlaces sufren

hidrólisis, precisamente aquéllos que unen capas de mureína adyacentes (García-Bustos y Tomasz, 1989).

#### 4.6.1.1.1. Proceso de activación (*conversión*) de la amidasa LYTA.

La amidasa LYTA se sintetiza en la célula como una forma de baja actividad (forma E) que requiere un proceso de activación (*conversión*) para alcanzar el estado de máxima actividad enzimática (forma C) (Tomasz y Westphal, 1971). Este proceso consiste en una interacción específica de la amidasa con los residuos de colina. En la célula la *conversión* es debida a la colina que forma parte de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la envoltura celular (Briese y Hakenbeck, 1985).

La *conversión* de la autolisina LYTA también se puede realizar *in vitro* incubando a baja temperatura la forma E de la enzima con paredes celulares que contengan colina en sus ácidos teicoicos (Tomasz y Westphal, 1971). El ácido lipoteicoico que contiene colina, así como un 2% de colina o fosforilcolina en el ensayo de actividad también son capaces de inducir la *conversión* de la amidasa LYTA (Briese y Hakenbeck, 1985). Sanz y cols. (1988) han demostrado que la estructura mínima que se requiere para la activación catalítica *in vitro* de la forma E es la de una alquilamina terciaria.

El procedimiento utilizado para llevar a cabo el proceso de *conversión* condiciona la  $M_r$  de la forma C resultante. Cuando éste se realiza con paredes celulares la  $M_r$  de la amidasa convertida es aproximadamente de 500.000, que es la  $M_r$  que presenta la enzima cuando se extrae de un cultivo de neumococo que crece en medio que contiene colina. Sin embargo cuando la *conversión* se realiza con colina libre, la  $M_r$  de la forma C es de 36.000, coincidiendo con la de la forma E. Esta diferencia en la  $M_r$  de la amidasa *convertida* se debe a que en el primer caso la enzima va asociada a fragmentos de pared (Briese y Hakenbeck, 1985).

La *conversión* de la forma E con colina libre origina una forma C estable que sólo después de una diálisis continuada (durante más de 20 días) se revierte (*desconversión*) a la forma E. Dado que el período de tiempo para la *desconversión* es superior al esperado para una mera diálisis de la colina, se ha sugerido la existencia de un complejo amidasa-colina que se constituiría en el paso limitante para el proceso de *desconversión* (Briese y Hakenbeck, 1985). Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados que indican la existencia de un sitio de unión a la colina en la molécula de la amidasa LYTA (apartado 4.6.1.1.).

#### 4.6.1.1.2. Inhibidores de la actividad catalítica de la amidasa LYTA.

La colina libre a concentraciones superiores al 0,1% inhibe de forma no competitiva la actividad enzimática de la amidasa LYTA debido a que interfiere con el proceso de adsorción de la enzima a los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared celular (Briese y Hakenbeck, 1985). Otros inhibidores de la actividad amidásica son el LTA que contiene colina, la fosforilcolina, y los análogos de la colina como el DEAE, es decir, todos aquellos compuestos que causan la *conversión* de la enzima (apartado 4.6.1.1.1.).

Las consecuencias fisiológicas cuando se tratan los cultivos de neumococo con estos inhibidores de la autolisina LYTA son similares a las descritas para las células-EA (apartado 4.3.2.3.) (Höltje y Tomasz, 1975 a; Giudicelli y Tomasz, 1984 a, b; Briese y Hakenbeck, 1985; Sanz y cols., 1988).

Debido al efecto inhibitor de la colina sobre la actividad de la amidasa LYTA, cuando la *conversión* se realiza *in vitro* con 2% de colina este aminoalcohol debe ser eliminado, por dilución o diálisis, antes de ensayar la actividad enzimática. Con ello se evita que la colina libre compita con la colina de los ácidos teicoicos de la pared e impida la unión de la enzima a su sustrato (Briese y Hakenbeck, 1985).

#### 4.6.1.1.3. Efecto del LTA en la regulación celular de la amidasa LYTA.

Briese y Hakenbeck (1985) determinaron que la forma E de la amidasa LYTA (que representaba un 40% de la amidasa celular) estaba presente sólo en el citoplasma celular de *S. pneumoniae*, mientras que el resto de la enzima se encontraba asociada a la membrana plasmática como forma C. La enzima asociada a la membrana podía ser liberada completamente con colina, lo que sugería una interacción específica de la proteína con los residuos de colina que forman parte del LTA de la membrana.

Se ha postulado que en la regulación *in vivo* de la amidasa LYTA la interacción específica de la enzima con los residuos de colina del LTA de la membrana citoplásmica jugará un papel muy importante. El LTA actuaría a modo de barrera topológica inhibiendo la actividad amidásica durante la mayor parte del ciclo celular (Briese y Hakenbeck, 1985). Incluso cuando se añade autolisina LYTA exógenamente a una cepa de neumococo que carece de esta enzima (curación fenotípica), ésta crece normalmente y sólo al final de la fase estacionaria sufre la autólisis (Tomasz y Waks, 1975), postulándose que el control al que se ve sometido la autolisina en estas condiciones es debido también al LTA de la membrana (Tomasz y Waks, 1975).

La principal causa de la inhibición de la actividad amidásica LYTA por el LTA *in vivo* son los residuos de colina presentes en la molécula de polímero. Sin embargo, en experimentos realizados *in vitro* la principal causa de esta inhibición es el atrapamiento micelar de la enzima por las moléculas de LTA en solución (Briese y Hakenbeck, 1985). Por analogía con la *conversión in vitro* (apartado 4.6.1.1.1.), la *conversión in vivo* podría ocurrir después de la translocación de la forma E de la amidasa LYTA a través de la membrana plasmática mediante interacción con los residuos de colina del LTA (Briese y Hakenbeck, 1985). Así, se ha observado que el LTA que contiene colina es un poderoso inhibidor de la enzima (Höltje y Tomasz, 1975 a) al mismo tiempo que la convierte a la forma C (Briese y Hakenbeck, 1985); sin embargo, su análogo que contiene etanolamina no inhibe la actividad amidásica (Horne y Tomasz, 1985 b).

Un mecanismo adicional potencialmente regulador de la actividad amidásica implica a otra enzima presente en *S. pneumoniae*, la fosforilcolinesterasa. Esta enzima es capaz de eliminar entre un 15% y un 20% de los residuos de fosforilcolina de los ácidos teicoicos (Höltje y Tomasz, 1974). Como la actividad catalítica de la amidasa LYTA posee un requerimiento absoluto por los residuos de colina del sustrato, la eliminación de una fracción de estos residuos por la esterasa es posible que origine en la pared celular zonas de resistencia a la autolisina. De igual forma, la inhibición de la autolisina LYTA por el LTA podría verse afectada por la liberación de los residuos de fosforilcolina del polímero.

#### 4.6.1.1.4. Efecto del DOC en neumococo.

Como ya se ha comentado en el apartado 4.2., una de las pruebas de diagnóstico empleadas habitualmente en clínica para la identificación de neumococos, es la sensibilidad de las células de esta especie a la lisis en presencia del detergente desoxicolato sódico (DOC) (Neufeld, 1900). Esta característica es específica de neumococo y se debe a la actividad de la amidasa LYTA, de tal forma que las cepas mutantes deficientes en esta autolisina no se lisan en presencia del detergente (Mosser y Tomasz, 1970; Tomasz y cols., 1975). Basándose en esta propiedad, se ha desarrollado un método de análisis que permite diferenciar de forma rápida y sencilla una cepa de neumococo con fenotipo  $Lyt^+$  (presencia de autolisina y lisis con DOC positiva) de otra que presente fenotipo  $Lyt^-$  (ausencia de autolisina y lisis con DOC negativa) (García y cols., 1985 b).

Hasta la fecha, las cepas de neumococo caracterizadas como  $DOC^-$  (García y cols., 1986 b; López y cols., 1986; Sánchez-Puelles y cols., 1986 a), todas ellas obtenidas en el laboratorio, habían presentado unos niveles de actividad hidrolítica de pared nulos o casi nulos, así como ausencia de autólisis al final de la fase estacionaria de crecimiento. Recientemente y mediante el empleo de una sonda de DNA específica de neumococo se han aislado varias cepas atípicas de

origen clínico que son resistentes a la lisis por desoxicolato (Fenoll y cols., 1990). Una de estas cepas de neumococo DOC<sup>-</sup> será objeto de estudio en esta Tesis.

#### 4.6.1.1.5. Clonación del gen que codifica para la amidasa LYTA, gen *lytA*.

El gen *lytA* se aisló a partir de una genoteca *BclI* de neumococo construida sobre pBR322 en *E. coli*. Los plásmidos de esta genoteca se utilizaron para complementar por transformación el fenotipo *Lyt*<sup>-</sup> de la cepa mutante M12, una cepa de neumococo que posee la mutación *lyt-4*. Así se aisló e identificó el plásmido pGL30 que contiene un fragmento *BclI* de 7,5 kb capaz de originar mediante recombinación un fenotipo *Lyt*<sup>+</sup> (García y cols., 1985 a). Los estudios de secuenciación demostraron que la región codificante del gen *lytA* está contenida en un fragmento *HindIII* de 1,2 kb del plásmido pGL80 (García y cols., 1986 c). La amidasa LYTA de neumococo ha sido la primera autolisina bacteriana clonada y secuenciada, aunque en la actualidad se conocen las secuencias de otras cuatro enzimas líticas bacterianas, la de una enzima lítica de *Bacillus sp.* (Potvin y cols., 1988); la de una lisozima (enzima-B) de *B. subtilis* YT-25 (Kamei y cols., 1988); la de la muramidasa M1 de *S. globisporus* (Lichenstein y cols., 1990); y la de la lisozima de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Christian Croux, comunicación personal). Las cepas de *E. coli* que contienen el plásmido recombinante pGL80 expresan una proteína que ha sido caracterizada bioquímica e inmunológicamente como la forma E de la amidasa LYTA de neumococo, el producto primario de transcripción del gen *lytA*. Este resultado constituyó el primer ejemplo de expresión de un gen de neumococo en *E. coli*, y permitió el estudio de la principal autolisina de *S. pneumoniae* en un sistema heterólogo en el que la enzima lítica no parecía ejercer ningún efecto letal, aún cuando su expresión era 300-500 veces superior a la detectada en el sistema homólogo, dada la ausencia de colina en la pared celular de *E. coli* (García y cols., 1985 a; García y cols., 1986 c).

El análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento *HindIII* de 1,2 kb (García y cols., 1986 c) reveló la existencia de un único marco de lectura abierto, con una secuencia consenso de unión al ribosoma y una serie de regiones que presuntamente podrían corresponder al promotor del gen *lytA*. La fase de lectura abierta codifica para una proteína de 318 aminoácidos con una  $M_r$  de 36.532, lo que coincide con las estimaciones realizadas previamente (Höltje y Tomasz, 1976; Briese y Hakenbeck, 1985).

Mediante técnicas de ingeniería genética se han realizado delecciones de los últimos aminoácidos de la proteína, y se ha observado que las formas enzimáticas resultantes ya no necesitan el proceso de *conversión* que caracteriza a la forma E de la amidasa LYTA, proceso que va ligado a la presencia de los últimos 11 aminoácidos de la enzima (Sánchez-Puelles y cols.,

1987). Sin embargo, las formas truncadas en el extremo C-terminal de la molécula presentan menor actividad específica que la enzima parental, como también se ha descrito para la enzima lítica de pared de *Bacillus* sp. (Potvin y cols., 1988).

#### 4.6.1.1.6. Caracterización de mutantes en el gen *lytA*.

El aislamiento del gen *lytA* permitió la caracterización de distintos mutantes de neumococo deficientes en autolisina obtenidos por mutación espontánea o por tratamiento con agentes mutagénicos. Lacks (1970) aisló un mutante de neumococo, *cwl-1*, defectivo en más del 99% de la actividad autolítica de la cepa salvaje R6. La estirpe R6ly4-4 (Fischer y Tomasz, 1984) se obtuvo por transformación de la cepa R6 con el DNA de *cwl-1*. La mutación presente en la cepa R6ly4-4, designada como *lyt-4*, fue complementada mediante clonación del gen tipo salvaje *lytA*, comprobándose su localización en la región estructural del gen que codifica para la amidasa LYTA. Se ha secuenciado esta mutación y se ha visto que corresponde a una transición CG a TA, lo que origina la sustitución de un residuo de glicina por otro de ácido glutámico en la secuencia de aminoácidos de la amidasa, alterando el perfil hidropático de la proteína (García y cols., 1986 b).

Otra mutación espontánea en el gen *lytA*, denominada *lyt-32*, corresponde a una deleción de un par GC que causa la aparición de dos codones de terminación consecutivos en el extremo 5' de la región estructural del gen. Análisis enzimáticos, inmunológicos y experimentos con maxicélulas demostraron que el gen mutante no expresa la amidasa LYTA (López y cols., 1986).

Sánchez-Puelles y cols. (1986 a) han aislado y caracterizado el primer mutante de *S. pneumoniae* (denominado M31) que muestra una deleción en su genoma de unas 5,5 kb y que engloba por completo al gen *lytA*.

#### 4.6.1.1.7. Funciones de la autolisina LYTA en neumococo.

El aislamiento de una cepa de neumococo carente del gen *lytA*, cepa M31 (apartado 4.6.1.1.6.), permitió el estudio del papel biológico que desempeña la principal autolisina de esta bacteria. La cepa M31 permitió establecer de forma inequívoca que la amidasa LYTA no era imprescindible para adquirir el estado de competencia que posibilita la transformación genética de *S. pneumoniae*, así como tampoco para la multiplicación de neumococo en los medios de cultivo (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a).

*S. pneumoniae* M31 crece a 37 °C formando pequeñas cadenas de 6 a 8 células, no se autolisa al final de la fase estacionaria de crecimiento, no se lisa en presencia de detergentes, y

exhibe una respuesta tolerante frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a). Cuando se transformó el mutante M31 con el plásmido pRG2, un plásmido derivado de pLS1 (Lacks y cols., 1986 a) capaz de replicarse autónomamente en *S. pneumoniae* y que expresa el gen *lytA*, se observó que la cepa resultante recuperaba el fenotipo  $Lyt^+$  y que las pequeñas cadenas desaparecerían dando lugar a las formas diploideas normales (Ronda y cols., 1987). Estos experimentos demostraban que la amidasa LYTA de neumococo no sólo es responsable de la autólisis de los cultivos al final de la fase estacionaria de crecimiento y de la lisis ocasionada por los detergentes y antibióticos  $\beta$ -lactámicos, sino que también está implicada en la separación de las células hijas al final de cada ciclo de división celular. Se ha postulado que la separación de las células hijas sería un proceso genéticamente programado que ocasionaría una parada de la maquinaria de biosíntesis de pared al final de cada ciclo de división celular, lo que, a su vez, liberaría el complejo autolisina-LTA en áreas muy localizadas de la superficie de la célula. De esta forma la amidasa, libre de su inhibidor natural, podría actuar localmente en dichas áreas con la consiguiente separación de las células hijas. Una vez concluida ésta, se restauraría la biosíntesis normal de pared y la amidasa LYTA se sometería de nuevo al control del LTA. Es decir, sería un mecanismo de disparo (*triggering*) de la autolisina similar al ocasionado por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pero con la diferencia de que éstos lo provocan a escala, tiempo y topografía erróneas (Tomasz, 1983). Sin embargo, es muy probable que en la separación de las células hijas también participe la segunda autolisina de neumococo (la glucosaminidasa) (apartado 4.6.1.2.), ya que la cepa M31 forma solamente pequeñas cadenas celulares y no las largas cadenas de cientos de unidades que se observan cuando la cepa se cultiva en medio Cden-EA, medio en el que la pared celular sintetizada no es susceptible a la degradación por la glucosaminidasa (Sánchez-Puelles y cols., 1986 b).

Aunque la separación de las células hijas no parece ser un proceso de vital importancia para los cultivos de *S. pneumoniae* que crecen en condiciones de laboratorio, sí puede serlo cuando los cultivos crecen en su ambiente natural. La formación de cadenas disminuye la capacidad de diseminación del microorganismo y produce un empobrecimiento más rápido del medio de cultivo.

El hecho de que la práctica totalidad de los aislados clínicos de neumococo posean actividad autolítica ha hecho sospechar que esta enzima, a pesar de su potencial poder destructor, debe desempeñar algún papel fundamental para la supervivencia y/o virulencia de *S. pneumoniae*. La presencia del gen *lytA* de forma general en los aislados clínicos de neumococo ha permitido utilizar un fragmento de DNA que codifica para los 148 primeros aminoácidos de la amidasa LYTA como sonda para la identificación de esta especie (Fenoll y cols., 1990).

Recientemente se ha podido comprobar que mutantes en el gen *lytA* construidos en neumococos capsulados poseen una virulencia significativamente menor que la de la cepa parental capsulada, y que la reintroducción del gen salvaje *lytA* en los mutantes restituye su capacidad virulenta a los niveles normales. Además, la inmunización previa con la amidasa LYTA purificada permite una mayor supervivencia en animales infectados por *S. pneumoniae* (Berry y cols., 1989). Estos resultados indican que las moléculas de amidasa poseen una disposición periférica en la célula accesible a los anticuerpos a pesar de la presencia del polisacárido capsular, y sugieren la posibilidad de que la amidasa de neumococo pueda ser utilizada como vacuna eficaz contra las infecciones causadas por *S. pneumoniae* (Berry y cols., 1989).

Es posible que uno de los mecanismos de virulencia de la principal autolisina de neumococo resida en su capacidad para hidrolizar el peptidoglicano, con la consiguiente liberación de productos solubles capaces de activar la ruta alternativa del sistema del complemento o la producción de interleuquina-1, factores de conocida acción inflamatoria (Reisenfeld y cols., 1989). Este mecanismo parece ser la base de la producción de púrpuras hemorrágicas (Chetty y Kreger, 1981). La autólisis de la célula podría liberar otros factores de virulencia de localización intracelular (neumolisina y neuraminidasa). No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la inactivación de la amidasa introduzca cambios fundamentales en la arquitectura de la superficie celular capaces de restar capacidad invasiva al microorganismo (Berry y cols., 1989).

#### 4.6.1.2. Características de la glucosaminidasa.

La ausencia total de amidasa LYTA en el mutante de neumococo M31 permitió detectar una nueva autolisina (Sánchez-Puelles y cols., 1986 b) con actividad glucosaminidasa (García y cols., 1989), que se encontraba enmascarada en las cepas salvajes por la alta actividad amidásica. Estudios previos ya habían sugerido la existencia de una glicosidasa en neumococo (Lee y Liu, 1977). Esta nueva enzima, que se ha purificado a homogeneidad electroforética, presenta una  $M_r$  de 64.000, no es reconocida por el antisuero frente a la amidasa LYTA, requiere la presencia de colina en los ácidos teicoicos de pared para ejercer su actividad catalítica, y ésta se inhibe con el LTA y la colina (García y cols., 1989). Una característica destacable de la glucosaminidasa de neumococo es que su actividad lítica es tres veces superior cuando se ensaya *in vitro* a 30 °C que cuando el ensayo de actividad se hace a 37 °C.

La glucosaminidasa de neumococo se comporta como una autolisina *in vivo* cuando la cepa M31 se cultiva a 30 °C, ya que a esta temperatura hay autólisis al final de la fase estacionaria de crecimiento (Sánchez-Puelles y cols., 1986 b), el encadenamiento celular

característico de mutantes  $Lyt^-$  desaparece (López y cols., 1990 a) y la respuesta tolerante frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que exhiben los mutantes deficientes en amidasa LYTA se revierte (López y cols., 1990 a). Estas mismas consecuencias fisiológicas aparecen cuando la cepa M31 se incuba a 37 °C y se somete a curación fenotípica con la glucosaminidasa empleando unos niveles de enzima mucho mayores de los que normalmente se detectan en esta cepa (García y cols., 1989).

Aunque la glucosaminidasa de *S. pneumoniae* no provoque autólisis de los cultivos a 37 °C, no se puede descartar que a esta temperatura la enzima ejerza una actividad lítica importante para la célula que pudiese explicar su posible contribución al proceso de separación de las células hijas al final del ciclo de división celular (apartado 4.6.1.1.7.). Se ha sugerido que las autolisinas minoritarias en la célula realizan importantes funciones en el remodelado de la pared celular durante el crecimiento (Kawamura y Shockman, 1983), así como en el desarrollo del estado de competencia para la transformación genética (Lacks y Neuberger, 1975). La respuesta definitiva a estos interrogantes pasa por la obtención de mutantes defectivos en esta segunda autolisina.

#### 4.6.2. Enzimas líticas de pared de fagos que infectan a *S. pneumoniae*.

La primera enzima de origen fágico capaz de hidrolizar la pared celular de neumococo que se aisló y purificó a homogeneidad electroforética fue la codificada por el genoma del bacteriófago Dp-1, y recibió el nombre de PAL (*Phage-Associated-Lysin*) (García y cols., 1983 a). La enzima presenta una  $M_r$  de 31.000 y se ha caracterizado bioquímicamente como una *N*-acetil-muramil-L-alanil amidasa (García y cols., 1984). Esta amidasa, sintetizada durante la infección de *S. pneumoniae* por Dp-1, requiere, tanto *in vitro* como *in vivo*, la presencia de colina para degradar las paredes celulares de neumococo y su actividad catalítica se inhibe por el LTA, al igual que ocurre con la amidasa LYTA del huésped (García y cols., 1983 a, b). Sin embargo otras propiedades físico-químicas la diferencian de la principal autolisina de neumococo, ya que es estimulada por agentes reductores como el DTT o el  $\beta$ -mercaptoetanol en ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* (García y cols., 1983 a, c), es inhibida parcialmente por cardiolipina, y no da reacciones cruzadas con la forma E (aunque sí con la forma C) de la amidasa LYTA en ensayos inmunológicos (García y cols., 1984). Mediante el empleo de un suero anti-PAL se ha demostrado que esta enzima interviene activamente en la liberación de la descendencia fágica en mutantes de neumococo que carecen de amidasa LYTA y que, por lo tanto, las dos amidasas líticas participan en la liberación de la progenie fágica (apartado 2.2.5) (García y cols., 1983 b, c).

La segunda enzima fágica con actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que se caracterizó en detalle fue la del fago Cp-1 de neumococo. El gen que codifica para esta

enzima lítica, gen *cpl1*, se aisló a partir de una genoteca del fago construida sobre pACYC184 en *E. coli*. El plásmido que contenía el gen *cpl1*, pCIP2, se seleccionó determinando la actividad lítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos de las cepas recombinantes (García y cols., 1987 a). Esto fue posible gracias a que, como sucedió con la amidasa LYTA, el gen de la enzima lítica fágica podía expresarse en *E. coli*. La caracterización bioquímica de la enzima lítica del fago Cp-1, CPL1, indicó que se trataba de una muramidasa (lisozima) (Figura 3 B) con una  $M_r$  de 39.000 (339 aminoácidos). Esta muramidasa no requiere el proceso de *conversión* para alcanzar su máxima actividad catalítica, aunque comparte con la amidasa LYTA la absoluta dependencia por la presencia de residuos de colina en los ácidos teicoicos de pared. La actividad muramidásica de la enzima CPL1 se inhibe no competitivamente por el LTA y la colina a concentraciones superiores al 0,01% (García y cols., 1987 a). El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *cpl1* permitió deducir la secuencia de aminoácidos de la lisozima CPL1 y puso de manifiesto la homología existente entre parte de la región estructural de este gen y la correspondiente región estructural del gen *lytA* de *S. pneumoniae* (García y cols., 1988).

Utilizando como sonda el gen *cpl1*, se determinó la localización exacta en los genomas de los fagos Cp-1, Cp-7 y Cp-9 (todos pertenecientes a la familia Cp de fagos líticos de *S. pneumoniae*) de los respectivos genes líticos de pared. Esto facilitó la clonación y posterior secuenciación de los genes *cpl7* y *cpl9* (García y cols., 1990). Su expresión en *E. coli* permitió determinar que estos genes también codifican para enzimas líticas de pared con actividad muramidásica (lisozima). La lisozima CPL9 tiene una  $M_r$  de 39.107 (339 aminoácidos) y tan sólo se diferencia de la lisozima CPL1 en 10 aminoácidos; al igual que ésta y que la amidasa LYTA, muestra un requerimiento absoluto por la presencia de colina en la pared celular (García y cols., 1990). La lisozima CPL7 tiene una  $M_r$  de 38.461 (342 aminoácidos), su actividad catalítica no depende de la presencia de residuos de colina en los ácidos teicoicos de pared y no se inhibe específicamente por el LTA o la colina (García y cols., 1990). El hecho de que la lisozima CPL7 sea capaz de hidrolizar indistintamente paredes de neumococo que contienen colina o etanolamina permite la liberación de la dependencia fágica en células-EA de *S. pneumoniae* infectadas con el fago Cp-7, sin que ello requiera la cooperación de las autolisinas bacterianas (García y cols., 1990).

La metodología empleada para la clonación de los genes de las enzimas líticas de los fagos Cp se utilizó también para clonar el gen *hbl* que codifica para la enzima lítica de pared del fago HB-3, un fago atemperado de *S. pneumoniae* (Romero y cols., 1990 a). La expresión del gen *hbl* en *E. coli* demostró que codificaba para una enzima con actividad amidásica, amidasa HBL, siendo la primera amidasa que se ha descrito para fagos que infectan a bacterias Gram-positivas. La amidasa HBL presenta una  $M_r$  de 36.000 y sus propiedades inmunológicas y bioquímicas son similares a las

descritas para la amidasa LYTA (Romero y cols., 1990 a). La secuenciación del gen *hbl* reveló la secuencia de aminoácidos de la amidasa HBL y confirmó la homología con el gen *lytA* (Romero y cols., 1990 b).

#### 4.6.3. Comparación de las enzimas líticas de pared de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos.

La característica común a todas las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo es la dependencia que presentan para su actividad de la presencia de colina en los ácidos teicoicos de la pared. Únicamente la lisozima CPL7 es capaz de hidrolizar, indistintamente, paredes de neumococo que contienen colina o etanolamina en su composición (García y cols., 1990).

Todas estas enzimas son capaces de inducir la curación fenotípica (apartado 4.6.1.1.3.) en mutantes de *S. pneumoniae* deficientes en amidasa LYTA ( $Lyt^-$ ) cuando se añaden al cultivo de forma exógena. El resultado de la curación es la autólisis de los cultivos en la fase estacionaria de crecimiento, la lisis por detergentes y la pérdida de la tolerancia que manifiestan los mutantes  $Lyt^-$  frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

La afinidad que presentan las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos, con la excepción de la lisozima CPL7, por la colina y por su análogo estructural, el dietilaminoetanol (DEAE), hace posible la purificación de las mismas a homogeneidad electroforética y en un sólo paso mediante su retención en columnas de Sepharosa-colina (Briese y Hakenbeck, 1985) o DEAE-celulosa (Sanz y cols., 1988). La disponibilidad de este método rápido de purificación, unido al hecho de que la mayoría de estas proteínas se han hiperproducido en *E. coli* mediante el empleo del promotor inducible *lpp-lac* (García y cols., 1987 b; Sanz y García, 1990), ha facilitado la obtención de grandes cantidades de enzima, lo que ha permitido realizar la caracterización estructural de las mismas.

Tanto la amidasa LYTA como la amidasa HBL necesitan el proceso de conversión para alcanzar su actividad enzimática máxima (apartados 4.6.1.1. y 4.6.2.). Este proceso parece estar relacionado con un cambio conformacional inducido por los residuos de colina en la estructura inicial de la proteína posibilitando la interacción enzima-sustrato (Sánchez-Puelles y cols., 1990). La interacción de la lisozima CPL1 con la colina provoca también cambios conformacionales en la proteína que se han puesto de manifiesto mediante técnicas de dicroísmo circular (Sanz y García, 1990).

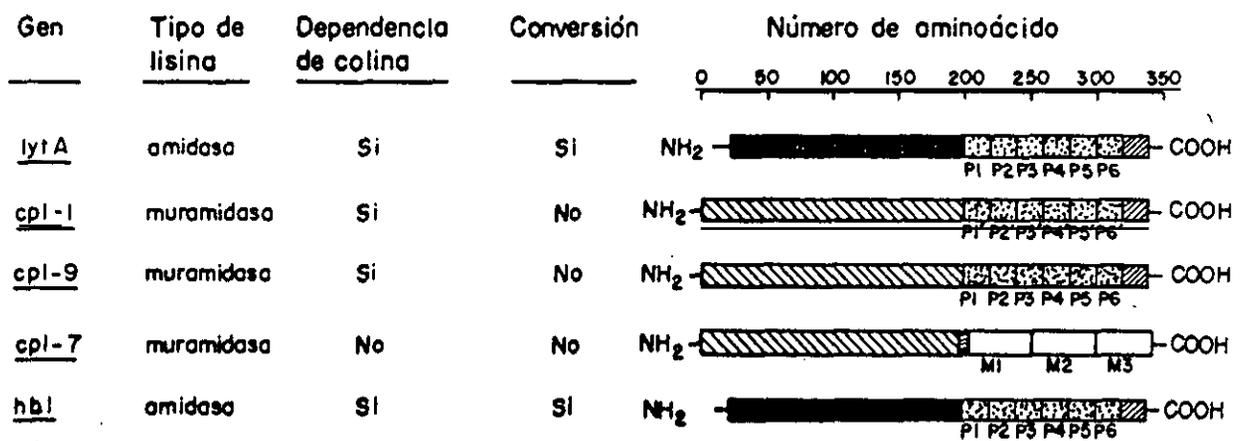
En todas estas enzimas, a excepción de la lisozima CPL7, la colina ejerce una inhibición no competitiva sobre su actividad catalítica. El bloqueo ocasionado por la colina libre sobre los centros de la molécula destinados a la unión de la colina de los ácidos teicoicos no se produce con la misma eficiencia en todas las enzimas, y así se ha observado que la amidasa LYTA presenta una

constante de inhibición por colina mayor que la determinada para la lisozima CPL1 (Briese y Hakenbeck, 1985; García y cols., 1987 a).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las enzimas líticas de pared de neumococo y de sus bacteriófagos ha puesto de manifiesto una serie de peculiaridades estructurales que hacen de estas enzimas un modelo muy interesante para establecer relaciones evolutivas entre ellas, y constituye un nuevo ejemplo a favor de la teoría modular de la evolución de las proteínas (García y cols., 1988; García y cols., 1990). Como se puede observar en la Figura 7, todas las enzimas presentan su molécula estructurada en dos dominios o módulos. El dominio N-terminal sería el responsable de la actividad catalítica de estas enzimas ya que aquéllas que poseen la misma actividad enzimática presentan dominios N-terminales semejantes. Así, el dominio N-terminal de la amidasa LYTA de *S. pneumoniae* es semejante al de la amidasa HBL del fago HB-3, y el dominio N-terminal de la lisozima fágica CPL1 es similar a los dominios N-terminales de las lisozimas fágicas CPL7 y CPL9. Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de los extremos N-terminales de las lisozimas CPL1, CPL7 y CPL9 con la secuencia de las lisozimas del hongo *Chalara* (Fouche and Hash, 1978), de *S. globisporus* (Lichenstein y cols., 1990) y de *C. acetobutylicum* (Christian Croux, comunicación personal), se observa una gran similitud. Además, dos aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de la lisozima de *Chalara*, el ácido aspártico de la posición 10 y el glutámico de la posición 37, están también presentes y localizados a la misma distancia en la estructura primaria de las restantes lisozimas.

Por otra parte, todos los dominios C-terminales de las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos, con la excepción del correspondiente a la lisozima CPL7, presentan una notable similitud. Así, de los 142 residuos del dominio C-terminal de la amidasa LYTA, 73 son idénticos a los del dominio C-terminal de la lisozima CPL1, y de las 69 sustituciones 55 son cambios conservativos (García y cols., 1988). Este hecho está de acuerdo con la observación de que la actividad de estas enzimas (con la excepción de la lisozima CPL7) es dependiente de la presencia de colina en la pared celular, y aporta una nueva evidencia sobre el papel fundamental que debe desempeñar el dominio C-terminal en el reconocimiento de dicha colina. Recientemente se ha llevado a cabo la clonación e hiperproducción en *E. coli* de los dominios C-terminales de la amidasa LYTA y de la lisozima CPL1, lo que ha puesto de manifiesto su gran afinidad por la colina y la ausencia de actividad hidrolítica sobre la pared celular de neumococo (Sánchez-Puelles y cols., 1990).

Todos los dominios C-terminales están constituidos por motivos de secuencias repetidas que se pueden considerar como unidades modulares surgidas por duplicación génica de una secuencia original (García y cols., 1988). En el caso de las enzimas LYTA, HBL, CPL1 y CPL9 existen seis motivos de aproximadamente 20 aminoácidos de longitud cada uno que presentan una secuencia



**Figura 7.** Comparación de las propiedades más relevantes y representación esquemática de las enzimas líticas de pared de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos. Las zonas de igual sombreado indican un alto grado de similitud. P1 a P6, P1' a P6' y M1 a M3 representan las secuencias repetidas (motivos) de los dominios C-terminales de las enzimas. Tomado de López y García (1990).

consenso GWVKIGDGWYYFDNSGAMATN (García y cols., 1988) (Figura 7). Sin embargo, el módulo C-terminal de la lisozima CPL7 está constituido por 2,8 motivos idénticos de 40 aminoácidos cada uno (García y cols., 1990) (Figura 7), lo que revelaría, de acuerdo con Doolittle (1986), que para este caso concreto el proceso de duplicación génica habría tenido lugar recientemente. La presencia de motivos internos repetidos en la secuencia de muchas proteínas ha sugerido connotaciones de relación estructura-función, pero sólo en algunos casos se ha podido demostrar esta hipótesis experimentalmente, como ocurre por ejemplo con las proteínas que se unen al DNA (Klug y Rhodes, 1987). La razón por la cual los dominios C-terminales se han originado por repetición de motivos se desconoce por el momento, pero se puede especular con la posibilidad de que estas repeticiones estén en relación con el hecho de que las enzimas están actuando sobre un sustrato polimérico constituido también por estructuras químicas repetidas (Saedi y cols., 1987). En la actualidad se conocen otras proteínas que también actúan sobre sustratos poliméricos y que contienen repeticiones en las regiones implicadas en el reconocimiento del sustrato, entre éstas destacan : la lisozima del fago  $\Phi 29$  que infecta a *B. subtilis* (Garvey y cols., 1986), la endoglucanasa E de *C. thermocellum* (Hall y cols., 1988), una celulasa (Avicelasa I) de *C. stercorarium* (Jauris y cols., 1990), las glucosiltransferasas de *S. mutans* (Shiroza y cols., 1987; Ueda y cols., 1987) y de *S. downei* (Ferretti y cols., 1987; Gilmore y cols., 1990), y una proteína de unión a glucanos de *S. mutans* (Banas y cols., 1990). También se han descrito toxinas de *C. difficile* capaces de reconocer pequeñas estructuras poliméricas y que presentan módulos repetidos en su molécula (Dove y cols., 1990; Barroso y cols., 1990).

## 5. OBJETIVOS.

De los datos presentados en los anteriores apartados se deduce que, aunque la amidasa LYTA de neumococo ha sido objeto de numerosos estudios bioquímicos, fisiológicos y genéticos, todavía hay muchos interrogantes que necesitan una respuesta. En primer lugar, todavía no se conoce cuál es la unidad de transcripción del gen *lytA* y si éste está sometido a algún tipo de regulación. Aunque se ha propuesto una regulación celular post-traducciona para la amidasa LYTA basada en el efecto inhibitor de los residuos de colina del LTA de la membrana citoplásmica, los estudios que se han realizado para determinar la localización subcelular de la proteína (Lacks y Neuberger, 1975; Briese y Hakenbeck, 1985) no permiten descartar artefactos de redistribución de la enzima durante su estudio.

La peculiar estructura deducida del análisis de las secuencias de la amidasa LYTA y de las enzimas líticas de pared de los fagos que infectan a neumococo, se ha sugerido como un ejemplo de la teoría modular de la evolución de las proteínas (García y cols., 1988; García y cols., 1990), no obstante, falta la demostración experimental de la estructura modular de estas enzimas.

La existencia de un número, cada vez mayor, de cepas de neumococo de origen clínico con características atípicas y cuyo DNA hibrida con el gen *lytA* de la cepa tipo R6 (Fenoll y cols., 1990), exige un estudio a nivel molecular de la(s) autolisina(s) de dichas cepas con el objetivo de comprobar si su comportamiento atípico está causado por estas enzimas.

Por todo ello, los objetivos de esta Tesis son los siguientes :

### 1) **Caracterizar la unidad de transcripción del gen *lytA*.**

- i) Identificación del promotor del gen *lytA*.
- ii) Identificación del terminador del gen *lytA*.
- iii) Aplicación de la unidad de transcripción del gen *lytA* al diseño de nuevos vectores plasmídicos para el análisis de la transcripción en *S. pneumoniae* y en otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

### 2) **Estudiar la regulación celular de la amidasa LYTA.**

- i) Estudiar la expresión del gen *lytA* durante el crecimiento celular de neumococo.
- ii) Estudiar la expresión de un gen *lytA* truncado y de la enzima truncada codificada por éste (cepa de neumococo EM3).
- iii) Estudiar la localización subcelular de la amidasa LYTA en su sistema homólogo y en *E. coli*.

**3) Estudiar la relación estructura-función en la amidasa LYTA.**

- i) Construcción de enzimas quiméricas entre la amidasa LYTA y las lisozimas de los fagos que infectan a *S. pneumoniae*, analizando las implicaciones evolutivas de estos estudios.
- ii) Clonación y expresión en *E. coli* del dominio N-terminal de la enzima LYTA.

**4) Caracterizar el sistema autolítico de *S. pneumoniae* 101/87, una cepa atípica (DOC) de origen clínico.**

- i) Clonación y secuenciación del gen que codifica para la enzima autolítica de esta cepa.
- ii) Clonación y expresión del gen que codifica para la enzima autolítica de la cepa 101/87 en *S. pneumoniae* M31.

**II. MATERIALES Y METODOS**

## **I. ESTIRPES BACTERIANAS, BACTERIOFAGOS Y PLASMIDOS.**

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron las estirpes bacterianas, los bacteriófagos y los plásmidos que se detallan en la Tabla I.

### **2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.**

Las cepas se conservaron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio de cultivo al que se añadió glicerol al 10% (v/v). En el momento de sembrarlas se descongelaron, incubándose en los medios correspondientes a  $37^{\circ}\text{C}$ , a menos que se indique lo contrario, con agitación para las cepas de *E. coli* y sin agitación para las cepas de *S. pneumoniae* y *S. oralis*.

#### **2.1. *S. pneumoniae* y *S. oralis*.**

Para el cultivo de *S. pneumoniae* y *S. oralis* se utilizó el medio C+Y : medio CpH8 (Tomasz y Hotchkiss, 1964) suplementando con extracto de levadura 0.08% (p/v) (Difco). Para cultivos en medio sólido se añadió al medio C+Y, agar (1% concentración final) y catalasa (250 unidades/ml) (Boehringer Mannheim).

Las cepas de *S. pneumoniae* que contienen en sus ácidos teicoicos residuos de etanolamina en lugar de residuos de colina, se obtuvieron prolongando el cultivo de la cepa correspondiente durante más de 10 generaciones en un medio definido (Cden) utilizando el aminoalcohol etanolamina en lugar de colina (medio Cden-EA) (Tomasz, 1964).

Las cepas de neumococo transformantes que contienen el plásmido pLSI o derivados de éste, se seleccionaron mediante su cultivo en medio C+Y en presencia de tetraciclina a una concentración de  $0,8\ \mu\text{g/ml}$  (medio líquido) o  $1\ \mu\text{g/ml}$  (medio sólido). Una vez seleccionadas las cepas, los posteriores cultivos se realizaron en medio C+Y sin tetraciclina ya que el plásmido pLSI y sus derivados son muy estables aún en ausencia de presión selectiva. Las cepas de *S. oralis* que contienen el plásmido pLSEI o derivados de éste se seleccionaron mediante su cultivo en medio C+Y en presencia de eritromicina ( $10\ \mu\text{g/ml}$ ).

El crecimiento de *S. pneumoniae* y *S. oralis* se siguió por nefelometría con el empleo de un Nefelómetro Coleman modelo 9, calibrado para conteo de viables en neumococo [ $N = 7,5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml].

#### **2.2. *E. coli*.**

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio LB descrito por Maniatis y cols. (1982), añadiendo agar al 1% (p/v) para cultivos en medio sólido. Las cepas de *E. coli* RB791 y DH1

**TABLA I.** Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.

Cepa	Plásmido	Genotipo o Fenotipo relevante	Referencia
<u><i>E. coli</i></u>			
HB101	---	<i>hsd</i> ( $r^-$ , $m^-$ ) <i>recA13</i>	Boyer y Rouland-Dussoix (1969)
HB101	pBR322	$Ap^R$ , $Tc^R$	Bolívar y cols. (1977)
HB101	pBR325	$Ap^R$ , $Cm^R$ , $Tc^R$	Bolívar (1978)
HB101	pGL80	<i>lytA</i> , $Ap^R$ , $Cm^R$	García y cols. (1986c)
HB101	pGL81	<i>lytA</i> , $Ap^R$ , $Cm^R$ , $Tc^R$	García y cols. (1987b)
HB101	pGL65	<i>lytA</i> , $Ap^R$	Sánchez-Puelles y cols. (1986a)
HB101	pGL30	<i>lytA</i> , $Ap^R$	García y cols. (1985a)
HB101	pGL83	<i>lytA</i> , $Ap^R$ , $Cm^R$ , $Tc^R$	García y cols. (1987b)
HB101	pCIP50	<i>cpl1</i> , $Ap^R$ , $Tc^R$	García y cols. (1987a)
HB101	pCP70	<i>cpl17</i> , $Ap^R$ , $Cm^R$	García y cols. (1990)
NF929	pGA46	$Cm^R$	An y Friesen (1979)
C600	---	<i>thi-1</i> , <i>leuB</i> , <i>thr-1</i>	Appleyard (1954)
C600	pLS1	$Tc^R$	Lacks y cols. (1986a)
C600	pLSE1	$Tc^R$ , $Er^R$	Ronda y cols. (1988)
JM83	---	<i>lacZ</i> $\Delta$ M15 ( $r^+$ , $m^+$ )	Messing, J. (1983)
JM83	pUC13	$Ap^R$	Messing, J. (1983)
JM83	pUC18	$Ap^R$	Messing, J. (1983)
JM83	pUC19	$Ap^R$	Messing, J. (1983)
NL8	---	W620 <i>nad::Tn10 tolA1</i>	Fognini-Lefebvre y cols. (1987)
TG1	---	F' ( <i>lacI</i> $^Q$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)	Gibson (1984)
RB791	---	W3110 <i>lacI</i> $^Q$	Brent y Ptashne (1981)
RB791	pGL100	<i>lytA</i> , $Ap^R$	García y cols. (1987b)
RB791	pINIIIA3	$Ap^R$	Inouye e Inouye (1985)
DH1	---	<i>hsd</i> ( $r^-$ , $m^-$ ) <i>recA1</i>	Low (1968)
DH1	pCP700	<i>cpl17</i> , $Ap^R$	Este laboratorio
GM119	---	<i>dcm6 dam3 metB1</i>	Arroj y Marinus (1983)

**TABLA I (continuación). Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.**

Cepa	Plásmido	Genotipo o Fenotipo relevante	Referencia
<u><i>S. pneumoniae</i></u>			
R6	---	cepa salvaje	Rockefeller University
M11	---	hex-4 end-1 exo-2 Lyt <sup>+</sup>	García y cols. (1985b)
M31	---	Hex <sup>-</sup> , $\Delta$ lytA	Sánchez-Puelles y cols. (1986a)
M31	pRG2	lytA, Tc <sup>R</sup>	Ronda y cols. (1987)
M22	---	Hex <sup>-</sup> , str-41, Lyt <sup>+</sup>	Ronda y cols. (1988)
746	---	lisogénica, DpnII	S. A. Lacks
CP1000	---	DpnI <sup>-</sup> , DpnII <sup>-</sup>	Shoemaker y Guild (1974)
801	pLS1	mal591, sul-d, Tc <sup>R</sup>	S. A. Lacks
101/87	---	Optoquina <sup>R</sup> , DOC <sup>-</sup>	Fenoll y cols. (1990)
<u><i>S. oralis</i></u>			
NCTC11427	---	cepa salvaje	Nat. Collection Types Cultures
NCTC11427	pLSE1	Tc <sup>R</sup> , Er <sup>R</sup>	Ronda y cols. (1988)
<u>Bacteriófagos</u>			
M13mp10			Messing (1983)
M13tg130			Kieny y cols. (1983)
Dp-1			López y cols. (1977)
Cp-1			Ronda y cols. (1981)
Cp-7			López y cols. (1984b)
HB-3			Bernheimer (1979)

portadoras del plásmido pIN-III-A3 y derivados de éste se cultivaron en medio LB al que se añadió lactosa al 2% (p/v), en estas condiciones la lactosa actúa como un inductor de la expresión génica regulada por el promotor-operador del gen *lacZ*.

La concentración de antibiótico añadida al medio LB para el cultivo de cepas resistentes fue de 100  $\mu\text{g/ml}$  para la ampicilina, 10  $\mu\text{g/ml}$  para la tetraciclina, y 20-30  $\mu\text{g/ml}$  para el cloranfenicol.

El crecimiento de las cepas de *E. coli* se siguió por turbidimetría a 550 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV 260.

### **3. DETERMINACION DEL FENOTIPO LYT (DOC).**

#### **3.1. En medio de cultivo sólido.**

La determinación del fenotipo Lyt en neumococo se basa en el hecho de que las cepas cultivadas a 37 °C y que contienen la amidasa autolítica (fenotipo Lyt<sup>+</sup>) se lisan en presencia de detergentes, mientras que las cepas que no la poseen (fenotipo Lyt<sup>-</sup>) no se lisan en estas condiciones (Lacks, 1970). Aunque esta afirmación era válida hasta hace poco tiempo, en esta Tesis se presentará su primera excepción (apartado 7. de Resultados).

La metodología para la determinación del fenotipo Lyt en neumococo ha sido desarrollada por García y cols. (1985 b). En esencia, consiste en que sobre la superficie de una placa con colonias de neumococo Lyt<sup>+</sup> y/o Lyt<sup>-</sup> se deposita un filtro de nitrocelulosa seco y estéril (Millipore HATF; tamaño del poro 0,45  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente, este filtro se separa de la superficie de la placa y se coloca durante 10 minutos a 37 °C sobre un fieltro impregnado en el detergente desoxicolato sódico (DOC) (Fluka) al 1% (p/v) tamponado con fosfato sódico 50 mM, pH 8,0. A continuación, el filtro se deja secar durante 20-30 segundos a temperatura ambiente, y se tiñe con una solución de azul de Coomassie (Swank y Munkres, 1971) durante 1 minuto. Después, los filtros se destiñen con una solución de ácido acético al 7,5% y metanol al 25%, se limpian mediante frotación suave, se lavan con agua abundante y, finalmente, se secan con aire caliente. Las colonias Lyt<sup>+</sup> (se habrán lisado y liberado proteínas) aparecen como manchas azules mientras que las Lyt<sup>-</sup> lo hacen como círculos blancos. Esta técnica tiene un gran poder de resolución ya que permite identificar una colonia de fenotipo Lyt<sup>-</sup> entre 10.000 colonias de fenotipo Lyt<sup>+</sup>, o viceversa.

Para la determinación del fenotipo Lyt en cepas de *S. oralis* que contienen clonado el gen *lytA* se siguió la misma técnica que la comentada anteriormente para neumococo (Ronda y cols., 1988).

### **3.2. En medio de cultivo líquido.**

Las cepas de *S. pneumoniae* cultivadas en medio líquido se trataron con el detergente desoxicolato sódico (DOC) básicamente como se describe en Tomasz y cols. (1975). En resumen, a 1 ml de células en fase exponencial de crecimiento se añaden 0,1 ml de tampón fosfato sódico 1 M, pH 8,0 y 0,1 ml de una solución de desoxicolato sódico al 10% (p/v). Tras incubación a 37 °C durante 5 minutos se determina la turbidez de la suspensión. Si la suspensión se vuelve transparente, el fenotipo de la cepa es DOC<sup>+</sup>; pero si, por el contrario, la suspensión no reduce su turbidez, el fenotipo de la cepa es DOC<sup>-</sup>.

El tratamiento de las células con el detergente Tritón X-100 (Probus) se realizó de idéntica manera a como se ha descrito para el desoxicolato.

### **4. CURACION FENOTIPICA DE NEUMOCOCO.**

Los experimentos de curación fenotípica de las cepas de neumococo Lyt<sup>-</sup> se realizaron como se describe en Tomasz y Waks (1975). La curación consiste en la adición de una enzima hidrolítica de la pared celular de neumococo a un cultivo de una cepa Lyt<sup>-</sup> en fase exponencial temprana de crecimiento. Se dice que dicha cepa se ha curado cuando ésta sufre la autólisis al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, un comportamiento similar al que experimenta una cepa Lyt<sup>+</sup> de forma natural.

En los experimentos de curación fenotípica realizados en esta Tesis se ha utilizado la cepa de neumococo M31, un mutante que carece del gen *lytA* (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a), cultivada a 37 °C en medio C+Y. A esta temperatura de incubación la autolisina minoritaria de neumococo, la glucosaminidasa, presenta una baja actividad y el fenotipo de la cepa M31 determinado como se describe en el apartado 3. es Lyt<sup>-</sup> (DOC<sup>-</sup>) (apartado 4.6.1.2. de la Introducción).

### **5. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACION GENETICA.**

#### **5.1. Transformación de *S. pneumoniae*.**

La preparación de células competentes para realizar la transformación genética en *S. pneumoniae* ha sido descrita por Tomasz (1970). Los cultivos de neumococo poseen competencia natural en una determinada etapa del crecimiento (la comprendida entre 280 N y 300 N), que es cuando se sintetiza el factor necesario (factor de competencia) para la inducción

del estado competente. Una vez que el cultivo alcanza esta concentración celular, se le añade glicerol al 10%, y se congela rápidamente. Las células conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  mantienen la competencia sin pérdida apreciable durante varios meses.

El método de transformación utilizado fue esencialmente el descrito por Barany y Tomasz (1980), excepto que la incubación con el DNA transformante se realizó a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos en medio CpH8 suplementado con seroalbúmina bovina al 0,08% (p/v). Después los cultivos se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 120 minutos en medio C+Y suplementado con seroalbúmina bovina al 0,08% (fase de expresión), antes de la siembra a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el medio sólido adecuado para cada transformación.

Para determinar el índice de competencia de los cultivos se realizó la transformación en medio líquido utilizando como DNA donador el DNA cromosómico de la cepa de neumococo M22, que confiere resistencia a  $140\text{ }\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente, con la diferencia de que las diluciones correspondientes se sembraron en medio líquido C+Y en presencia de estreptomicina ( $140\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) y del factor anti-R (anticuerpos que reconocen la pared celular de las formas R de neumococo) (Tomasz, 1970).

#### 5.1.1. Obtención y valoración del factor de competencia.

El factor de competencia se obtuvo empleando la cepa de neumococo M11 y siguiendo el método que se describe en Tomasz y Mosser (1966). La capacidad dicho factor para inducir la competencia en neumococo se valoró mediante la transformación de células no competentes de la cepa R6, utilizándose la técnica de transformación en medio líquido descrita en el apartado 5.1. y el factor de competencia aislado.

Para obtener células no competentes de la cepa R6 se cultivó ésta en medio C+Y, tamponado a un pH inicial de 6,6, hasta alcanzar una concentración celular equivalente a 80-100 N (Tomasz, 1966).

#### 5.2. Transformación de *S. oralis*.

*S. oralis*, al igual que neumococo, presenta competencia natural, aunque ésta es máxima a una concentración celular ( $3,5 \times 10^7$  UFC/ml) inferior a la descrita para neumococo (Ronda y cols., 1988). La transformación de *S. oralis* se realizó de forma similar a como se ha detallado para *S. pneumoniae*.

#### 5.3. Transformación de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* se transformaron con el método del RbCl (Kushner, 1978), a excepción de la cepa *E. coli* TGI que se transformó con el método del CaCl<sub>2</sub> (Messing, 1983).

## **6. OBTENCION DE EXTRACTOS CRUDOS DE CULTIVOS CELULARES.**

Para obtener extractos crudos de las cepas de *E. coli*, se cultivaron éstas en 100 ml del medio indicado en cada caso a 37 °C durante 12 horas (fase estacionaria de crecimiento). Para obtener extractos crudos de *S. pneumoniae* y *S. oralis*, se cultivaron las cepas correspondientes en 10 ml del medio indicado en cada caso a 37 °C hasta alcanzar una concentración celular de  $3-5 \times 10^8$  UFC/ml (fase exponencial media).

A continuación, los cultivos se enfriaron a 4 °C y se centrifugaron a  $6.000 \times g$  durante 10 minutos, resuspendiéndose las células en 6 ml de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5 (tampón TM) para las cepas de *E. coli* y en 10 ml de tampón TM para las cepas de *S. pneumoniae* y *S. oralis*. Una vez homogeneizada la suspensión, las células se rompieron en un sonicador MSE modelo MK2 mediante cuatro tratamientos de 10 segundos cada uno, manteniendo siempre la muestra a 4 °C. Finalmente, la suspensión sonicada se centrifugó a 4 °C y  $10.000 \times g$  durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de esta centrifugación (extracto crudo) se conservó a -20 °C. La concentración de proteína en el extracto se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando la curva patrón de la seroalbúmina bovina.

## **7. TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR EN *E. coli*.**

### **7.1. Fraccionamiento subcelular mediante choque osmótico.**

El choque osmótico de los cultivos de la cepa *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] se realizó como se describe en Nossal and Heppel (1966). Para ello, se cultivó la cepa CM21 en 25 ml de medio LB con ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0,5 (fase exponencial media). Las células del cultivo se concentraron mediante centrifugación, se resuspendieron en 10 ml de la solución de plasmolisis [Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM y sacarosa al 20% (p/v)], y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Con este tratamiento se liberan parte de las proteínas que se localizan en el periplasma de la bacteria. Posteriormente, las células se centrifugaron a  $8.000 \times g$  durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante constituía la fracción de sacarosa y el sedimento las células plasmolisadas. Estas se resuspendieron suavemente en 10 ml de agua a 4 °C y se mantuvieron a esa temperatura durante otros 10 minutos (choque

hipotónico). Con este tratamiento se liberan las proteínas periplásmicas que no lo han hecho previamente en la fracción de la sacarosa. Después de una centrifugación de 10 minutos a 4 °C y 5.000 x g, se separó el sobrenadante (fracción H<sub>2</sub>O) del sedimento (fracción celular). Este último se resuspendió en tampón TM y las células se rompieron mediante sonicación a 4 °C (con dos tratamientos de 10 segundos cada uno). La fracción soluble (citoplasma) y la sedimentable (envolturas celulares) se separaron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g durante 60 minutos.

## **7.2. Fraccionamiento subcelular mediante la formación de esferoplastos.**

Se siguió el procedimiento descrito por Koshland y Botstein (1980). Para ello, se cultivó la cepa *E. coli* CM21 en 25 ml de medio LB con ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0,5 (fase exponencial media). Las células del cultivo se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron en 2,4 ml de una solución [Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 0,5 mM y sacarosa al 20% (p/v)] que contenía 0,24 mg de lisozima. Después de una incubación a 4 °C durante 15-20 minutos, los esferoplastos formados (visualizados al microscopio) se estabilizaron añadiendo 45 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M. La centrifugación a 8.000 x g durante 20 minutos a 4 °C originó un sobrenadante que contenía proteínas periplásmicas (fracción periplásmica), y un sedimento celular que se sometió a choque hipotónico mediante resuspensión en 10 ml de agua a 4 °C y agitación a esta temperatura durante 10 minutos. En este caso, y a diferencia de lo comentado en el apartado 7.1., el choque hipotónico libera las proteínas citoplásmicas. La fracción soluble (citoplasma) se separó de la fracción sedimentable (envolturas celulares) mediante ultracentrifugación. La eficiencia en la formación de esferoplastos fue mayor del 95 %, como se pudo comprobar por observación directa al microscopio de contraste de fase, así como también por la reducida actividad amidásica detectada en el sedimento de una centrifugación a baja velocidad de los esferoplastos cuando éstos ya habían sufrido el choque hipotónico.

## **8. OBTENCION DE LAS PAREDES CELULARES DE NEUMOCOCO.**

### **8.1. Marcaje radiactivo de las paredes celulares.**

El marcaje de las paredes celulares de *S. pneumoniae* con [metil-<sup>3</sup>H]colina (60 Ci/mmol; Amersham) o con L-[4,5-<sup>3</sup>H]lisina (40 Ci/mmol, Amersham), se llevó a cabo añadiendo el isótopo correspondiente a la cepa R6 cultivada en medio CpH8 según se describe en Mosser y Tomasz (1970).

Para el marcaje de las paredes celulares que contienen etanolamina en lugar de colina, se añadió [2-<sup>14</sup>C]etanolamina (44 mCi/mmol, Amersham) o L-[4,5-<sup>3</sup>H]lisina (40 Ci/mmol) a la cepa R6 cultivada en medio Cden-EA según se describe en Höltje y Tomasz (1975 b).

## **8.2. Aislamiento y purificación de las paredes celulares.**

Para llevar a cabo el aislamiento y purificación de las paredes celulares se siguió básicamente el método desarrollado por García-Bustos y Tomasz (1987). En resumen, se cultivó la cepa tipo R6 en medio CpH8 o en medio Cden-EA, para la obtención de paredes que contienen etanolamina, en presencia del isótopo correspondiente hasta que el cultivo alcanzó una concentración celular de  $3,7 \times 10^8$  UFC/ml. Las células se centrifugaron a  $6.000 \times g$  durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento resultante se resuspendió en tampón fosfato-salino (tampón fosfato 20 mM, pH 6,9 y NaCl 0,15 M). Posteriormente, la suspensión celular se calentó a 90 °C durante 30 minutos en presencia de SDS al 4% (p/v) con el fin de inactivar la autolisina. Después de varios lavados con agua destilada para eliminar el SDS, la células se rompieron mediante agitación intensa con bolas de vidrio (Ballotini No. 13, Serva). El restante tratamiento hasta la obtención de las paredes celulares se realizó como se describe en García-Bustos y Tomasz (1987). Finalmente, las paredes celulares se resuspendieron de forma homogénea en tampón SPSH (tampón fosfato sódico 25 mM, pH8,0; β-mercaptoetanol 20 mM y NaCl 0,85%).

## **9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

### **9.1. Determinación de la actividad de las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo.**

#### **9.1.1. Ensayo enzimático de los extractos obtenidos de *E. coli*.**

Los extractos crudos de cepas de *E. coli* transformantes que expresan una actividad hidrolítica de pared se ensayaron siguiendo el procedimiento clásico para la determinación de la actividad amidásica en neumococo (Mosser y Tomasz, 1970), pero con algunas modificaciones.

Previamente a la reacción, el extracto celular se preincubó a 4 °C durante 10 minutos en presencia de colina a una concentración final de 140 mM (2%, p/v) (Briese y Hakenbeck, 1985). La preincubación tiene como objetivo la *conversión* de aquellas enzimas que requieren este proceso para alcanzar su actividad enzimática máxima, ya que en *E. coli* se sintetizan en su forma

de baja actividad catalítica (forma E para la amidasa LYTA). Después de esta preincubación, la colina añadida se diluye con tampón TM hasta una concentración final inferior al 0,01%, con ello se evita el efecto inhibitor de este aminoalcohol sobre la actividad hidrolítica de pared al competir con los residuos de colina de las paredes celulares (apartado 4.6.1.1.2. de la Introducción).

La mezcla de reacción contiene 200  $\mu$ l de tampón TM, a los que se añaden 10  $\mu$ l de paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente (sustrato) y de 5 a 30  $\mu$ l de la dilución adecuada del extracto celular *convertido*. La incubación se realiza a 37 °C durante 10 minutos, y la reacción se detiene mediante la adición de 10  $\mu$ l de formaldehído al 35% y 10  $\mu$ l de seroalbúmina bovina al 4%. Las muestras se centrifugan en una microfuga Hettich a 10.000 x g durante 10 minutos. A 150  $\mu$ l del sobrenadante de cada muestra se les añade 3,5 ml de líquido de centelleo (Cocktail-22 Normascint, Scharlau) y se determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido LKB Wallac (modelo 1219 Racbeta). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis (solubilización) de 1  $\mu$ g de pared en 10 minutos (Höltje y Tomasz, 1976).

#### 9.1.2. Ensayo enzimático de los extractos obtenidos de *S. pneumoniae*.

Dado que las células de *S. pneumoniae* cultivadas en medio C+Y poseen colina, los extractos celulares obtenidos de cultivos de esta bacteria no requieren preincubación en presencia de este aminoalcohol. El ensayo enzimático se realiza en tampón TM al que se añade el detergente Brij 58 (Sigma) a una concentración final del 0,1% (p/v). El detergente libera las enzimas unidas a la membrana celular y, por lo tanto, elimina la acción inhibitor de LTA que contiene colina sobre la actividad de las enzimas líticas de pared que requieren este aminoalcohol (Briese y Hakenbeck, 1985). Al mismo tiempo, el detergente *per se* también incrementa de 3 a 5 veces la actividad de estas enzimas.

La mezcla de reacción, que contiene 200  $\mu$ l de tampón TM con Brij al 0,1% y de 5 a 30  $\mu$ l de la dilución adecuada del extracto que se desea ensayar, se mantiene durante 5 minutos a temperatura ambiente para que el detergente solubilice las membranas. Después se añaden 10  $\mu$ l de paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente, y se incuba a 37 °C durante 10 minutos. La reacción se detiene y la radiactividad liberada se valora como se ha descrito en el apartado 9.1.1.

Los ensayos enzimáticos de los extractos obtenidos de *S. oralis* se realizaron de idéntica forma.

### 9.1.3. Ensayo enzimático de las proteínas purificadas.

Las enzimas hidrolíticas de pared se purifican en presencia de colina (apartado 12.1.), por lo que no requieren preincubación con el aminoalcohol. La mezcla de reacción contiene 200  $\mu$ l de tampón TM, 10  $\mu$ l de paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente y 10  $\mu$ l de la dilución adecuada de la enzima purificada. La incubación se realiza como se ha descrito en el apartado 9.1.1.

### 9.2. Determinación de la actividad de la $\beta$ -lactamasa y de la ICDH.

La actividad de la  $\beta$ -lactamasa se determinó mediante el método espectrofotométrico de Ross y O'Callaghan (1975). Para valorar la actividad de la isocitrato-deshidrogenasa (ICDH) se siguió el método de Smith y cols. (1987).

## 10. CONVERSION DE LA AMIDASA LYTA IN VIVO EN CELULAS PLASMOLISADAS DE *E. coli* CM21.

Las células de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] se cultivaron en 4 ml de medio LB con ampicilina hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Después de una centrifugación se resuspendieron en 1 ml de tampón de plasmolisis (apartado 7.1) al que se añadió tetraciclina (10  $\mu$ g/ml) y espectinomicina (100  $\mu$ g/ml). Una alícuota se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en presencia de colina 70 mM, otra alícuota (control) también se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente pero en ausencia de colina. En estas condiciones experimentales la síntesis *de novo* de proteínas en la célula se inhibe por acción de los antibióticos y la colina, aunque penetra al espacio periplásmico celular, no puede ser transportada hasta el citoplasma de la célula (Styvold y cols., 1986), como se ha puesto de manifiesto en nuestro laboratorio utilizando [*metil*- $^3$ H]colina como marcador. Posteriormente, las células se centrifugaron a 8.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante constituía la fracción de sacarosa y el sedimento lo formaban las células plasmolisadas. Este sedimento se resuspendió en tampón TM y las células se rompieron por sonicación (fracción celular). Por último, en la fracción de sacarosa y en la fracción celular se determinó la actividad amidásica mediante ensayos enzimáticos con o sin preincubación en presencia de colina (apartado 9.1.1.).

Estas condiciones experimentales permiten conocer el porcentaje de amidasa LYTA convertida a la forma C por la colina añadida al tampón de plasmolisis y, por lo tanto, el porcentaje de enzima accesible al espacio periplásmico de la célula.

## **II. OBTENCION DEL SUERO ANTI-AMIDASA LYTA. ANALISIS INMUNOCITOQUIMICO EN NEUMOCOCO Y E. coli CM21.**

El suero de conejo frente a la amidasa LYTA de *S. pneumoniae* se preparó según se describe en García y cols. (1982).

Para el marcaje de células intactas de *S. pneumoniae* R6 y M31 (pRG2) y de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] con los anticuerpos anti-amidasa LYTA, las células de un cultivo (0,5 ml) en fase exponencial de crecimiento se resuspendieron en 0,25 ml de tampón fosfato-salino, pH 7,4, y se incubaron durante 1 hora a 4 °C con 25 µl de suero anti-amidasa LYTA. El exceso de anticuerpos se eliminó mediante dos lavados sucesivos con 0,5 ml de tampón fosfato-salino cada uno. Las células lavadas se resuspendieron en 200 µl de tampón fosfato-salino y se incubaron durante 1 hora a 4 °C en presencia de 10 µl de inmunoglobulinas (IgGs) de cabra anti-IgGs de conejo marcadas con oro coloidal (AuroProbe EM GAR G15, Jansen Life Sciences Products). El exceso de IgGs se eliminó mediante un exhaustivo lavado con agua destilada. La suspensión celular se examinó en un microscopio electrónico Philips EM 300.

Para el marcaje de secciones ultrafinas de células de *E. coli* CM21 con los anticuerpos frente a la amidasa LYTA, las células se lavaron previamente con tampón cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,4. El sedimento celular se resuspendió de nuevo en tampón cacodilato y se sometió a un proceso de fijación durante 1 hora a 4 °C en presencia de paraformaldehído (40 mg/ml) y glutaraldehído (0,2%, v/v). Después de varios lavados con tampón cacodilato, las células se incluyeron en agar y se deshidrataron mediante pases sucesivos en soluciones de etanol. Posteriormente, las muestras se pusieron en contacto con una resina Spurr a 60 °C durante 24 horas (polimerización). Las secciones celulares se obtuvieron con la ayuda de un ultramicrotomo y se incubaron a temperatura ambiente en las siguientes condiciones: incubación durante 1 hora con el tampón A (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; azida sódica 0,02%; NaCl 0,9%; polietilenglicol 20.000 a 0,5 mg/ml y seroalbúmina bovina a 20 mg/ml), y posteriormente durante otra hora con una dilución 1:10 (en tampón A) del suero anti-amidasa LYTA. Seguidamente, las muestras se lavaron 6 veces con el tampón A, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con la dilución 1:10 (en tampón A) de las IgGs de cabra anti-IgGs de conejo marcadas con oro coloidal. Después de 6 lavados sucesivos con el tampón A seguidos de 3 lavados con agua destilada, las muestras se observaron al microscopio electrónico, previa tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo según se detalla en Reynolds (1963).

## **12. PURIFICACION DE LAS ENZIMAS LITICAS DE PARED DE NEUMOCOCO Y DE SUS BACTERIOFAGOS.**

### **12.1. Purificación mediante cromatografía en DEAE-celulosa.**

Las enzimas de neumococo y de sus bacteriófagos que hidrolizan la pared celular de esta bacteria y cuya actividad depende de la presencia de residuos de colina en los ácidos teicoicos del sustrato, se purificaron en un solo paso mediante una cromatografía de afinidad utilizando columnas de DEAE-celulosa según se describe en Sanz y cols. (1988).

Las enzimas se purificaron a partir de los extractos celulares obtenidos de las cepas transformantes de *E. coli* cultivadas hasta la fase estacionaria de crecimiento (12 horas) en el medio de cultivo adecuado para cada caso. Los extractos crudos se obtuvieron, después de concentrar las células 30 veces en tampón TM, mediante la ruptura de las mismas en una *French-press* (Americam Instruments Company) a una presión de 1.100 pascales y posterior centrifugación a 4 °C y 10.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (Sigma) equilibrada en tampón TM, y el restante proceso de purificación se realizó a 4 °C. Después de lavar la columna con 3 volúmenes de tampón TM que contenía NaCl 1,5 M, la enzima retenida por interacción específica con el DEAE (análogo de la colina) se eluyó con tampón TM que contenía NaCl 1,5 M y colina 140 mM. Las fracciones en las que se detectó actividad hidrolítica de pared se dializaron durante 12 horas frente a 300 volúmenes de tampón TM. La concentración de la proteína purificada se determinó mediante el método de Bradford, y su pureza se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (apartado 13.). Las enzimas se conservaron a -20 °C.

### **12.2. Purificación de la lisozima CPL7 y de la amidasa LC7.**

La lisozima CPL7 y la amidasa LC7 no presentan afinidad por la colina, por lo que su purificación no se puede realizar en un solo paso mediante una cromatografía en DEAE-celulosa. Los extractos crudos de las cepas de *E. coli* que expresan estas proteínas se obtuvieron como se indica en el apartado 12.1. y se sometieron a una precipitación fraccionada con sulfato amónico (20%-50%). El proceso de purificación se realizó a 4 °C. La fracción sedimentable después de la precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación se resuspendió en 10 ml de tampón TM y se aplicó a una columna (6 x 90 cm) de cromatografía por filtración en gel (Biogel-P60, Bio-Rad). La elución se realizó con tampón TM, y las fracciones en las que se detectó actividad hidrolítica de pared se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

### **13. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.**

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sodico (SDS). La técnica empleada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (160 x 100 x 2 mm) al 10% o 15%. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS al 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%; glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y corriente constante (50 mA), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS al 0,1%. Las proteínas de los geles se visualizaron con azul brillante de Coomassie R-250 según se describe en Swank y Munkress (1971). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular se adquirieron a la casa comercial Bio-Rad.

### **14. DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE LA AMIDASA LYTA.**

La secuencia de aminoácidos N-terminal de la amidasa LYTA se determinó mediante el método de degradación de Edman según se describe en López y cols. (1982 b). Se utilizó un secuenciador automático modelo 477A (Applied Biosystems).

### **15. EXTRACCION DEL DNA CROMOSOMICO DE NEUMOCOCO.**

Para la extracción del DNA cromosómico de las cepas de neumococo con fenotipo  $Lyt^+$ , se partió de un cultivo de células en fase exponencial de crecimiento (400 N). El sedimento celular se lavó con tampón TES (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM y NaCl 150 mM) y las células se resuspendieron finalmente, en 1/50 del volumen del cultivo, en tampón de lisis (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; EDTA 0,03 M; Sarkosyl al 0,4% y Tritón X-100 al 0,1%) (Morrison, 1978). La suspensión celular se incubó a 37 °C hasta que se volvió transparente (lisis celular), y se trató durante 30 minutos a 37 °C con RNAasa (100  $\mu$ g/ml) y Proteinasa K (100  $\mu$ g/ml), respectivamente. Por último, se añadió CsCl a la suspensión hasta que ésta alcanzó una densidad de 1,700 g/cm<sup>3</sup> (equivalente a un índice de refracción de 1,3995), y se centrifugó en un rotor Beckman VTi 50 a 130.000 g durante 24 horas a 20 °C. De la fracción que contenía el DNA, la de mayor viscosidad, se aisló éste mediante precipitación y posterior resuspensión en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). La concentración de DNA se estimó a partir de la

absorbancia de la preparación a 260 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de DNA de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Para la extracción del DNA cromosómico de las cepas de neumococo con fenotipo  $\text{Lyt}^-$ , las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 y se curaron (Tomasz y Waks, 1975) con la adición de 1/3.000 del volumen del cultivo de enzima LYTA purificada a una concentración de 15 mg/ml. La curación se prolongó durante 15 a 37 °C. A continuación, se añadió EDTA (30 mM) y los detergentes Tritón X-100 (1%, v/v) y Sarkosyl (0,4%, p/v), incubándose la suspensión a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente, la muestra se sometió a una ultracentrifugación como se ha descrito anteriormente.

## **16. PREPARACION DE PLASMIDOS.**

La preparación de plásmidos a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando el método de Birnboim y Doly (1979) tal y como lo describen Maniatis y cols. (1982). La extracción de plásmidos de las cepas de *S. pneumoniae* y *S. oralis* en fase exponencial de crecimiento se llevó a cabo siguiendo el método de Birnboim y Doly, con la modificación consistente en que la lisis celular se realizó mediante la resuspensión de las células en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, y posterior incubación a 37 °C durante 15 minutos en presencia de desoxicolato sódico (1%, p/v). Para la extracción de plásmidos de las cepas con fenotipo  $\text{Lyt}^-$ , las células se curaron con amidasa LYTA durante 30 minutos a 37 °C antes de la adición del desoxicolato.

### **16.1. Determinación del número de copias de los plásmidos en neumococo.**

Para la determinación del número de copias de los plásmidos en neumococo se utilizó el procedimiento descrito por Lacks y cols. (1986 a). En resumen, las células con el plásmido correspondiente se cultivaron en medio C+Y en presencia de [ $^3\text{H}$ ]desoxitimidina (Amersham) (10  $\mu\text{Ci/ml}$  concentración final) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, el cultivo se concentró 25 veces y se realizó la lisis celular (Lacks y cols., 1986 a). El extracto (100  $\mu\text{l}$ ) se sometió a una electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (apartado 18.) y se determinó la radiactividad correspondiente al DNA cromosómico y al DNA plasmídico. Como control se utilizó la cepa de neumococo 801 (pLS1), cepa que contiene 24 copias del plásmido pLS1. El número de copias del plásmido se calculó como :  $\text{CPM}_{\text{plásmido}} \times 3.000 / \text{CPM}_{\text{Cromosoma}} \times \text{Tamaño (kb) plásmido}$ , donde 3.000 representa el tamaño del genoma de neumococo expresado en kb (Lacks y cols., 1986 a).

## **17. MANIPULACION DEL DNA CON ENZIMAS DE USO COMUN EN BIOLOGIA MOLECULAR.**

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Boehringer Mannheim, Amersham, Pharmacia y New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera se obtuvo de Boehringer Mannheim. Amersham suministró la DNA ligasa y la polinucleótido quinasa del fago T4, así como el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Todas las enzimas y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo las indicaciones recomendadas por las casas suministradoras.

## **18. ELECTROFORESIS DEL DNA EN GELES DE AGAROSA.**

Para realizar la electroforesis del DNA se utilizaron geles con 0,7% o 1% de agarosa (Bio-Rad) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,1), empleando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió 1/5-1/10 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0,2 % (p/v), xilencianol al 0,2% y EDTA 40 mM, pH 8,0. La electroforesis se realizó a 100-150 V durante 60-90 minutos, y una vez finalizada los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml) para su visualización con radiación ultravioleta. Como marcador de tamaño se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (Amersham).

## **19. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA.**

Los fragmentos resultantes de la digestión del DNA con las enzimas de restricción se aislaron y purificaron de 3 formas distintas.

### **19.1. Geles de agarosa de bajo punto de fusión.**

Para algunos aislamientos de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 1-1,4% en tampón TAE. Una vez realizada la electroforesis, se cortó en cada caso la banda deseada del gel y se resuspendió en tampón TE con NaCl 0,25 M. La agarosa se fundió manteniéndola a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se trató con fenol y posteriormente con éter (v/v), incubándola después a 65 °C durante 10-15 minutos con el fin de eliminar los posibles restos de éste. El DNA se precipitó con dos y medio volúmenes de etanol absoluto durante 45 minutos a -70 °C, tras una centrifugación a 10.000 x g durante 10

minutos, se lavó con etanol al 70% y finalmente se disolvió en un volumen adecuado de tampón TE.

### **19.2. Geles de poliacrilamida.**

Para el aislamiento de fragmentos de DNA se utilizaron también geles de poliacrilamida (no desnaturalizantes) a una concentración en tampón TBE (Tris-borato 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH 8,0) variable dependiendo del tamaño de los fragmentos que se fuesen a separar. Se empleó como electrolito para la electroforesis el tampón TBE. A las muestras se les añadió 1/5-1/10 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0,2% (p/v), xilencianol al 0,2% y EDTA 40 mM, pH 8,0. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de metileno y se recortó la banda de DNA deseada en cada caso. El DNA se eluyó de la banda de acrilamida como se describe en Maniatis y cols. (1982).

### **19.3. Técnica del Geneclean.**

Los fragmentos que se desean aislar se separan mediante una electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente, se recortan las bandas de interés y el DNA se purifica de la agarosa mediante su adsorción a diminutas partículas de vidrio siguiendo la técnica del *Geneclean*. El kit de *Geneclean* se utilizó como recomiendan los fabricantes (Bio 101 Inc., La Jolla, CA).

## **20. AISLAMIENTO DEL RNA.**

Para obtener el RNA total de un cultivo de *E. coli* o de *S. pneumoniae*, las células se cultivaron en 50 ml del medio correspondiente hasta la fase exponencial media de crecimiento. El sedimento celular de los cultivos de *S. pneumoniae* se resuspendió en 2,5 ml de una solución de sacarosa al 5% (p/v) que contenía desoxicolato sódico al 0,1% (p/v). Las células de *E. coli* se resuspendieron en 2,5 ml de acetato sódico 20 mM, pH 5,5, EDTA 1mM, en presencia de 2,5 mg de lisozima. La lisis celular se completó con 4 ciclos de congelación-descongelación. Posteriormente, se añadió SDS al 0,5% (p/v) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 minuto. A continuación, los extractos se trataron durante 5 minutos a 70 °C con 5 ml de fenol saturado con tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. Después de una centrifugación, la fase acuosa recibió un nuevo tratamiento con fenol. Los ácidos nucleicos (RNAs) se precipitaron 4 veces utilizando tampón acetato sódico 200 mM, pH 7,0, y etanol absoluto, disolviéndose finalmente

en un volumen adecuado de tampón TE. La concentración de RNA se estimó a partir de la absorbancia de la preparación a 260 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$ . La cantidad de RNA obtenida a partir de los 50 ml de cultivo fue de 0,5 mg para *S. pneumoniae* y de 0,8 mg para *E. coli*. Los RNAs se conservaron a  $-70^\circ\text{C}$ .

## **21. DETERMINACION DE LOS SITIOS DE INICIACION Y TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION MEDIANTE EL EMPLEO DE LA NUCLEASA SI.**

Para la localización del sitio de iniciación y terminación de la transcripción del gen *lytA* se siguió la técnica descrita por Berk y Sharp (1977) basada en el empleo de la nucleasa SI.

Para determinar el sitio de iniciación de la transcripción, se marcaron radiactivamente los extremos 5' del fragmento de DNA utilizado para la hibridación con los RNAs. Para ello, y después de la eliminación previa con fosfatasa alcalina de los grupos fosfato localizados en los extremos 5' terminales del fragmento de DNA, se empleó la T4 polinucleótido quinasa y el [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (3.000 Ci/mmol, Amersham) según se describe en Maniatis y cols. (1982). Para localizar el sitio de terminación de la transcripción, el fragmento de DNA destinado a la hibridación con los RNAs se marcó radiactivamente en sus extremos 3'. Dicho marcaje se realizó utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (4 unidades) en 20  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,9;  $\text{MgCl}_2$  10 mM; ditioneitol (DDT) 5mM y espermidina 0,1 mM, a la que se añadieron 40  $\mu\text{Ci}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP (3.000 Ci/mmol, Amersham). La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, añadiéndose después 2 nmoles de cada uno de los 4 dNTPs no marcados radiactivamente, e incubándose a continuación durante otros 10 minutos. Los fragmentos de DNA marcados radiactivamente se purificaron mediante tratamiento con fenol y posterior precipitación con etanol absoluto.

La hibridación se realizó mezclando los fragmentos de DNA marcados radiactivamente (100.000 CPM) y el RNA total (150  $\mu\text{g}$ ) en 50  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía piperazina-*N,N'*-bis (2-etanosulfonato) 40 mM, pH 6,3; NaCl 0,4 M; EDTA 1 mM y formamida desionizada al 70% (v/v). La mezcla se calentó a  $85^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para desnaturalizar el DNA y la incubación se continuó a  $45^\circ\text{C}$  durante 3 horas. En estas condiciones se favorece la hibridación DNA-RNA frente a la hibridación DNA-DNA. Después de la adición de 0,45 ml de una solución de acetato sódico 30 mM, pH 4,6;  $\text{ZnSO}_4$  4,5 mM y 9  $\mu\text{g}$  de DNA de timo de ternera sonificado, las muestras se trataron con 400 unidades de nucleasa SI (Boehringer Mannheim). La mezcla se incubó durante 20 minutos a  $30^\circ\text{C}$  y la reacción se detuvo a  $4^\circ\text{C}$  con 113  $\mu\text{l}$  de acetato amónico 2,5 M y EDTA 50 mM. Después del tratamiento con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se añadieron a la fase acuosa 10  $\mu\text{g}$  de RNA transferente y el

fragmento de DNA protegido por la hibridación con los RNAs se precipitó con 0,7 ml de isopropanol, resuspendiéndose finalmente en un volumen adecuado de tampón TE. Para determinar la longitud en pb del fragmento protegido se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida 6%-urea 8 M, aplicándose en cada calle 10.000 CPM de la muestra.

## **22. SECUENCIACION DEL DNA.**

La secuenciación del DNA se realizó según el método de Sanger y cols. (1977), utilizando la técnica de Zhang y cols. (1988) para la secuenciación del DNA de doble cadena. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Sequenase Kit* (United States Biochemicals) y como nucleótido marcado radiactivamente, [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dCTP (Amersham), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. *E. coli* TGI fue la cepa utilizada como huésped para los bacteriófagos M13mp10 (Messing, 1983) y M13tg130 (Kieny y cols., 1983). *E. coli* JM83 fue la cepa huésped de los vectores de clonación pUC (Messing, 1983).

El análisis de las secuencias de nucleótidos se realizó mediante el programa de ordenador ANALISIS diseñado por el Dr. José Luis García.

## **23. MUTAGENESIS DIRIGIDA.**

Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida, así como los empleados como *primers* para la secuenciación del DNA, se sintetizaron en un sintetizador de DNA LKB Gene Assembler Plus (Pharmacia). Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida se empleó el sistema de mutagénesis *in vitro* de Amersham (método Eckstein), siguiendo el protocolo que detallan los fabricantes.

## **24. ENSAYOS DE TRANSCRIPCION-TRADUCCION IN VITRO.**

La expresión *in vitro* del gen *lytA* en el fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb se realizó mediante el sistema de transcripción-traducción bacteriana libre de células comercializado por Amersham. La mezcla (30  $\mu$ l) que contiene los polipéptidos sintetizados *in vitro* se incubó durante 6 horas a 37 °C en 200  $\mu$ l de tampón Tris-maleato 50 mM, pH6,5 y en presencia de 10  $\mu$ l de paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [*metil*- $^3$ H]colina. La reacción se detuvo y la radiactividad liberada se valoró como se describe en el apartado 9.1.1.

## **25. TECNICAS DE HIBRIDACION DE DNA.**

Los fragmentos de DNA marcados radiactivamente (sondas) se obtuvieron mediante la técnica de *random-primer* utilizando [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (400 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) (Amersham), el fragmento Klenow y la solución de *primers* (Pharmacia) con los dNTPs según se indica en Sambrook y cols. (1989).

Todas las hibridaciones, y los correspondientes lavados de la sonda, se realizaron a 65 °C.

### **25.1. Técnica de Southern-blot.**

La hibridación de DNA mediante la técnica descrita por Southern (1975), se realizó siguiendo el protocolo de Maniatis y cols. (1982). Las membranas para la transferencia del DNA (Hybond-N) se obtuvieron de Amersham. Las bandas radiactivas se detectaron por autoradiografía utilizando películas Agfa Curix RP2 y pantallas amplificadoras Dupont, Cronex Lightning Plus a -70 °C.

### **25.2. Hibridación de DNA sobre filtros de colonias celulares.**

Las colonias de *E. coli* se transfirieron a los filtros de nitrocelulosa (Millipore HATF, tamaño de poro 0,45  $\mu$ m) como se indica en Maniatis y cols. (1982). Las células se lisaron sobre el filtro mediante tratamientos sucesivos, de 5 minutos de duración cada uno, con las soluciones que se indican : i) NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M (2 veces); ii) Tris-HCl 1M, pH 7,0; iii) Tris-HCl 0,5 M, pH 7,0 y NaCl 1,5 M; iv) 2 x SSC (NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M). La fijación del DNA al filtro se realizó mediante incubación a 80 °C durante 2 horas. Para eliminar los restos celulares, los filtros se hirvieron en agua destilada durante 10 minutos. La hibridación con la sonda radiactiva se realizó como se describe en Maniatis y cols. (1982) (apartado 25.1.).

## **26. TECNICA DE WESTERN-BLOT.**

Las proteínas purificadas y las proteínas de los extractos crudos, una vez separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) según se describe en Maniatis y cols. (1982). La membrana se saturó con leche desnatada al 5% (p/v) en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM) mediante incubación a 4 °C durante 12 horas. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 4 horas en presencia del suero anti-amidasa

LYTA (García y cols., 1982). Después de 3 lavados, de 10 minutos de duración cada uno, con PBS que contenía Tween al 0,1% (v/v), la membrana se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente y suave agitación con anticuerpos de cabra anti-IgGs de conejo conjugados con peroxidasa (Jackson Immunoresearch). Finalmente, tras un lavado con tampón PBS, las bandas de reacción con los anticuerpos se visualizaron con peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol (Sigma).

## **27. PURIFICACION DEL FAGO EJ-I.**

Para la obtención del fago EJ-I se cultivó a 37 °C la cepa de neumococo 101/87 en 2 litros de medio C+Y. A los 180 N, se añadió al cultivo mitomocina C (Sigma) a una concentración final de 0,07 µg/ml, y se continuó la incubación en oscuridad hasta que se produjo la lisis celular. El lisado se centrifugó a 6.000 x g durante 15 minutos y al sobrenadante se le añadió NaCl 0,5 M y polietilenglicol 6.000 al 10% (p/v) (Merck), dejándose precipitar toda la noche a 4 °C. A continuación, se centrifugó a 6.000 x g durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió, en 2% del volumen inicial, en tampón TBT (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8; NaCl 0,1 M y MgCl<sub>2</sub> 0,01 M). La purificación del fago se realizó mediante dos ultracentrifugaciones sucesivas en gradientes de CsCl (Ronda y cols., 1981). La banda azulada que corresponde al fago se dializó frente a tampón TBT.

### **27.1. Observación al microscopio electrónico.**

Una alícuota de la preparación de fago purificado se dializó frente a tampón acetato amónico 100 mM, pH 7,0, y después de la diálisis se puso en contacto con un volumen de fosfotungstato potásico al 2% (pH 7,0). Una gota de esta mezcla se adsorbió durante 5 minutos en rejillas de cobre recubiertas de carbono. A continuación, se eliminó el exceso de líquido y la preparación de fago se observó al microscopio.

Para la visualización al microscopio electrónico del DNA del fago, se añadieron 5 µl de formamida y 1 µl de tampón fosfato potásico 1M, pH 7,0 a 3 µl de la preparación de fago purificado. La mezcla se hirvió durante 2 minutos y, a continuación, se le añadió 1 µl de NaClO<sub>4</sub> 1 M, incubándose a 37 °C durante 45 minutos. Por último, la muestra se colocó sobre las rejillas siguiendo la técnica del carbonato (Spiess y Lurz, 1988) y utilizando citocromo c como coadyuvante.

Las muestras se analizaron, a los aumentos adecuados para cada caso, en un microscopio electrónico Philips EM 300 a 80 kv.

**28. OBTENCION DEL DNA DEL FAGO EJ-I.**

El DNA del fago EJ-I se obtuvo a partir de la preparación de fago purificado mediante tratamiento con SDS y proteinasa K, según se describe en Inciarte y cols. (1976).

**III. RESULTADOS**

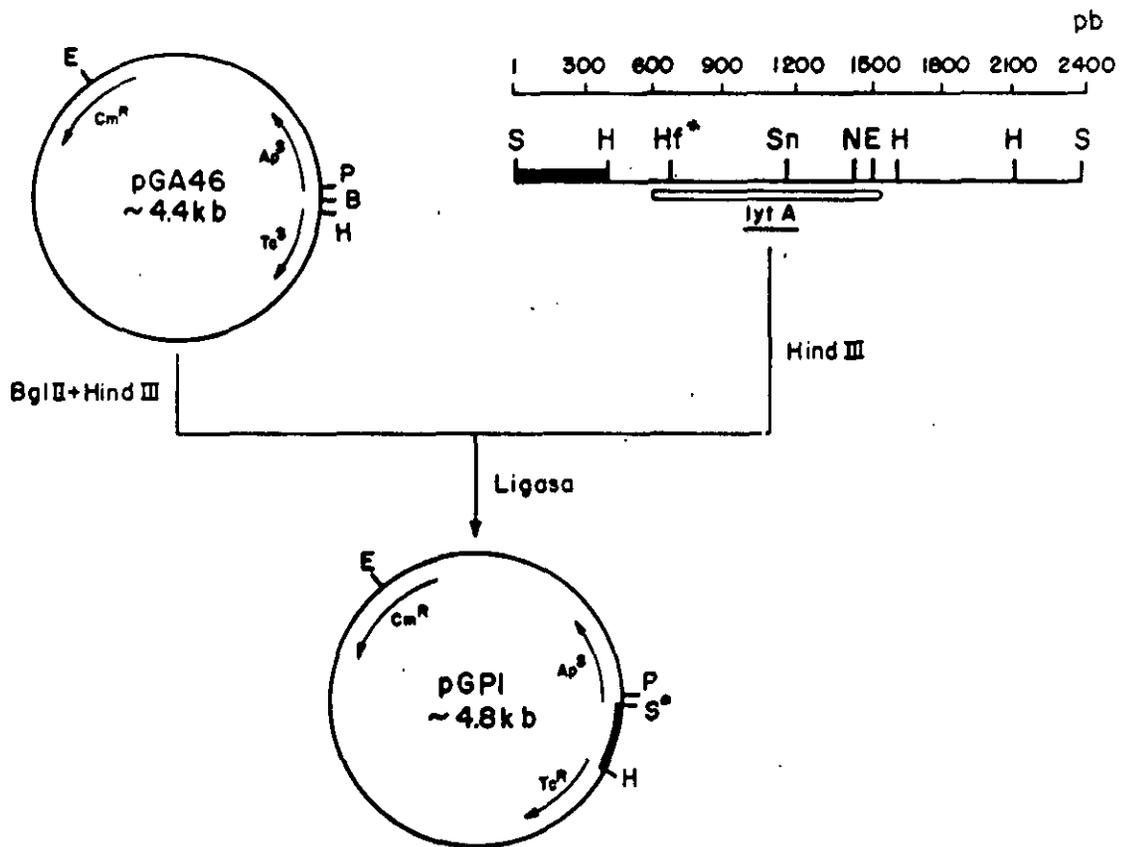
## **I. CARACTERIZACION DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCION DEL GEN *lytA*.**

Como ya se comentó en el apartado 4.6.1.1.5. de la Introducción, la región estructural del gen *lytA* se encuentra definida dentro de un fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb (García y cols., 1986 c) (Figura 8). Estudios basados en la búsqueda de homología con los promotores ya descritos para genes de *E. coli*, revelaron la existencia de varios sitios posibles para la iniciación de la transcripción del gen *lytA* en el fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb (García y cols., 1986 c). Sin embargo, dado que la localización precisa del promotor y terminador del gen *lytA* no era conocida, se decidió caracterizar la unidad de transcripción de dicho gen. La única unidad de transcripción descrita en *S. pneumoniae* hasta la fecha era la correspondiente al gen *polA*, gen que presentaba una atípica *región leader* de tan sólo 2 nucleótidos de longitud y, por lo tanto, carecía de un sitio de unión al ribosoma (RBS) en posición 5' (*upstream*) respecto al codón de iniciación de la traducción (López y cols., 1989). La caracterización de la unidad de transcripción del gen *lytA* permitiría comprobar si esa característica atípica antes mencionada se encontraba también en otros genes de neumococo. El análisis del promotor y terminador del gen *lytA* sería también de gran interés para el estudio de la expresión de este gen en *S. pneumoniae*, así como para el desarrollo y construcción de nuevos vectores destinados a la identificación de elementos reguladores de la transcripción génica.

### **1.1 Identificación de la región promotora del gen *lytA*.**

#### **1.1.1. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción.**

Como ya se ha comentado anteriormente, estudios previos indicaban la posibilidad de que el promotor del gen *lytA* se localizase en el fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb que contiene la región estructural del gen (Figura 8). Este fragmento está clonado en los plásmidos pGL80 (García y cols., 1986c) y pRG2 (Ronda y cols., 1987), plásmidos que expresan la amidasa LYTA en *E. coli* y *S. pneumoniae*, respectivamente. Por lo tanto, parecía lógico pensar que el promotor del gen *lytA* pudiese estar contenido en el fragmento de restricción *HindIII-Hinfi* de 0,29 kb, fragmento que comprende una secuencia de 0,2 kb de la región 5' no codificante del gen y 0,09 kb del comienzo de su región estructural (Figura 8). Empleando el fragmento de restricción *HindIII-Hinfi* de 0,29 kb y los RNAs extraídos de *E. coli* HB101 (pGL80) y *S. pneumoniae* M31 (pRG2), se observó una protección completa de este fragmento frente a la acción de la nucleasa S1, lo que indicaba que el promotor del gen *lytA* no se localiza en el fragmento *HindIII* de 1,2 kb, como previamente se había postulado. Por esta razón, se analizó un



**Figura 8.** Subclonación del promotor del gen *lytA* en el plásmido pGA46.

Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción más relevantes son : B, *Bgl*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*II; Hf, *Hinf*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sau*3AI; Sn, *Sna*BI. Los asteriscos indican la presencia de otras dianas de restricción *Hinf*I o *Sau*3AI. La región estructural del gen *lytA* se representa con una barra blanca. En trazo grueso se muestra el fragmento de DNA que contiene el promotor del gen *lytA*. La posición y la dirección de la transcripción de los genes se indica con una flecha. La secuencia del fragmento *Sau*3AI de 2,3 kb del plásmido pGL65 se detalla en la Figura 11.

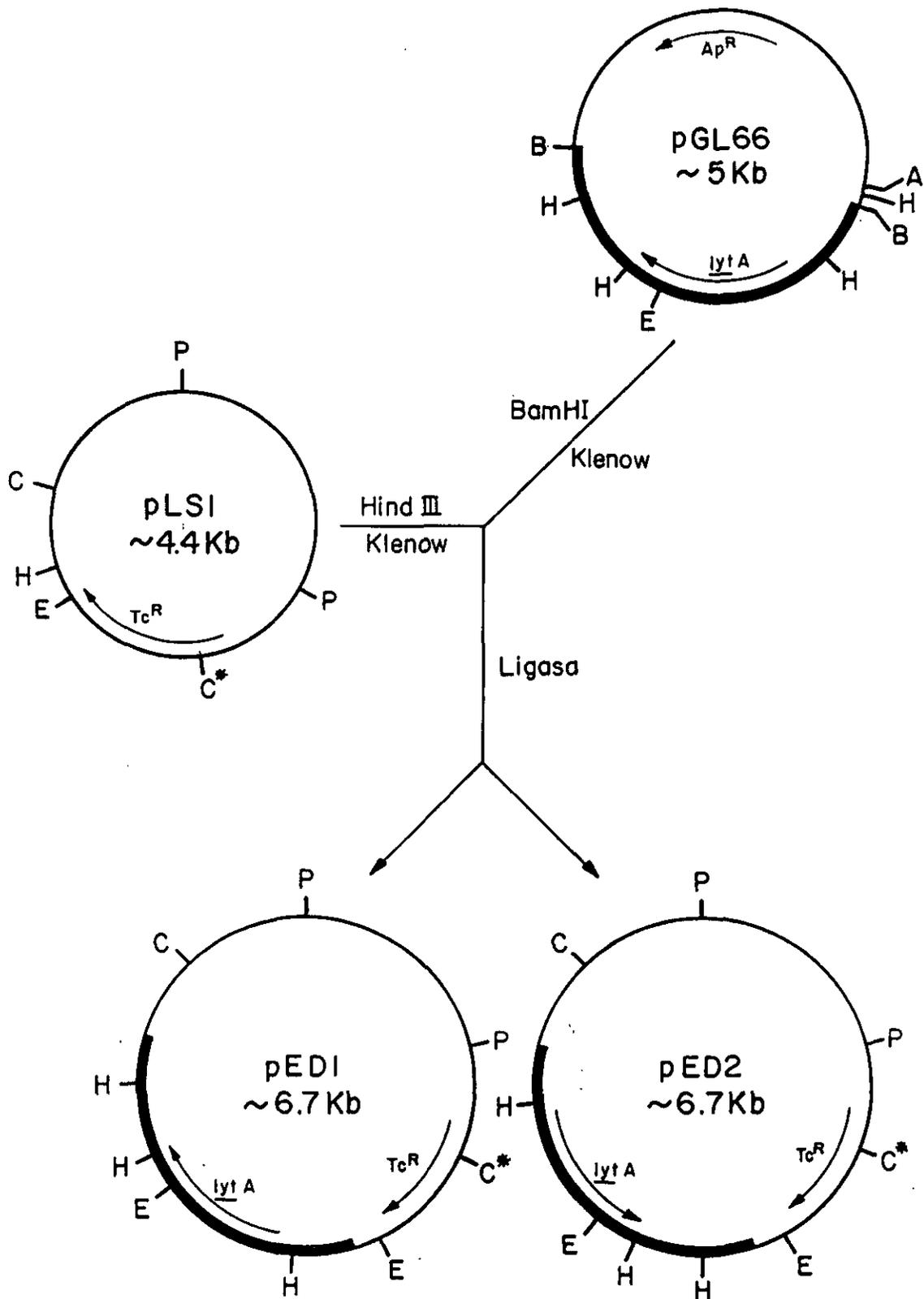
fragmento de restricción de mayor tamaño, el fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb clonado en el plásmido pGL65 (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a). La posición del gen *lytA* en el mapa físico de dicho fragmento se detalla en la Figura 8.

Cuando se realizó un ensayo de transcripción-traducción *in vitro* empleando como molde el fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb (apartado 24. de Materiales y Métodos), el extracto obtenido mostró actividad hidrolítica sobre paredes celulares de *S. pneumoniae*. Este resultado sugería la existencia en el fragmento *Sau3AI* de una secuencia promotora de la transcripción del gen *lytA* que permitía la expresión de la amidasa LYTA en *E. coli*.

El empleo del plásmido pGA46 de *E. coli* (An y Friesen, 1979), un plásmido para la búsqueda de promotores, ratificó el resultado obtenido con los ensayos de transcripción-traducción *in vitro*. Así, cuando el fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb se digirió con la enzima de restricción *HindIII* y los fragmentos resultantes se ligaron al plásmido pGA46, previamente digerido con las enzimas de restricción *HindIII* o con *HindIII* y *BglII*, sólo se detectaron transformantes de *E. coli* resistentes a tetraciclina cuando el plásmido pGA46 se había digerido con *HindIII* y *BglII*. Todos los plásmidos aislados de estos transformantes eran idénticos (pGPI) y contenían un inserto correspondiente al fragmento *Sau3AI-HindIII* de 0,38 kb (Figura 8). Este resultado demostraba la existencia en el fragmento *Sau3AI-HindIII* de 0,38 kb de una región promotora de la transcripción funcional en *E. coli*.

Para comprobar si el fragmento de restricción *Sau3AI* de 2,3 kb también expresaba la amidasa LYTA en *S. pneumoniae*, se subclonó dicho fragmento en el plásmido pLS1, un plásmido que se replica tanto en *E. coli* como en *S. pneumoniae* (Stassi y cols., 1981; Lacks y cols., 1986 a). La estrategia seguida para la subclonación se detalla en la Figura 9. Dado que la manipulación genética es más sencilla en *E. coli* que en *S. pneumoniae*, los plásmidos resultantes, pED1 y pED2, se aislaron a partir de transformantes de *E. coli* C600 seleccionados por su resistencia a tetraciclina y por su actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo. Los plásmidos pED1 y pED2 contienen el fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb clonado en las dos orientaciones posibles (Figura 9). Cuando se transformó *S. pneumoniae* M31, una cepa que presenta una delección completa del gen *lytA* y, por lo tanto, de fenotipo *Lyt*<sup>-</sup> (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a), con los plásmidos recombinantes pED1 y pED2, los transformantes mostraron un fenotipo *Lyt*<sup>+</sup> en ambos casos. Además, en los extractos de las cepas M31 (pED1) y M31 (pED2) se detectó una importante actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo (Tabla 3). Estos resultados sugerían la existencia de un promotor para el gen *lytA* que se localizaba en el fragmento de restricción *Sau3AI* de 2,3 kb y que era funcional en *S. pneumoniae*.

Para determinar la localización del promotor del gen *lytA* era necesario conocer previamente la secuencia de nucleótidos del fragmento de restricción *Sau3AI* de 2,3 kb. La



**Figura 9.** Construcción de los plásmidos pED1 y pED2.

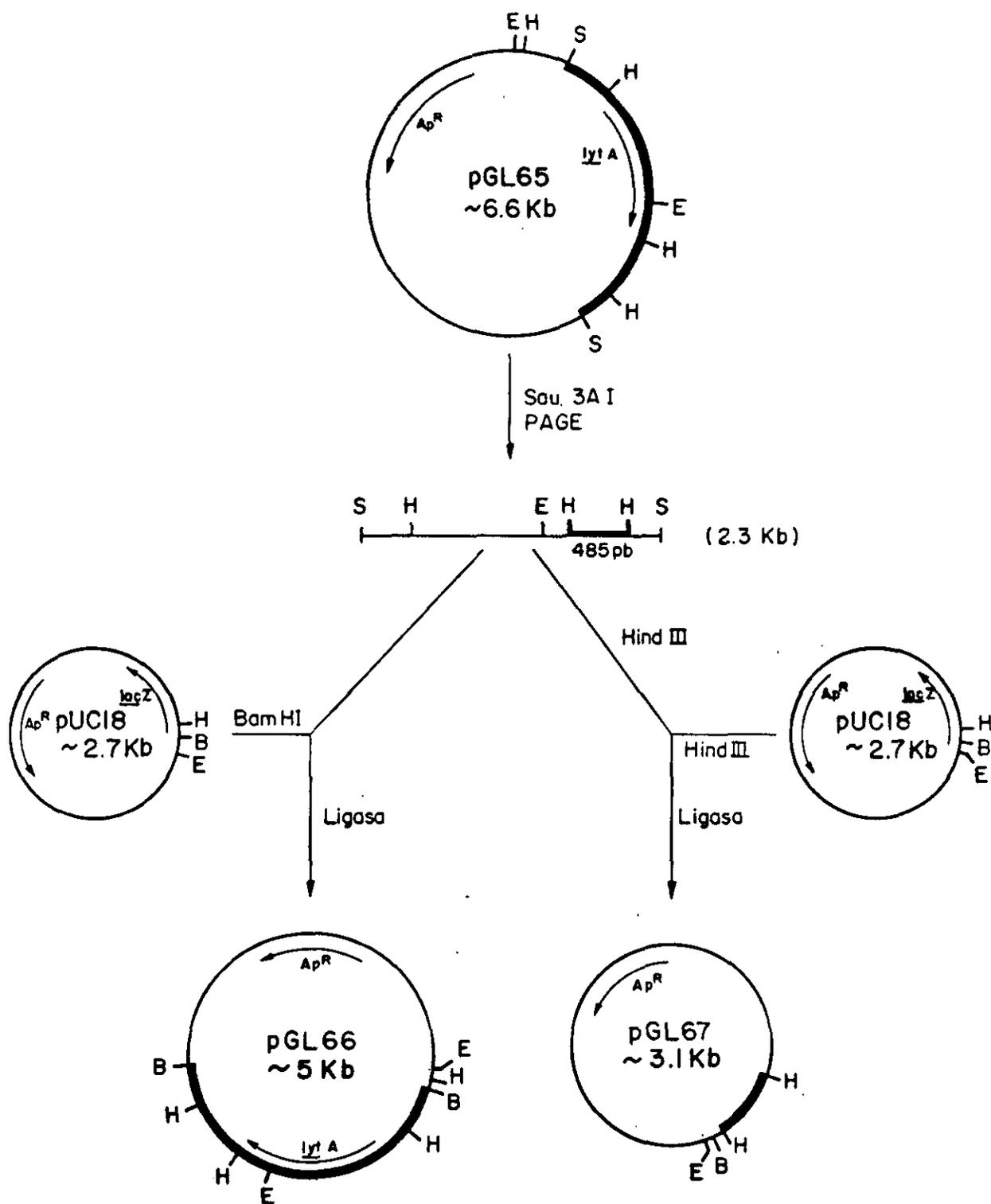
En trazo grueso se representa el fragmento de 2,3 kb del plásmido pGL65. La posición y la dirección de la transcripción de los genes se indica con una flecha. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción más relevantes son : A, *AccI*, B, *BamHI*, C, *ClaI*, E, *EcoRI*, H, *HindIII*, P, *PstI*. C , significa que la diana *ClaI* se metila en presencia de metiltransferasas *Dam*. Klenow, indica el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. El plásmido pGL66 (Figura 10) es un derivado de pUC18 que contiene clonado el fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb del plásmido pGL65.

construcción de los plásmidos pGL66 y pGL67 (Figura 10) fue necesaria para la secuenciación completa de este fragmento. En la Figura 11 se muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento *Sau3A1*.

Una vez conocida la secuencia de nucleótidos del fragmento *Sau3A1*, se procedió a la localización del promotor del gen *lytA* utilizando el fragmento de restricción *Sau3A1-Hinfl* de 0,67 kb (Figuras 8 y 12 A) y los RNAs extraídos de *E. coli* HBI01 (pGL65) y *S. pneumoniae* M31 (pED2). Después de la digestión con la nucleasa *SI* se observó la existencia de dos fragmentos de DNA, uno mayoritario y otro minoritario, que habían resultado protegidos. El fragmento mayoritario, de 326-330 pb, resultó protegido con los RNAs de *E. coli* y de *S. pneumoniae* (Figura 12 C). El fragmento minoritario, de 284-286 pb, sólo fue detectado mediante el empleo de RNAs de *E. coli* (Figura 12 B y C). Los RNAs controles, extraídos de *E. coli* (pBR325) y *S. pneumoniae* M31, no originaron fragmentos de DNA protegidos (Figura 12 B y C). Aunque no se puede descartar un efecto de *nibbling* debido a la nucleasa *SI* (Sollner-Webb y Reeder, 1979), estos resultados localizan, con bastante precisión, el principal sitio de iniciación de la transcripción (promotor P1) del gen *lytA* a 240 pb del codón de iniciación de la traducción (ATG), en el nucleótido 343 de la secuencia que se muestra en la Figura 11. Un segundo sitio de iniciación de la transcripción (promotor P2), sólo presente en *E. coli*, se localiza a 43 pb de P1, en el nucleótido 386 de la secuencia del fragmento *Sau3A1* (Figura 11).

### 1.1.2. Análisis de las secuencias promotoras y de la región leader.

Cuando se analiza la secuencia de nucleótidos localizada *upstream* del sitio de iniciación de la transcripción de P1, se observa la existencia de dos secuencias características de promotores de genes procariotas reconocidos por la subunidad  $\sigma_{70}$  de la RNA polimerasa (Hawley y McClure, 1983). Una de ellas contiene una región -10 (TAAAGT) (nucleótido 328) situada a 17 pb de una región -35 (TTGACT) (nucleótido 305) y a 10 pb del sitio de inicio de la transcripción (Figura 11). La otra secuencia contiene una región -10 (TAGTAT) (nucleótido 335) situada a 15 pb de una región -35 (TTTATA) (nucleótido 314) y a 3 pb del inicio de la transcripción (Figura 11). Las secuencias TAGTTTA (nucleótido 290) y CTTTTG (nucleótido 302), a 8 pb y 6 pb por delante (*upstream*) de las respectivas regiones -35 (Figura 11), podrían corresponder a las regiones -44 descritas para algunos promotores procariotas (Galas y cols., 1985). En cualquier caso, idénticas regiones -44, -35 y -10 ya se han descrito para algunos promotores de *E. coli* (Galas y cols., 1985; Harley y Reynolds, 1987). Una región -10 (TATAAT), idéntica a la región -10 consenso para promotores de *E. coli*, se localiza en el nucleótido 323, pero no se observa la correspondiente región -35 a una distancia adecuada (Figura 11).



**Figura 10.** Construcción de los plásmidos pGL66 y pGL67.

En trazo grueso se representa el fragmento o partes del fragmento de restricción *Sau3A*I de 2,3 kb. La posición y la dirección de la transcripción de los genes se indica con una flecha. Las abreviaturas de las dianas de restricción más relevantes son : B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sau3A*I. PAGE, indica que el aislamiento y purificación del fragmento *Sau3A*I se llevó a cabo mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 19.2. de Materiales y Métodos). El plásmido pUC18 se describe en Messing (1983).

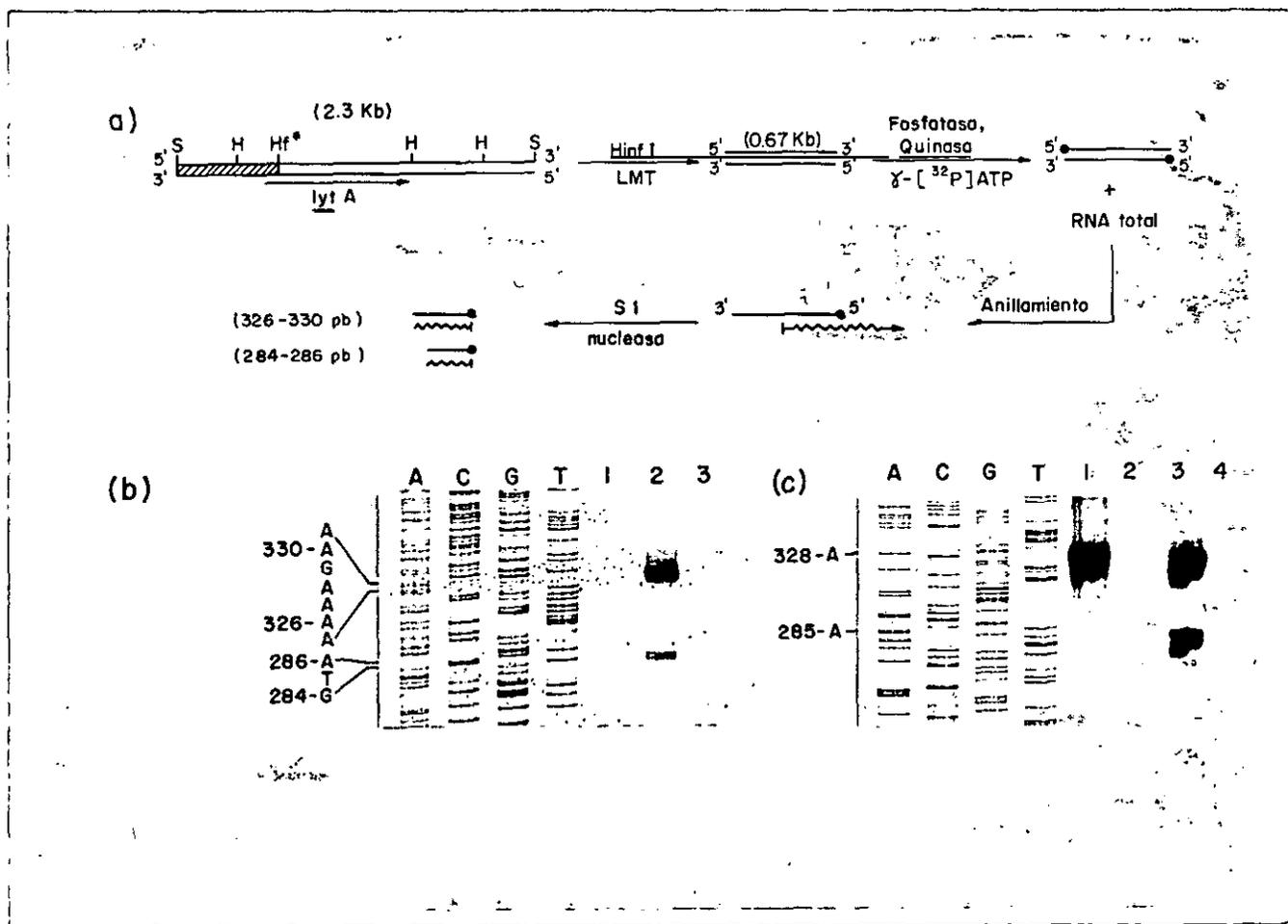
```

GATCCTTCCTCTAGTTTCTAGCTTTATTGAACTAATCGGAAAAATCGTTTTGTGGTTTTGATTATTCCTTGGGCAGGAT 80
ATAAGGGTGTATCCTTTGTGAACCTCTTATCTGGGTTGCCATGACAGTTCACCTGTACTTCTCATTATTCGGTCATCCC 160
TTGATAAAGAAGGCAAGGCAATCTTGCCAACCAAAGTGAATCCTAGTTGGATTACTGAATAAAATCCATTTCTCTA 240
GTGAAAATCGAAAAAAGCTTGTGTTCTCGTCTTTAGTTGGTGTGAAAATAGTTTAAACAGACTTTTGACTTCTTTTATAT 320
--10-- --10--P1* --35-- --10-- P2*
GATATAATAAGTATAGTATTTATGAAAAGGACATATAGAGACTGAAAAATATACTTTTGAAGCTTTTGTAGTCTGGG 400
M K R T Y R D C K N I L L K S F L V W
GTGTTATTGTAGATAGAATGCAGACCTTGTGAGTCTATTTACAGTGTCAAATAGTGCCTTTTGAAGTCTATCTACAA 480
G V I V D R M Q T L S V L F T V S K END
M R F E V L S T
=====
GCCTAATCGTACTAAGATTGTCTTCTTTGTAAGGTAGAAAATAAGGAGTTTCTGGTCTGGATTGAAAAAATGAGTTG 560
S L I V T K I V F F V R END
TTTTAATTGATAAGGAGTAGAATATGGAAATT ..... 942 bp .....AAATAA 1540
M E I ..... lytA ..... K END
=====
TAATGGAATGTCTTTCAAATCAGAACGCGCATATTATTAGGCTTGAAGCTTAAATAGTATGCGTTTTCTTGTGGAG 1620
ATATTCCTTCAATGTTTGTACTATATTAAACAAAAATCAGAAAGCAAAGTATGCTCAAATAAAATCTAAA 1700
TTTGACAATGTAAACCGAGTCGGATAGCTTTAAGTACTGTTTTGAGGTGAAGATACGATTTTTGATAGGAACTCATCAA 1780
TTTTAGATTTTTAAGCAGCATCAATAAATGCTTCTTGTGTTTGTGATAATTTTTTTTATTTAAAAAATATGACAAAAGT 1860
GTGCTATTCTTTTTATGAGAGGTGTATGAATATGATAAATGTATGTGATAAATGTATGTGATGTTGGAAAAAGAATAAAA 1940
GAACCTAGAATATCTTCAAATCTTACTCAAGATAAGATTGCTGAATATTTGTCTTTATATTTGCTTTGAATCAAAGCAT 2020
GATTGCCAAAATGGAAAAAGGTGAAAGGAATATCACGGATGGATTTAAGTAATAAGCTTCAAATCTTAGAAAAAAGTTG 2100
GGAGCTGATGGTGAAGCGCCGATAGATATTTTAAATTGGTACAAAAGATAGAAAATTTGACGCTGGTATTTTATGGACT 2180
CGGAAAGATATTAGCGGAGTCTGTTATAAAGGAAGTCAAGTTCAGTCTCATTGCAGTCAATTCAGACATGTCATTAGGAAG 2260
GTAAAGATTTCTTTAGCACATGAACTGTATCATCTTTATATGATGAGGTGAAGAAGAGTTCAGTCACTTATCTTGA 2340
TTGGTGAAGGAGATGAAACTGAAAGAAAAGCGGATC 2376

```

**Figura 11.** Secuencia de nucleótidos del fragmento *Sau3AI* de 2,3 kb que contiene el gen *lytA* de *S. pneumoniae*.

Sólo se detalla la secuencia de la hebra de DNA que corresponde al RNA mensajero. Los asteriscos indican los sitios de iniciación de la transcripción en los promotores P1 y P2. Se muestran también las posibles regiones -35 y -10. Los marcos de lectura abiertos (ORFs) se representan como secuencias de aminoácidos en código de una letra. La secuencia de la región estructural del gen *lytA* ha sido determinada por García y cols. (1986c). Los posibles bucles en la región *leader* y en el terminador de la transcripción se señalan con una doble línea discontinua. Las dianas de restricción *HindIII* se marcan con una línea continua. Los números situados en el margen derecho indican el número de nucleótido en la secuencia.



**Figura 12.** Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *lytA* en *S. pneumoniae* y en *E. coli*.

**Panel (a).** Estrategia empleada. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción más relevantes son: H, *Hind*III; Hf, *Hinf*I; S, *Sau*3AI. El asterisco significa que la diana *Hinf*I no es única en el fragmento. La posición y dirección de la transcripción del gen *lytA* se señala con una flecha. LMT, indica que el fragmento de restricción fue aislado y purificado mediante una electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (apartado 19.1. de Materiales y Métodos). Los RNAs se representan con una línea quebrada. El marcaje radiactivo en los extremos 5' del fragmento de DNA se indica con un círculo negro.

**Paneles (b) y (c).** Determinación, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-urea, del tamaño de los fragmentos de DNA protegidos de la digestión con la nucleasa S1. En las calles A, C, G y T, se muestra la secuencia empleada como referencia para calcular la longitud en pb del fragmento de DNA protegido. Las letras situadas en el margen izquierdo representan los nucleótidos de la secuencia de referencia; los números indican la longitud en pb de los fragmentos de DNA protegidos.

**Panel (b).** Las calles 1 y 2 muestran los fragmentos de DNA protegidos por los RNAs de *E. coli* HB101 (pBR325) y *E. coli* HB101 (pGL65), respectivamente. La calle 3 corresponde a la digestión con la nucleasa S1 en ausencia de RNA.

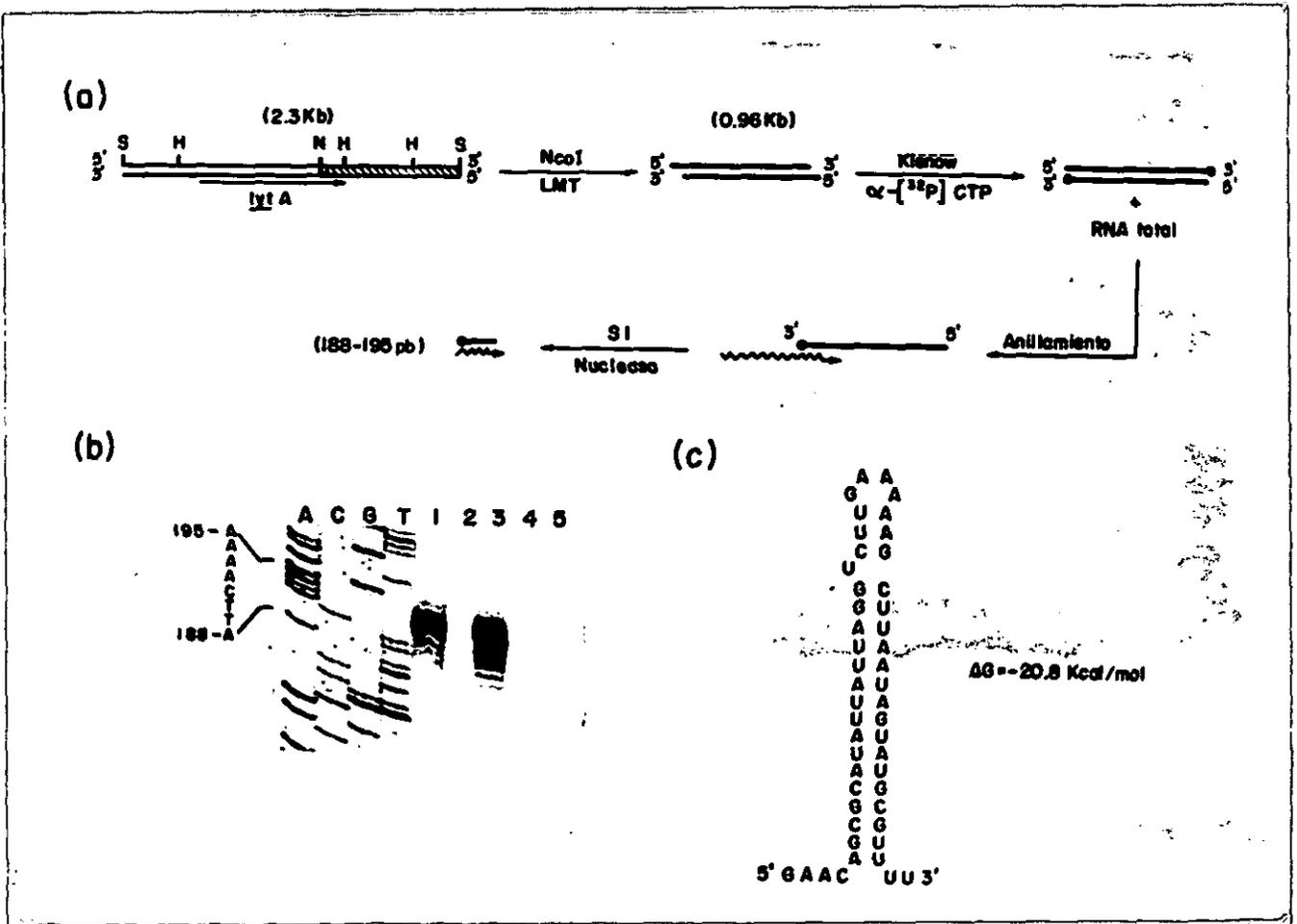
**Panel (c).** Las calles 1 a 3 muestran los fragmentos de DNA protegidos por los RNAs de *S. pneumoniae* M31 (pED2), *S. pneumoniae* M31, y *E. coli* HB101 (pGL65), respectivamente. La calle 4 corresponde a la digestión con la nucleasa S1 en ausencia de RNA.

En posición anterior al segundo sitio de iniciación de la transcripción (promotor P2) se observa una región -10 (TATACT) (nucleótido 372) situada a 17 pb de una región -35 (AGGACA) (nucleótido 349) y a 9 pb del inicio de la transcripción (Figura 11). Este segundo lugar de iniciación de la transcripción no se ha detectado en *S. pneumoniae* y la región -35 propuesta tampoco se ha descrito hasta la fecha para ningún promotor de *E. coli*.

La región que se extiende desde el inicio de la transcripción en el promotor P1 hasta el codón de iniciación de la traducción del gen *lytA*, región *leader*, presenta como característica peculiar su gran longitud (240 pb). Aunque regiones *leader* similares, e incluso de mayor longitud, se han descrito en la literatura (Friesen y cols., 1983; Benner-Lugger y Boss, 1988), se trata de una propiedad poco frecuente y generalmente relacionada con mecanismos de regulación génica. La región *leader* del gen *lytA* tiene un contenido en pb AT (70%) superior al que presenta la región estructural del gen (53%). Se observan dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2) en esta región *leader*. El ORF1 codifica para un polipéptido de 37 aminoácidos que comienza en el codón ATG del inicio de la transcripción P1 (Figura 11); el ORF2 codifica para un polipéptido de 20 aminoácidos que tiene su inicio en el codón GTG localizado en el nucleótido 456 (Figura 11). En ninguno de los dos casos se ha detectado un sitio de unión al ribosoma (RBS) (Shine y Dalgarno, 1974) a una distancia apropiada del correspondiente codón de iniciación de la traducción, lo que hace improbable que estos polipéptidos puedan ser sintetizados. Con la ayuda del programa de ordenador PCFOLD (Zuker y Stiegler, 1981), diseñado para la búsqueda de estructuras secundarias (bucles) en el RNA transcrito, solamente se pudo detectar un bucle suficientemente estable, -5,9 kcal/mol, al final del ORF2 (Figura 11), aunque su significado se desconoce por el momento. No obstante, la ausencia de bucles significativamente estables en la región *leader* era previsible debido a su bajo contenido en C (10%).

## **1.2. Determinación del sitio de terminación de la transcripción en el gen *lytA*.**

Para localizar el extremo 3' del RNA mensajero del gen *lytA* se siguió la estrategia que se detalla en la Figura 13 A. Los RNAs empleados se obtuvieron de *E. coli* HB101 (pGL65) y de *S. pneumoniae* M31 (pED2). Después del tratamiento con la nucleasa S1 se observaron varios fragmentos de DNA protegidos (Figura 13 B). Así, los RNAs extraídos de neumococo originaron ocho fragmentos de protección, dos de ellos mayoritarios (bandas más intensas en la calle 3 de la Figura 13 B). Los RNAs extraídos de *E. coli* también dieron origen a los dos fragmentos de DNA mayoritarios, si bien el número de fragmentos minoritarios protegidos era inferior respecto al caso de neumococo (calle 1 de la Figura 13 B). Los RNAs extraídos de *E. coli* (pBR325) y de *S. pneumoniae* M31 no dieron origen a ningún fragmento de DNA protegido



**Figura 13.** Determinación del sitio de terminación de la transcripción del gen *lytA* en *S. pneumoniae* y en *E. coli*.

**Panel (a).** Estrategia empleada. Las abreviaturas de las dianas de restricción mostradas son : H, *HindIII*; N, *NcoI*; S, *Sau3AI*. La posición y dirección de la transcripción del gen *lytA* se señala con una flecha. LMT, significa que el fragmento de restricción fue aislado y purificado mediante una electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (apartado 19.1. de Materiales y Métodos). Klenow, indica el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Los RNAs se representan con una línea quebrada. El marcaje radiactivo en los extremos 3' del DNA se indica con un círculo negro.

**Panel (b).** Determinación, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-urea, del tamaño de los fragmentos de DNA protegidos de la digestión con la nucleasa S1. En las calles A, C, G y T se muestra la secuencia empleada como referencia para calcular la longitud en pb del fragmento de DNA protegido. Las letras situadas en el margen izquierdo representan los nucleótidos de la secuencia de referencia; los números indican la longitud en pb de los fragmentos de DNA protegidos. Las calles 1 a 4 muestran los fragmentos de DNA protegidos por los RNAs de *E. coli* HB101 (pGL65), *E. coli* HB101 (pBR325), *S. pneumoniae* M31 (pED2) y *S. pneumoniae* M31, respectivamente. La calle 5 corresponde a la digestión con la nucleasa S1 en ausencia de RNA.

**Panel (c).** Bucle de terminación de la transcripción propuesto.

(calles 2 y 4 de la Figura 13 B), tal y como cabía esperar de cepas que no llevan clonado el gen *lytA*. Estos resultados indicaban que la terminación de los transcritos del gen *lytA* en *E. coli* y en *S. pneumoniae* se producía en el nucleótido 1610 y en nucleótidos adyacentes, a 72 pb del codón de terminación de la traducción del gen (nucleótido 1538) (Figura 11). Este sitio se localiza en el extremo 3' de una estructura secundaria en el RNA, estructura de bucle, que presenta una energía libre teórica de -20,8 kcal/mol (Zuker y Stiegler, 1981) (Figura 13 C) y va seguida de una secuencia rica en residuos de uracilo, una característica típica de los terminadores de la transcripción rho-independientes de procariontes (Rosenberg y Court, 1979).

## **2. APLICACION DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCION DEL GEN *lytA* AL DISEÑO DE VECTORES PARA EL ANALISIS TRANSCRIPCIONAL EN BACTERIAS.**

El diseño de vectores plasmídicos destinados a la identificación y análisis en diferentes bacterias de elementos reguladores de la transcripción génica (promotores y terminadores), requiere : i) un plásmido de amplio espectro de huésped que permita el estudio de la transcripción en diferentes sistemas bacterianos; ii) un gen marcador con una secuencia de clonación múltiple (región *polilinker*) en posición anterior al RBS y que exprese una proteína fácilmente detectable y cuantificable en los diferentes huéspedes utilizados. El plásmido pLSE1 (Ronda y cols., 1988) y el gen *lytA* de neumococo clonado en el plásmido pGL103 cumplen esos dos requisitos.

### **2.1. Construcción de los plásmidos pLSE3 y pLSE4.**

El plásmido pLSI (Stassi y cols., 1981; Lacks y cols., 1986 a) es un vector de amplio espectro de huésped ya que se replica tanto en bacterias Gram-positivas (*S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *B. subtilis*) como en Gram-negativas (*E. coli*). Recientemente, se ha determinado que el plásmido pLSI también se replica en *B. stearothermophilus*, *S. sanguis*, *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis* (M. Espinosa, comunicación personal). Sin embargo, pLSI contiene un único gen marcador, el gen *tet* que confiere resistencia a tetraciclina, por lo que no puede ser utilizado como vector de clonación en bacterias que poseen resistencia natural a este antibiótico, como ocurre, por ejemplo, con *S. oralis* (Ronda y cols., 1988). Por este motivo, se construyó el plásmido pLSE1, un derivado de pLSI que contiene los genes *tet* y *erm* que confieren resistencia a tetraciclina y eritromicina, respectivamente (Figura 14 A) (Ronda y cols., 1988). La presencia de ambos genes marcadores en pLSE1 mejora la utilidad de pLSI como vector de amplio espectro de huésped y permite una fácil selección del inserto clonado por inactivación insercional de uno de los dos genes que confieren resistencia antibiótica.

Mediante técnicas de mutagénesis dirigida se había construido el plásmido pGL83 que presenta una diana de restricción *Xba*I situada 18 nucleótidos antes del codón de iniciación de la traducción (AUG) del gen *lytA* (García y cols., 1987 b). La digestión de pGL83 con *Xba*I y *Bam*HI origina un fragmento de restricción que contiene el RBS y la región estructural del gen *lytA*, pero carece del promotor y la región *leader* de dicho gen. En la Figura 14 A se detalla la subclonación de este fragmento *Xba*I-*Bam*HI en el plásmido pUC19 de *E. coli* (Messing, 1983). El plásmido resultante, pGL103, presenta nuevas dianas de restricción (secuencia de clonación múltiple) precediendo al RBS del gen *lytA*. En los extractos crudos de *E. coli* JM83 (pGL103) se detectó actividad hidrolítica inducible por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) sobre paredes



celulares de neumococo. Este resultado indicaba que la secuencia de clonación múltiple no creaba ninguna señal de terminación de la transcripción que inhibiese la expresión del gen *lytA*, y que la misma se encontraba bajo el control del promotor *lac* ya que era inducible por IPTG.

Para la construcción de un vector destinado a la identificación y análisis de regiones promotoras de la transcripción se siguió la estrategia que se detalla en la Figura 14 A. Los plásmidos pLSE3 y pLSE4, que contenían el gen *lytA* clonado en orientaciones opuestas, se aislaron a partir de transformantes de *E. coli* C600 resistentes a tetraciclina. El gen *lytA* subclonado en pLSE3 y pLSE4 carecía de su propio promotor y tampoco se habían descrito hasta la fecha sitios de iniciación de la transcripción próximos a la diana de restricción *HindIII* de los plásmidos pLS1 y pLSE1. Por este motivo, no era previsible la expresión del gen *lytA* en los plásmidos pLSE3 y pLSE4, y ambos deberían ser útiles como vectores plasmídicos para la búsqueda y análisis de promotores. Así, en efecto, en los extractos crudos de *E. coli* C600 (pLSE4) no se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo (Tabla 2). Sin embargo, y en contra de lo esperado, los extractos de *E. coli* C600 (pLSE3) sí hidrolizaban dichas paredes (Tabla 2).

Cuando se transformó la cepa de neumococo M31 (Tabla 1) con los plásmidos pLSE3 y pLSE4, los transformantes presentaron un fenotipo  $Lyt^+$  y  $Lyt^-$ , respectivamente. En los extractos crudos de M31 (pLSE3) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo, sin embargo, en los extractos crudos de M31 (pLSE4) no se pudo detectar tal actividad (Tabla 2). Estos resultados ratificaban los obtenidos con *E. coli* C600 (pLSE3) y *E. coli* C600 (pLSE4) (Tabla 2), y sugerían la posibilidad de utilizar el plásmido pLSE4, tanto en *E. coli* como en *S. pneumoniae*, para la identificación de regiones promotoras. Así, si el fragmento de DNA clonado en pLSE4 tuviese actividad promotora de la transcripción, habría expresión del gen *lytA*, lo que originaría un fenotipo  $Lyt^+$  en neumococo y actividad hidrolítica de pared en los extractos de neumococo y *E. coli*. Los niveles de actividad hidrolítica en estos extractos reflejarían la fuerza del promotor clonado.

El plásmido pLSE4 posee varias dianas de restricción en su secuencia de clonación múltiple (*XbaI*, *SphI*, *SalI*, y *AccI*) que son únicas en el vector, y que se localizan antes del RBS del gen *lytA* (Figura 14 A y B). Estas dianas son compatibles con las correspondientes a otras endonucleasas de restricción, así por ejemplo, *AccI* es compatible con *ClaI*, *HinPI*, *TaqI*, *NarI*, *Maell*, *MspI*, *FspII*, *HpaII*, *AhaI*; *XbaI* es compatible con *SpeI*, *AvrII*, *NheI*; *SalI* lo es con *XhoI*; y *SphI* es compatible con *NlaIII* y *NspI*. Además, el vector presenta un codón de terminación de la traducción en los tres marcos de lectura posibles entre las dianas de restricción de la secuencia de clonación múltiple y el codón de iniciación de la traducción (AUG) del gen *lytA*, evitando así la posibilidad de que se formen proteínas de fusión no deseadas (Figura 14 B).

**TABLA 2.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en extractos crudos de las cepas que se indican.

Plásmido	Actividad específica (unidades/mg proteína)		
	<i>S. pneumoniae</i> M31	<i>S. oralis</i> NCTC11427	<i>E. coli</i> C600
pLSE1	< 1	< 1	< 1
pLSE3	1.600	840	730
pLSE4	< 1	< 1	< 1
pLSE11	4.700	< 1	< 1
pLSE14	280	< 1	660

Los valores son la media de 3 experimentos. Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 6. de Materiales y Métodos. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se detalla en los apartados 9.1.1. y 9.1.2. de Materiales y Métodos. Se utilizaron como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina.

Puesto que no se ha descrito la presencia de ningún promotor localizado en la región 3' no codificante del gen *tet* en el plásmido pLS1 (Lacks y cols., 1986 a), parece razonable atribuir la expresión de la amidasa LYTA en el plásmido pLSE3 al promotor del gen *tet* (Ballester y cols., 1990) mediante un mecanismo de *readthrough*.

## **2.2. Transformación de *S. oralis* con los plásmidos pLSE3 y pLSE4.**

Puesto que la actividad de la amidasa LYTA está más estrictamente regulada en *S. oralis* que en *S. pneumoniae* (Ronda y cols., 1988), *S. oralis* podría ser el huésped idóneo para utilizar el plásmido pLSE4 en la clonación y análisis de promotores fuertes que pudieran ser letales en neumococo. Como los plásmidos pLSE3 y pLSE4 contienen un origen de replicación funcional en *S. oralis* NCTC 11427 (Ronda y cols., 1988), se transformó esta cepa con dichos plásmidos y se analizó el fenotipo *Lyt* de los transformantes utilizando la técnica de los filtros desarrollada para neumococo (apartado 3. de Materiales y Métodos). *S. oralis* (pLSE3) mostró un fenotipo *Lyt*<sup>+</sup> (DOC<sup>+</sup>) mientras que *S. oralis* (pLSE4) presentó un fenotipo *Lyt*<sup>-</sup> (DOC<sup>-</sup>), un resultado similar al obtenido con las cepas de neumococo M31 (pLSE3) y M31 (pLSE4). Los niveles de actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo detectados en los extractos de *S. oralis* (pLSE3) y *S. oralis* (pLSE4) (Tabla 2) estaban de acuerdo con los fenotipos señalados anteriormente para estas dos cepas. Estos resultados demostraban la posibilidad de utilizar *S. oralis* como un huésped alternativo para el análisis de los promotores clonados en el plásmido pLSE4.

## **2.3. Utilización del plásmido pLSE4 como un vector para la búsqueda de promotores en bacterias.**

Los resultados presentados en los apartados 2.1. y 2.2. sugerían la posibilidad de utilizar el plásmido pLSE4 en *S. pneumoniae*, *S. oralis* y *E. coli*, como un vector para el aislamiento e identificación de promotores. Para demostrar esto experimentalmente, se digirió el DNA cromosómico de *S. pneumoniae* M31 con las enzimas *Cla*I o *Sa*II, y los fragmentos de restricción resultantes se ligaron a pLSE4 digerido con *Ac*cI (ligación A) o *Sa*II (ligación B), respectivamente. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *S. pneumoniae* M31, y se determinó el fenotipo *Lyt* de los transformantes resistentes a tetraciclina. Un 20% y un 4% de los transformantes procedentes de las ligaciones A y B, respectivamente, mostraron un fenotipo *Lyt*<sup>+</sup>. De entre los primeros se aisló la cepa *S. pneumoniae* M31 (pLSE11), que contiene clonado en la diana *Ac*cI de pLSE4 un inserto de DNA de 4,5 kb que induce la expresión de actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo (Tabla 2). De los transformantes de la ligación B se aisló la cepa de neumococo M31 (pLSE14), que contiene clonado un inserto de DNA de 2,3

kb en la diana *Sall* de pLSE4 y que también hidroliza paredes celulares de neumococo (Tabla 2). En ambos casos, por lo tanto, el fragmento clonado posee una actividad promotora que induce la transcripción del gen *lytA*. Esta actividad no puede ser atribuida al promotor de dicho gen, ya que el DNA cromosómico utilizado procede de *S. pneumoniae* M31, una cepa que presenta la delección de toda la unidad de transcripción del gen *lytA* (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a).

Los anteriores resultados demostraban que el plásmido pLSE4 podía ser utilizado para el aislamiento y análisis de promotores en *S. pneumoniae*. Dado que este vector puede replicarse también en *S. oralis* y *E. coli*, se analizó en estos sistemas heterólogos la expresión de los dos promotores clonados. Así, cuando se transformó *E. coli* C600 y *S. oralis* NCTC 11427 con el plásmido pLSE11, no se detectó actividad hidrolítica de pared en los extractos de los transformantes resistentes a tetraciclina (Tabla 2). El análisis de plásmido en *E. coli* (pLSE11) y *S. oralis* (pLSE11) reveló la presencia de plásmidos de tamaño inferior al esperado, lo que indicaba la existencia de delecciones en pLSE11. Esta inestabilidad de los plásmidos que contienen secuencias de DNA de neumococo ha sido descrita varias veces en la literatura (Stassi y Lacks, 1982; Chen y Morrison, 1987; Martin y cols., 1989), y es uno de los principales problemas para la clonación de genes de *S. pneumoniae* en *E. coli*. Sin embargo, la situación era distinta cuando se analizaba el inserto de 2,3 kb del plásmido pLSE14. Aunque este plásmido era aparentemente estable en *E. coli* y *S. oralis*, sólo se pudo detectar actividad hidrolítica de pared en extractos de *E. coli* (Tabla 2). Si pLSE14 aislado de *S. oralis* se empleaba para retransformar *E. coli* C600 o *S. pneumoniae* M31, los extractos crudos de las cepas transformantes eran activos sobre paredes de neumococo, demostrando que el promotor clonado en pLSE14 era funcional en *E. coli* y *S. pneumoniae* pero no en *S. oralis*.

Los resultados presentados demuestran la utilidad de pLSE4 como vector para la búsqueda de promotores de neumococo y para el estudio de su regulación tanto en el huésped natural como en sistemas heterólogos. Es probable que utilizando el plásmido pLSE4 también se puedan realizar experimentos similares para el aislamiento y análisis de promotores de otras bacterias.

### **3. REGULACION CELULAR DE LA AMIDASA LYTA.**

Dado el carácter lítico de las autolisinas, estas enzimas deberían estar estrictamente reguladas en la célula. El único mecanismo regulador postulado hasta la fecha para la amidasa LYTA de neumococo es el efecto inhibitor del LTA sobre su actividad enzimática, así como la absoluta y específica dependencia de la presencia colina en los ácidos teicoicos de la pared celular para su actividad (Höltje y Tomasz, 1975 a, b; Briese y Hakenbeck, 1985). Por ello, resultaba interesante estudiar si la expresión del gen *lytA* actuaba como otro posible mecanismo de regulación celular de la autolisina LYTA.

#### **3.1. Expresión del gen *lytA* durante el crecimiento celular de neumococo.**

Para comprobar si el gen *lytA* se expresaba constitutivamente en un cultivo de neumococo o si, por el contrario, estaba sometido a algún tipo de regulación, se determinaron los niveles de actividad amidásica durante el crecimiento del cultivo.

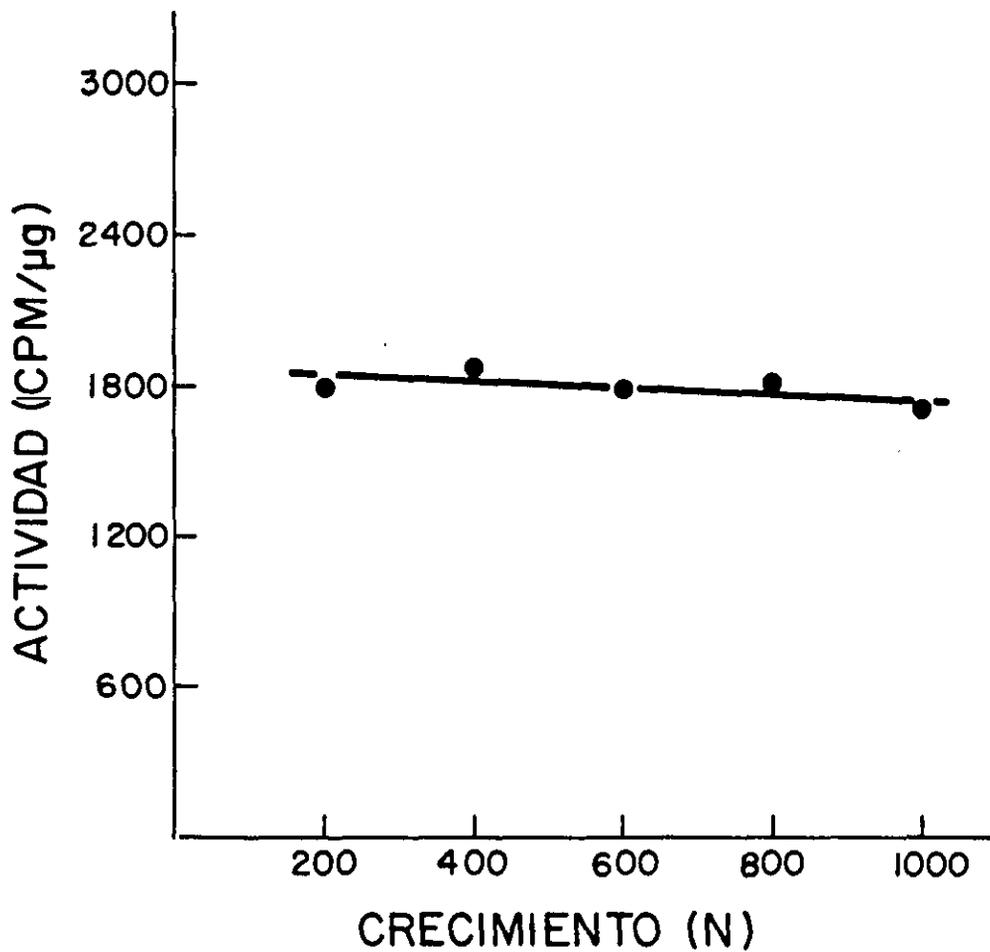
##### **3.1.1. Expresión del gen *lytA* en la cepa R6 de neumococo.**

Para estudiar la expresión del gen *lytA* en el cromosoma de neumococo se utilizó la cepa tipo *S. pneumoniae* R6. En la Figura 15 se muestran los niveles de actividad amidásica durante el crecimiento de la cepa R6 cuando ésta se cultiva en medio C+Y. Como se aprecia en dicha figura, la actividad amidásica aumentaba proporcionalmente al número de células. En ningún caso se observó actividad en el medio de cultivo. Este resultado indicaba que la expresión del gen *lytA* en la cepa R6 era constitutiva.

##### **3.1.2. Expresión del gen *lytA* en las cepas de neumococo M31 (pED1) y M31 (pED2).**

Para analizar la expresión del gen *lytA* cuando éste se encuentra presente en la célula en varias copias, se valoró la actividad amidásica durante el crecimiento de las cepas de neumococo M31(pED1) y M31 (pED2) (apartado 1.1.1.). Los plásmidos pED1 y pED2 contienen clonada la unidad de transcripción del gen *lytA* en el plásmido pLS1 (Figura 9), y su número de copias en la cepa M31 es de 20 y 60, respectivamente (Tabla 3).

En la Tabla 3 se muestra la actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo de los extractos crudos de las cepas M31 (pED1) y M31 (pED2) en fase exponencial y al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. Como se observa en la tabla, los niveles de actividad



**Figura 15.** Actividad de la amidasa LYTA en la cepa R6.

En el eje de ordenadas se representa la actividad hidrolítica de pared detectada en los extractos de la cepa R6 y expresada como CPM liberadas por  $\mu\text{g}$  de proteína. En abscisas se representa el crecimiento, expresado en unidades nefelométricas (N), de la cepa R6 cultivada en medio C+Y. Los extractos se obtuvieron y se ensayaron durante 10 minutos como se describe en los apartados 6. y 9.1.2. de Materiales y Métodos. Se utilizaron como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [metil- $^3\text{H}$ ]colina.

**TABLA 3.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos crudos de las cepas de *S. pneumoniae* que se indican.

Cepa	Plásmido	No. copias <sup>a</sup> plásmido	A.E. <sup>b</sup> (exponencial)	A.E. <sup>c</sup> (estacionaria)
M31 (pED1)	pED1	20	13.100	10.500
M31 (pED2)	pED2	60	6.000	7.300
R6	--	--	1.800	1.700

Los valores son la media de 2 experimentos.

A.E., Actividad específica. Se expresa en CPM/ $\mu$ g proteína (en 10 minutos de ensayo).

Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 6. de Materiales y Métodos.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se detalla en el apartado 9.1.2. de Materiales y Métodos, empleando como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina.

<sup>a</sup> El número de copias de los plásmidos se determinó como se describe en el apartado 16.1. de Materiales y Métodos.

<sup>b</sup> El extracto empleado procede de un cultivo en fase exponencial de crecimiento.

<sup>c</sup> El extracto empleado procede de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento.

amidásica en estas dos cepas eran significativamente superiores a los presentados por la cepa R6, lo cual era de esperar dado el elevado número de copias de los plásmidos pED1 y pED2. Sin embargo, y al igual que ocurría con la cepa R6, la expresión del gen *lytA* en M31 (pED1) y M31 (pED2) era constitutiva.

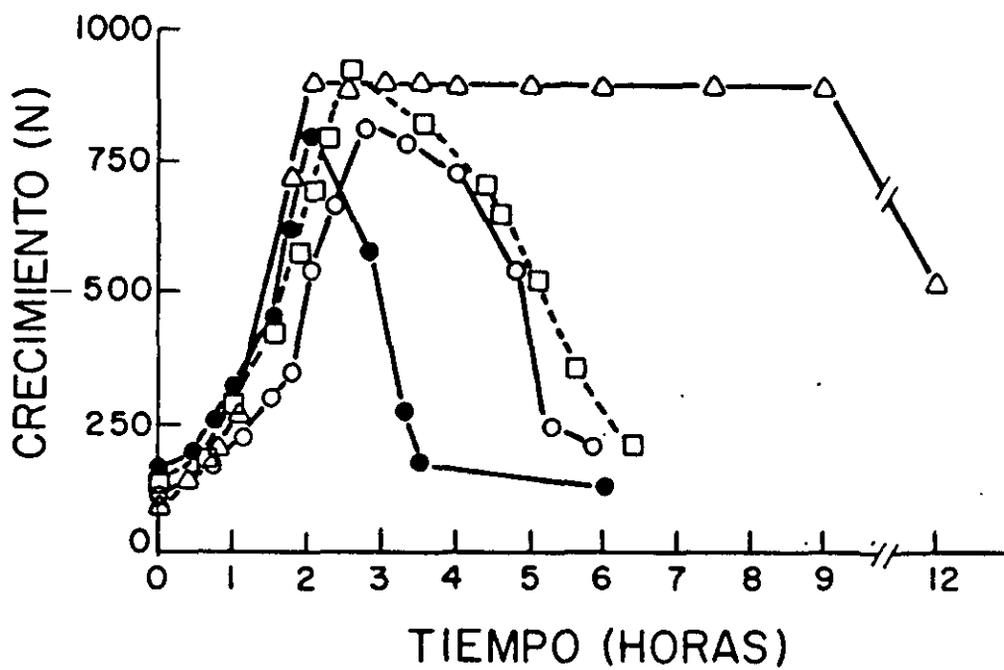
El comportamiento de las cepas M31 (pED1) y M31 (pED2) durante la fase exponencial de crecimiento no mostraba diferencias con el observado para la cepa tipo R6. Sin embargo, la fase estacionaria de las cepas M31 transformantes se reducía significativamente respecto a la de la cepa R6 (Figura 16). Estos resultados demostraban que neumococo era capaz de mantener bajo control niveles elevados de amidasa LYTA durante la fase exponencial de crecimiento, si bien en este caso la autólisis se adelantaba al comienzo de la fase estacionaria. Un resultado similar se había obtenido previamente con *S. pneumoniae* M31 (pRG2) (Figura 16), cepa que también expresa una elevada actividad amidásica (Ronda y cols., 1987), aunque en este caso la expresión del gen *lytA* no está bajo el control de su propio promotor sino bajo el control de un promotor localizado en el plásmido pLS1 (apartado 2.1.).

### **3.2. Estudio de la expresión y regulación de una amidasa LYTA truncada en su extremo C-terminal.**

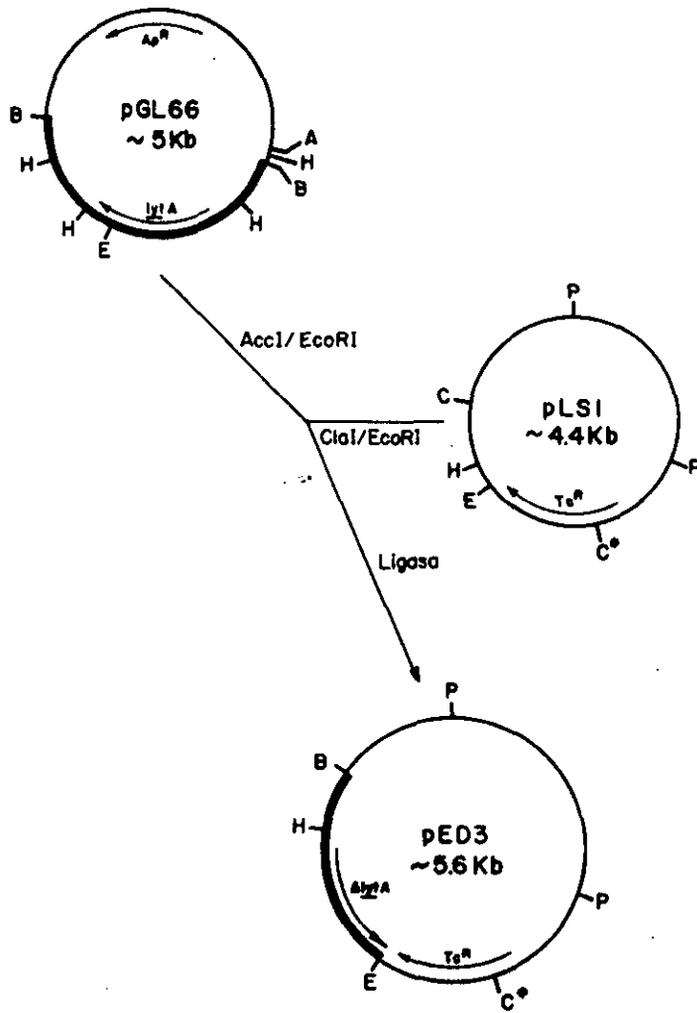
Se ha descrito que en el proceso de *conversión* que requiere la amidasa LYTA para alcanzar su máxima actividad enzimática están implicados los aminoácidos localizados en el extremo C-terminal de la molécula, ya que mutaciones en el gen *lytA* que ocasionan la delección de dichos aminoácidos originan proteínas truncadas que no requieren el proceso de *conversión*, si bien la actividad específica de tales proteínas se reduce considerablemente respecto a la de la enzima parental (Sánchez-Puelles y cols., 1987) (apartado 4.6.1.1.5. de la Introducción). Sin embargo, ninguno de estos genes *lytA* mutantes ha sido clonado y expresado en neumococo. Era interesante, por lo tanto, estudiar la expresión en *S. pneumoniae* de alguna de estas proteínas truncadas para comprobar si se comportan como autolisinas y si la ausencia del proceso de *conversión* que se observa *in vitro* influye *in vivo* en la actividad de estas enzimas.

#### **3.2.1. Construcción del plásmido pED3 y análisis de la amidasa LYTA truncada.**

Para expresar en neumococo una proteína LYTA truncada en su extremo C-terminal se subclonó el fragmento de restricción *AccI-EcoRI* de pGL66, fragmento que contiene el promotor y 1.120 pb de la región estructural del gen *lytA*, en el plásmido pLS1 (Figura 17 A). El plásmido resultante, pED3, se aisló de un clon de *E. coli* C600 resistente a tetraciclina. El plásmido pED3



**Figura 16.** Curvas de crecimiento de distintas cepas de neumococo. Las cepas de neumococo R6 (Δ), M31 (pED1)(○), M31 (pED2)(◻) y M31 (pRG2) (●) se cultivaron a 37 °C en medio C+Y. El crecimiento y la lisis se siguieron por nefelometría.

**A****B** $\Delta$  *lytA*

	1113					1130	No. nucleótido
5'	CCA	<b>GAA TTC</b>	CTG	TTA	TAA	3'	
3'	GGT	<b>CTT AAG</b>	GAC	AAT	ATT	5'	
	P	E	F	L	L	Stop	
	305			309			No. aminoácido

**Figura 17.** Construcción del plásmido pED3.

**Panel A.** En trazo grueso se representa el inserto del DNA de neumococo que contiene al gen *lytA*. La posición y la dirección de la transcripción de los genes se señala con una flecha. Las dianas de restricción mostradas son : A, *AccI*; B, *Bam*HI; C, *ClaI*; E, *EcoRI*; H, *Hind*III; P, *PstI*. C , indica que la diana *ClaI* puede metilarse por metiltransferasas *Dam*.  $\Delta$ *lytA* representa el gen *lytA* deletado en su extremo 3'.

**Panel B.** Secuencia de nucleótidos del extremo 3' de la región estructural del gen  $\Delta$ *lytA*. Se muestra también la secuencia de aminoácidos derivada en código de una letra. En negrita se representan los nucleótidos derivados del vector que codifican para los dos aminoácidos adicionales (negrita) en el extremo C-terminal de la molécula de amidasa LYTA truncada de 309 aminoácidos. El número de nucleótido hace referencia a la secuencia del fragmento *Hind*III de 1,2 kb que contiene al gen *lytA* (García y cols., 1986c).

codifica para una proteína de 309 aminoácidos, una amidasa LYTA truncada en sus últimos 11 residuos y con dos aminoácidos adicionales derivados de la secuencia del plásmido pLS1 (Figura 17 B). Un posible bucle para la terminación de la transcripción con una energía libre de -14,8 kcal/mol (Zuker y Stiegler, 1981) se localiza a 3 pb del codón de terminación de la traducción en la secuencia del plásmido pLS1 (Lacks y cols., 1986 a). En los extractos crudos de *E. coli* C600 (pED3) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo, no requiriéndose el proceso de conversión para alcanzar la actividad enzimática máxima (Tabla 4). Por el contrario, en los extractos crudos de la cepa *E. coli* C600 (pED1) que contiene clonado el gen *lytA* completo (apartado 1.1.1.) (Figura 9), era necesario el proceso de conversión para alcanzar la máxima actividad (Tabla 4). En la Tabla 4 se observa también que la actividad hidrolítica de los extractos de *E. coli* C600 (pED3) era equivalente a un 5,7% de la que presentaban los extractos de *E. coli* C600 (pED1). La actividad específica de la amidasa LYTA truncada purificada a homogeneidad electroforética representaba un 3,5% de la que se detectaba con la amidasa LYTA intacta. Por otra parte, el desoxicolato al 1% (p/v) incrementaba 8 veces la actividad hidrolítica en los extractos de ambas cepas (Tabla 4).

### 3.2.2. Obtención y caracterización de la cepa EM3 de *S. pneumoniae*.

El plásmido pED3 se utilizó para transformar células competentes de la cepa M31 de *S. pneumoniae*. Uno de los clones transformantes resistente a tetraciclina se aisló e identificó como *S. pneumoniae* M31 (pED3) y se denominó cepa EM3. Cuando la cepa EM3 se cultivaba en medio C+Y su fase exponencial de crecimiento era similar a la de la cepa R6, sin embargo carecía prácticamente de fase estacionaria produciéndose la autólisis del cultivo al final de la fase exponencial (Figuras 18 y 46). Cuando se añadía tetraciclina al medio C+Y, el crecimiento de EM3 disminuía y se hacía más lento. En presencia de penicilina G el comportamiento de la cepa EM3 era similar al mostrado por la cepa R6 (Figura 18). Estos resultados indicaban que la amidasa LYTA truncada se expresaba en el sistema homólogo y que su regulación durante la fase exponencial de crecimiento era similar a la de la enzima parental LYTA. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurría con la cepa R6, cuando *S. pneumoniae* EM3 se trataba con desoxicolato (apartado 3.2. de Materiales y Métodos) no se producía la lisis celular (fenotipo DOC<sup>-</sup>). Este efecto no era una respuesta general de la cepa EM3 a la acción de los detergentes ya que el Tritón X-100 sí provocaba la lisis de los cultivos.

En la Tabla 5 se compara la actividad hidrolítica *in vitro* sobre paredes celulares de neumococo en los extractos crudos de las cepas R6 y EM3. Como se puede observar, la actividad de la cepa EM3 representa un 70% de la que presenta la cepa R6. Esta pequeña

**TABLA 4.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos crudos de las cepas de *E. coli* que se indican.

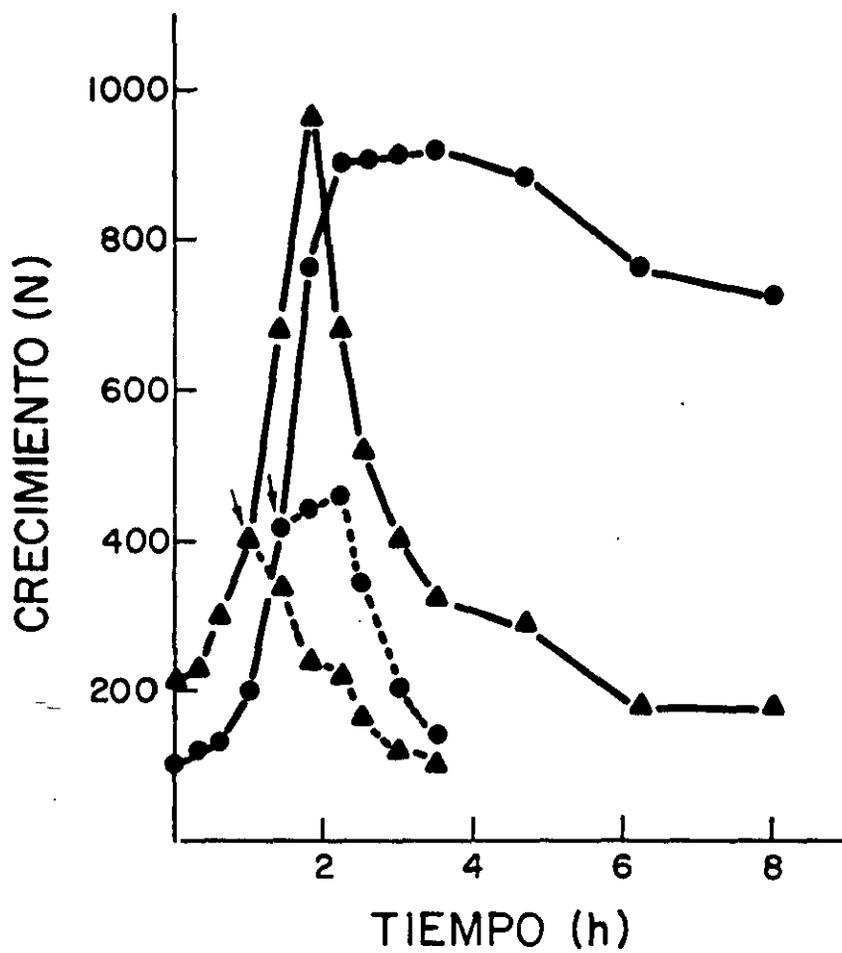
Cepa	A.E. <sup>a</sup>		Activación por desoxicolato <sup>b</sup> (número de veces)
	Conversión (-)	(+)	
C600 (pED1)	900	8.000	8
C600 (pED3)	440	460	8

Los valores son la media de dos experimentos.

<sup>a</sup> A.E., actividad específica (CPM/ $\mu$ g proteína) en 10 minutos de ensayo. Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 6. de Materiales y Métodos. (+) significa que los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se detalla en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, es decir, preincubando el extracto en presencia de colina 140 mM (*conversión*). (-) significa que los ensayos de actividad se realizaron como se indica en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos pero sin preincubar el extracto durante 10 minutos en presencia de colina, es decir, en ausencia de *conversión*.

<sup>b</sup> La actividad enzimática de los extractos se determinó como se describe en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, en ausencia o en presencia de desoxicolato al 1% (p/v). Para evitar la formación de precipitados, al detener la reacción no se añadió formaldehído. En la tabla se muestra el número de veces que se incrementa la actividad hidrolítica del extracto cuando éste se ensaya en presencia del detergente.

En todas las valoraciones de actividad se utilizaron como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina.



**Figura 18.** Curvas de crecimiento de las cepas de neumococo R6 (●) y EM3 (▲) en medio C+Y. En línea discontinua se representa la respuesta de los cultivos a la penicilina G (0,14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20 x MIC). La flecha indica el momento en el que se añadió el antibiótico. El crecimiento y la lisis se siguieron por nefelometría (N).

**TABLA 5.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos crudos de las cepas de *S. pneumoniae* que se indican.

Cepa	Actividad específica (CPM/ $\mu$ g proteína)	Porcentaje de actividad
R6	1.900	100
EM3	1.330	70

Los valores son la media de 3 experimentos. La actividad específica se refiere a 10 minutos de ensayo.

Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 6. de Materiales y Métodos. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se detalla en el apartado 9.1.2. de Materiales y Métodos. Se utilizaron como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina.

diferencia entre los niveles de actividad de ambas cepas no explica, sin embargo, el fenotipo  $\text{DOC}^-$  de *S. pneumoniae* EM3, ya que se conocen cepas de neumococo que muestran un fenotipo  $\text{DOC}^+$  con un nivel de actividad lítica inferior al de la cepa EM3. Así, por ejemplo, la cepa M31(pNLC7) (apartado 5.2.4.) , o la South African CMR40 (Liu y Tomasz, 1985) tienen una actividad amidásica que representa un 10% y un 15%, respectivamente, de la que presenta la cepa R6 y, sin embargo, muestran un fenotipo  $\text{DOC}^+$ . El fenotipo  $\text{DOC}^-$  de la cepa EM3 tampoco era debido a un efecto inhibitor del desoxicolato sobre la actividad de la proteína LYTA truncada, ya que, al contrario, este detergente actuaba como un activador de la enzima (Tabla 4).

Cuando se analizó la expresión del gen *lytA* truncado durante el crecimiento de la cepa EM3 se observó que ésta era constitutiva, un resultado similar al que se había obtenido con el gen *lytA* completo y provisto de su propio terminador de la transcripción (apartados 3.1.1 y 3.1.2.).

#### **4. LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA AMIDASA LYTA DE NEUMOCOCO.**

Las autolisinas, como el resto de las proteínas de la bacteria, se sintetizan en el citoplasma de la célula, por lo que necesitan atravesar la membrana citoplásmica para alcanzar su sustrato, la pared celular. Dado que la amidasa LYTA de neumococo parece sintetizarse de forma constitutiva en la célula (apartado 3.1.), su regulación deberá realizarse a un nivel post-traducciona. La posible translocación de la enzima a través de la membrana podría ser uno de los puntos clave para dicha regulación, como ya habían postulado Höltje y Tomasz (1975 a). Para analizar este aspecto era imprescindible conocer la localización subcelular de la enzima.

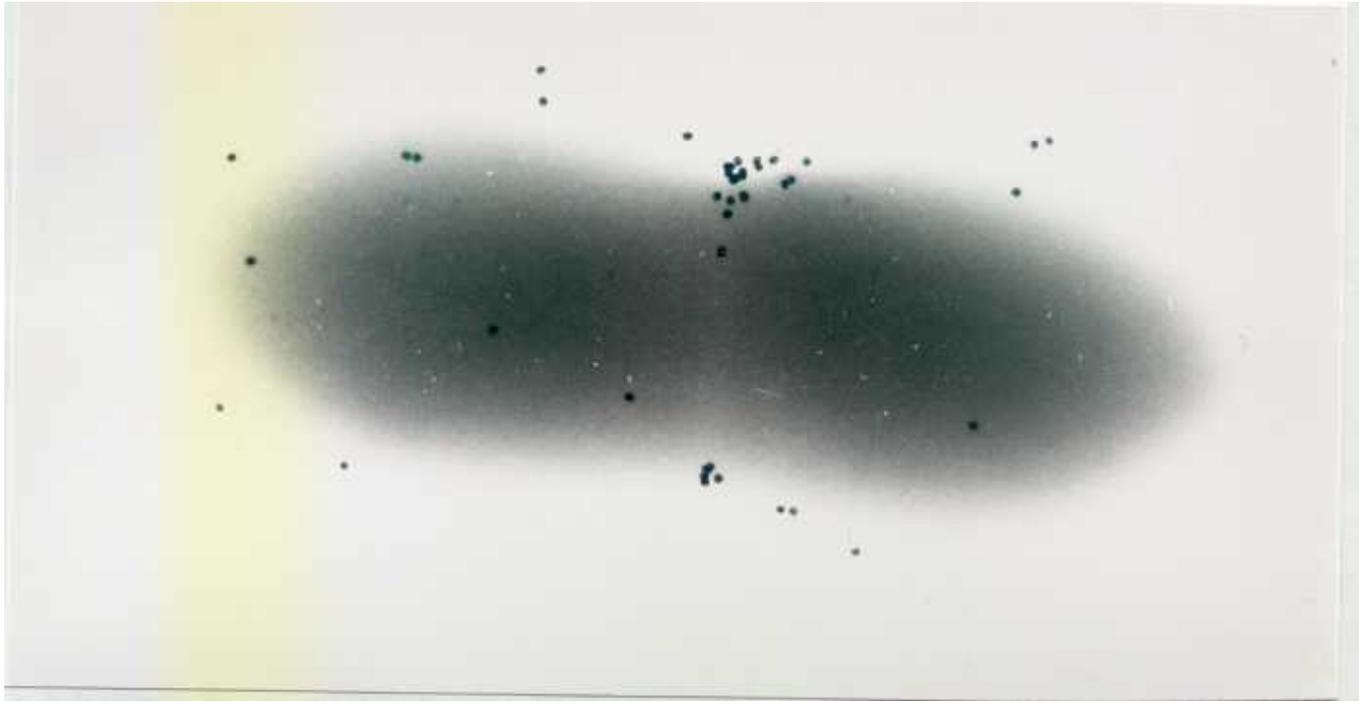
##### **4.1. Localización subcelular de la amidasa LYTA mediante técnicas inmunocitoquímicas.**

###### **4.1.1. Localización inmunocitoquímica en *S. pneumoniae*.**

Para determinar la localización subcelular de la amidasa LYTA en neumococo se utilizaron las cepas R6 y M31 (pRG2) (Tabla 1) cultivadas en medio C+Y. Las células intactas de *S. pneumoniae* M31 (pRG2) y R6 se analizaron mediante técnicas inmunocitoquímicas empleando anticuerpos anti-amidasa LYTA. La observación al microscopio electrónico (Figura 19 A y B) reveló que los anticuerpos se localizaban preferentemente en la región del septo de la célula en ambas cepas, lo que indicaba una localización periférica para la enzima LYTA, y confirmaba la participación de la amidasa de neumococo en el proceso de separación de las células hijas (Ronda y cols., 1987). Sin embargo, cuando R6 se cultivaba en un medio que contenía etanolamina en lugar de colina, medio Cden-EA, no se observaba reacción de las células-EA con los anticuerpos (Figura 19 C). Este resultado sugería que en las células-EA, o bien la amidasa no era accesible al anticuerpo, o bien esta enzima se liberaba al medio de cultivo. Esta última posibilidad, sin embargo, no parecía ser la correcta, ya que en ningún caso se había detectado actividad amidásica en el medio de cultivo cuando *S. pneumoniae* R6 se cultivaba en C+Y o en Cden-EA.

El análisis de secciones ultrafinas de las células de *S. pneumoniae* R6 y M31 (pRG2) mediante técnicas inmunocitoquímicas presentó serias dificultades. Este hecho podía ser debido a varias causas: i) un número muy reducido de moléculas de enzima LYTA en las secciones celulares analizadas; ii) limitaciones técnicas del método empleado para la fijación de las muestras que podría producir la liberación o alteración de la amidasa; iii) la baja sensibilidad del anticuerpo utilizado. Todo ello hacía muy difícil el estudio de la localización subcelular de la amidasa LYTA en neumococo mediante técnicas inmunocitoquímicas. Por este motivo, se decidió estudiar la

**A**



**B**



**Figura 19.** Localización inmunocitoquímica de la amidasa LYTA en células de *S. pneumoniae*.  
Panel A. *S. pneumoniae* R6 cultivado en medio C+Y.  
Panel B. *S. pneumoniae* M31 (pRG2) cultivado en medio C+Y.



**Figura 19.** (continuación)  
**Panel C.** *S. pneumoniae* R6 cultivado en medio Cden-EA.  
La preparación de las muestras se realizó como se indica en el apartado II. de Materiales y Métodos. Aumentos (x 97.500)

localización de esta proteína en un sistema que sintetiza mayores cantidades de enzima y para el que se han desarrollado diferentes métodos de localización subcelular. La cepa *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] (García y cols., 1986 c), que expresa una actividad amidásica 300 veces superior a la de la cepa R6 de neumococo, fue la seleccionada para realizar estos estudios.

#### 4.1.2. Localización inmunocitoquímica en *E. coli*.

Para estudiar la localización subcelular de la amidasa LYTA en células intactas de *E. coli* CM21 así como en secciones ultrafinas de éstas, se utilizaron las mismas técnicas inmunocitoquímicas que las empleadas para *S. pneumoniae* (apartado 4.1.1.). Como se aprecia en la Figura 20 A, una mínima, aunque significativa, fracción de la amidasa se localizaba en la membrana externa de *E. coli*. De hecho, empleando en un ensayo de actividad enzimática las células intactas de la cepa CM21 se detectaba el 3% de la actividad amidásica que se observaba en un extracto crudo de dicha cepa. El análisis de secciones celulares mostró una localización periférica de la enzima LYTA en *E. coli* (Figura 20 B y C). La mayoría de las moléculas de amidasa se localizaban en la envoltura celular y apenas si se observaban anticuerpos anti-amidasa LYTA en el citoplasma de las bacterias.

Cuando se determinaba la actividad amidásica en los extractos crudos de *E. coli* CM21, sólo era posible detectarla en la fracción soluble de dichos extractos (García y cols., 1985 a; García y cols., 1987 b). Estos resultados y los obtenidos mediante el análisis inmunocitoquímico sugerían la posibilidad de que la amidasa LYTA se localizase mayoritariamente en el espacio periplásmico de *E. coli*, bien soluble o bien débilmente asociada a estructuras de la envoltura celular. Para conocer cuál de estas dos posibilidades era la correcta se llevaron a cabo experimentos de fraccionamiento subcelular.

### **4.2. Localización subcelular de la amidasa LYTA en *E. coli* mediante técnicas de fraccionamiento subcelular.**

#### 4.2.1. Fraccionamiento subcelular mediante choque osmótico.

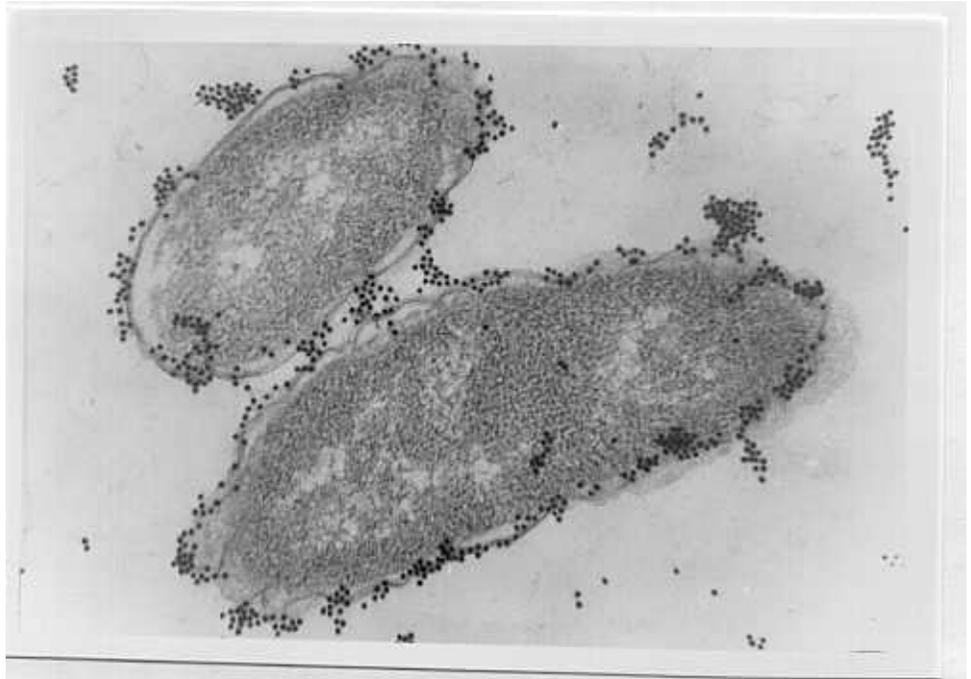
El método de fraccionamiento subcelular desarrollado por Nossal y Heppel (1966), basado en el choque osmótico de las células que libera proteínas periplásmicas, es uno de los más empleados para la localización de proteínas en bacterias. Cuando un cultivo de *E. coli* CM21 se sometió a esta técnica de fraccionamiento, utilizando la  $\beta$ -lactamasa y la isocitrato-deshidrogenasa (ICDH) como enzimas marcadoras periplásmica y citoplásmica respectivamente,

**A**

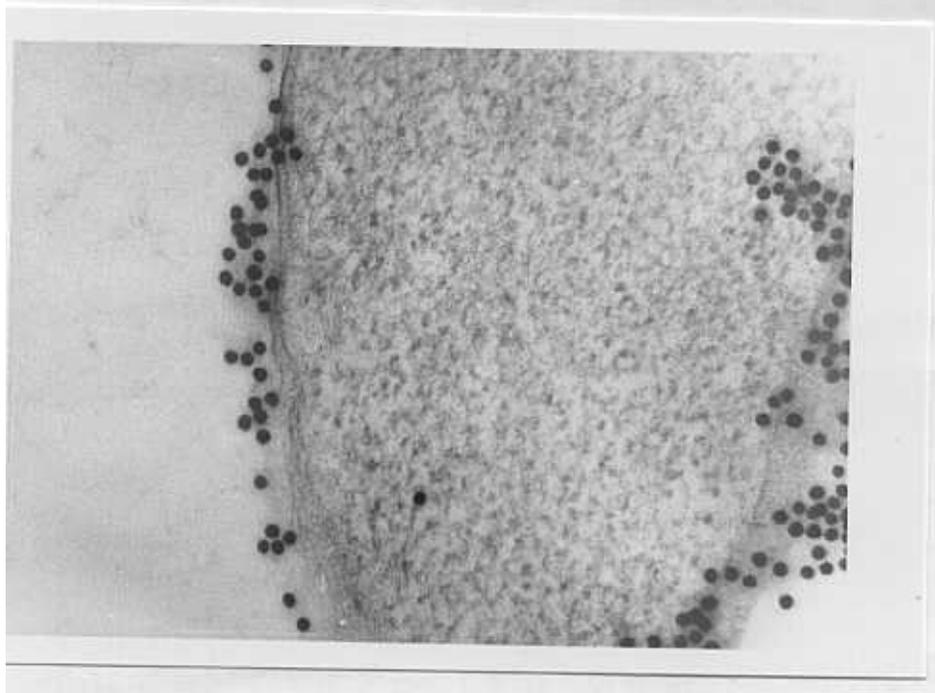


**Figura 20.** Localización inmunocitoquímica de la amidasa LYTA en células intactas y en secciones ultrafinas de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)]. Las muestras se obtuvieron como se indica en el apartado II. de Materiales y Métodos. Panel A. Células intactas [aumentos (x 31.350)].

**B**



**C**



**Figura 20.** (continuación)

Panel B. Secciones celulares ultrafinas [aumentos (x 70.200)].

Panel C. Secciones celulares ultrafinas [aumentos (x 143.640)].

se obtuvieron los resultados que se detallan en la Tabla 6. Como se observa en dicha tabla, la fracción periplásmica (fracción de sacarosa y fracción H<sub>2</sub>O) contenía el 80% de la actividad amidásica y tan sólo un 4% del marcador citoplásmico, lo que sugería una localización periférica para la enzima LYTA. Aunque estos resultados confirmaban los obtenidos mediante los análisis inmunocitoquímicos (apartado 4.1.2.), la localización de la amidasa en la célula de *E. coli* no correspondía, sin embargo, a la de una proteína típicamente periplásmica como la  $\beta$ -lactamasa (Tabla 6).

En la literatura se han descrito proteínas (grupo D) (Beacham, 1979), entre las que se encuentran el factor de elongación Tu (Jacobson y cols., 1976) y la tiorredoxina (Lunn y Pigiet, 1982), que se caracterizan por su localización en la cara interna de la membrana citoplásmica de *E. coli*. Estas proteínas pueden ser liberadas de la célula mediante choque osmótico pero no mediante formación de esferoplastos (Beacham, 1979). Para comprobar si la amidasa LYTA se comportaba como una proteína del grupo D, se estudió su localización subcelular mediante la formación de esferoplastos.

#### 4.2.2. Localización subcelular mediante la formación de esferoplastos.

La formación de esferoplastos mediante tratamiento de las células de *E. coli* CM21 con sacarosa-lisozima-EDTA sólo liberó en la fracción periplásmica el 15% de la actividad amidásica total de la célula (Tabla 7). Esta cantidad de enzima era similar a la liberada en la fracción de sacarosa del choque osmótico (Tabla 6), lo que sugería que tal liberación no se debía a la hidrólisis del peptidoglicano por la lisozima. Tan sólo un 3% del marcador citoplásmico (ICDH) se detectó en la fracción periplásmica (Tabla 7), lo que indicaba que la liberación de la amidasa LYTA en los esferoplastos no era debida a lisis celular.

Dado que la cantidad de enzima LYTA liberada mediante la formación de esferoplastos era inferior a la liberada mediante técnicas de choque osmótico (Tablas 6 y 7), se podía concluir que aunque la amidasa estaba mayoritariamente (80%) asociada a la envoltura celular de *E. coli* CM21, sólo un 15% se localizaba soluble en el espacio periplásmico. El 65% restante estaría asociado a la membrana por interacciones débiles.

Se han descrito algunas proteínas localizadas en la cara interna de la membrana citoplásmica de *E. coli* que no se liberan mediante formación de esferoplastos pero sí mediante choque osmótico (apartado 4.2.1.). Sin embargo, esta liberación por choque osmótico se suprime en presencia de cationes divalentes (Beacham, 1979; Jacobson y cols., 1976; Lunn y Pigiet, 1982). La pequeña, aunque significativa, cantidad de amidasa LYTA liberada mediante la formación de esferoplastos, junto con el hecho de que la liberación de esta enzima por choque

**TABLA 6.** Liberación de la amidasa LYTA mediante choque osmótico de los cultivos de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)].

Enzima	Fracción				
	Medio	Sacarosa	H <sub>2</sub> O	Células	
				Soluble	Sedimentable
Amidasa	1	19	60	20	N.D.
$\beta$ -Lactamasa	N.D.	83	17	N.D.	N.D.
ICDH	N.D.	1	3	96	N.D.

Los valores son la media de 5 experimentos y se expresan como porcentajes de la actividad enzimática total del cultivo.

N.D., significa que no se pudo detectar actividad enzimática.

El procedimiento utilizado para realizar el choque osmótico de las células se detalla en el apartado 7.1. de Materiales y Métodos.

Las enzimas  $\beta$ -Lactamasa e isocitrato-deshidrogenasa (ICDH) se ensayaron como se describe en el apartado 9.2. de Materiales y Métodos. La amidasa LYTA se ensayó como se describe en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina.

**TABLA 7.** Liberación de la amidasa LYTA mediante formación de esferoplastos en los cultivos de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)].

Enzima	Fracción			
	Medio	Periplasma	Células	
			Soluble	Sedimentable
Amidasa	1	15	84	N.D.
$\beta$ -Lactamasa	N.D.	100	N.D.	N.D.
ICDH	N.D.	3	97	N.D.

Los valores son la media de 5 experimentos y se expresan como porcentajes de la actividad enzimática total del cultivo.

N.D., significa que no se pudo detectar actividad enzimática.

La formación de esferoplastos se describe en el apartado 7.2. de Materiales y Métodos.

La actividad de las enzimas se determinó como se indica en la Tabla 6.

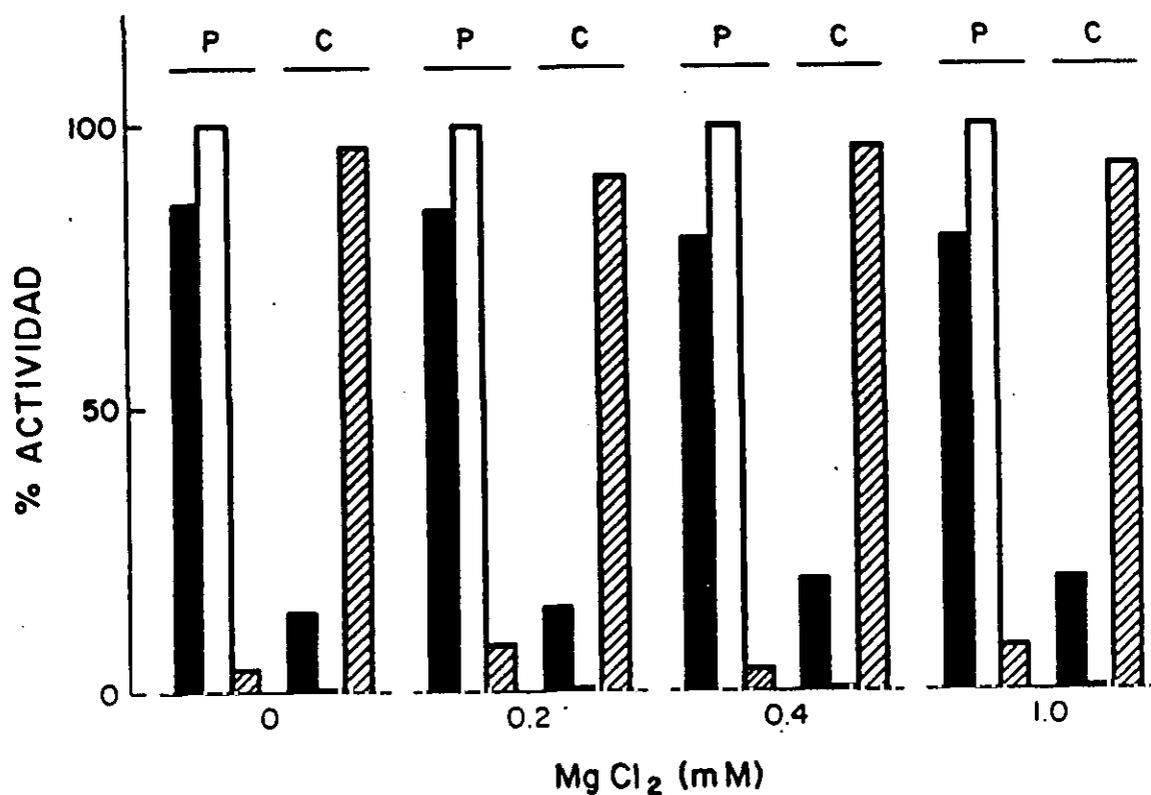
osmótico fuese independiente de la presencia de  $MgCl_2$  en el fraccionamiento realizado (Figura 21), sugería que la amidasa LYTA de neumococo se localizaba mayoritariamente en la cara externa de la membrana citoplásmica de *E. coli* CM21.

Para confirmar la localización periplásmica de la amidasa LYTA, se intentó el tratamiento de los esferoplastos de *E. coli* CM21 con enzimas proteolíticas. Sin embargo, los resultados de este experimento no fueron satisfactorios. La amidasa de neumococo era muy resistente al ataque por enzimas proteolíticas en los tampones utilizados para la formación de los esferoplastos. Así, por ejemplo, cuando los extractos crudos de *E. coli* CM21 se trataban, en presencia del tampón empleado para formar los esferoplastos, con 0,1 mg/ml de tripsina o proteinasa K (1:1, proteasa:proteína total) durante 30 minutos a 30 °C, sólo perdían el 20% de su actividad amidásica inicial. Cuando las proteasas se utilizaban a concentraciones superiores a 0,1 mg/ml, únicamente se conseguía una disminución parcial de la actividad amidásica y la integridad de los esferoplastos sufría daños irreversibles.

#### 4.2.3. Conversión in vivo de la amidasa LYTA en células plasmolisadas de *E. coli* CM21.

Styrvold y cols. (1986) demostraron que la colina no puede penetrar al citoplasma de *E. coli* a menos que las células sean plasmolisadas con NaCl o sacarosa. Este proceso requiere síntesis proteica *de novo*, ya que cesa totalmente en presencia de inhibidores de dicha síntesis (Styrvold y cols., 1986). Así, en células de *E. coli* CM21 plasmolisadas en presencia de tetraciclina y espectinomicina, la colina añadida al medio de cultivo sólo alcanzaría el periplasma celular y, por lo tanto, sólo podría activar (*convertir*) a la amidasa LYTA presente en el espacio periplásmico. Los experimentos de *conversión in vivo* en presencia de colina (apartado 10. de Materiales y Métodos) demostraron que la amidasa presente en la fracción de la sacarosa, y que representaba aproximadamente el 15% de la amidasa celular (Tabla 6), se había *convertido* a la forma C. El 65% de la enzima que permanecía en las células plasmolisadas (representaba el 55% de la amidasa celular) se encontraba también como forma C. Estos resultados confirmaban los obtenidos en los apartados 4.2.1 y 4.2.2., e indicaban que aproximadamente el 70% de la amidasa celular era accesible a la colina, es decir, se localizaba externamente a la membrana citoplásmica, bien soluble, bien asociada a membrana.

Las proteínas que se encuentran débilmente asociadas a la membrana de *E. coli* pueden aislarse en la fracción de membrana o en la fracción soluble (citoplasma) dependiendo del procedimiento utilizado para romper las células (Beacham, 1979; Lunn y Pigiet, 1982). La amidasa LYTA siempre se aisló en la fracción soluble, tanto si las células de *E. coli* CM21 se



**Figura 21.** Efecto de los iones  $Mg^{2+}$  en la liberación de la amidasa LYTA de células de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] sometidas a choque osmótico.

Las células se sometieron a choque osmótico como se describe en el apartado 7.1. de Materiales y Métodos, añadiendo en el choque hipotónico distintas concentraciones de  $MgCl_2$ . Las abreviaturas utilizadas son : P, fracción periplásmica; C, fracción celular (citoplasma y envolturas celulares). Las barras representan el porcentaje de actividad enzimática en ambas fracciones : barras negras (amidasa LYTA), barras blancas ( $\beta$ -lactamasa), barras rayadas (isocitrato-deshidrogenasa).

rompían mediante sonicación (Tabla 7), como si se utilizaban otros métodos de ruptura como presión o agitación con bolas de vidrio.

#### **4.3. Localización subcelular de la amidasa LYTA en mutantes de secreción de *E. coli*.**

Se han caracterizado mutantes de *E. coli* (*lky*, *exc*, *tol*) que secretan proteínas periplásmicas al medio de cultivo y que pueden ser utilizados para determinar la localización subcelular de las proteínas (Fognini-Lefebvre y cols., 1987) (apartado 3.7.5. de la Introducción). Por este motivo, la cepa mutante *E. coli* NL8 (*tolA1*) se transformó con el plásmido pGL80 (García y cols., 1986 c). Cuando la cepa transformante NL8 (pGL80) se cultivó hasta la fase estacionaria de crecimiento y se determinó la actividad amidásica liberada al medio de cultivo, utilizando como enzimas marcadoras la  $\beta$ -lactamasa y la ICDH, se obtuvieron los resultados que se detallan en la Tabla 8. En esta tabla también se muestran los resultados obtenidos con la cepa CM21 cultivada en las mismas condiciones. Mientras que *E. coli* CM21 tan sólo liberaba al medio el 1% de la proteína LYTA, *E. coli* NL8 (pGL80) liberaba aproximadamente el 15% de la amidasa al medio de cultivo. Este resultado demostraba, de nuevo, que el 15% de la amidasa celular permanece soluble en el espacio periplásmico de *E. coli*.

#### **4.4. Estudio del mecanismo de secreción de la amidasa LYTA.**

Una vez demostrado que la amidasa LYTA se localizaba mayoritariamente en el espacio periplásmico de *E. coli* débilmente asociada a la membrana citoplásmica, se procedió al estudio del mecanismo de translocación utilizado por esta enzima para alcanzar dicho espacio celular.

La amidasa LYTA es una molécula fundamentalmente hidrofílica (García y cols., 1986 c) y el análisis de su secuencia de aminoácidos no permite identificar ninguna estructura característica de un péptido señal N-terminal.

Para comprobar si la proteína LYTA liberada de *E. coli* CM21 mediante técnicas de choque osmótico sufría un procesamiento en la región N-terminal de su molécula que pudiese explicar un mecanismo de translocación basado en la existencia de un péptido señal N-terminal procesable, se purificó por cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa la enzima asociada a las fracciones periplásmica y citoplásmica (fracción soluble) del choque osmótico. La enzima LYTA purificada de ambas fracciones presentaba una movilidad electroforética en geles de poliacrilamida-SDS prácticamente idéntica, correspondiente a 36,5 kd (Figura 22), y no se apreciaba más de una banda cuando la proteína de las dos fracciones se aplicaba en la misma calle del gel. La amidasa de la fracción periplásmica y citoplásmica presentaba la misma secuencia de

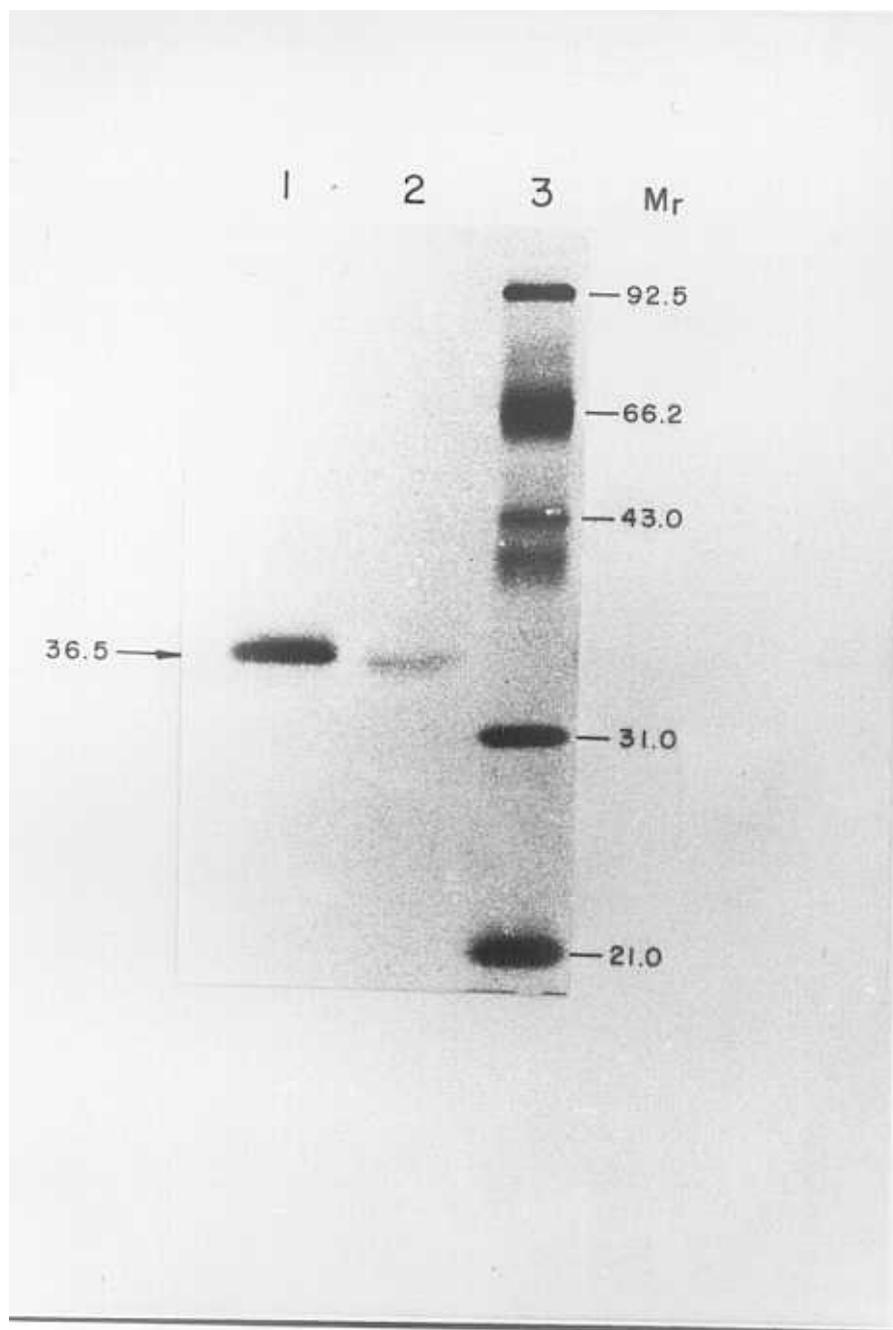
**TABLA 8.** Liberación de la amidasa LYTA al medio de cultivo en las cepas *E. coli* NL8(pGL80) y *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)].

Enzima	Medio de cultivo		Células	
	CM21	NL8 (pGL80)	CM21	NL8 (pGL80)
Amidasa	1	13	99	87
$\beta$ -Lactamasa	21	87	79	13
ICDH	N.D.	N.D.	100	100

Los valores son la media de 4 experimentos y se expresan como porcentajes de la actividad enzimática total del cultivo.

N.D., indica que no se pudo detectar actividad enzimática en esa fracción.

Las células se cultivaron hasta la fase estacionaria de crecimiento. Después de una centrifugación, el sobrenadante (medio de cultivo) y el sedimento (células), previamente resuspendido en tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5 y sonicado, se ensayaron para determinar sus niveles de actividad enzimática. La actividad de cada una de las enzimas se determinó como se indica en la Tabla 6.



**Figura 22.** Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de la amidasa LYTA purificada de las fracciones periplásmica y citoplásmica de *E. coli* CM21. Las células de *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] se sometieron a un choque osmótico como se describe en el apartado 7.1. de Materiales y Métodos. La amidasa LYTA liberada en las fracciones periplásmica (calle 1) y citoplásmica (calle 2) se purificó mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa según se detalla en el apartado 12.1. de Materiales y Métodos, y se analizó mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. En la calle 3 se muestran las proteínas marcadoras: fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica e inhibidor de tripsina. La  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) de las proteínas marcadoras se indica en el margen derecho. La flecha señala la  $M_r$  de la amidasa LYTA.

aminoácidos en su región N-terminal (Met, Glu, Ile, Asn, Val, Ser), secuencia idéntica a la deducida del análisis del gen *lytA* (García y cols., 1986 c). La proteína LYTA purificada de neumococo también presentaba la misma  $M_r$  que se deduce de la secuencia del gen, y no se pudo observar la existencia de formas minoritarias de menor  $M_r$ .

Estos resultados demostraban la ausencia de un péptido señal procesable en la molécula LYTA. Sin embargo, no se puede descartar que esa ligera diferencia en la movilidad electroforética observada para la amidasa de las fracciones citoplásmica y periplásmica pueda ser debida a otro tipo de modificaciones de la enzima periplásmica durante el proceso de translocación.

## **5. ENZIMAS LÍTICAS QUIMÉRICAS ENTRE LA AMIDASA LYTA Y LAS LISOZIMAS CPLI o CPL7.**

El estudio comparativo de las secuencias de nucleótidos de los genes *lytA*, *hbl*, *cplI*, *cpl7* y *cpl9* reveló que las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo podían ser el resultado de la fusión de dos dominios funcionales independientes, uno que contenía el centro activo de la molécula (dominio N-terminal) y otro responsable del reconocimiento de los ácidos teicoicos de la pared celular (dominio C-terminal) (García y cols., 1988; García y cols., 1990; Romero y cols., 1990 b). La construcción de enzimas quiméricas funcionales mediante la recombinación *in vitro* de los genes que codifican para las proteínas LYTA, CPLI y CPL7, sería la demostración experimental de la hipótesis que postula la organización modular de las enzimas líticas de pared de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos. El intercambio entre los dominios N- y C-terminales de las enzimas LYTA, CPLI y CPL7, permitiría comprobar de forma directa si éstos realmente actúan como auténticos dominios funcionales y si la función que se había asignado a cada uno de ellos era la correcta.

### **5.1. Enzimas líticas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPLI.**

Se procedió, en primer lugar, a la construcción de enzimas líticas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPLI. Las dos enzimas parentales requerían la presencia de colina en la pared celular para llevar a cabo su actividad, pero mientras la amidasa LYTA necesitaba el proceso de *conversión* para alcanzar su máxima actividad (apartado 4.6.1.1.1. de la Introducción), la lisozima CPLI era independiente de dicho proceso (García y cols., 1987 a). Esta última característica permitiría diferenciar ambos dominios C-terminales en las proteínas quiméricas. Si la hipótesis sobre la organización modular de estas enzimas fuese correcta, las dos proteínas híbridas deberían poseer propiedades que fuesen combinación de las que presentaban las correspondientes enzimas parentales, es decir, debería originarse una lisozima *convertible* y una amidasa *no convertible*.

#### **5.1.1. Construcción de las enzimas quiméricas CLL y LCA.**

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas LYTA y CPLI ha permitido diferenciar dos dominios moleculares, un dominio N-terminal no homólogo y un dominio C-terminal homólogo en las dos proteínas (Figura 7). En la amidasa LYTA el dominio N-terminal está constituido por 176 aminoácidos, mientras que en la lisozima CPLI la longitud del

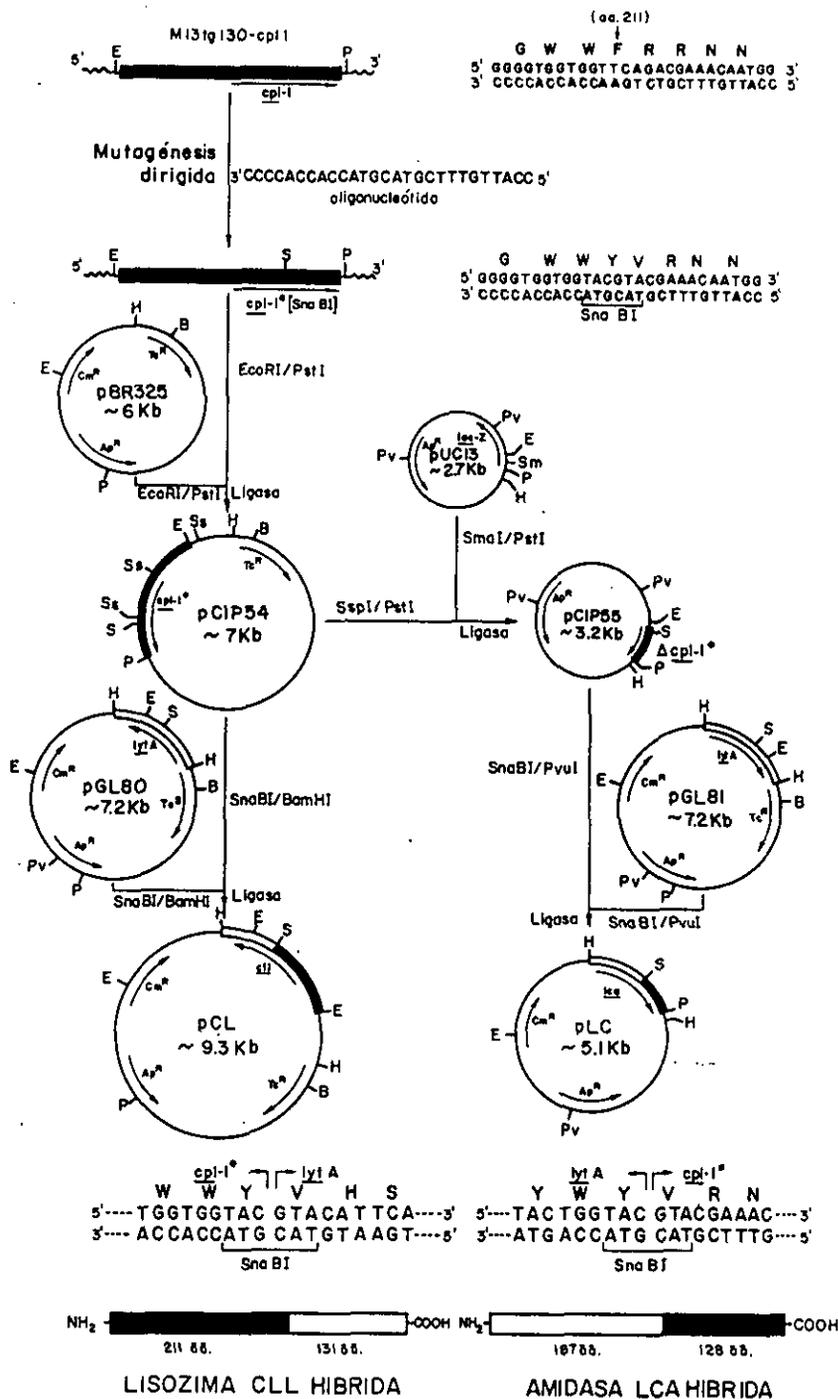
dominio N-terminal es de 200 aminoácidos (García y cols., 1988). Los dominios C-terminales de las dos enzimas se estructuran en 6 motivos de secuencias repetidas de aproximadamente 20 aminoácidos cada uno (P1 a P6) (Figura 7) (García y cols., 1988). El motivo P1 podría representar, junto con los últimos aminoácidos del dominio N-terminal, la región de unión entre los dos dominios de la molécula. Esta región de unión sería la más adecuada para realizar la fusión entre la amidasa LYTA y la lisozima CPLI.

La construcción de las enzimas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPLI se llevó a cabo mediante recombinación *in vitro* entre los genes *lytA* y *cplI*. Para ello se aprovechó la existencia en el gen *lytA* de una diana de restricción *Sna*BI que se localiza en la región que codifica para el dipéptido Tyr<sup>187</sup>-Val<sup>188</sup> del motivo P1 de la proteína (García y cols., 1988), región que parecía la más adecuada para llevar a cabo la fusión de los genes *lytA* y *cplI*, como ya se ha indicado anteriormente. Dado que el gen *cplI* carece de una diana de restricción *Sna*BI en una posición equivalente a la ocupada por la del gen *lytA*, se creó esta diana mediante técnicas de mutagénesis dirigida (Figura 23). La nueva diana *Sna*BI se localiza en la secuencia del gen *cplI* que codifica para el dipéptido Phe<sup>211</sup>-Arg<sup>212</sup> de la proteína CPLI (Figura 23). Este dipéptido está situado dentro del motivo P1 de la lisozima CPLI en una posición equivalente a la ocupada por el dipéptido Tyr-Val del motivo P1 de la amidasa LYTA (García y cols., 1988). El gen *cplI* mutado (*cplI*<sup>\*</sup>) se seleccionó mediante digestión con la endonucleasa de restricción *Sna*BI. La secuenciación de la región del gen *cplI*<sup>\*</sup> que contiene la nueva diana *Sna*BI no reveló la existencia de mutaciones no deseadas.

El plásmido pCIP54 contiene clonado el gen *cplI*<sup>\*</sup> y su construcción se detalla en la Figura 23. Aunque la creación de la diana *Sna*BI en el gen *cplI* supuso la sustitución en la lisozima CPLI del dipéptido Phe<sup>211</sup>-Arg<sup>212</sup> por el dipéptido Tyr-Val (Figura 23), la proteína resultante (CPLI<sup>\*</sup>) se comportaba de forma similar a como lo hacía la lisozima parental (CPLI). En los extractos crudos de *E. coli* HB101 (pCIP54) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo pero sólo cuando éstas contenían colina en su composición.

La fusión de la región del gen *cplI*<sup>\*</sup> que codifica para el dominio N-terminal de la lisozima CPLI<sup>\*</sup> con la región del gen *lytA* que codifica para el dominio C-terminal de la amidasa LYTA, se realizó como se muestra en la Figura 23. El plásmido resultante, pCL, se aisló a partir de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol. La fusión génica realizada se confirmó mediante secuenciación. El plásmido pCL contiene el gen quimérico *cII* que codifica para la proteína quimérica CLL (Figura 23).

Para realizar la fusión de la región del gen *lytA* que codifica para el dominio N-terminal de la amidasa LYTA con la región del gen *cplI*<sup>\*</sup> que codifica para el dominio C-terminal de la lisozima CPLI, se siguió la estrategia que se muestra en la Figura 23. El plásmido resultante, pLC, se aisló



**Figura 23.** Construcción de los plásmidos pCL y pLC.

Mediante mutagénesis dirigida se creó una diana de restricción *SnaBI* en el gen *cplI* clonado en la forma replicativa del fago M13 (M13tg130-*cplI*). El vector fágico se representa con línea ondulada. Se indica la secuencia del oligonucleótido empleado para la mutagénesis. Se muestra también la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (en código de una letra) de la región que rodea al aminoácido 211 de la lisozima CPLI y de su forma mutada, respectivamente. La diana de restricción *SnaBI* creada en el gen mutante *cplI* se indica en la parte inferior de la secuencia parcial de nucleótidos de dicho gen. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción son: B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; Pv, *PvuII*; S, *SnaBI*; Sm, *SmaI*; Ss, *SspI*.  $\Delta$ , indica un gen deletado. La posición y la dirección de la transcripción de los genes se señala con una flecha. Los genes *lytA* y *cplI* se representan con barras blancas y negras, respectivamente. Los plásmidos pGL80 y pGL81 contienen el gen *lytA* clonado en pBR325 pero en orientaciones opuestas (García y cols., 1986c; García y cols., 1987b). En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (en código de una letra) de la región que rodea a la diana *SnaBI* de los genes quiméricos. También se representan esquemáticamente las nuevas proteínas quiméricas, indicando el número de aminoácidos de cada uno de los dominios que se han intercambiado.

de transformantes resistentes a ampicilina y cloranfenicol pero sensibles a tetraciclina. La fusión génica realizada se confirmó mediante secuenciación. El plásmido pLC contiene el gen quimérico *lca* que codifica para la proteína quimérica LCA (Figura 23).

### 5.1.2. Caracterización bioquímica de las proteínas quiméricas.

En los extractos crudos de *E. coli* HB101 (pCL) y *E. coli* HB101 (pLC) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que contenían colina en sus ácidos teicoicos (Tabla 9), si bien esta actividad no era detectable cuando las paredes celulares empleadas contenían etanolamina. Este resultado demostraba que las proteínas quiméricas CLL y LCA : i) se expresaban en *E. coli*, ii) eran activas, iii) dependían de la colina para su actividad (Figura 24), y iv) constituían el primer ejemplo de quimeras activas entre una proteína de bacteria y una proteína de fago.

La enzima CLL, construida con el dominio N-terminal de la lisozima CPLI del fago Cp-I y con el dominio C-terminal de la amidasa LYTA de neumococo, requería el proceso de *conversión* para alcanzar su máxima actividad enzimática. Por el contrario, la quimera LCA, construida con el dominio N-terminal de la amidasa LYTA y el dominio C-terminal de la lisozima CPLI, no requería el proceso de *conversión* (Tabla 9 y Figura 24).

Dado que tanto la quimera CLL como la quimera LCA reconocen específicamente los residuos de colina de la pared celular, su purificación a homogeneidad electroforética se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa (Sanz y cols., 1988). La quimera LCA presentó una  $M_r$  en geles de poliacrilamida-SDS de 36.000 (Figura 25), lo que estaba de acuerdo con la  $M_r$  deducida del análisis de su secuencia primaria, 36.100. Sin embargo, la quimera CLL presentaba una  $M_r$  (38.500) ligeramente inferior a la que se deducía del análisis de su secuencia (39.300) (Figura 25), lo que podía deberse a una movilidad anómala de esta enzima en geles de poliacrilamida-SDS como ya se ha descrito para otras proteínas. Las enzimas parentales presentaban las  $M_r$  esperadas, 36.500 para la amidasa LYTA y 39.000 para la lisozima CPLI (Figura 25).

Cuando las enzimas quiméricas purificadas se sometían a tratamiento térmico (45 °C) durante 10 minutos su actividad se reducía al 50%, un comportamiento similar al que presentaban las enzimas parentales. Este hecho sugería que las nuevas interacciones entre dominios no introducían alteraciones significativas en la estructura de la proteína quimérica, al menos en lo que se refiere a su estabilidad térmica.

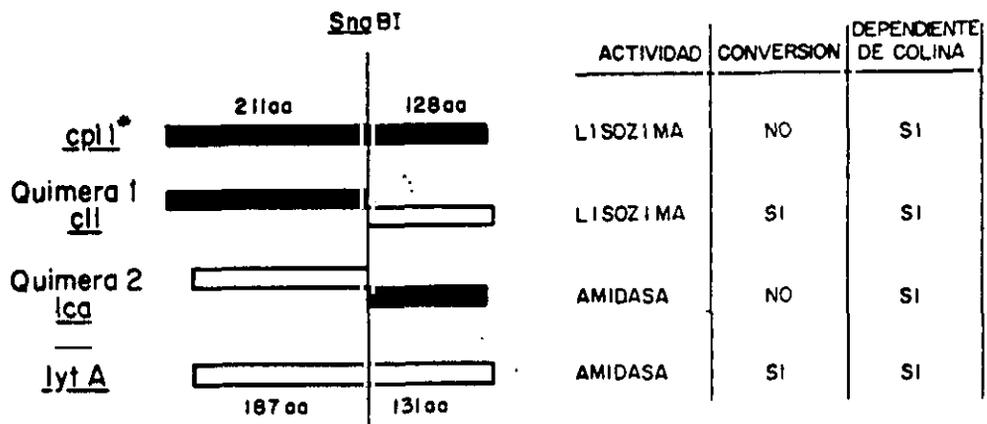
Las propiedades bioquímicas más importantes para las proteínas quiméricas, comparadas con las que presentan las dos enzimas parentales, se resumen en la Tabla 10. Cuando se digieren

**TABLA 9.** Efecto de la *conversión* sobre la actividad de las enzimas LYTA, CPL1, LCA y CLL.

Preincubación	Actividad enzimática (CPM/10 minutos)			
	LYTA	CPL1	LCA	CLL
Sin colina <sup>a</sup>	342	2.507	3.728	240
Con colina <sup>b</sup>	3.459	2.699	3.121	2.067

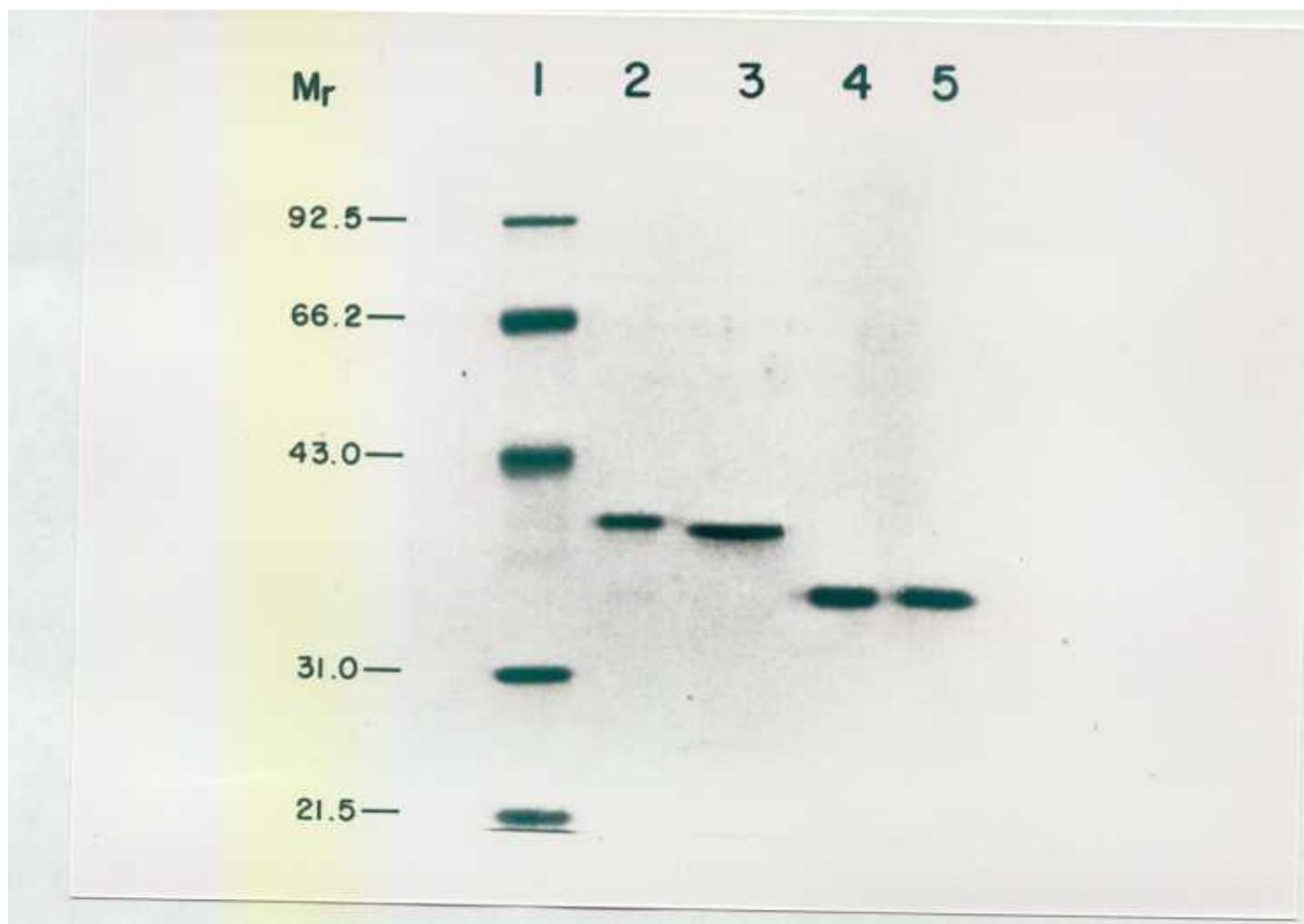
Los valores son la media de 2 experimentos.

Los extractos crudos de las cepas transformantes de *E. coli* HB101 que contienen los plásmidos pGL80 (*lytA*), pCIP50 (*cplI*), pLC (*lca*) o pCL (*cll*), se obtuvieron como se describe en el apartado 6. de Materiales y Métodos. La actividad enzimática en (b) se determinó como se detalla en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, es decir, preincubando los extractos en presencia de colina 140 mM durante 10 minutos a 4 °C (*conversión*). Se utilizaron como sustrato paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina. La actividad enzimática en (a) se determinó como en (b) pero sin preincubar con colina. El empleo de extractos crudos es necesario para evitar la *conversión* de las enzimas durante el proceso de purificación.



**Figura 24.** Representación esquemática y propiedades enzimáticas de las enzimas LYTA, CPLI, LCA, y CLL.

Se muestra como referencia la posición de la diana de restricción *SnaBI* utilizada para la construcción de los genes quiméricos. Los números a la derecha e izquierda de la diana *SnaBI* indican la longitud en aminoácidos de los dominios N- y C-terminales de las enzimas parentales.



**Figura 25.** Electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS al 10% de las enzimas LYTA, CPLI, LCA y CLL purificadas.

Las cuatro enzimas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa como se describe en el apartado 12.1. de Materiales y Métodos. Calle 1, proteínas marcadoras : fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina; en el margen izquierdo se muestra su  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ). Calle 2, proteína CPLI purificada de extractos de *E. coli* HB101 (pCIP50). Calle 3, proteína CLL purificada de extractos de *E. coli* HB101 (pCL). Calle 4, proteína LCA purificada de extractos de *E. coli* HB101 (pLC). Calle 5, proteína LYTA purificada de extractos de *E. coli* RB791 (pGL100). En cada calle se aplicó 1  $\mu$ g de proteína.

**TABLA 10.** Propiedades bioquímicas de las enzimas LYTA, CPL1, LCA y CLL purificadas.

Enzimas	Propiedad					
	Actividad enzimática		Pared celular <sup>c</sup>		$K_m$	Co.Cl <sub>50</sub>
	Tipo <sup>a</sup>	A.E. <sup>b</sup>	Col.	EA.	g/l	mM <sup>d</sup>
LYTA	Amidasa	600.000	+	-	0.04	24
CPL1	Lisozima	750.000	+	-	0.09	3
LCA	Amidasa	180.000	+	-	0.32	5
CLL	Lisozima	800.000	+	-	0.03	20

Las enzimas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa como se describe en el apartado 12.1. de Materiales y Métodos.

<sup>a</sup> El tipo de actividad enzimática se determinó como se describe en la Figura 26.

<sup>b</sup> A.E., actividad específica (unidades/mg proteína). La actividad enzimática de las proteínas purificadas se determinó como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina. Los valores son la media de 3 experimentos.

<sup>c</sup> Col., paredes celulares de neumococo que contienen colina. EA., paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina. (+), indica que las enzimas tienen un 100% de actividad. (-), indica que las enzimas tienen menos del 0,1% de actividad.

<sup>d</sup> Co.Cl<sub>50</sub>, representa la concentración de colina necesaria para inhibir al 50% la actividad enzimática de las enzimas purificadas. Estos datos se han calculado a partir de los representados en la Figura 27.

paredes celulares de neumococo con las enzimas quiméricas el perfil de degradación que se obtiene indica que la enzima LCA es una amidasa mientras que la CLL se comporta como una lisozima (Figura 26). Es de destacar el hecho de que las quimeras no sólo son activas, sino que además su actividad específica no difiere significativamente de la que presentan las proteínas parentales correspondientes (Tabla 10). Cuando se determinó la  $K_m$  de las 4 proteínas se observó que mientras la  $K_m$  de la amidasa LCA se había incrementado 8 veces respecto a la que presentaba la amidasa LYTA, la  $K_m$  de la lisozima CLL era 3 veces inferior a la que presentaba la lisozima CPLI (Tabla 10).

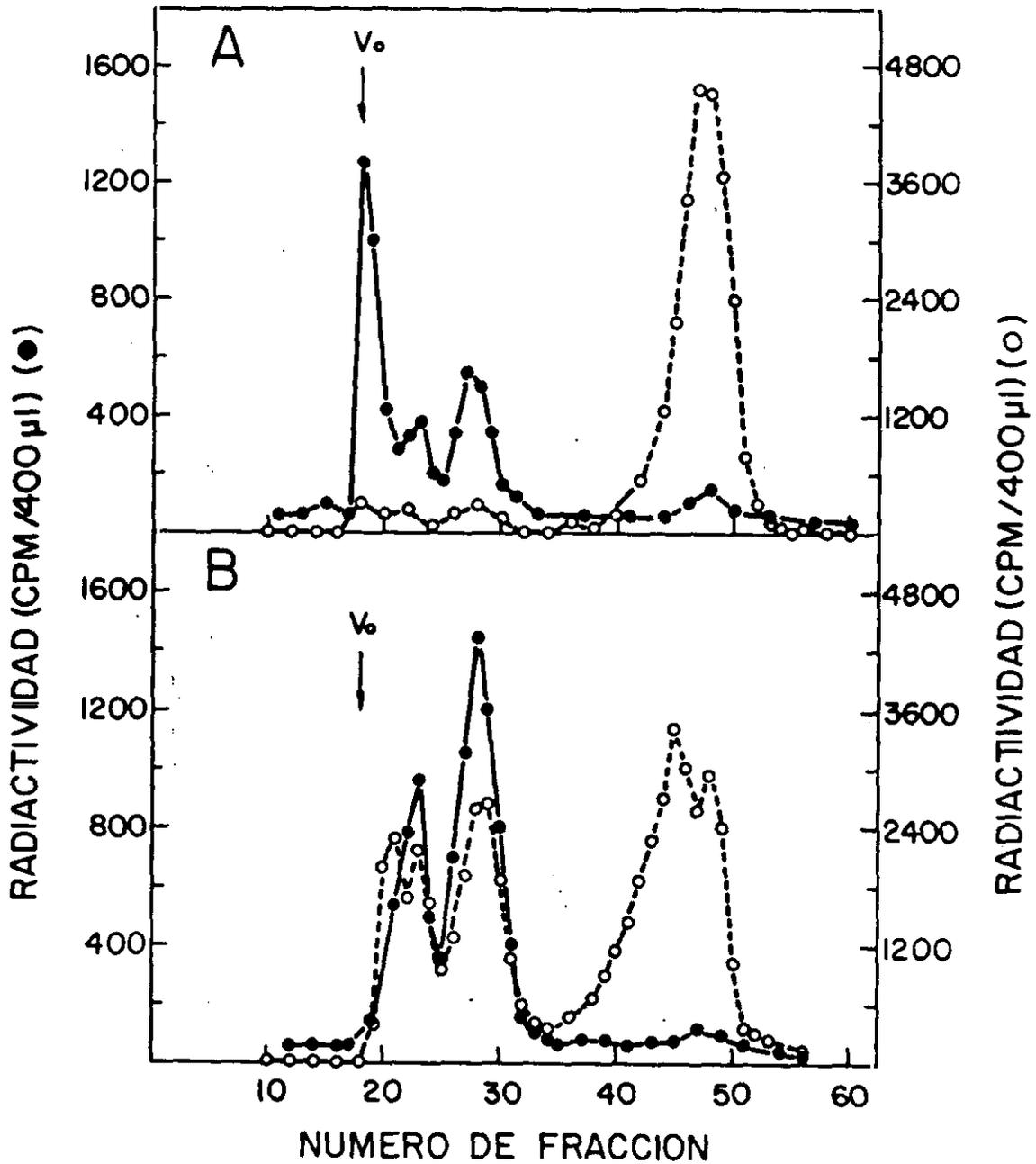
Una característica que demostraba la interacción del dominio C-terminal de estas enzimas con la colina del sustrato era la referente a la concentración de colina necesaria para inhibir la actividad enzimática. La concentración de colina que se necesita para inhibir la actividad de la lisozima CPLI (García y cols., 1988) es inferior a la necesaria para inhibir la actividad de la amidasa LYTA (Briese y Hakenbeck, 1985). En la Tabla 10 y en la Figura 27 se observa que el 50% de inhibición de la actividad de la lisozima CPLI o la amidasa LCA se consigue con concentraciones de colina que son 4-5 veces inferiores a las necesarias para inhibir al 50% la actividad de la amidasa LYTA o la lisozima CLL.

Las propiedades que presentan las proteínas CLL y LCA son, por lo tanto, una combinación de las que caracterizan a las enzimas parentales y se pueden adscribir por separado a cada uno de los dos dominios que se han intercambiado. Por ello, estas quimeras demuestran la organización modular de las enzimas líticas de pared de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos, con la existencia de un dominio N-terminal catalítico y un dominio C-terminal para el reconocimiento del sustrato.

### 5.1.3. Actividad *in vivo* de las enzimas quiméricas.

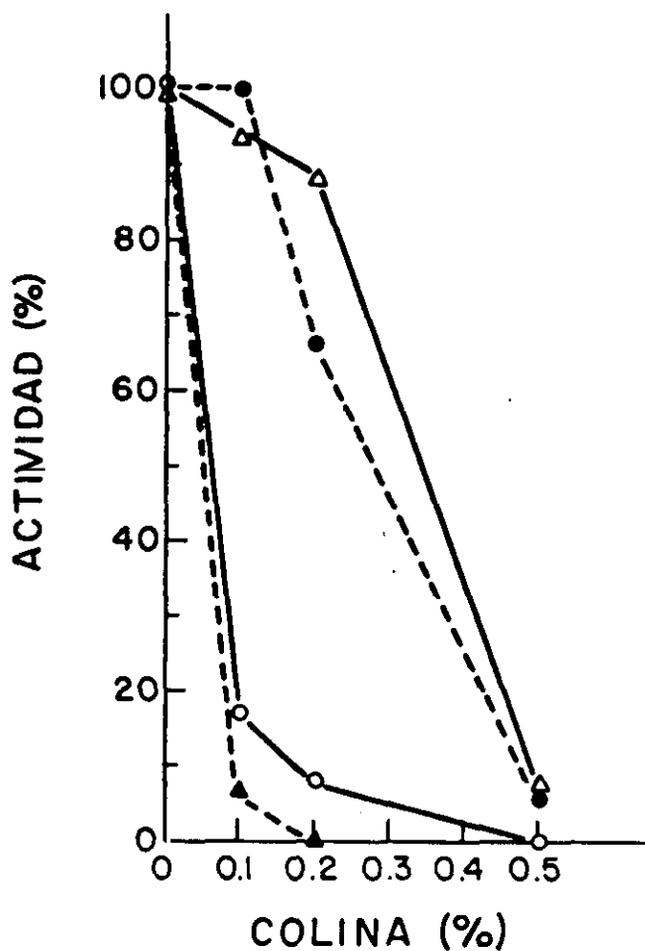
La capacidad lítica *in vivo* de las enzimas quiméricas purificadas se determinó mediante curación fenotípica (apartado 4.6.1.1.3. de Materiales y Métodos) de cultivos de *S. pneumoniae* M31. La adición de lisozima CLL o amidasa LCA a un cultivo de la cepa M31 durante la fase exponencial de crecimiento originó la autólisis de éste al comienzo de la fase estacionaria (Figura 28). Las enzimas parentales se comportaban de idéntica forma (Figura 28), como se había demostrado previamente (Tomasz y Waks, 1975; García y cols., 1987 a).

Estos resultados demuestran que las enzimas líticas quiméricas: i) se someten a los mismos mecanismos de control que regulan a la amidasa LYTA de neumococo durante la fase exponencial de crecimiento de los cultivos de esta bacteria; ii) se comportan como eficientes proteínas líticas cuando se ensayan *in vivo* en el sistema homólogo.



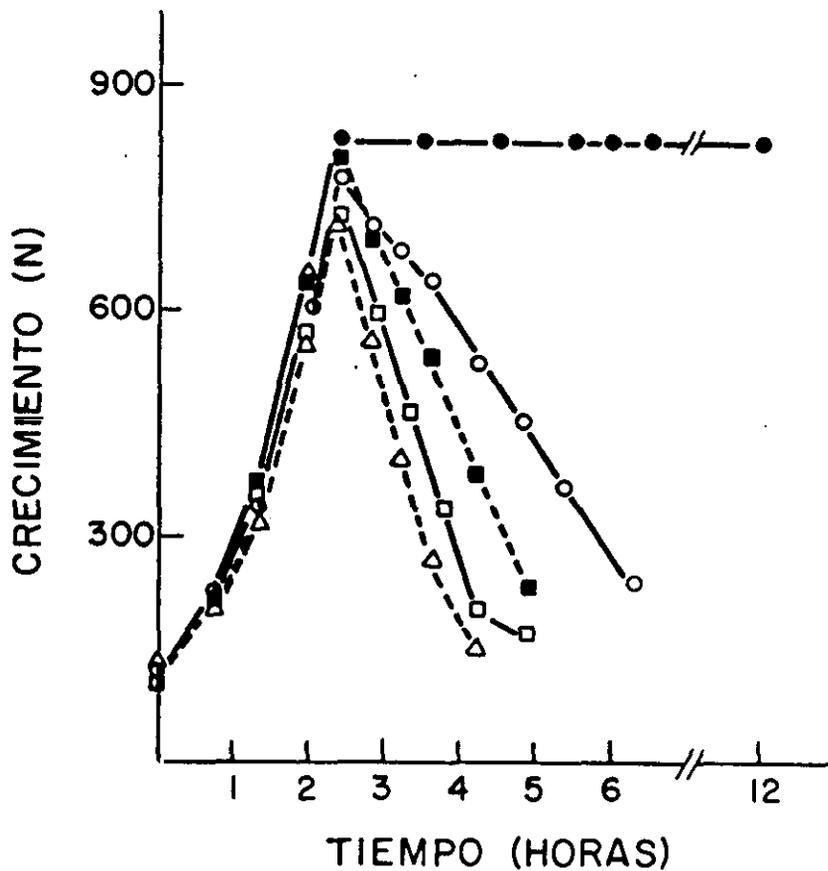
**Figura 26.** Hidrólisis de las paredes celulares de neumococo con las enzimas quiméricas LCA y CLL.

Las paredes celulares de neumococo (100  $\mu$ l) que contienen colina y están marcadas radiactivamente con [metil- $^3$ H]colina (0,6 mg/ml;  $5 \times 10^5$  CPM/mg)( $\bullet$ ) ó [ $^3$ H]lisina (4mg/ml;  $2,5 \times 10^5$  CPM/mg)( $\circ$ ), se incubaron a 37  $^{\circ}$ C durante 18 horas con la enzima LCA (panel A) o con la enzima CLL (panel B) en 300  $\mu$ l de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5. Después de una centrifugación (12.000  $\times$  g, 15 minutos), el sobrenadante (productos de la hidrólisis de las paredes) se aplicó en una columna de Sephadex G-75 (1,5  $\times$  50 cm). La elución se realizó con NaCl 0,15 M y se determinó la radiactividad en 400  $\mu$ l de cada fracción (1,5 ml). La flecha indica el volumen de exclusión de la columna ( $V_0$ ). El perfil de degradación del panel A es el característico de una enzima lítica con actividad amidásica, mientras que el del panel B es el propio de una enzima lítica de pared con actividad muramidásica (lisozima) (García y cols., 1988).



**Figura 27.** Efecto inhibitor de la colina sobre la actividad enzimática de las enzimas LYTA, CPLI, LCA y CLL.

La actividad enzimática de las amidasas LYTA (●) y LCA (○), y de las lisozimas CPLI (▲) y CLL (△), en presencia de diferentes concentraciones de colina, se determinó como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos. En el eje de abscisas se representa el % (p/v) de colina en el ensayo.



**Figura 28.** Efecto de la adición de las enzimas quiméricas LCA y CLL a un cultivo de *S. pneumoniae* M31.

Células de la cepa de neumococo M31 se cultivaron a 37 °C en medio C+Y hasta una concentración de  $7,5 \times 10^7$  UFC/ml. A tiempo cero, alícuotas del cultivo recibieron 300 unidades/ml de las enzimas quiméricas purificadas CLL(△) ó LCA (■); otras alícuotas recibieron, como control positivo, 300 unidades/ml de las enzimas parentales LYTA (○) o CPLI (□). La incubación se continuó y el crecimiento y la lisis celular se siguieron por nefelometría (N). Asimismo, se muestra el crecimiento de un cultivo control que no recibió la adición exógena de ninguna enzima (●).

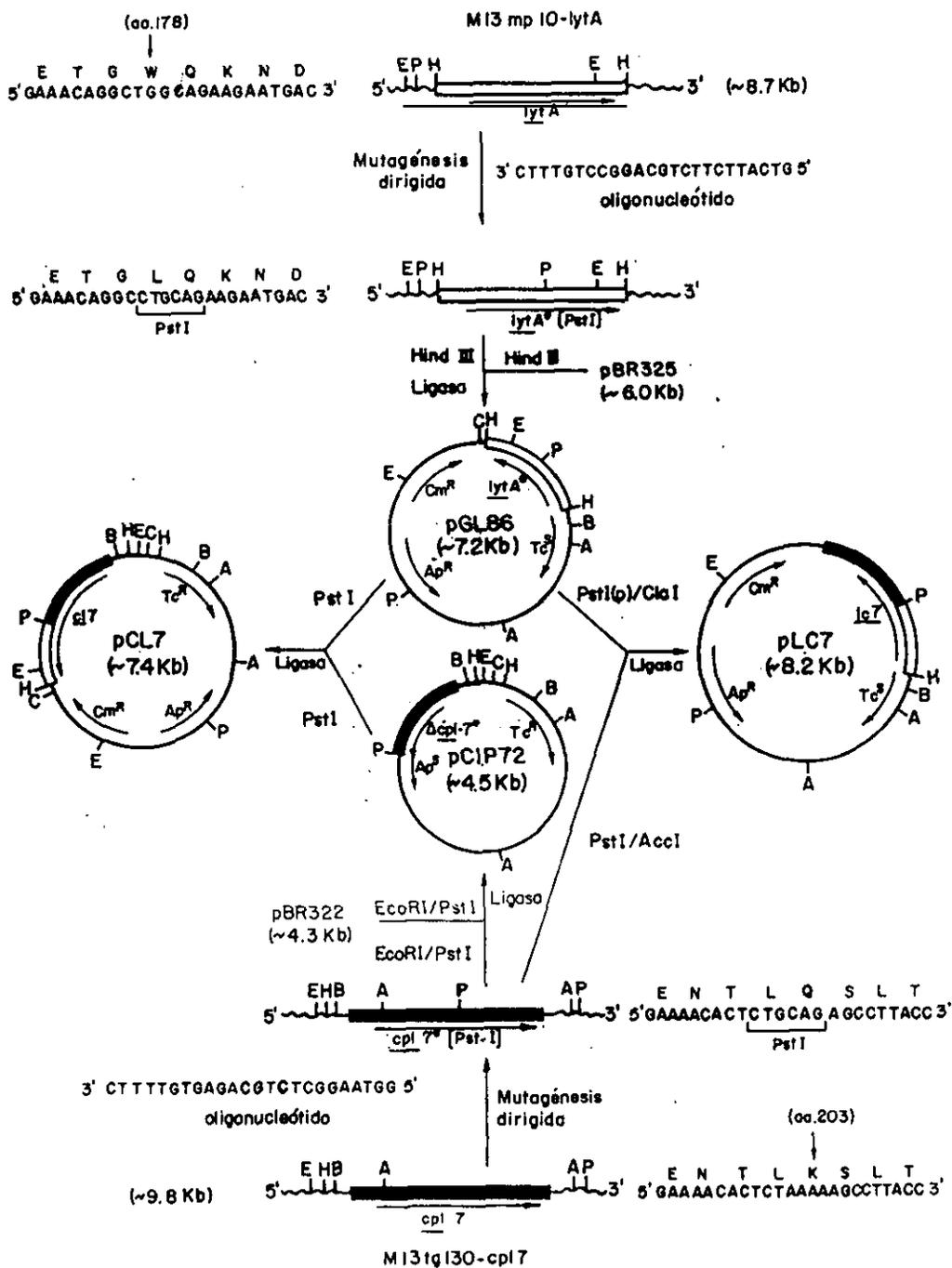
## 5.2. Enzimas líticas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL7.

Las enzimas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL7 se construyeron en base a la similitud que presentaban las enzimas parentales en sus dominios C-terminales. Sin embargo, se desconocía si el intercambio entre dominios no homólogos también podría originar enzimas quiméricas activas cuyas propiedades fuesen la combinación de las presentadas por las enzimas parentales. Para comprobarlo, se procedió a la construcción de proteínas híbridas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL7, enzimas que no muestran similitud en su secuencia. Así, mientras la proteína LYTA es una amidasa y depende de la colina para su actividad, la proteína CPL7 es una lisozima independiente de colina. El intercambio entre los dominios N- y C-terminales de ambas enzimas debería originar una amidasa quimérica independiente de colina y una lisozima quimérica dependiente de colina para su actividad.

### 5.2.1. Construcción de las quimeras LC7 y CL7.

Para llevar a cabo la fusión de los dominios N- y C-terminales de la amidasa LYTA con los correspondientes dominios C- y N-terminales de la lisozima CPL7 se creó, mediante mutagénesis dirigida en los genes *lytA* y *cpl7*, una diana de restricción *Pst*I en la secuencia que codifica para la región de unión de los dominios N- y C-terminales de ambas proteínas (Figuras 7 y 29). El dominio N-terminal de la amidasa LYTA tiene 176 aminoácidos; el dominio N-terminal de la lisozima CPL7 presenta 204 aminoácidos (García y cols., 1988; García y cols., 1990). La diana *Pst*I creada en el gen *lytA* supuso la sustitución del triptófano en posición 178 por una leucina en el inicio del motivo PI de la amidasa LYTA (Figura 29). La diana *Pst*I del gen *cpl7* supuso la sustitución de la lisina en posición 203, el penúltimo aminoácido del dominio N-terminal de la lisozima CPL7, por una glutamina (Figura 29). Los genes *lytA* mutado (*lytA*<sup>\*</sup>) y *cpl7* mutado (*cpl7*<sup>\*</sup>) se seleccionaron en base a su digestión por la endonucleasa de restricción *Pst*I. La proteína codificada por el gen *lytA*<sup>\*</sup> mantenía la actividad hidrolítica sobre paredes celulares y la dependencia de colina, mientras que la enzima codificada por el gen *cpl7*<sup>\*</sup> mantenía la actividad hidrolítica sobre paredes celulares que contenían colina o etanolamina.

Los genes quiméricos *lc7*, que codifica para la enzima quimérica LC7, y *cl7*, que codifica para la enzima quimérica CL7, se construyeron mediante la fusión de los genes *lytA*<sup>\*</sup> y *cpl7*<sup>\*</sup> siguiendo la estrategia que se indica en la Figura 29. Los plásmidos pLC7 y pCL7 contienen clonados los genes *lc7* y *cl7*, respectivamente. Las fusiones génicas realizadas se confirmaron mediante la secuenciación de las regiones de unión de ambos módulos.



**Figura 29.** Construcción de los plásmidos pCL7 y pCL7.

Mediante mutagénesis dirigida se creó una diana de restricción *Pst*I en la región estructural de los genes *lytA* y *cpl7*. Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis se indican en cada caso. Los genes *lytA* y *cpl7* están clonados en las formas replicativas de los fagos M13mp10-*lytA* y M13tg130-*cpl7*, respectivamente. El DNA del fago se representa con línea ondulada; el gen *lytA* y el gen mutante *lytA\** se representan con una barra blanca; el gen *cpl7* y el gen mutante *cpl7\** se representan con una barra negra. Las flechas señalan la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada (en código de una letra) de los genes *lytA*, *lytA\**, *cpl7* y *cpl7\** en la región que rodea a la diana *Pst*I creada; se indica también la posición de la diana *Pst*I en los genes *lytA* y *cpl7*. Los aminoácidos de las proteínas LYTA y CPL7 que se sustituyen en las correspondientes proteínas mutadas se señalan con una flecha, entre paréntesis se especifica su posición en la secuencia primaria de la proteína. Δ*cpl7* representa la región del gen *cpl7* que codifica para el dominio N-terminal de la lisozima CPL7. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción son: A, *Acc*I; B, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I. (p), significa digestión parcial. La construcción de los plásmidos se verificó mediante análisis de restricción.

En los extractos crudos obtenidos tanto de *E. coli* HB101 (pLC7) como de *E. coli* HB101 (pCL7) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo (Tabla 11), lo que indicaba que las proteínas quiméricas LC7 y CL7 eran activas. Los extractos celulares de *E. coli* HB101 (pLC7) eran capaces de degradar paredes celulares de neumococo que contenían colina o etanolamina en sus ácidos teicoicos (Tabla 11). Sin embargo, los extractos de *E. coli* HB101 (pCL7) sólo hidrolizaban eficientemente paredes celulares que contenían colina en su composición (Tabla 11). La enzima LC7 no requería el proceso de *conversión* con colina para alcanzar su máxima actividad catalítica, un requerimiento imprescindible tanto para la amidasa LYTA como para la enzima quimérica CL7 (Tabla 11).

Para determinar el tipo de actividad catalítica de las enzimas quiméricas, los fragmentos resultantes de la digestión de la pared celular de neumococo con dichas enzimas se analizaron mediante cromatografía por filtración en gel. Los perfiles de elución mostraron que la quimera LC7 era una amidasa mientras que la CL7 tenía actividad muramidásica (lisozima) (Figura 30).

Estos resultados demostraban que las dos enzimas quiméricas construidas eran activas y presentaban las propiedades híbridas esperadas, confirmándose, de nuevo, la teoría modular para las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos.

### 5.2.2. Purificación de las enzimas quiméricas.

Para caracterizar mejor las proteínas híbridas LC7 y CL7 se procedió a su purificación. La quimera CL7, dada su característica dependencia por la colina, se purificó mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa (Sanz y cols., 1988).

La quimera LC7, al igual que la lisozima parental CPL7, carece del dominio C-terminal que reconoce específicamente los residuos de colina, por lo que su purificación en un solo paso mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa no era posible. Debido a esto se procedió, en primer lugar, a la clonación e hiperexpresión del gen *lc7* en el plásmido pIN-III(*lpp*<sup>P</sup>-5)-A3 de *E. coli* (Inouye e Inouye, 1985). En la Figura 31 se muestra la estrategia que se siguió para la construcción del plásmido pPLC7, plásmido que contenía clonado el gen *lc7* bajo el control del promotor *lpp*<sup>5</sup>-*lac* inducible por lactosa o por IPTG. En los extractos crudos de la cepa *E. coli* DH1 (pPLC7) cultivada en presencia de 2% de lactosa se detectó una actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que era 35 veces superior a la detectada en los extractos crudos de *E. coli* HB101 (pLC7), cepa que no hiperexpresa la proteína clonada. La quimera LC7 se purificó a partir de los extractos de *E. coli* DH1 (pPLC7) como se indica en el apartado 12.2. de Materiales y Métodos.

**TABLA II.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos de las cepas de *E. coli* que se indican.

Cepa	Actividad <sup>a</sup>		
	Paredes-colina <sup>b</sup>		Paredes-EA <sup>c</sup>
	Sin convertir	Convertidos	
HB101 (pGL80)	292	2.892	< 10
HB101 (pCP70)	556	608	1.164
HB101 (pCL7)	271	1.016	< 10
HB101 (pLC7)	470	438	9.855

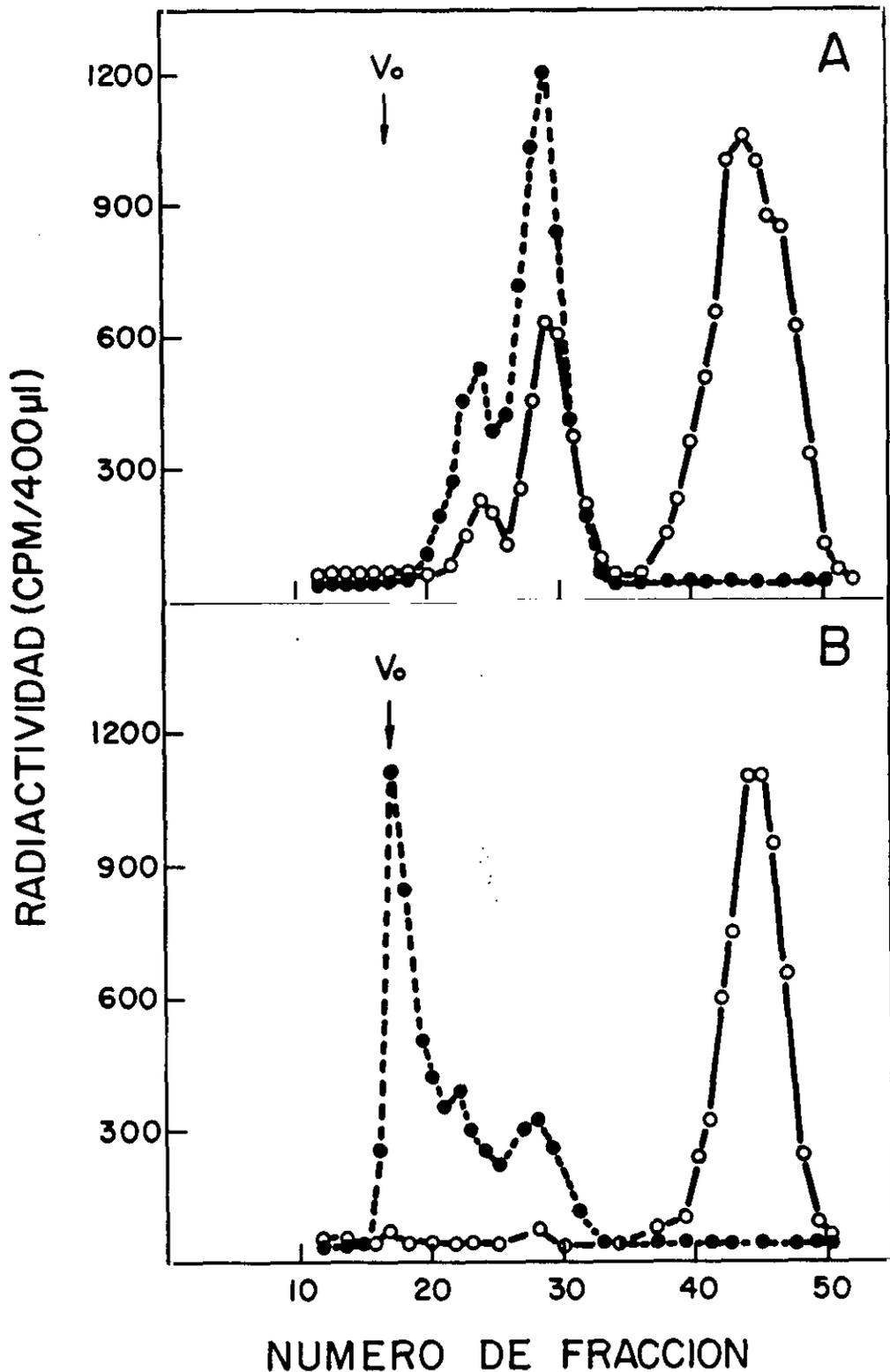
Los valores son la media de 2 experimentos.

Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 6. de Materiales y Métodos.

<sup>a</sup> La actividad se expresa en CPM solubilizadas durante el ensayo enzimático (10 minutos a 37 °C). Se ensayaron, 0,2 µl de extracto de HB101 (pGL80); 33 µl de extracto de HB101 (pCP70); 0,2 µl de extracto de HB101 (pCL7); y 33 µl de extracto de HB101 (pLC7).

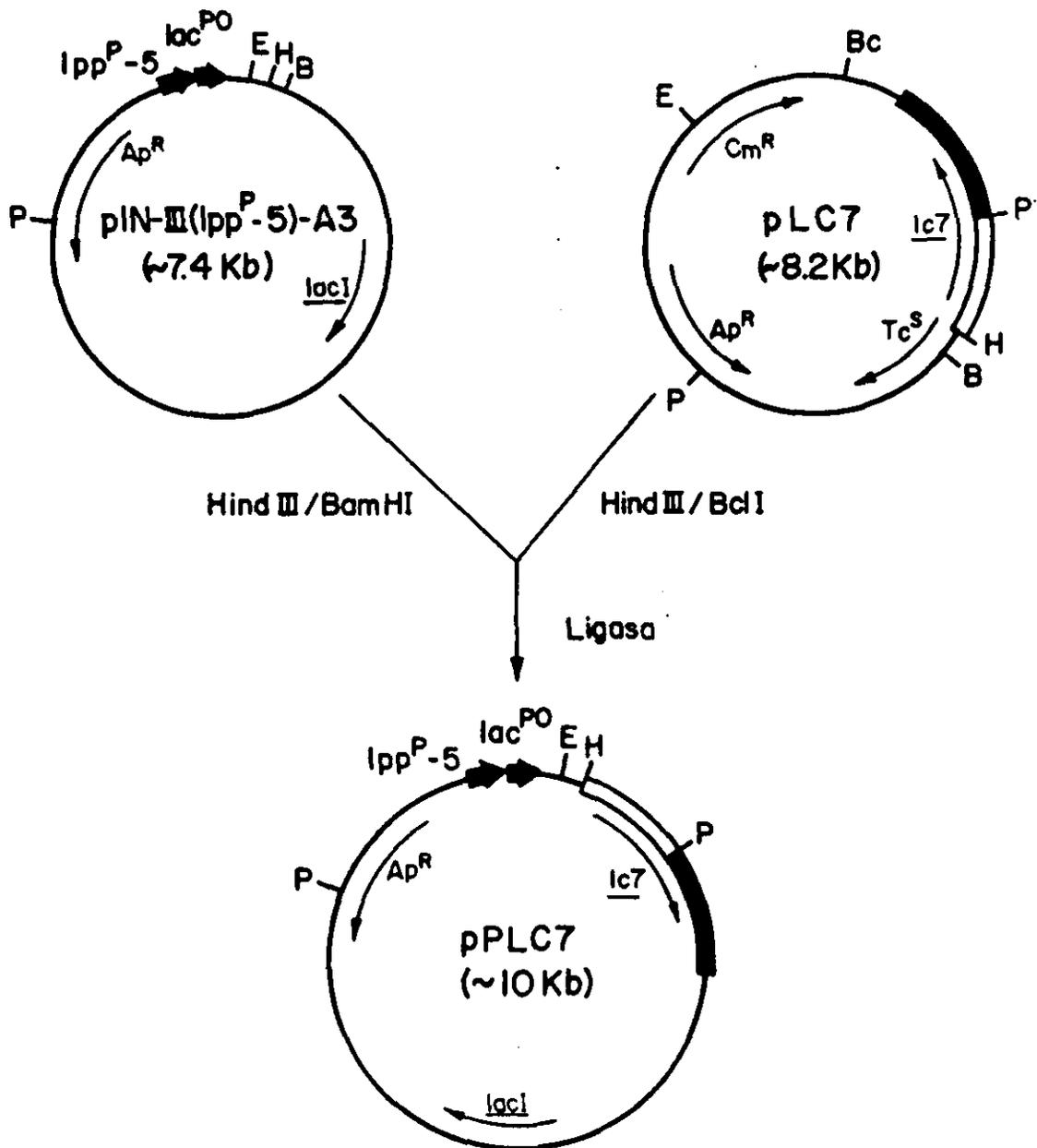
<sup>b</sup> Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se describe en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, con o sin preincubación durante 10 minutos a 4 °C en presencia de colina 140 mM (*conversión*). Como sustrato se emplearon paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina.

<sup>c</sup> Actividad de los extractos sobre paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina. Los ensayos enzimáticos se realizaron como se detalla en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos pero sin preincubación en presencia de colina.



**Figura 30.** Hidrólisis de las paredes celulares de neumococo con las enzimas quiméricas LC7 y CL7.

Las paredes celulares de neumococo (100 µl) que contienen colina y están marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina (●) ó [<sup>3</sup>H]lisina (○) se incubaron con la enzima CL7 (panel A) y LC7 (panel B) en 300 µl de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5. Las condiciones del ensayo y el análisis de los productos de la hidrólisis de las paredes mediante cromatografía por filtración en gel se detallan en la Figura 26. La flecha indica el volumen de exclusión ( $V_o$ ) de la columna. El perfil de degradación del panel A es el característico para una enzima lítica de pared con actividad muramidásica (lisozima), mientras que el del panel B es el característico de una enzima lítica con actividad amidásica (García y cols., 1988).



**Figura 31.** Construcción del plásmido pPLC7.

Con una barra blanca y negra se representa el gen *lc7*, construído mediante la fusión de la secuencia del gen *lytA* que codifica para el dominio N-terminal de la amidasa LYTA (barra blanca) con la secuencia del gen *cp17* que codifica para el dominio C-terminal de la lisozima CPL7 (barra negra). Las flechas finas indican la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Las flechas gruesas corresponden al promotor modificado del gen de la lipoproteína (*lpp<sup>P</sup>-5*) y al promotor-operador del gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*lac<sup>PO</sup>*) de *E. coli*. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción son : B, *Bam*HI; Bc, *Bcl*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I. *lacI* es el gen que codifica para el represor del operón de la lactosa. El plásmido pLC7 utilizado en esta construcción se aisló de *E. coli* GM119 (pLC7), una cepa *Dam*<sup>-</sup>.

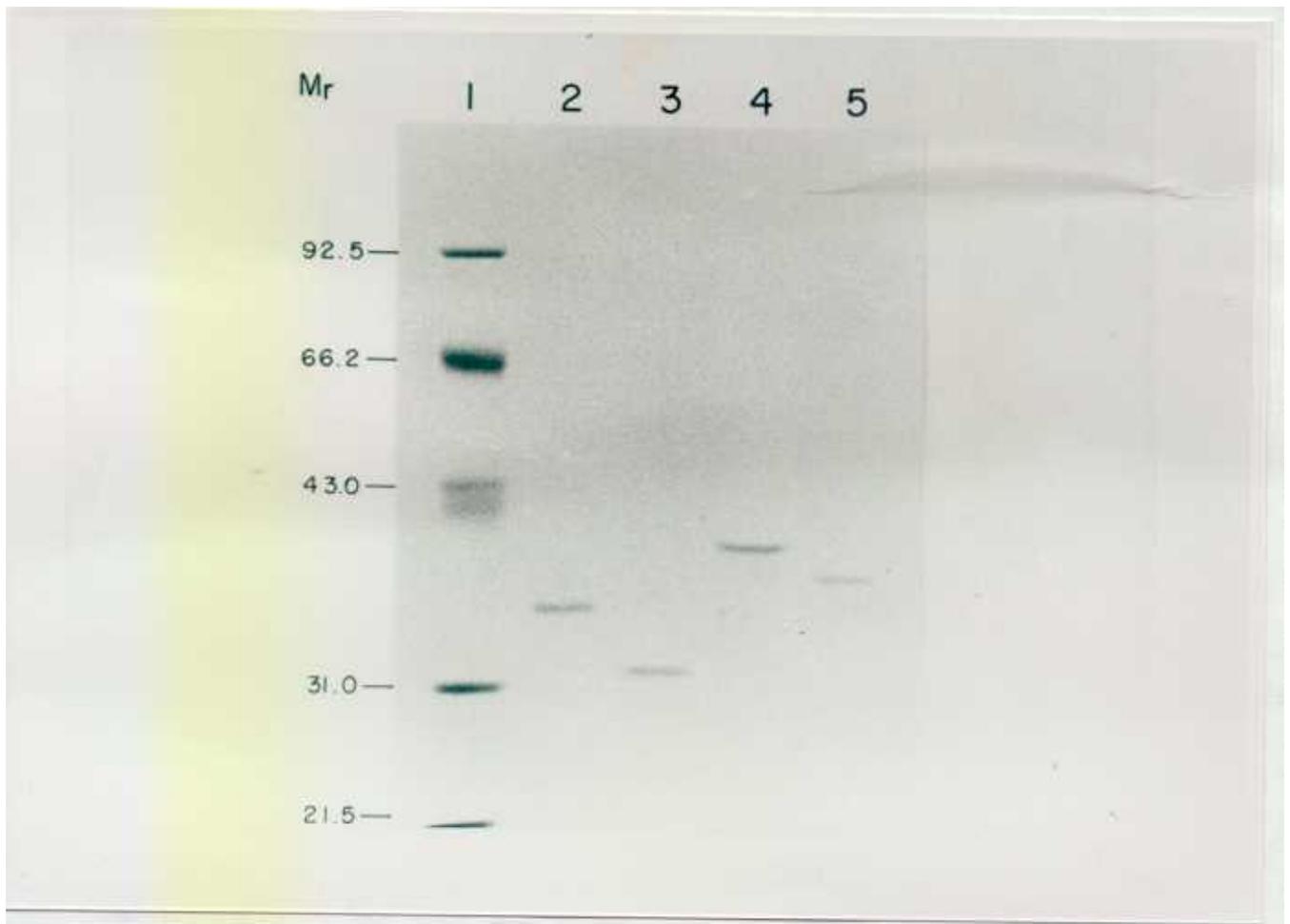
Cuando las enzimas quiméricas purificadas se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Figura 32), la amidasa LC7 presentó una  $M_r$  (32.000) ligeramente inferior a la  $M_r$  deducida de su secuencia de aminoácidos (35.467). Una discrepancia similar entre el peso molecular real de la proteína y el calculado mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS se había observado también para la quimera CLL (apartado 5.1.2.). La lisozima CL7 presentó una  $M_r$  de 40.000, valor que prácticamente coincidía con el deducido de su secuencia de aminoácidos, 39.322. La amidasa LYTA y la lisozima CPL7 mostraron las  $M_r$  esperadas de 36.500 y 38.500, respectivamente.

Algunas propiedades de las enzimas quiméricas purificadas se resumen en la Tabla 12. Puesto que la lisozima CL7 presentaba una baja actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que contenían etanolamina en comparación a la que presentaba sobre paredes celulares que contenían colina, debía considerarse, al igual que la amidasa LYTA, como una enzima dependiente de colina. Por el contrario, tanto la amidasa LC7 como la lisozima parental CPL7 se comportaban como enzimas independientes de colina (Tabla 12). Como era lógico suponer, sólo la actividad de las enzimas dependientes de colina se inhibía completamente al añadir este aminoalcohol al ensayo enzimático (Tabla 12). La pequeña inhibición causada por la colina sobre la amidasa LC7 (5%) y la lisozima CPL7 (15%) era inespecífica y debida a la fuerza iónica del medio, ya que una concentración equivalente de NaCl producía el mismo efecto inhibitorio que la colina.

Cuando se determinó la actividad enzimática de las enzimas parentales y de las enzimas quiméricas a distintos pH, se observaron respuestas diferentes (Figura 33). Las enzimas CPL7 y LC7 eran más activas a pH 4,5 que a pH 6,5, sin embargo, las enzimas LYTA y CL7 tenían más actividad a pH 6,5. Para las cuatro enzimas la actividad a pH 8,0 era siempre inferior al 50% de la actividad enzimática máxima (Figura 33). Las actividades enzimáticas que se muestran en la Tabla 12 han sido determinadas al pH óptimo para la amidasa LYTA, pH 6,5, que es el pH habitual en la fase estacionaria de crecimiento de los cultivos de neumococo en medio C+Y (López y cols., 1976). Por ello, y según se deduce de los datos presentados en la Figura 33, la actividad enzimática de la amidasa LC7 y de la lisozima CPL7 al pH óptimo de los tres que se han ensayado, será 5 y 2 veces, respectivamente, superior a la que se indica en la Tabla 12.

### 5.2.3. Actividad in vivo de las enzimas quiméricas.

La capacidad lítica *in vivo* de la amidasa LC7 y la lisozima CL7 se determinó de forma similar a como se ha descrito en el apartado 5.1.3. para las proteínas quiméricas CL y LC. En la Figura 34 se muestra que la adición de 200 unidades/ml de CL7 o LC7 a un cultivo de la cepa de



**Figura 32.** Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% de las enzimas LYTA, CPL7, LC7 y CL7 purificadas.

Las enzimas LYTA y CL7 se purificaron mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa (apartado 12.1. de Materiales y Métodos); las proteínas CPL7 y LC7 se purificaron como se describe en el apartado 12.2. de Materiales y Métodos. Calle 1, proteínas marcadoras : fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica e inhibidor de tripsina. Sus  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) se detallan en el margen izquierdo de la figura. Calle 2, amidasa LYTA purificada de extractos de *E. coli* RB791 (pGL100). Calle 3, amidasa LC7 purificada de extractos de *E. coli* DHI (pPLC7). Calle 4, lisozima CL7 purificada de extractos de *E. coli* HB101 (pCL7). Calle 5, lisozima CPL7 purificada de extractos de *E. coli* DHI (pCP700). Las cepas transformantes de *E. coli* DHI y RB791 se crecieron en presencia de 2% (p/v) de lactosa. En cada calle se aplicó 1  $\mu$ g de proteína.

**TABLA 12.** Propiedades bioquímicas de las enzimas LYTA, LC7, CPL7 y CL7 purificadas.

Propiedad	Enzima			
	LYTA	LC7	CPL7	CL7
Tipo de actividad <sup>a</sup>	Amidasa	Amidasa	Lisozima	Lisozima
A.E. (P-colina) <sup>b</sup>	560	15	86	378
A.E. (P-EA) <sup>c</sup>	1	65	74	2
% Inhibic.colina <sup>d</sup>	100	5	15	100

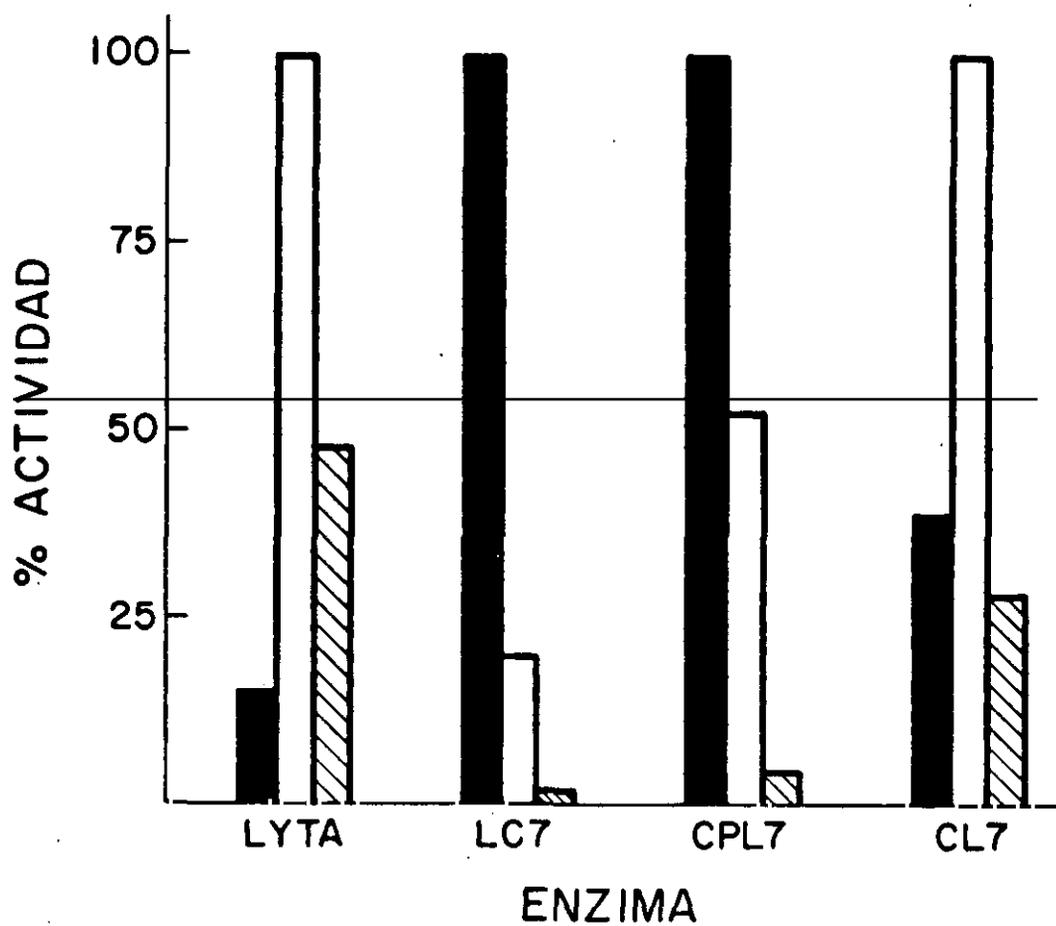
Los datos son la media de 2 experimentos.

Las enzimas se purificaron como se indica en la Figura 32.

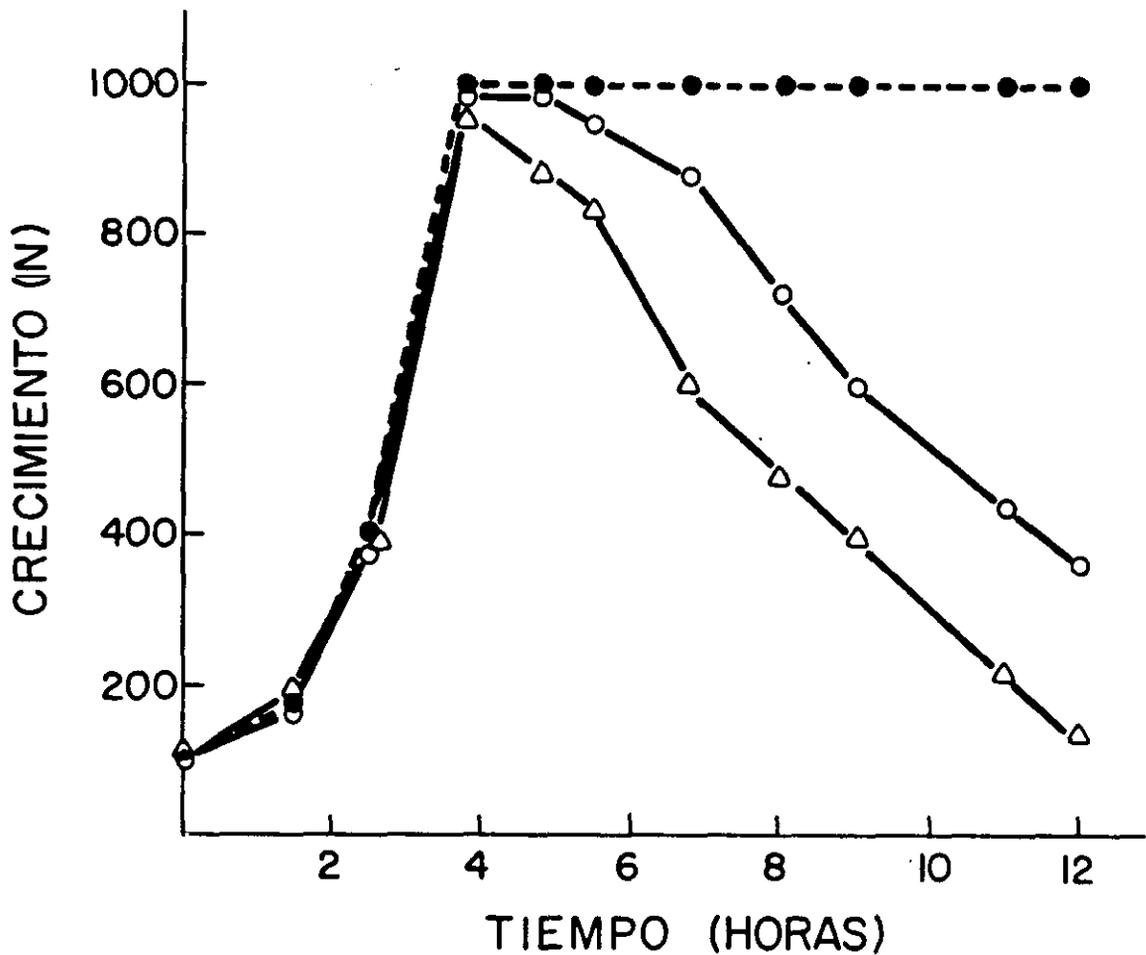
<sup>a</sup> El tipo de actividad enzimática se determinó como se detalla en la Figura 26.

<sup>b</sup> y <sup>c</sup> La actividad específica (A.E.) se expresa en unidades por  $\mu\text{g}$  de proteína. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina que contienen colina (b) o etanolamina (c).

<sup>d</sup> El efecto inhibitorio de la colina (70 mM) sobre la actividad de las enzimas purificadas se determinó utilizando paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina. El 100% de inhibición significa que la actividad residual era inferior a la mínima actividad que se puede detectar en el ensayo.



**Figura 33.** Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas LYTA, CPL7, LC7 y CL7. Las enzimas purificadas se ensayaron sobre paredes celulares que contenían colina como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos. Los tampones utilizados fueron : acetato sódico 50 mM, pH 4,5 (barras negras); fosfato sódico 50 mM, pH 6,5 (barras blancas); fosfato sódico 50 mM, pH 8,0 (barras rayadas). El 100% de actividad representa la actividad al pH óptimo de los tres que se han elegido.



**Figura 34.** Efecto de la adición de las enzimas quiméricas CL7 y LC7 a un cultivo de *S. pneumoniae* M31.

Las células de la cepa de neumococo M31 se cultivaron a 37 °C en medio C+Y hasta alcanzar una concentración de  $7,5 \times 10^7$  UFC/ml. A tiempo cero, alícuotas del cultivo recibieron 200 unidades/ml de las enzimas quiméricas purificadas LC7 (○) ó CL7 (△), y se continuó la incubación. El crecimiento y la lisis de los cultivos se siguieron por nefelometría (N). También se muestra como control el crecimiento de un cultivo que no recibió la adición exógena de ninguna enzima (●).

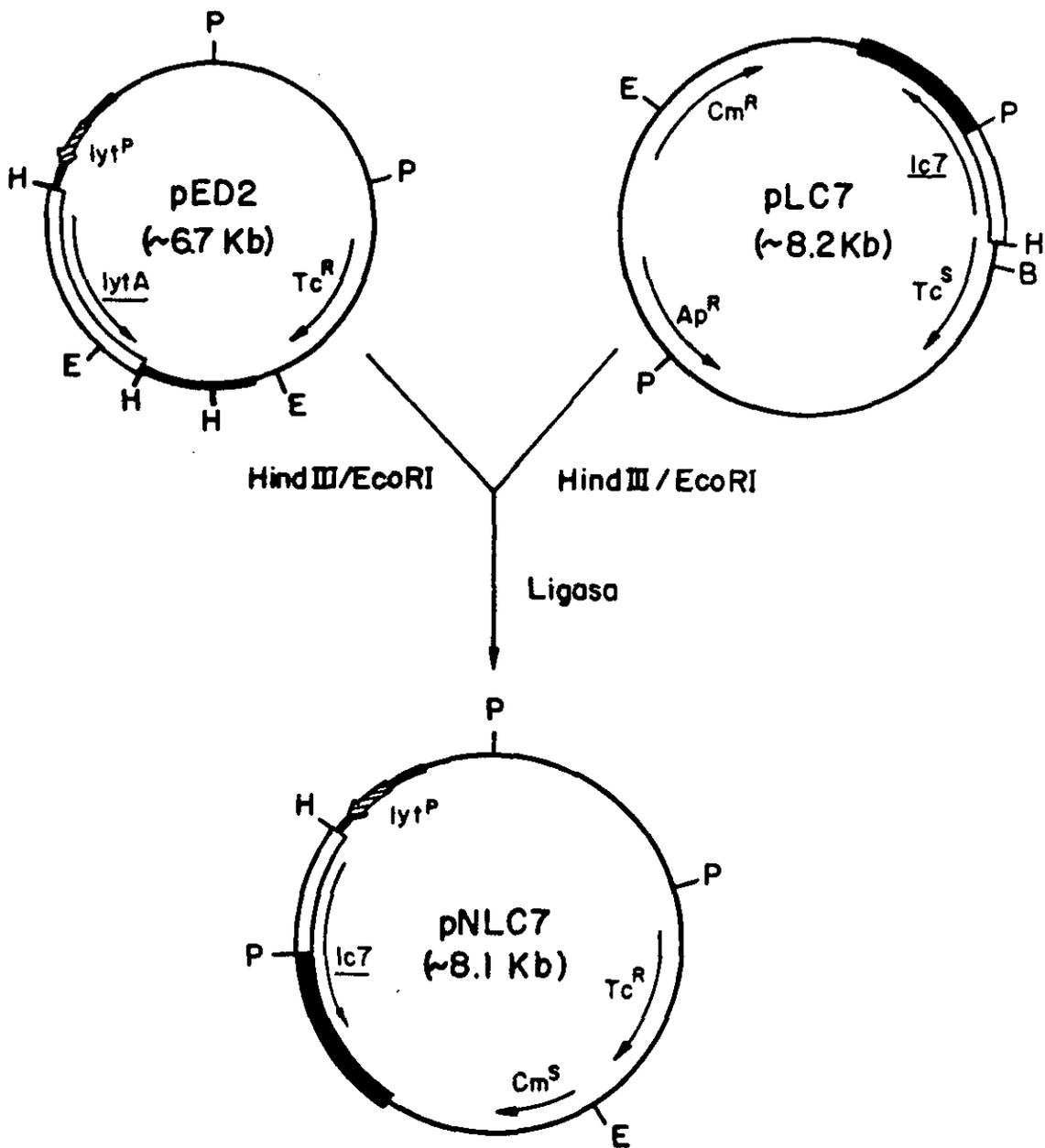
neumococo M31 al comienzo de la fase exponencial de crecimiento, causaba la lisis de dicho cultivo cuando éste alcanzaba la fase estacionaria. Este resultado indicaba que las enzimas quiméricas LC7 y CL7 eran capaces de degradar paredes celulares de neumococo *in vivo*, y que el control (inhibición) al que se ve sometida la amidasa LYTA durante la fase exponencial de crecimiento era también efectivo sobre las quimeras cuando éstas se añadían exógenamente al cultivo.

#### 5.2.4. Clonación y expresión de la amidasa quimérica LC7 en *S. pneumoniae*.

Dado que la proteína quimérica LC7 presentaba propiedades no descritas hasta la fecha en otras amidasas de neumococo y sus bacteriófagos, resultaba interesante su clonación y expresión en el sistema homólogo. El estudio de la regulación de la amidasa LC7 en *S. pneumoniae* podría aportar nuevos datos sobre el control de la autolisina LYTA en esta bacteria, ya que el único mecanismo propuesto para explicar la regulación de la autolisina LYTA en neumococo se basa en el efecto inhibitorio de los residuos de colina del LTA de la membrana celular (Briese y Hakenbeck, 1985).

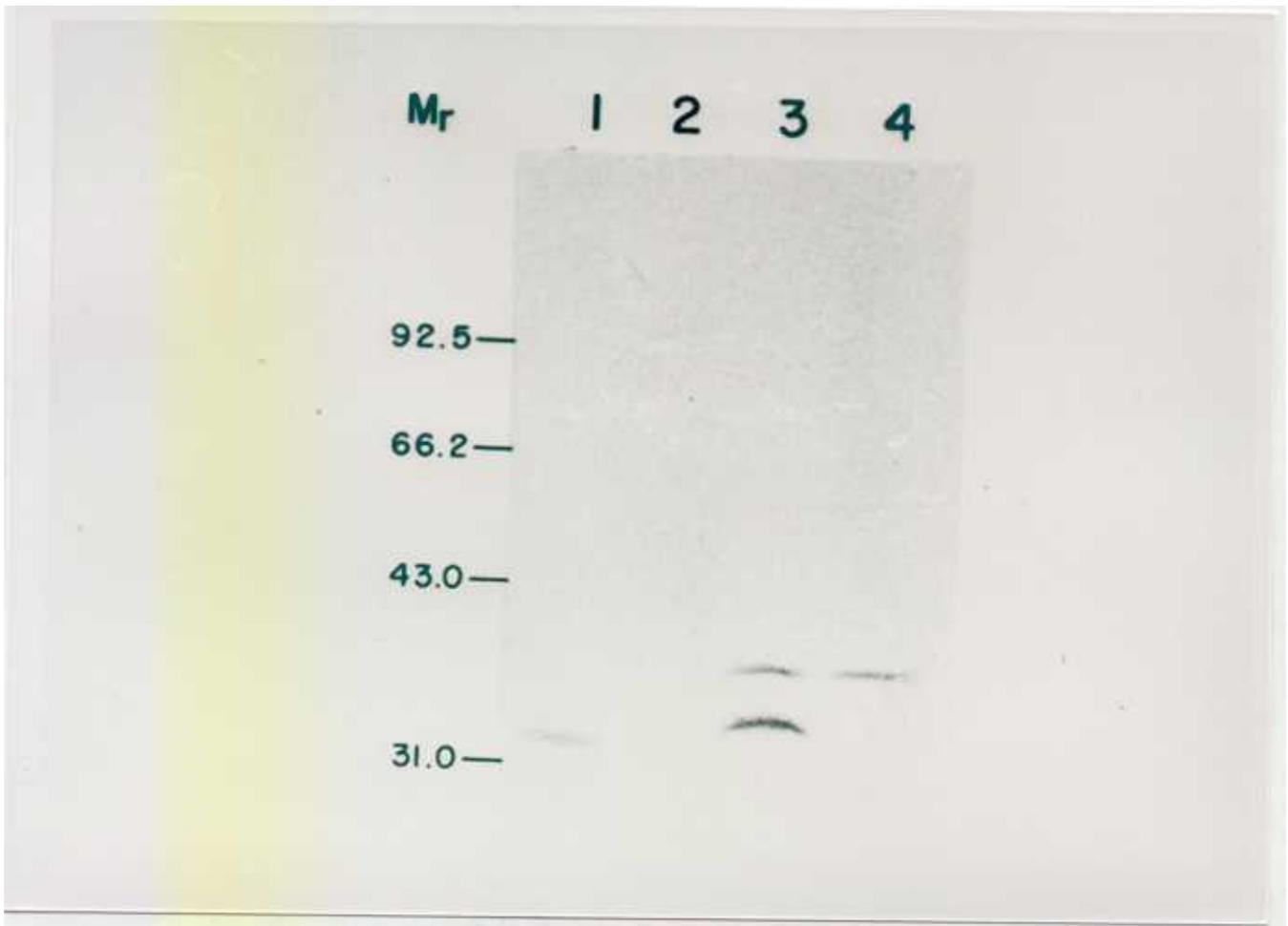
Para analizar la respuesta de neumococo a la expresión de la amidasa quimérica LC7 se clonó el gen *lc7* en las cepas M31 y R6 de *S. pneumoniae*. Para ello, se substituyó la región estructural del gen *lytA* en el plásmido pED2 por el gen *lc7* del plásmido pLC7 (Figura 35). El plásmido resultante, pNLC7, contenía el gen *lc7* bajo el control del promotor del gen *lytA* (Figura 35). Las cepas de neumococo R6 (pNLC7) y M31 (pNLC7) expresaban la amidasa quimérica LC7 como quedaba de manifiesto al analizar los extractos de estas cepas mediante la técnica de *Western-blot* utilizando un suero anti-amidasa LYTA (Figura 36). En los extractos de *S. pneumoniae* M31 (pNLC7) se detectó actividad hidrolítica tanto sobre paredes celulares de neumococo que contenían colina (250 unidades/mg de proteína) como sobre paredes celulares que contenían etanolamina (1100 unidades/mg proteína). De la misma forma, en los extractos de *S. pneumoniae* R6 (pNLC7) también se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares que contenían etanolamina (1600 unidades/mg de proteína) o colina (2700 unidades/mg de proteína). La actividad del extracto de la cepa R6 (pNLC7) sobre paredes que contenían colina era la suma de las actividades enzimáticas debidas a la amidasa LYTA del huésped y a la amidasa LC7 clonada (Figura 36, calle 3).

Cuando la cepa *S. pneumoniae* M31 (pNLC7) se cultivó en medio C+Y a 37 °C, los cultivos se autolisaron al final de la fase estacionaria de crecimiento, al contrario de lo que ocurría con la cepa parental M31 (Figura 37 A). Además, la cepa recombinante presentaba un fenotipo DOC<sup>+</sup> (apartado 3.2. de Materiales y Métodos), en contraste con el fenotipo DOC<sup>-</sup>



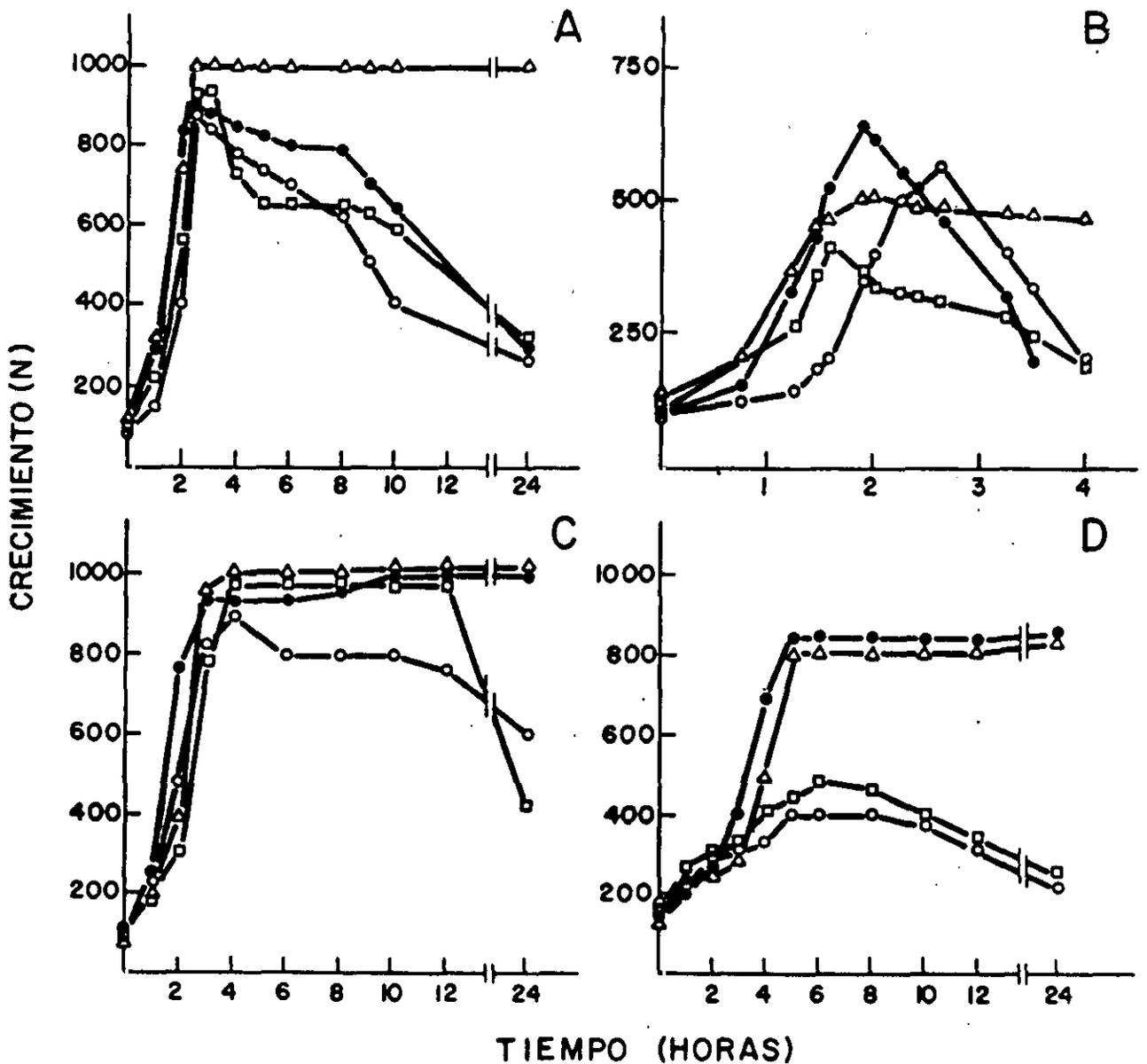
**Figura 35.** Construcción del plásmido pNLC7.

En línea gruesa se representan las regiones flanqueantes del fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb que contiene la región estructural del gen *lytA* (barra blanca). La barra blanca y negra indica el gen quimérico *lc7*, construido por la fusión de la secuencia del gen *lytA* que codifica para el dominio N-terminal de la amidasa LYTA (barra blanca) con la secuencia del gen *cpl7* que codifica para el dominio C-terminal de la lisozima CPL7 (barra negra). Las flechas finas muestran la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Las flechas gruesas y rayadas corresponden al promotor del gen *lytA* (*lytP*). Las dianas de restricción más relevantes se indican con las siguientes abreviaturas: B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*.



**Figura 36.** Western-blot de los extractos crudos de las cepas de neumococo M31, M31 (pNLC7), R6 y R6 (pNLC7).

El Western-blot se realizó como se indica en el apartado 26. de Materiales y Métodos. Se utilizó un suero anti-amidasa LYTA. Calle 1, extracto de la cepa *S. pneumoniae* M31 (pNLC7). Calle 2, extracto de la cepa *S. pneumoniae* M31. Calle 3, extracto de la cepa *S. pneumoniae* R6 (pNLC7). Calle 4, extracto de la cepa *S. pneumoniae* R6. En cada calle se aplicaron 250  $\mu\text{g}$  de proteína. La  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) de las proteínas marcadoras se indica en el margen izquierdo de la figura.



**Figura 37.** Curvas de crecimiento de las cepas de neumococo R6, M31, R6 (pNLC7) y M31 (pNLC7) cultivadas en diferentes medios. Las cepas R6 (●), M31 (△), R6 (pNLC7) (○) y M31 (pNLC7) (◻) se cultivaron a 37 °C en : medio C+Y (panel A); medio C+Y al que se le añadió penicilina G (0,2 µg/ml, 28 x MIC) cuando el cultivo había alcanzado una concentración celular de  $2,5 \times 10^8$  UFC/ml (350 N) (panel B); medio C+Y con 0,6% de colina (panel C); medio Cden-EA (panel D). El crecimiento y la lisis se siguieron por nefelometría (N).

de la cepa M31. Estos resultados demostraban que la enzima quimérica LC7 se comportaba en neumococo como una autolisina cuya actividad se mantenía inhibida durante la mayor parte del crecimiento del cultivo, como ocurría con la amidasa LYTA en la cepa R6 (Figura 37 A). La expresión de la amidasa LC7 no alteraba, aparentemente, el comportamiento fisiológico de la cepa tipo R6 (Figura 37 A). Cuando se añadía penicilina al medio de cultivo (Figura 37 B), la cepa M31 (pNLC7) no mostraba la respuesta tolerante característica de la cepa M31 sino que sufría una rápida lisis celular, lo que indicaba que la enzima quimérica LC7 era la responsable de dicha lisis en presencia del antibiótico.

Para distinguir la actividad debida a la amidasa LYTA de la debida a la amidasa LC7, se cultivaron las cepas de neumococo en presencia de colina al 0,6% (p/v) (Figura 37 C) o en medio Cden-EA (Figura 37 D). Cuando se añade colina al 0,6% a un cultivo de neumococo, se impide tanto su autolisis como su lisis por el desoxicolato, y este efecto es debido a la inhibición de la actividad de la amidasa LYTA por la colina (apartado 4.6.1.1.2. de la Introducción) (Giudicelli y Tomasz, 1984 a; Briese y Hakenbeck, 1985). Como se observa en la Figura 37 C, las cepas R6 y M31 no se autolisaban en presencia de 0,6% de colina, y presentaban un fenotipo DOC<sup>-</sup>. Sin embargo, las cepas transformantes M31 (pNLC7) y R6 (pNLC7), que expresaban una amidasa que no se inhibía por colina, sí se autolisaban (Figura 37 C), y su fenotipo era DOC<sup>+</sup>.

La sustitución de la colina por etanolamina en la pared celular de *S. pneumoniae* inhibe la autolisis de los cultivos y la sensibilidad de éstos al desoxicolato (apartado 4.3.2.3. de la Introducción). En la Figura 37 D se muestra que las cepas que expresan la amidasa LC7 se autolisaban y su fenotipo era DOC<sup>+</sup>, mientras que las correspondientes cepas parentales (R6 y M31) no se autolisaban y su fenotipo era DOC<sup>-</sup>.

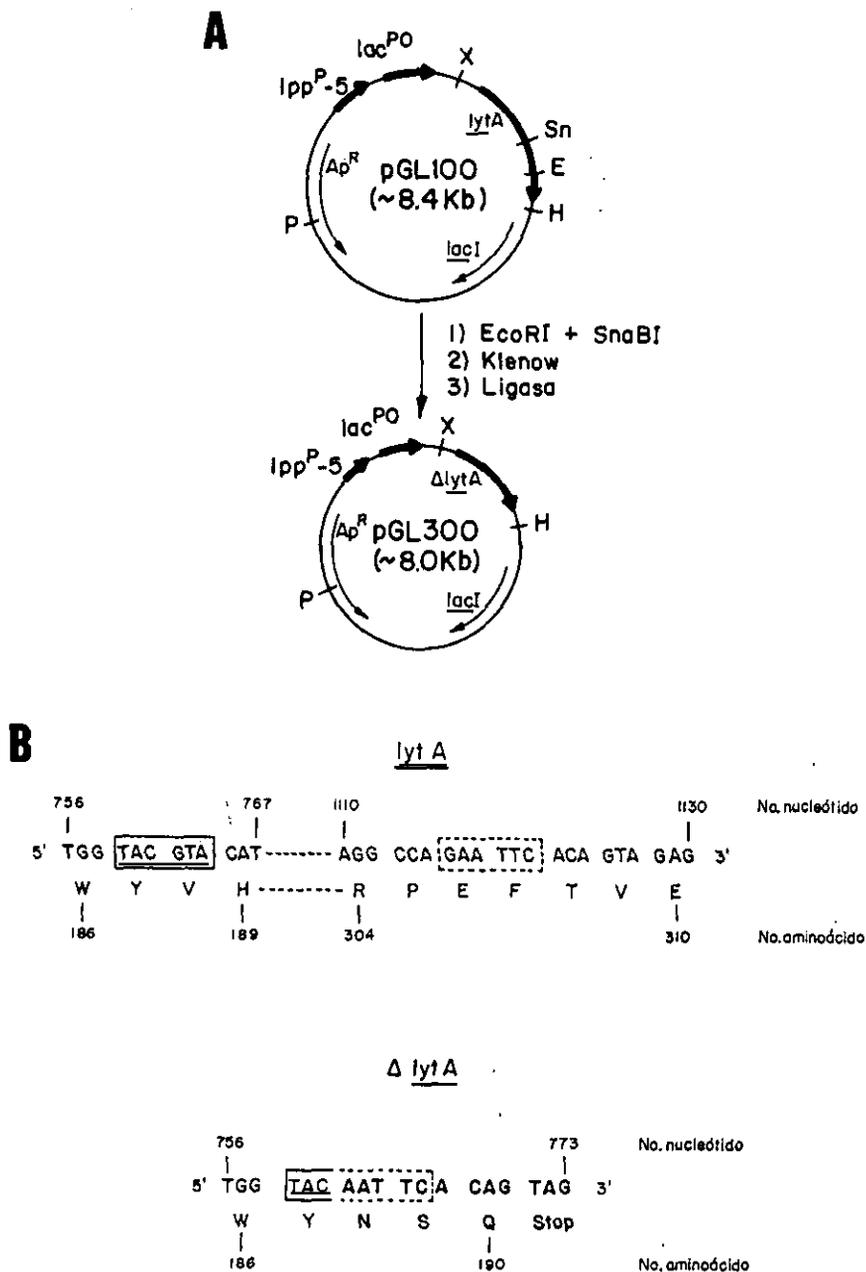
Cuando neumococo se cultiva en medio C+Y tamponado a un pH inicial de 6,6 (el medio C+Y normalmente se tampona a un pH inicial de 8) no se produce la autolisis de los cultivos (López y cols., 1976). Este efecto se había atribuido, en gran medida, a los bajos niveles de actividad que presenta la amidasa LYTA a pH 4,5, el pH del cultivo cuando éste alcanza el final de la fase exponencial de crecimiento (López y cols., 1976). Dado que la amidasa LC7 mostraba más actividad a pH 4,5 que a pH 6,5 (Figura 33), se debería esperar que las cepas portadoras del plásmido pNLC7, al igual que se autolisaban en medio C+Y normal se autolisasen también en medio C+Y a pH inicial de 6,6. Sin embargo, ninguna de las dos cepas transformantes sufrió autolisis, un resultado que hacía sospechar la existencia de factores adicionales a la amidasa LYTA implicados también en la respuesta de los cultivos de neumococo al pH del medio.

## **6. CLONACION Y EXPRESION EN *E. coli* DEL DOMINIO N-TERMINAL DE LA AMIDASA LYTA.**

La construcción de enzimas quiméricas activas entre la amidasa LYTA y las lisozimas CPL1 y CPL7 (apartado 5.) supuso la demostración experimental de la hipótesis que postulaba la organización modular de estas enzimas. Paralelamente, la clonación y expresión en *E. coli* del dominio C-terminal de las enzimas LYTA y CPL1 (Sánchez-Puelles y cols., 1990), reveló que dicho dominio constituía realmente un módulo funcional independiente que conservaba la capacidad de interaccionar con la colina de la pared celular. Para determinar si el dominio N-terminal de la amidasa LYTA actuaba también como un módulo funcional independiente con actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo, se procedió a su clonación y expresión en *E. coli*.

### **6.1. Construcción del plásmido pGL300.**

Para la clonación del dominio N-terminal de la amidasa LYTA en *E. coli* se utilizó el plásmido pGL100 que contiene la región estructural completa del gen *lytA* bajo el control del promotor inducible *lpp<sup>5</sup>-lac<sup>PO</sup>* (Inouye e Inouye, 1985). La separación de los dominios N- y C-terminal de la amidasa LYTA se realizó mediante la deleción del fragmento de restricción *Sna*BI-*Eco*RI (357 pb) del plásmido pGL100 siguiendo la estrategia que se indica en la Figura 38 A. En la Figura 38 B se detalla la deleción realizada en el gen *lytA* así como la secuencia de nucleótidos de la región del gen  $\Delta$ *lytA* que codifica para los aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína LYTA truncada en el plásmido resultante pGL300. La secuenciación de esta región del gen  $\Delta$ *lytA* confirmó la existencia de un codón de terminación de la traducción (UAG) a 9 nucleótidos de la posición que ocupaba la diana *Sna*BI en el gen *lytA* (Figura 38 B). El gen  $\Delta$ *lytA* del plásmido pGL300 codifica, por lo tanto, para una proteína LYTA truncada de tan sólo 190 aminoácidos (Figura 38 B). De estos 190 aminoácidos, 176 corresponden al dominio N-terminal de la enzima parental, 11 corresponden al motivo PI del dominio C-terminal (región de unión de ambos dominios) (García y cols., 1988) y los 3 últimos están codificados por un nuevo marco de lectura abierto surgido como consecuencia de la ligación realizada para la construcción del plásmido pGL300 (Figura 38 B).



**Figura 38.** Clonación del dominio N-terminal de la amidasa LYTA.

**Panel A.** Construcción del plásmido pGL300. Las flechas finas señalan la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Las flechas gruesas indican la región estructural de los genes *lytA* y  $\Delta lytA$ , así como la localización de los promotores *lpp*<sup>P-5</sup> (promotor modificado del gen de la lipoproteína) y *lac*<sup>PO</sup> (promotor-operador del gen de la  $\beta$ -galactosidasa) de *E. coli*. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción son: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; Sn, *SnaBI*; X, *XbaI*. Klenow, indica el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. *lacI* es el gen que codifica para el represor del operón de la lactosa.

**Panel B.** En la parte superior del panel se muestra la secuencia parcial de nucleótidos así como la secuencia de aminoácidos derivada (en código de una letra) de la región que rodea a las dianas de restricción *SnaBI* y *EcoRI* del gen *lytA*. En la parte inferior del panel se detalla la secuencia de nucleótidos del extremo 3' de la región estructural del gen  $\Delta lytA$  del plásmido pGL300, se muestra también la secuencia de aminoácidos derivada. El recuadro en línea continua señala la posición de la diana de restricción *SnaBI*. El recuadro en línea discontinua señala la posición de la diana de restricción *EcoRI*. El recuadro en línea continua y discontinua indica la ligación realizada para la construcción del plásmido pGL300. Los nucleótidos señalados con trazo grueso muestran el nuevo marco de lectura que se crea en el gen  $\Delta lytA$ . Los aminoácidos señalados con trazo grueso son los codificados por el nuevo marco de lectura, y corresponden al extremo C-terminal de la amidasa LYTA truncada de 190 aminoácidos. El número de nucleótido hace referencia a la secuencia del fragmento *HindIII* de 1,2 kb que contiene al gen *lytA* (García y cols., 1986c).

## 6.2. Análisis de los extractos de *E. coli* RB791 (pGL300).

Cuando un extracto crudo de la cepa *E. coli* RB791 (pGL300) cultivada en presencia de 2% de lactosa (condiciones de inducción) se analizó mediante la técnica de *Western-blot* utilizando un suero anti-amidasa LYTA, se observó una única proteína que reaccionaba con el antisuero empleado, pero cuya  $M_r$ , 28.000, era superior a la teórica esperada, 21.525 (190 aminoácidos) (Figura 39). El resultado del análisis mediante *Western-blot* demostraba, por lo tanto, que la región N-terminal de la amidasa LYTA se expresaba en *E. coli* como un dominio independiente del resto de la molécula, y que esta expresión estaba bajo el control de un promotor inducible en presencia de lactosa al 2% (promotor  $lpp^5-lac^{PO}$ ). La causa de la movilidad anómala de la proteína en geles de poliacrilamida-SDS se desconoce, pero no parece poder atribuirse a ningún mecanismo que suprima la terminación de la traducción, ya que la cepa *E. coli* RB791 (Tabla 1) no es supresora y se ha observado la existencia de otros dos codones de terminación de la traducción a 9 pb (TGA) y 18 pb (TAA) del codón de terminación de la traducción (TAG) propuesto para el gen *lytA* (Figura 38 B), lo que impediría la traducción de los casi 60 aminoácidos adicionales necesarios para dar cuenta de una  $M_r$  de 28.000.

Para comprobar si el dominio N-terminal conservaba la función que desempeñaba en la molécula completa de amidasa LYTA, es decir, la actividad amidásica sobre paredes celulares de neumococo, se realizaron ensayos enzimáticos con los extractos crudos de *E. coli* RB791 (pGL300). El resultado de estos ensayos mostró la existencia de actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo, aunque esta actividad era  $5,7 \times 10^4$  veces inferior a la que se detectaba en extractos crudos de *E. coli* (pGL100), cepa que hiperexpresa la enzima LYTA completa (Tabla 13). Sin embargo, mientras que en los extractos de la cepa RB791 (pGL300) se detectó un nivel de actividad similar sobre paredes celulares de neumococo que contienen colina o etanolamina, en los extractos de la cepa RB791 (pGL100) la actividad hidrolítica sobre paredes que contienen colina era 1.300 veces superior a la actividad detectada sobre paredes que contienen etanolamina (Tabla 13). En los extractos de la cepa control RB791 (pIN-III-A3) no se detectó actividad enzimática (Tabla 13) ni siquiera después de 3 horas de incubación a 37 °C, lo que indicaba que la actividad observada en la cepa RB791 (pGL300) aunque baja, era significativa, y no se podía atribuir a un efecto inespecífico del extracto empleado en el ensayo enzimático.

Cuando se analizaron mediante una cromatografía por filtración en gel los productos de degradación de las paredes celulares de neumococo digeridas con los extractos de *E. coli* RB791 (pGL300), el perfil de elución obtenido reveló la presencia de una actividad amidásica en dichos extractos. Todos estos resultados confirmaban que el dominio N-terminal de la amidasa LYTA actuaba como un módulo funcional independiente del dominio C-terminal de la molécula.



**Figura 39.** Western-blot de los extractos crudos de *E. coli* RB791 (pGL300) y de la proteína LYTA purificada.

El Western-blot se realizó como se describe en el apartado 26. de Materiales y Métodos. Se empleó un gel de poliacrilamida-SDS al 15% y un suero anti-amidasa LYTA. Calle 1, extracto de la cepa *E. coli* RB791 (pGL300) cultivada en presencia de lactosa al 2% (p/v) (15  $\mu$ g de proteína). Calle 2, extracto de la cepa *E. coli* RB791 (pGL300) cultivada en ausencia de lactosa (15  $\mu$ g de proteína). Calle 3, proteína LYTA purificada (2  $\mu$ g de proteína). En el margen derecho de la figura se muestran las  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) de las proteínas marcadoras. Con una flecha se indica la posición y la  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) calculada para la amidasa LYTA y para el dominio N-terminal de la amidasa LYTA.

**TABLA 13.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos de las cepas de *E. coli* que se indican.

Cepa	Actividad específica (CPM/mg proteína)	
	Paredes-Colina <sup>a</sup>	Paredes-EA <sup>b</sup>
RB791 (pGL100)	$4 \times 10^7$	$3 \times 10^4$
RB791 (pGL300)	$0,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
RB791 (pIN-III-A3)	< 1	< 1

Los datos son la media de 2 experimentos. La actividad específica se refiere a 10 minutos de ensayo.

Las células se cultivaron en presencia de lactosa al 2% (p/v) (condiciones de inducción) hasta la fase estacionaria de crecimiento. Los extractos se obtuvieron como se indica en el apartado 6. de Materiales y Métodos. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se describe en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato : (a) paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina; (b) paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina.

## **7. CARACTERIZACION DEL SISTEMA LITICO DE LA CEPA CLINICA ATIPICA**

### **S. pneumoniae 101/87.**

#### **7.1. Aislamiento y procedencia de la cepa 101/87.**

La cepa *S. pneumoniae* 101/87 se aisló en el año 1987 de la sangre de un paciente y se clasificó como un estreptococo del grupo *viridans*. El posterior análisis en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda (Madrid), empleando las 4 pruebas habituales para la identificación de neumococos (sensibilidad a la optoquina, lisis por desoxicolato, reacción de *quellung* y morfología de las colonias), no permitió clasificar a la cepa 101/87 como un neumococo ya que, aunque en medio agar-sangre desarrollaba una clara reacción  $\alpha$ -hemolítica, era resistente a la optoquina, no se lisaba con desoxicolato (fenotipo DOC<sup>-</sup>) y no era identificable por la reacción de *quellung* al no presentar cápsula (Fenoll y cols., 1990). Además, por pruebas bioquímicas de identificación (sistema API 20) la cepa 101/87 se clasificaba como un *S. mitis*. Sin embargo, su DNA hibridaba con una sonda específica de neumococo, el plásmido pCE3 que contiene clonado un fragmento de DNA que codifica para los 148 primeros aminoácidos del dominio N-terminal de la amidasa LYTA (Fenoll y cols., 1990). Por otra parte, el DNA de la cepa 101/87 no hibridó con una sonda específica de *S. oralis*, una especie muy próxima a *S. pneumoniae* y que también contiene colina en su pared celular (Fenoll y cols., 1990).

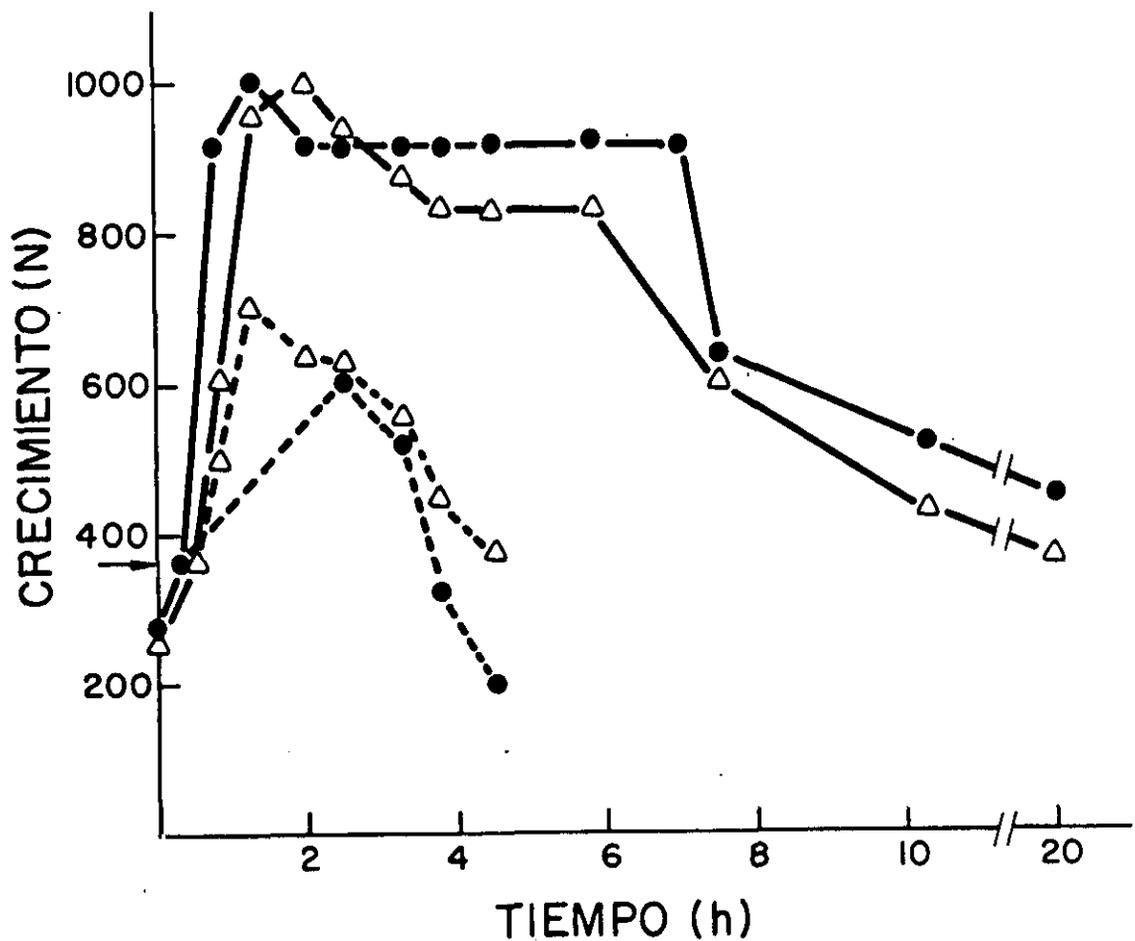
Después del análisis de los datos anteriormente presentados se concluyó que la cepa 101/87 es un neumococo con características atípicas (Fenoll y cols., 1990).

#### **7.2. Características fisiológicas de la cepa 101/87.**

##### **7.2.1. Crecimiento en medio de cultivo C+Y.**

Cuando la cepa 101/87 se cultivó en medio C+Y su crecimiento fue similar al de la cepa tipo R6, autolisándose al alcanzar el final de la fase estacionaria de crecimiento (Figura 40). La observación de la cepa 101/87 al microscopio de contraste de fase reveló que las células formaban largas cadenas con tendencia a entremezclarse y originar estructuras macroscópicas en forma de agregados, en contraste con las formas diploideas características de la cepa R6.

Para comprobar si la cepa 101/87 era resistente o tolerante a la penicilina G, se añadió al medio C+Y este antibiótico a una concentración de 0,007  $\mu\text{g/ml}$  (la MIC para la cepa R6). En estas condiciones el crecimiento de la cepa 101/87 cesaba y se producía una rápida lisis celular, de



**Figura 40.** Curvas de crecimiento de las cepas de neumococo R6 y 101/87. Las cepas R6 (●) y 101/87 (△) se cultivaron a 37 °C en medio C+Y (línea continua), o en medio C+Y con penicilina G (0,007 μg/ml, 1 x MIC) (línea discontinua). La flecha indica la concentración celular en el momento de añadir el antibiótico al cultivo. El crecimiento y la lisis celular se siguieron por nefelometría (N).

modo análogo a como se comportaba en esas mismas condiciones la cepa R6 (Figura 40). Este resultado indicaba que la cepa 101/87 no era resistente ni tolerante a la penicilina G.

Si el medio de cultivo C+Y contenía colina al 2% la cepa 101/87 era capaz de crecer hasta la fase estacionaria pero no se autolisaba. Esta respuesta era similar a la que presentaba la cepa R6 y sugería la existencia en la cepa 101/87 de una enzima autolítica con actividad dependiente de la presencia de colina en la pared celular. Para comprobar que la [metil-<sup>3</sup>H]colina añadida al medio de cultivo se incorporaba en las paredes celulares de la cepa 101/87, se determinó la radiactividad presente en dichas paredes. El resultado de esta valoración demostró que las células de la cepa 101/87 incorporaban colina a su pared celular de forma similar a como lo hacían las células de la cepa R6.

### 7.2.2. Respuesta al tratamiento con detergentes.

Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las características atípicas de la cepa 101/87 era la de no lisarse en presencia del detergente desoxicolato sódico (fenotipo DOC<sup>-</sup>). Para comprobar si este efecto lo ocasionaban también otros detergentes, se determinó la respuesta de la cepa 101/87 al tratamiento con Tritón X-100 (apartado 3.2. de Materiales y Métodos). Cuando las células de esta cepa se pusieron en presencia de Tritón X-100 se produjo una lisis inmediata. Para estudiar el comportamiento de la cepa 101/87 frente al desoxicolato en presencia de autolisina exógena (curación fenotípica), se añadió amidasa LYTA (200 unidades/ml) a un cultivo en fase exponencial temprana de crecimiento y cuando éste alcanzó los 500 N ( fase exponencial media) se trató con desoxicolato. En estas condiciones la cepa 101/87 mostró un fenotipo DOC<sup>+</sup>.

### 7.2.3. Experimentos de transformación genética.

Cuando se intentó la transformación genética de la cepa 101/87 siguiendo el protocolo clásico de transformación de neumococo (apartado 5.1. de Materiales y Métodos), no se obtuvieron transformantes. En estos experimentos se utilizó como DNA donador el DNA cromosómico de la cepa de neumococo M22, que confiere resistencia a estreptomycin, o el plásmido pED2 (Figura 9), que confiere resistencia a tetraciclina. La carencia de transformación podía deberse a dos causas, o bien la cepa 101/87 adquiriría el estado de competencia a una concentración celular distinta a la descrita para la cepa tipo R6 ( $2,1-2,2 \times 10^8$  UFC/ml), o bien la cepa 101/87 no alcanzaba nunca el estado de competencia. Para determinar cuál de estas dos posibles causas era la correcta, se intentó la transformación de muestras de un cultivo de la cepa

101/87 tomadas a diferentes concentraciones celulares en un rango de  $1,5$  a  $3 \times 10^8$  UFC/ml, empleando como DNA donador el DNA cromosómico de la cepa M22. En ninguno de los casos se obtuvieron transformantes, por lo que había que concluir que la cepa 101/87 en las condiciones ensayadas no presentaba competencia natural. Para determinar si la ausencia de competencia natural en la cepa 101/87 se podía deber a una carencia del factor necesario para la inducción del estado de competencia en neumococo (factor de competencia), se procedió al aislamiento de dicho factor de la cepa 101/87 y a su valoración según se detalla en el apartado 5.1.1. de Materiales y Métodos. Los resultados negativos de esta valoración sugerían que el factor de competencia o no era activo sobre la cepa tipo R6 o no se sintetizaba en *S. pneumoniae* 101/87. Para tratar de compensar la ausencia de factor de competencia activo en la cepa 101/87 se procedió a su transformación empleando factor de competencia extraído de la cepa de neumococo M11, una cepa derivada de *S. pneumoniae* R6 (Tabla 1). Con este factor de competencia, y utilizando una cantidad saturante de DNA de la cepa M22, se obtuvieron  $0,8 \times 10^5$  transformantes/ml con la cepa R6 en estado de no competencia, mientras que no se obtuvo ningún transformante de *S. pneumoniae* 101/87.

Estos resultados demuestran que, en las condiciones de transformación establecidas para la cepa tipo R6, *S. pneumoniae* 101/87 no es transformable. Además, esta característica no se puede atribuir exclusivamente a la carencia de factor de competencia activo sino que deberán existir otras causas que no han sido determinadas hasta el momento.

#### 7.2.4. Infección con bacteriófagos de neumococo.

Cuando *S. pneumoniae* 101/87 se cultiva en presencia de fagos de neumococo, tales como Cp-1, Cp-7, Dp-1, o HB-3, no se observa ni lisis del cultivo en medio líquido, ni placas de lisis en medio sólido.

#### 7.2.5. Determinación *in vitro* de los niveles de actividad hidrolítica de pared.

Cuando se ensayaron los extractos crudos de *S. pneumoniae* 101/87, se detectó una actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que contenían colina que representaba un 50% de la detectada en los extractos crudos de la cepa R6 (Tabla 14). Sin embargo, ni los extractos crudos de la cepa R6 ni los de la cepa 101/87 hidrolizaban paredes celulares de neumococo que contenían etanolamina en su composición (Tabla 14). Por otro lado, y al igual que ocurría con la cepa R6 (apartado 3.1.1.), la actividad hidrolítica de pared durante el crecimiento de la cepa 101/87 aumentaba proporcionalmente al número de células.

**TABLA 14.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos crudos de las cepas de *S. pneumoniae* que se indican.

Cepa	Actividad específica (CPM/ $\mu$ g proteína)	
	Paredes-Colina <sup>a</sup>	Paredes-EA <sup>b</sup>
R6	1.900	< 1
101/87	950	< 1
M31 (pED4)	6.700	< 1

Los valores son la media de 2 experimentos. La actividad específica se refiere a 10 minutos de ensayo.

Los extractos se obtuvieron como se indica en el apartado 6. de Materiales y Métodos. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se describe en el apartado 9.1.2. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato : (a) paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina; (b) paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina.

Estos resultados indican la existencia de, al menos, una enzima lítica de pared en la cepa 101/87. Esta enzima se sintetiza de forma constitutiva y su actividad hidrolítica depende de la presencia de colina en la pared celular, lo que explica que los cultivos de esta cepa se autolisen al final de la fase estacionaria de crecimiento (Figura 40) y que dicha autólisis se inhiba en presencia de colina al 2% (apartado 7.2.1).

#### 7.2.6. Análisis de los extractos celulares mediante Western-blot.

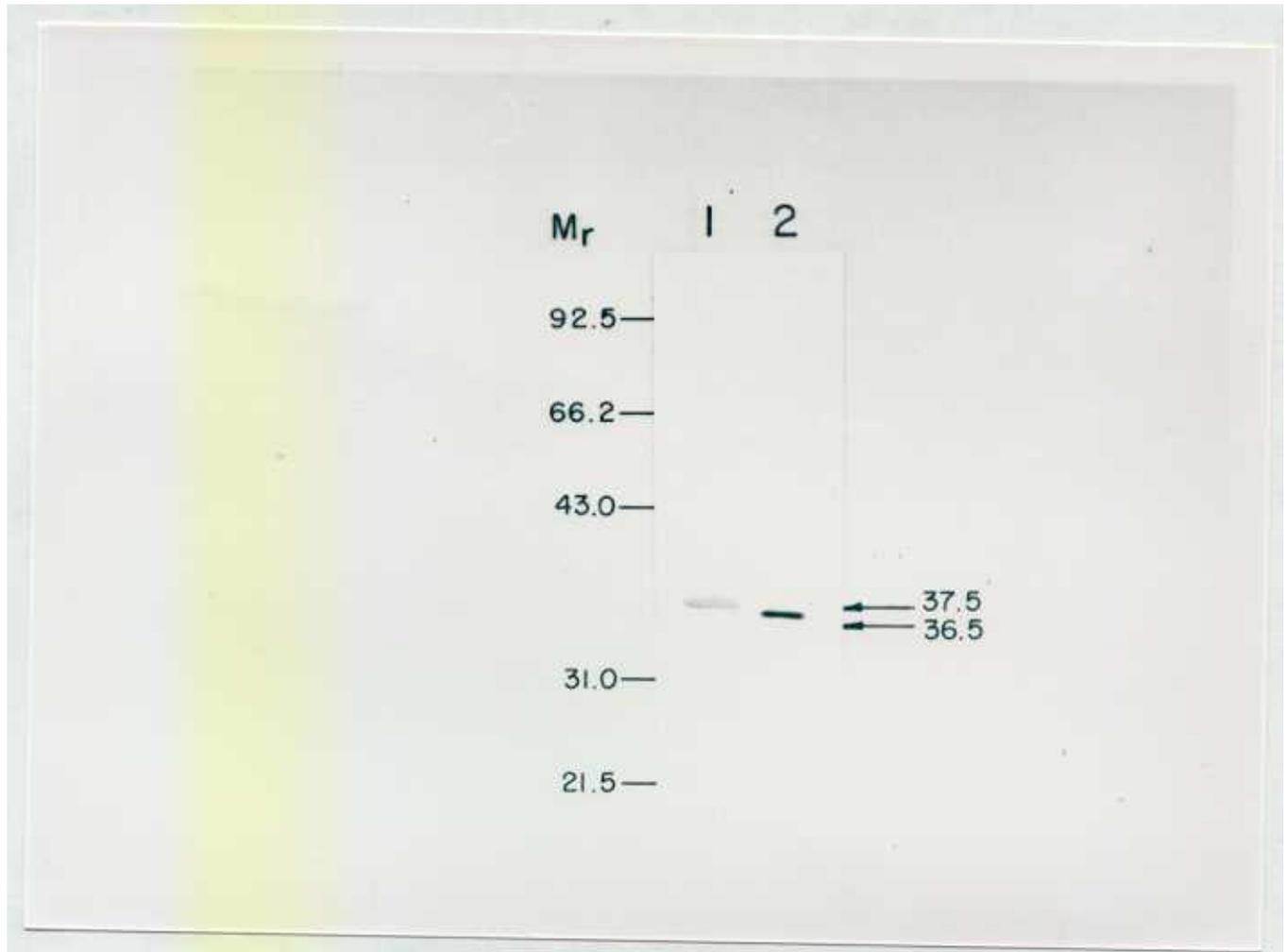
En la Figura 41 se muestra el resultado del análisis de un extracto crudo de la cepa 101/87 mediante la técnica de *Western-blot* utilizando un suero anti-amidasa LYTA. Como se aprecia en dicha figura, el extracto de la cepa 101/87 contenía una proteína que reaccionaba con el antisuero utilizado y cuya  $M_r$  (37.500) era ligeramente superior a la  $M_r$  de la proteína LYTA (36.500). Este resultado volvía a confirmar la existencia en la cepa 101/87 de una proteína que probablemente fuese homóloga a la amidasa LYTA de la cepa R6.

#### 7.2.7. Efecto del desoxicolato sobre la actividad hidrolítica de pared en ensayos *in vitro*.

El hecho de que la cepa 101/87 no se lisase en presencia de desoxicolato podría deberse a una reducción de la actividad autolítica en presencia del detergente. Para comprobar si el desoxicolato al 1% ejercía un efecto inhibitor sobre la actividad hidrolítica de pared de la cepa 101/87, se valoró dicha actividad en un extracto crudo de esta cepa en presencia o ausencia del detergente. El resultado de esta valoración reveló que el desoxicolato no sólo no inhibe la actividad hidrolítica del extracto, sino que la incrementa 5 veces (ver también Tabla 16).

### 7.3. Clonación y expresión en *E. coli* del gen *lytA101* de *S. pneumoniae* 101/87.

Dado que la cepa de neumococo que expresa una amidasa LYTA truncada (cepa EM3) (apartado 3.2.) presenta un fenotipo  $DOC^-$  y su actividad lítica de pared en ensayos *in vitro* es sólo ligeramente inferior a la de la cepa tipo R6 (Tabla 5), resultaba interesante clonar y expresar el gen que codifica la enzima autolítica de la cepa 101/87, gen *lytA101*, para determinar si el producto de dicho gen también poseía alguna anomalía estructural que permitiese explicar el comportamiento anómalo de esta cepa frente al desoxicolato.



**Figura 41.** Western-blot de un extracto crudo de la cepa de neumococo 101/87 y de la amidasa LYTA purificada.

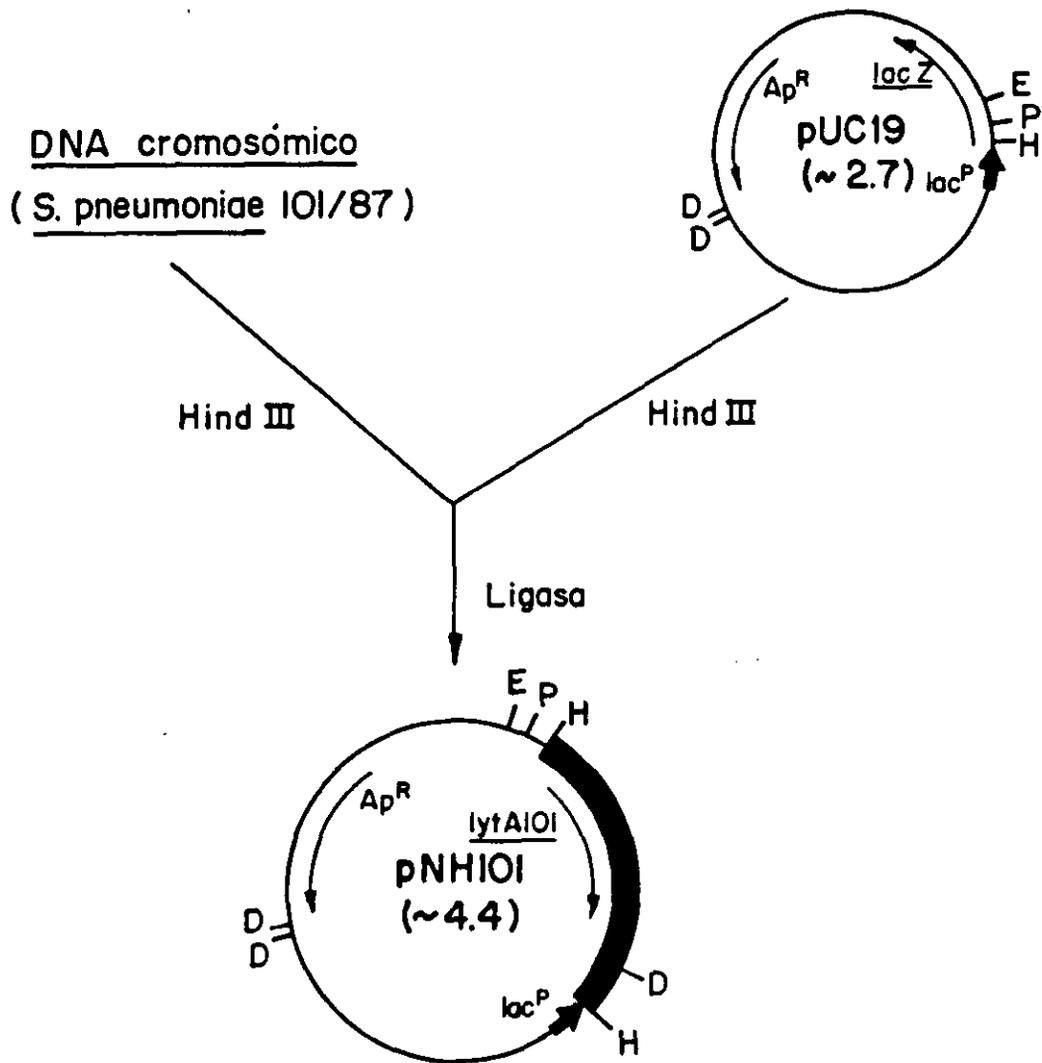
El Western-blot se realizó como se describe en el apartado 26. de Materiales y Métodos. Se utilizó un suero anti-amidasa LYTA. Calle 1, extracto de *S. pneumoniae* 101/87 (180  $\mu\text{g}$ ). Calle 2, proteína LYTA purificada (2  $\mu\text{g}$ ). La  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) de las proteínas marcadoras se indica en el margen izquierdo de la figura. Las flechas señalan la posición y la  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) de las proteínas que reaccionan con el anticuerpo utilizado.

### 7.3.1. Clonación y secuenciación del gen *lytA101*.

Como ya se ha comentado en el apartado 7.1., el DNA de la cepa 101/87 hibrida con la región del gen *lytA* clonada en el plásmido pCE3 (Fenoll y cols., 1990). Así pues, la utilización del gen *lytA* como sonda en experimentos de hibridación de DNA sería de gran utilidad para poder clonar el gen *lytA101*.

Dado que la región estructural del gen *lytA* se localiza en un fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb en el DNA cromosómico de *S. pneumoniae* R6 (García y cols., 1986 c), se procedió a la clonación del gen *lytA101* mediante la construcción, en *E. coli* JM83 (Tabla 1), de una genoteca *HindIII* de la cepa 101/87 utilizando el plásmido pUC19 (Tabla 1). Sólo dos clones hibridaron con el gen *lytA* cuando éste se utilizó como sonda en experimentos de hibridación de DNA sobre filtros de colonias celulares (apartado 25.2. de Materiales y Métodos). De uno de estos clones se aisló el plásmido recombinante pNH101 (Figura 42). Debido a que la cepa HB101 de *E. coli* (Tabla 1) es la empleada habitualmente como cepa huésped para los plásmidos recombinantes que contienen clonados los genes que codifican enzimas líticas de la pared celular de neumococo, se transformó dicha cepa con el plásmido pNH101. En los extractos crudos de *E. coli* HB101 (pNH101) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que contenían colina (Tabla 15), lo que permitía suponer que el fragmento de DNA clonado contenía el gen *lytA101* y que éste era capaz de expresarse en *E. coli*, como ya se había descrito para el gen *lytA* (García y cols., 1986 c).

La secuenciación del fragmento clonado en pNH101 se realizó utilizando oligonucleótidos sintéticos como *primers*. La secuencia completa de dicho fragmento se detalla en la Figura 43. La primera característica diferencial respecto a la cepa R6 es que el fragmento clonado tiene 1,7 kb en vez de 1,2 kb. La región estructural del gen *lytA101* está definida por un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 316 aminoácidos, proteína LYTA101, cuya secuencia de aminoácidos en código de una letra se representa en la Figura 43. El codón de iniciación de la traducción, ATG, se localiza en el nucleótido que ocupa la posición 1 y el codón de terminación de la traducción, TAG, ocupa la posición 949 (Figura 43); una posible secuencia de unión al ribosoma (RBS) se encuentra situada a 6 pb del codón ATG (Figura 43). Así pues, la región estructural del gen *lytA101* tiene una longitud de 948 pb, 6 pb inferior a la que presenta la región estructural del gen *lytA* (García y cols., 1986 c). El mapa físico de la región estructural del gen *lytA101* se muestra en la Figura 53. La comparación de las secuencias de nucleótidos entre los genes *lytA* y *lytA101*, así como la comparación entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas LYTA y LYTA101, reveló una clara similitud en ambos casos (apartado 7.8.).



**Figura 42.** Clonación del gen *lytA101* en el plásmido pUC19 de *E. coli*. El DNA cromosómico de *S. pneumoniae* IOI/87 se digirió con la enzima de restricción *Hind*III y los fragmentos resultantes se ligaron al plásmido pUC19 de *E. coli* previamente digerido con la misma enzima de restricción. Las flechas finas indican la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Las flechas gruesas representan el promotor *lacP*. La barra negra muestra el fragmento *Hind*III de 1,7 kb que contiene al gen *lytA101*. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción son : D, *Dra*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I. Entre paréntesis se detalla el tamaño de los plásmidos en kb.

**TABLA 15.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en los extractos crudos de las cepas de *E. coli* que se indican.

Cepa	Actividad enzimática (CPM)		
	Paredes-colina <sup>a</sup>		Paredes-EA <sup>b</sup>
	Sin convertir	Convertidos	
HB101 (pNH101)	400	2.550	< 10
HB101 (pNE103)	330	3.600	< 10

Los datos son la media de 2 experimentos.

Los extractos se obtuvieron de cultivos en fase estacionaria de crecimiento concentrados 33 veces y sometidos a 1.100 pascales de presión en una *French-press*.

La actividad se expresa en CPM solubilizadas durante el ensayo enzimático (10 minutos a 37 °C). Se ensayaron 0,15 µl del extracto de HB101 (pNH101) y 1 µl del extracto de HB101 (pNE103).

<sup>a</sup> Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se describe en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos, con o sin preincubación durante 10 minutos a 4 °C en presencia de colina 140 mM (*conversión*). Como sustrato se emplearon paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [*metil*-<sup>3</sup>H]colina.

<sup>b</sup> Actividad de los extractos sobre paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina. Los ensayos enzimáticos se realizaron como se detalla en el apartado 9.1.1. de Materiales y Métodos pero sin preincubación en presencia de colina.

AAGCTTTTtagTTTTGGGGG -181

TTGTTGTAGATAGAATGCAGACCTCATCAGTCCTATTTACAGTGTCAAATAGTGCCTTT -121  
TGAAGTCTATCTACAAGCCTAATCGTGACTAGGATTGTCTTCTTTGTAAGGTATAAATA -61  
AAGGAGTTTCTAGCTCTGGATTGTAAAAATAAGTTATTTTAATTGATAAGGAGTAGAAT -1

**M E I D V S K L R T D L P Q V G V Q P Y 20**  
ATGGAAATTGATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAACCATAT 60

**R Q V H A H S T G N R N S T V Q N E A D 40**  
AGGCAAGTCCATGCCATTCCACAGGCAACCGTAACTCAACGGTGCAAATGAGGCTGAC 120

**Y H Y R K D P E L G F F S H V C G N G R 60**  
TACCATTACAGAAAAGATCCTGAATTGGGCTTCTTTTCTCACGTATGCGGTAATGGTTCGT 180

**V M Q V G P V D N G A W D V G G G W N A 80**  
GTTATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCA 240

**E G Y A Q V E L I E S H E S K E E F L I 100**  
GAAGGTTATGCACAAGTTGAACTGATTGAAAGCCATGAATCAAAGAAGAGTTTCTGATT 300

**D Y R L Y I E L L R N L A V E A G I P K 120**  
GACTATCGTCTCTATATCGAACTCTTGCGCAATCTAGCGGTTGAAGCTGGTATACCGAAA 360

**T L D T D D L A G I K T H E Y C T N N Q 140**  
ACACTTGATACAGACGACTTGGCAGGTATCAAGACACACGAATATTGCACCAATAACCAA 420

**P D N N S D H I D P Y P Y L A K W G I S 160**  
CCTGACAACAACTCAGATCACATTGACCCCTATCCTTATCTTGCCAAATGGGGTATTAGC 480

**R E Q F K Q D I E N G L T I E A G W Q Q 180**  
CGTGAGCAGTTTAAGCAGGATATTGAAAACGGCTTGACGATTGAAGCAGGATGGCAACAG 540

**N D T G T W Y V H S D G S Y P K D K F E 200**  
AACGATACTGGCACCTGGTATGTACATTCAGACGGTTCTTATCCAAAAGATAAGTTTGAG 600

**K V N G T W Y Y F D G S G Y M L A D R W 220**  
AAAGTCAATGGTACCTGGTATTACTTCGACGGCTCAGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGG 660

**K K H T D G N W Y W F D Q S G E M A T G 240**  
AAGAAGCACACAGACGGAAATTTGGTATTGGTTTGACCAGTCAGGCGAAATGGCGACAGGC 720

**W K K I A E K W Y Y F D G E G A M K T G 260**  
TGGAAGAAAATCGCTGAGAAGTGGTACTATTTTCGATGGAGAAGGTGCTATGAAAACAGGC 780

**W V K Y K E T W Y Y L D S Q N G D M V S 280**  
TGGGTCAAATATAAGGAGACTTGGTACTATCTTGATAGTCAAATGGGGATATGGTTTCT 840

**H A F V K S N D G W Y Y L K E D G T I A 300**  
CATGCTTTTGTCAAATCAAATGATGGCTGGTATTACCTCAAAGAAGATGGCACGATAGCA 900

**D R P E F S I E P D G L I T M K \*\*\* 316**  
GACAGACCAGAATTTAGTATAGAACCCTGACGGTTTGATTACGATGAAGTAGTTTTTTGGT 960

**GAAGGGTAGCAAATTTAAACAAGAAATCATGATAGTAACAAGGTTATTGGTAAGGGAGAAG 1020**  
CGGCTTCTATTTCTTAGCGAAAAAGCATAATGGGATATTAGGAAGTAATAACCTAAGAG 1080  
ATGTTGAACCATATGTAGAAGAATTTTCTTTAGAACATATGACGACAGGAGATATACTGG 1140  
TTGAAGCGTTTAAAGCGCAATTTATTACTGAACAAGAGGGCAATCATATCTGGAATAATA 1200  
TGCTTAAAAAGAGAAGGAAAATTTGGGGCGGATTCTTTTTTCAGACTATCTTCGTGGAAGTG 1260  
TTCATCAAATAGACAAAAATAAATTTGGATAAATCGAACTCACTATTCAGTAGGCATAT 1320  
GAGCACTTCGAAGAAGAAAAGTGTCAAATTTGAGCCTATAAGACTAGAAATGACCTACATA 1380  
GGGGATGAGAGAAAAGTTGTCTTGAAGTTTCCCTGAACTATCAGTCGCATATCAAACGA 1440  
TATGTAGGGTGTATGTGAGAGGGGATAGCGAGTAGTTTTTtagTTGTTTTATCAAAGCTT 1500

**Figura 43.** Secuencia de nucleótidos del fragmento *HindIII* de 1,7 kb que contiene el gen *lytA101* de *S. pneumoniae* 101/87.

Sólo se detalla la secuencia de la hebra de DNA que corresponde al RNA mensajero. La secuencia de nucleótidos de la región estructural del gen *lytA101* se acompaña de la secuencia de aminoácidos derivada (en código de una letra). Los números situados en el margen derecho de la figura indican el número de nucleótido de la secuencia o el número de aminoácido de la proteína LYTA101 derivada (negrita). El nucleótido número uno es el correspondiente al codón de iniciación de la traducción del gen. El codón de terminación de la traducción se señala con asteriscos. Con una línea continua se muestra el sitio propuesto de unión al ribosoma. Los seis motivos que caracterizan al dominio C-terminal de la proteína LYTA101 se indican con las letras P1 a P6.

### 7.3.2. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína LYTA101.

Cuando se ensayaron los extractos crudos de *E. coli* HB101(pNH101) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que contenían colina, sin embargo sobre paredes que contenían etanolamina no se pudo detectar una actividad significativa (Tabla 15). Además, la preincubación de los extractos con colina 140 mM (*conversión*) incrementaba considerablemente la actividad hidrolítica de pared (Tabla 15). La proteína LYTA101 se comportaba, por lo tanto, de forma análoga a la proteína LYTA de la cepa R6, ambas mostraban una actividad que dependía de la presencia de colina en la pared celular y que requería el proceso de *conversión*. Este requerimiento de colina se utilizó para la purificación de la proteína LYTA101 a homogeneidad electroforética en un sólo paso mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa (Sanz y cols., 1988). La proteína LYTA101 purificada se muestra en la Figura 44 (calle 2); su  $M_r$ , 37.500, es ligeramente superior a la que se deduce de la secuencia del gen *lytA101*, 36.472.

Las propiedades bioquímicas más importantes de la proteína LYTA101 se resumen en la Tabla 16. Al igual que la enzima LYTA, la proteína LYTA101 es una amidasa que se sintetiza como una forma de baja actividad catalítica y que requiere el proceso de *conversión* para ser plenamente activa (Tabla 15). La actividad específica de ambas enzimas es también muy parecida y se inhibe en presencia de colina. La actividad específica de la amidasa LYTA101 sobre paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina es 1.000 veces inferior a la que presenta la enzima sobre paredes que contienen colina, es decir, la amidasa LYTA101 tiene una actividad lítica dependiente de colina, propiedad que ya se había observado en los extractos crudos de *E. coli* HB101 (pNH101) (Tabla 15). Por último, el desoxicolato al 1% activa la enzima 5 veces, activación que también ocurre con la amidasa LYTA (Tablas 4 y 16) y que ya se había observado en los extractos crudos de la cepa 101/87 (apartado 7.2.7.).

### 7.4. Clonación y expresión del gen *lytA101* en *S. pneumoniae* M31.

El análisis bioquímico de la proteína LYTA101 (apartado 7.3.2.) no reveló ninguna diferencia importante respecto a las propiedades de la amidasa LYTA que pudiese explicar por qué los cultivos de la cepa 101/87 no se lisan en presencia de desoxicolato. Para comprobar si la enzima LYTA101 originaba un fenotipo DOC<sup>+</sup> en una cepa de neumococo isogénica con la cepa tipo pero con una delección del gen *lytA* y por lo tanto DOC<sup>-</sup> (cepa M31), se procedió a la subclonación del gen *lytA101* (fragmento *Hind*III de 1,7 kb) en el plásmido pEDI (Figura 9) (apartado 1.1.1.). Se siguió la estrategia de subclonación que se detalla en la Figura 45. El



**Figura 44.** Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% de las enzimas LYTA, LYTA101 y EJM purificadas.

Las enzimas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa como se describe en el apartado 12.1. de Materiales y Métodos. Calle 1, proteína LYTA purificada de extractos de *E. coli* RB791 (pGL100). Calle 2, proteína LYTA101 purificada de extractos de *E. coli* HB101 (pNH101). Calle 3, proteína EJM purificada de extractos de *E. coli* HB101 (pNE103). Calle 4, proteínas marcadoras : fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica; en el margen derecho se muestra su  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ). En cada calle se aplicó 1  $\mu$ g de proteína.

**TABLA 16.** Propiedades bioquímicas de las enzimas LYTA, LYTA101 y EJL purificadas.

Propiedad	Enzima		
	LYTA	LYTA101	EJL
Tipo de actv. enzimática <sup>a</sup>	Amidasa	Amidasa	Amidasa
A.E. (Paredes-Colina) <sup>b</sup>	800	1.000	84
A.E. (Paredes-EA) <sup>c</sup>	1	1	< 1
% Inhibición por colina <sup>d</sup>	100	100	100
% Activación por DOC <sup>e</sup>	350	250	330

Los datos son la media de 2 experimentos.

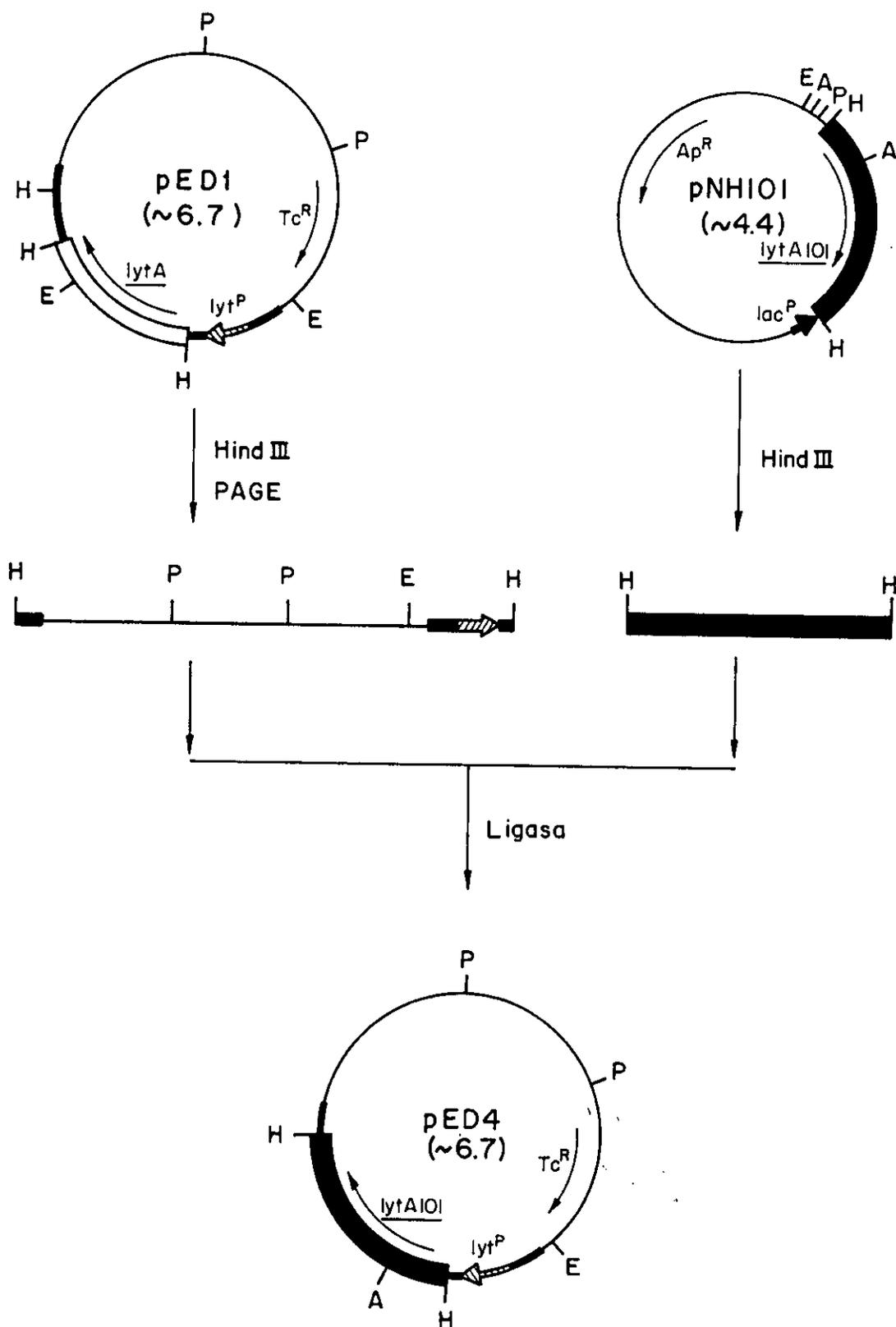
Las enzimas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa como se indica en el apartado 12.1. de Materiales y Métodos. En todos los ensayos de actividad realizados la proteína EJL purificada se preincubó 10 minutos a 4 °C en presencia de colina 140 mM (conversión).

<sup>a</sup> El tipo de actividad enzimática se determinó como se detalla en la Figura 26.

<sup>b</sup> y <sup>c</sup> La actividad específica (A.E.) se expresa en unidades por  $\mu\text{g}$  de proteína. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato: paredes celulares de neumococo que contienen colina marcadas radiactivamente con [metil-<sup>3</sup>H]colina (b); paredes celulares de neumococo que contienen etanolamina marcadas radiactivamente con [<sup>3</sup>H]lisina (c).

<sup>d</sup> Para determinar el efecto inhibitorio de la colina (70 mM) sobre la actividad de las enzimas purificadas, se utilizaron paredes celulares que contenían colina. El 100% de inhibición significa que la actividad residual era inferior a la mínima actividad que se puede detectar en el ensayo.

<sup>e</sup> Los ensayos de actividad se realizaron como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos pero en presencia de desoxicolato sódico al 1% (p/v). Para evitar la formación de precipitados al detener la reacción, no se añadió formaldehído.



**Figura 45.** Construcción del plásmido pED4.

Las flechas finas señalan la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Las flechas gruesas rayadas representan el promotor del gen *lytA* (*lyt<sup>P</sup>*); la flecha gruesa negra representa el promotor *lac<sup>P</sup>*. El trazo grueso corresponde al fragmento *Sau*3A1 de 2,3 kb que contiene al gen *lytA* (Figura 9). El fragmento *Hind*III de 1,2 kb que contiene la región estructural del gen *lytA* se representa con una barra blanca. La barra negra muestra el fragmento *Hind*III de 1,7 kb que contiene al gen *lytA101*. Entre paréntesis se detalla el tamaño de los plásmidos en kb. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción son : A, *Acc*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I. PAGE, indica que el fragmento señalado se aisló y purificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 19.2. de Materiales y Métodos).

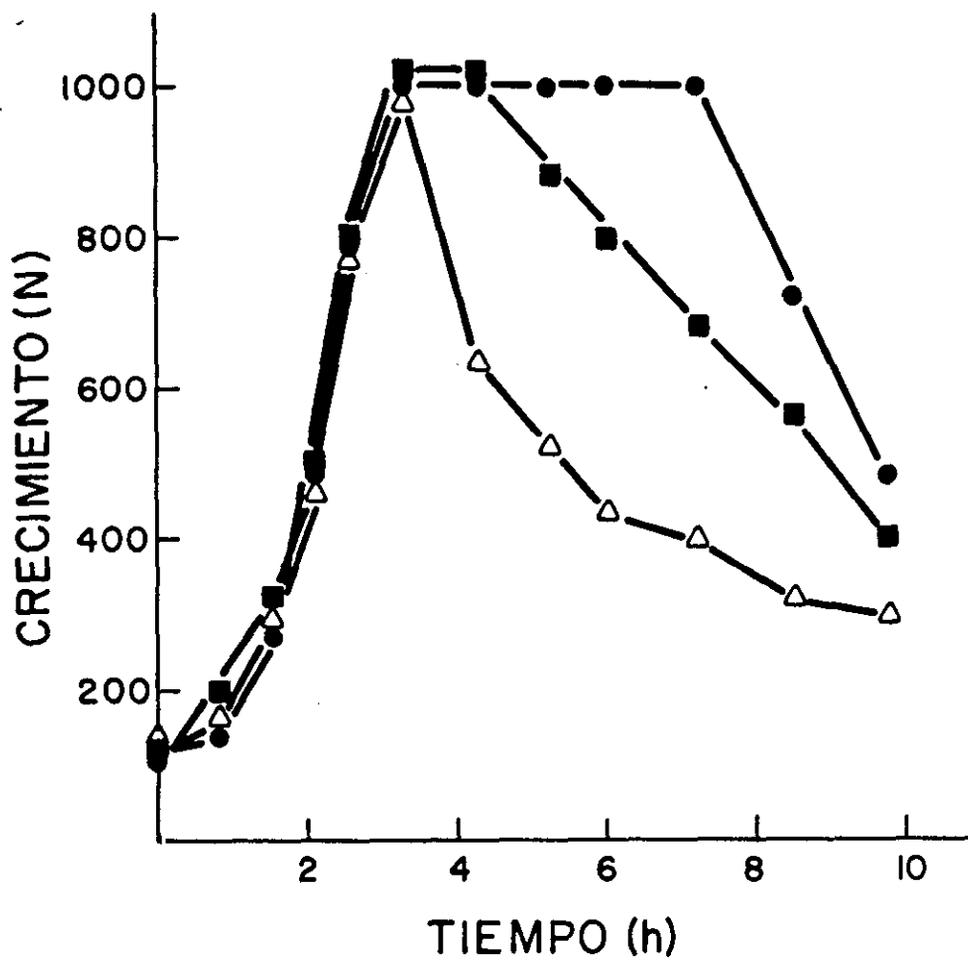
plásmido resultante, pED4, contenía el gen *lytA101* bajo el control del promotor del gen *lytA*. Debido a que la manipulación genética de *E. coli* es más sencilla que la de *S. pneumoniae*, se empleó *E. coli* C600 para el aislamiento del plásmido pED4, el cual se utilizó después para transformar la cepa M31 de *S. pneumoniae*. Uno de los clones transformantes resistentes a tetraciclina se aisló e identificó como la cepa recombinante *S. pneumoniae* M31 (pED4).

El crecimiento de *S. pneumoniae* M31 (pED4) en medio C+Y mostró una fase estacionaria muy corta, produciéndose la autólisis del cultivo al final de la fase exponencial (Figura 46). Esto indicaba que la amidasa LYTA101 se comportaba en la cepa M31 como una autolisina, manteniéndose bajo el control celular durante toda la fase exponencial de crecimiento. Un comportamiento similar se observó también con la cepa EM3 (apartado 3.2.2.). Además, y a diferencia de lo ocurría con *S. pneumoniae* 101/87, cuando las células de la cepa M31 (pED4) se trataron con desoxicolato se produjo una rápida lisis de las mismas. La actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo en un extracto crudo de la cepa M31 (pED4) se muestra en la Tabla 14; como se puede observar, esta actividad es superior a la que presentan las cepas 101/87 y R6, lo que quizás sea debido al número de copias del plásmido pED4 en la cepa M31.

De estos resultados se concluye que la amidasa LYTA101 es capaz de originar un fenotipo DOC<sup>+</sup> cuando se clona y expresa en la cepa de neumococo M31.

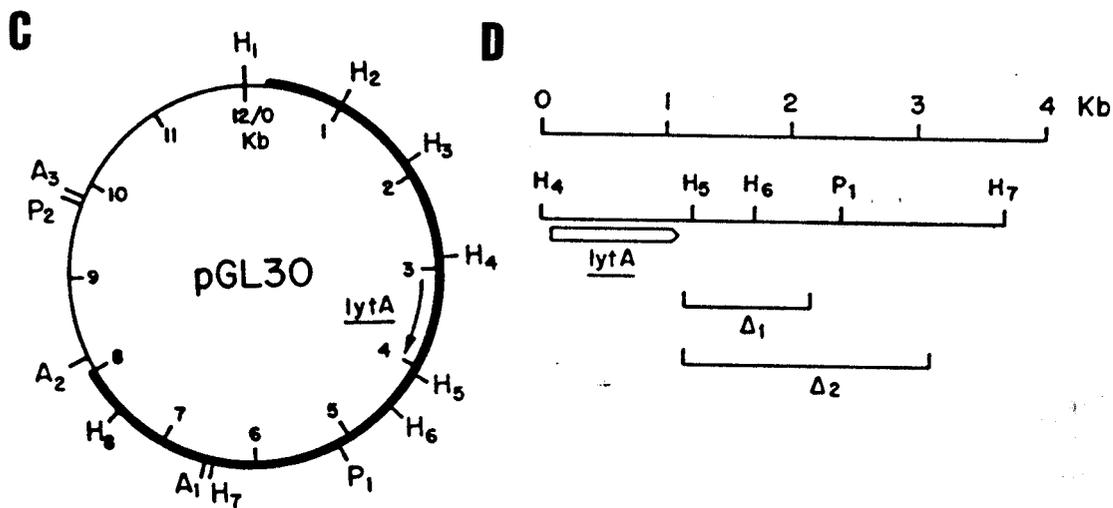
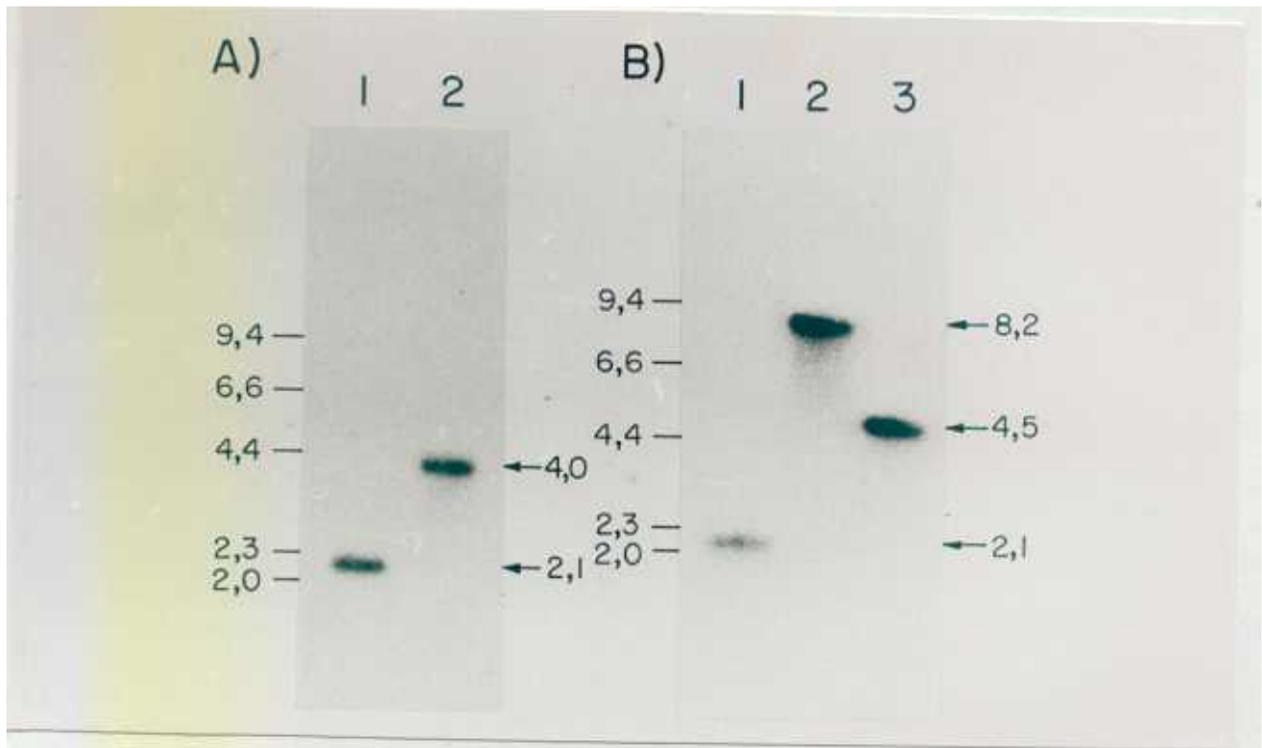
### **7.5. Caracterización de una delección en el DNA de la cepa 101/87.**

Cuando se comparan las secuencias de los genes *lytA* y *lytA101* (apartado 7.8., Figura 52), se observa que la homología entre ambos se mantiene en la región 5' no codificante y en la región estructural de los mismos, pero se pierde a partir del codón de terminación de la traducción. Para determinar si ha habido una delección o inserción en el DNA de la cepa 101/87 que pudiese explicar la pérdida de homología antes mencionada, se realizó un *Southern-blot* del DNA cromosómico de la cepa R6 digerido con las enzimas de restricción *HindIII* o *EcoRI*, y del plásmido pGL30 (Figura 47 C) (García y cols., 1985 a) digerido con las enzimas de restricción *HindIII*, *AccI*, o *PvuII*. Este *Southern-blot* se hibridó con el fragmento de restricción *DraI-HindIII* de 0,35 kb del plásmido pNH101, fragmento que se localiza a 197 pb del codón de terminación de la traducción del gen *lytA101* (Figura 42). El resultado de la hibridación se muestra en la Figura 47 A y B. El DNA cromosómico de la cepa R6 digerido con *EcoRI* o *HindIII* (Figura 47 A) mostraba en ambos casos una única banda de hibridación de 4 kb y 2,1 kb, respectivamente, lo que indicaba la existencia en la cepa R6 de un fragmento homólogo al *DraI-HindIII* de la cepa 101/87. Las bandas de hibridación del plásmido pGL30 digerido con *HindIII*, *AccI* o *PvuII* (Figura 47 B), de 2,1 kb, 8,2 kb, y 4,5 kb, respectivamente, permitían localizar el fragmento *DraI-HindIII* de la cepa



**Figura 46.** Curvas de crecimiento de las cepas de neumococo R6, M31 (pED4) y EM3 en medio C+Y.

Las cepas R6 (●), M31 (pED4) (◻) y EM3 (◻) se cultivaron a 37 °C en medio C+Y. El crecimiento y la lisis se siguieron por nefelometría (N).



**Figura 47.** Caracterización de una deleción en el DNA de la cepa 101/87.

Los *Southern-blots* de los paneles A y B se realizaron como se describe en el apartado 25.1. de Materiales y Métodos. Para realizar la hibridación se utilizó como sonda radiactiva el fragmento de restricción *Dra*I-*Hind*III de 0,35 kb del plásmido pNH101 (Figura 42). En el margen izquierdo de los paneles se muestra el tamaño en kb de los fragmentos de restricción empleados como marcadores. Las flechas indican la posición y el tamaño en kb de los fragmentos de restricción que hibridan con la sonda de DNA empleada.

**Panel A.** *Southern-blot* del DNA cromosómico de la cepa R6 digerido con las enzimas de restricción *Hind*III (calle 1) y *Eco*RI (calle 2).

**Panel B.** *Southern-blot* del plásmido pGL30 digerido con las enzimas de restricción *Hind*III (calle 1), *Ac*I (calle 2) y *Pvu*II (calle 3).

**Panel C.** Mapa físico del plásmido recombinante pGL30. Con trazo grueso se representa el inserto correspondiente al fragmento de restricción *Bcl*I de 7,5 kb que contiene el gen *lytA* de la cepa R6. La flecha señala la posición y la dirección de la transcripción del gen *lytA*. A<sub>1</sub>- A<sub>3</sub>, indican la posición de las 3 dianas de restricción *Ac*I; H<sub>1</sub>- H<sub>8</sub>, indican la posición de las 8 dianas de restricción *Hind*III; P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>, indican la posición de las dos dianas de restricción *Pst*I.

**Panel D.** Esquema de la región delecionada (Δ) en el DNA de la cepa de neumococo 101/87. Se representa el mapa físico de una región del DNA de la cepa R6. La región estructural del gen *lytA* se muestra con una flecha. H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub> y P<sub>1</sub> corresponden a las dianas de restricción del plásmido pGL30 señaladas en el panel C. Δ<sub>1</sub>, indica la mínima deleción posible (1,0 kb) en el DNA de la cepa 101/87; Δ<sub>2</sub>, indica la máxima deleción posible (2,1 kb).

101/87 dentro del fragmento de restricción *PvuII-HindIII* (P<sub>1</sub>-H<sub>7</sub>) de 1,3 kb del plásmido pGL30 (Figura 47 C). Se demuestra de esta forma la existencia de una deleción en el DNA de la cepa 101/87 respecto al DNA de la cepa tipo R6, deleción que se extiende en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción del gen *lytA101* hasta una posición localizada a una distancia de 1- 2,1 kb de dicho codón (Figura 47 D).

## **7.6. Clonación y expresión en *E. coli* de un segundo gen lítico de pared de *S. pneumoniae* 101/87, gen *eil*.**

### **7.6.1. Identificación de una segunda secuencia homóloga al gen *lytA* en el cromosoma de la cepa 101/87.**

Para comprobar que el gen *lytA101* está presente en el DNA de la cepa 101/87 en un fragmento de restricción *HindIII* de 1,7 kb, y que este fragmento no se ha originado por mutación durante la construcción de la genoteca de esta cepa en *E. coli*, se realizó un *Southern-blot* del DNA cromosómico de las cepas 101/87 y R6 (control) digerido con las enzimas de restricción *BclI*, *Sau3AI* y *HindIII*, y se hibridó con el gen *lytA*. El perfil de hibridación para el DNA de la cepa 101/87 era distinto al mostrado por el DNA de la cepa R6 (Figura 48), como cabía esperar de las diferencias existentes entre los correspondientes mapas físicos de los genes *lytA* y *lytA101* (Figura 53). Este resultado no sólo confirmó la existencia en la cepa 101/87 del fragmento de restricción *HindIII* de 1,7 kb que contiene al gen *lytA101*, sino que también demostró la existencia de otro fragmento *HindIII* (9,4 kb) que hibridaba con el gen *lytA* y que no tenía equivalente en la cepa R6 (Figura 48 A). Del mismo modo, los fragmentos de restricción de la cepa R6, *BclI* (7,5 kb) y *Sau3AI* (2,3 kb) (Figura 48 B) habían desaparecido en la cepa 101/87, siendo sustituidos por un mayor número de fragmentos de restricción con nuevos tamaños moleculares (Figura 48 A). Así, la enzima *BclI* originaba tres fragmentos de DNA (10,0; 8,4 y 1,1 kb) que hibridaban con el gen *lytA*; este número ascendía a cuatro (1,8; 1,6; 1,1 y 0,3 kb) cuando se utilizaba la enzima *Sau3AI*. Si se realiza el *Southern-blot* con el DNA de la cepa 101/87 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* o *PstI*, se observan, en cada caso, dos bandas de hibridación con el gen *lytA* (Figura 49 A). Estos datos demuestran la existencia en el cromosoma de la cepa 101/87 de otra secuencia de DNA, además de la correspondiente al gen *lytA101*, homóloga al gen *lytA*.

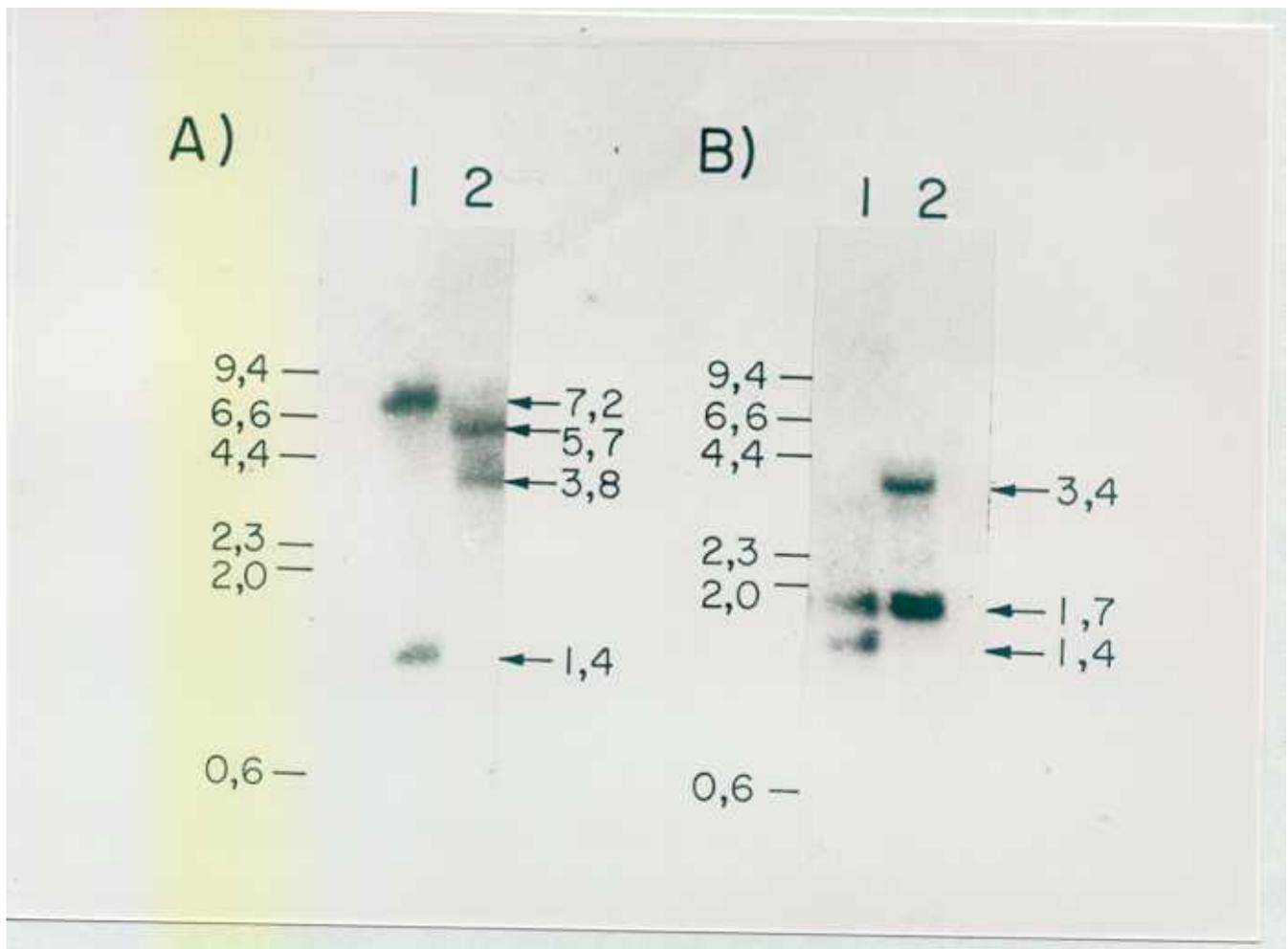


**Figura 48.** Southern-blots del DNA de las cepas de neumococo 101/87 y R6.

Los Southern-blots se realizaron como se describe en el apartado 25.1. de Materiales y Métodos. Se empleó como sonda para las hibridaciones el fragmento de restricción *Hind*III de 1,2 kb que contiene el gen *lytA*. Las flechas indican la posición y el tamaño en kb de los fragmentos que hibridan con la sonda empleada. El tamaño en kb de los fragmentos marcadores se muestra en el centro de la figura.

**Panel A.** Calles 1, 2, y 3, DNA de la cepa 101/87 digerido con las enzimas de restricción *Hind*III, *Sau*3AI o *Bcl*I, respectivamente. En la calle 3, el fragmento *Bcl*I de 1,1 kb que hibrida con el gen *lytA* (se señala con una flecha) se observa después de una exposición más larga.

**Panel B.** Calles 1, 2 y 3, DNA de la cepa R6 digerido con las enzimas de restricción *Hind*III, *Sau*3AI o *Bcl*I, respectivamente.



**Figura 49.** Southern-blots del DNA de la cepa de neumococo 101/87.

Los Southern-blots se realizaron como se describe en el apartado 25.1. de Materiales y Métodos. Se empleó como sonda de DNA para las hibridaciones el fragmento *HindIII* de 1,2 kb que contiene la región estructural del gen *lytA*. En el margen izquierdo de cada panel se muestra el tamaño en kb de los fragmentos de DNA utilizados como marcadores. Las flechas indican la posición y el tamaño en kb de los fragmentos de restricción que hibridan con la sonda de DNA empleada.

Panel A. Southern-blot del DNA de la cepa 101/87 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (calle 1) y *PstI* (calle 2).

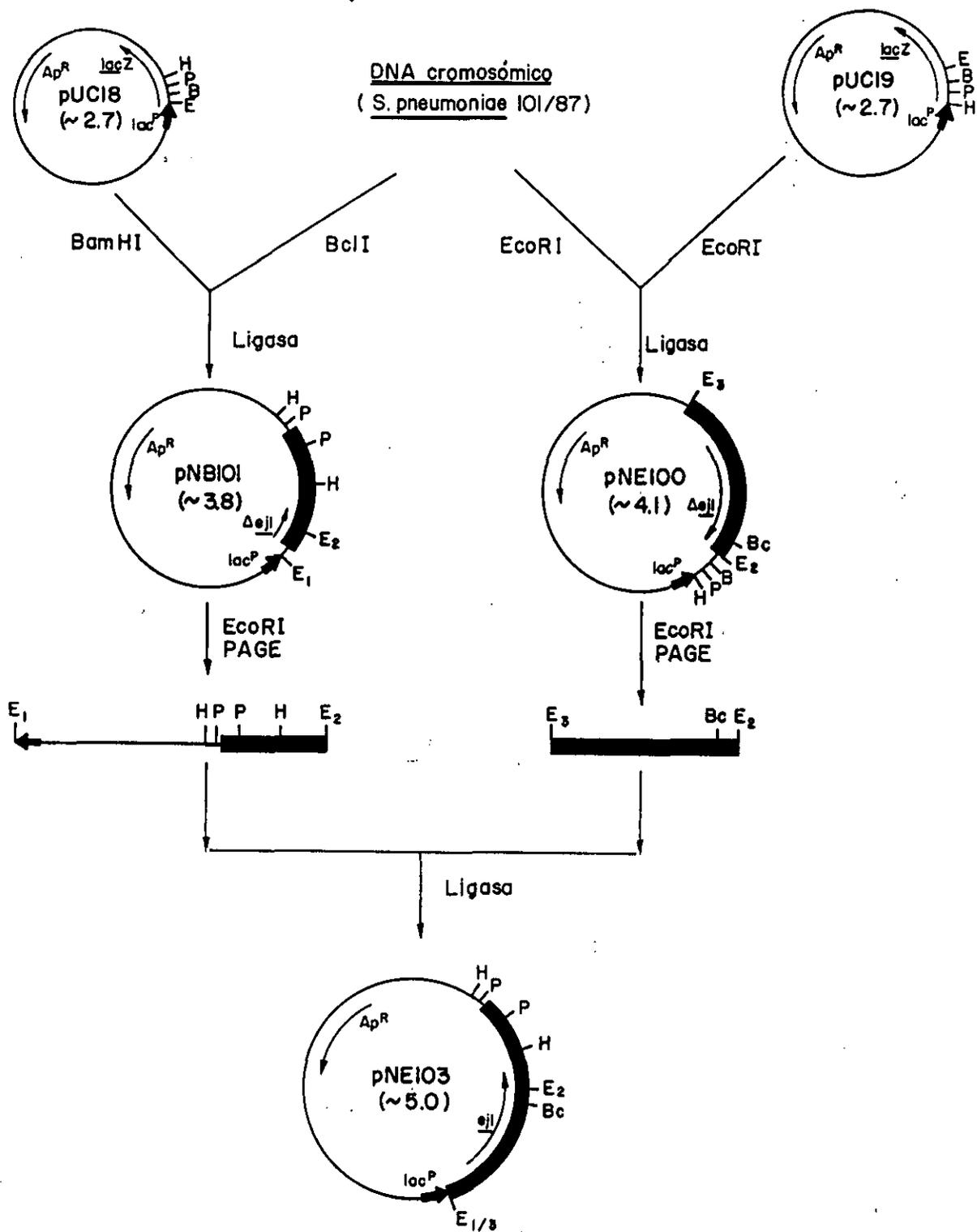
Panel B. Southern-blot del DNA de la cepa 101/87 digerido con las enzimas de restricción : *EcoRI* (calle 1); *PstI* y *HindIII* (calle 2).

### 7.6.2. Clonación en *E. coli* de los fragmentos de restricción *Bcl*I (1,1 kb) y *Eco*RI (1,4 kb) del DNA de la cepa 101/87 que hibridan con el gen *lytA*.

Para clonar la segunda secuencia del cromosoma de *S. pneumoniae* 101/87 que hibrida con el gen *lytA*, se construyeron en *E. coli* JM83 una genoteca *Bcl*I y otra *Eco*RI de la cepa 101/87 utilizando los plásmidos pUC18 y pUC19, respectivamente. De 25.000 clones recombinantes de la genoteca *Eco*RI y 2.000 clones recombinantes de la genoteca *Bcl*I, tan sólo 3 y 6 clones, respectivamente, dieron una señal positiva cuando se hibridaron las colonias celulares con el gen *lytA* (apartado 25.2. de Materiales y Métodos). De un clon positivo de la genoteca *Bcl*I se aisló el plásmido recombinante pNB101 (con un inserto *Bcl*I de 1,1 kb) (Figura 50); el plásmido pNE100 (con un inserto *Eco*RI de 1,4 kb) (Figura 50) se aisló de un clon positivo de la genoteca *Eco*RI. Ambos insertos contienen una secuencia común de 200 pb situada entre las dianas de restricción *Bcl*I y *Eco*RI (E<sub>2</sub>) (Figura 50), lo que indica que son fragmentos adyacentes en el cromosoma de la cepa 101/87. Para reunir en un único inserto los fragmentos clonados en los plásmidos pNB101 y pNE100 se siguió la estrategia que se muestra en la Figura 50, el plásmido resultante recibió el nombre de pNE103.

### 7.6.3. Secuenciación del inserto clonado en el plásmido pNE103.

La secuenciación del fragmento de 2,5 kb clonado en el plásmido pNE103 se realizó utilizando oligonucleótidos sintéticos como *primers*. La secuencia conocida (1,5 kb) se detalla en la Figura 51. Se distinguen tres marcos de lectura abiertos y consecutivos (ORF1, ORF2 y ORF3). El ORF1 tiene su iniciación fuera del fragmento clonado (Figura 51); el ORF2 codifica para una proteína de tan sólo 85 aminoácidos, con un posible sitio de unión al ribosoma (RBS) a 5 pb del codón de iniciación de la traducción (Figura 51). El ORF3 codifica para una proteína de 316 residuos, proteína E<sub>JL</sub>, cuya secuencia de aminoácidos en código de una letra se muestra en la Figura 51. El codón ATG de iniciación de la traducción se sitúa en el nucleótido que ocupa la posición 1, y el codón de terminación de la traducción (TAG) se localiza en el nucleótido 949 (Figura 51); un posible RBS se sitúa a 4 pb del codón ATG (Figura 51). La región estructural del gen que codifica para la proteína E<sub>JL</sub>, gen *ejl*, tiene, por lo tanto, 948 pb. El mapa físico de esta región se detalla en la Figura 53. A 24 pb del codón de terminación de la traducción del gen *ejl* se localiza una posible estructura de bucle, que presenta una energía libre teórica de -7,3 kcal/mol (Zuker y Stiegler, 1981), y que podría representar el terminador de la transcripción. Al igual que ocurre con el terminador del gen *lytA* (apartado 1.2.), el posible terminador del gen



**Figura 50.** Clonación del gen *eji* en *E. coli*.

El DNA cromosómico de la cepa de neumococo 101/87 se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* o *BclI* y los fragmentos resultantes se ligaron a los plásmidos pUC19 o pUC18 según se muestra en la parte superior de la figura. El plásmido pNE103 (parte inferior de la figura) contiene el gen *eji* completo. Las flechas finas señalan la posición y la dirección de la transcripción de los genes. Las flechas gruesas representan el promotor *lacP*. Las barras negras indican el inserto de DNA de la cepa 101/87 que hibrida con el gen *lytA*.  $\Delta eji$ , significa que el gen *eji* está deletado. PAGE, indica que los fragmentos señalados se aislaron y purificaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 19.2. de Materiales y Métodos). Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción más relevantes son : B, *BamHI*; Bc, *BclI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*. Las dianas de restricción *EcoRI* con subíndices idénticos son la misma diana.  $E_{1/3}$ , representa una diana *EcoRI* originada mediante la ligación de las dianas  $E_1$  y  $E_3$ . El tamaño de los plásmidos en kb se indica entre paréntesis.

GAATTCCACAAGGGT -481  
 L-----ORF1----->

TTAAAACCCTAATTCATTAATTGGTTCTATATACAATGATAGCGGAATACCTTACGGCA -421  
 CATGGTATATTGGTAATCCAGCAGACGCCAATCATTTAAGATTCCAATTCTTAAACCCAG -361  
 TACCAACAGATAGCGATATTGGAGATATTCGTGTTAGTACTATCTCTTATTACACTGACG -301  
 ACGAATGGCCAACAACATTACCATAATAGAAAGGAAAAAATATGATTAACCTGGAATTAC -241  
 ----->L-----ORF2----->

GACTAAAAAATAAATTCTTTTGGCTGACTGCCATTCCAGCCTTCTTGCTTGTCTTGCAAG -181  
 CTGGTGCAGCAGTCTTTGGATATCATCTGGACTTAGGTGATATCGGCAACAAGCTAATTC -121  
 TGCTTGTCAATGCGGTATTTCGTATTCTTGACTGCTATCGGTTTTGGTCAATGACCCGACTA -61  
 CAAGCGGAATCGCAGACAGCACAGCGCTTGAATACAAGAAACCAAGTGAGGAGTAAT -1  
 ----->

M D I D T S R L R T D L P O V G V O P Y 20  
 ATGGATATCGATACAAGCAGACTACGCACGGACTTGCCTCAAGTAGGAGTGCACCTTAT 60

R O V H A H S T G N R N S T A Q N E A D 40  
 AGACAAGTACACGCTCACTCAACTGGAAACCGTAACTCAACTGCTCAAACGAGGCGGAT 120

Y H W R K D P E L G F F S H V V G N G R 60  
 TATCACTGGAGAAAGGACCCTGAACTTGGGTTCTTTTCTCATGTGGTTCGGAAATGGCCGA 180

V M Q V G P V N N G S W D V G G G W N A 80  
 GTTATGCAGGTAGGCCCTGTAAACAACGGGAGTTGGGACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCT 240

E T Y A A V E L I E S H S T E E E F M E 100  
 GAGACCTATGCAGCAGTTGAATTGATTGAAAGCCATTCAACTGAAGAAGAGTTCATGGAA 300

D Y R L Y I E L L R N L A D E A D L P K 120  
 GACTACCGCCTCTATATCGAATTGCTACGTAATCTAGCAGATGAAGCAGACCTACCAAAA 360

T L D T D D L A G I K T H E Y C T N N O 140  
 ACTCTTGATACTGACGACTTGGCAGGTATCAAAACACATGAATACTGTACCAATAACCAG 420

P N N N S D H V D P Y P Y L A K W G V S 160  
 CCTAACAACTCAGACCACGTTGACCCTTATCCATATCTTGCCAAATGGGGCGTTAGC 480

R E O F K O D I E N G L T I E A <sup>P1</sup> G W K K 180  
 CGTGAACAGTTCAAGCAGGATATTGAAAACGGCTTGACAATTGAAGCAGGCTGGAAGAAA 540

N D T G T W Y V Y S D G S Y P K D <sup>P2</sup> K F E 200  
 AACGATACAGGCACCTGGTACGTGTACTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGATAAGTTTGAA 600

K V N G T W Y Y F D G S G Y M L A D <sup>P3</sup> R W 220  
 AAGGTC AACGGAACCTGGTATTACTTCGACGGGT CAGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGG 660

K K H S D G N W Y W F D Q S G E M A T <sup>P4</sup> G 240  
 AAGAAGCACTCAGACGGCAATGGTACTGGTTTGATCAATCAGGCGAAATGGCCACAGGC 720

W K K I A E K W Y Y F D V E G A M K T <sup>P5</sup> G 260  
 TGGAAGAAAATCGCTGAGAAGTGGTACTATTTTCGACGTAGAGGGTGCTATGAAGACAGGA 780

W V K Y K D T W Y Y L D S K D G N M V S 280  
 TGGGTCAAGTATAAAGACACTTGGTACTACCTAGACAGCAAAGACGGTAACATGGTATCA 840

N <sup>P6</sup> E F I R A G O G W Y Y I K P D G T M A <sup>1</sup> 300  
 AATGAATTCATCAGAGCAGGTC AAGGCTGGTACTACATTAACCAGACGGAACAATGGCT 900

D K L E F T V E P D G L I T T K \*\*\* 316  
 GATAAGCTAGAGTTCACGGTAGAACCAGACGGCTTGATTACGACAAAATAGAAAGACTTC 960

AAAATAGATTACACTA ACCGCCAGCAATAGCTTGCTTTTTTTCGTTTGTCTAGAATTGA 1020  
 CTTGTTGACATCAACAAA 1038

**Figura 51.** Secuencia conocida del inserto de 2,5 kb del plásmido pNE103 que contiene el gen *ejl* de *S. pneumoniae* 101/87.

Sólo se detalla la secuencia de la hebra de DNA que corresponde al RNA mensajero. La secuencia de nucleótidos de la región estructural del gen *ejl* se acompaña de la secuencia de aminoácidos derivada (en código de una letra). Los números situados en el margen derecho de la figura indican el número de nucleótido de la secuencia o el número de aminoácido de la proteína Ejl derivada (negrita). El nucleótido número uno es el correspondiente al codón de iniciación de la traducción del gen *ejl*; el codón de terminación de la traducción se señala con asteriscos. El terminador de la transcripción propuesto se señala con una doble línea continua. Los seis motivos que caracterizan al dominio C-terminal de la proteína Ejl se indican con las letras P1 a P6. Con una línea discontinua se muestran los marcos de lectura abiertos ORF1 y ORF2. Los sitios de unión al ribosoma propuestos para el ORF2 y el gen *ejl* se indican con una línea continua sencilla.

*ejl* va seguido de una secuencia rica en residuos de uracilo, lo que explicaría una terminación de la transcripción rho-independiente (Rosenberg y Court, 1979). La comparación entre las secuencias de nucleótidos de las regiones estructurales de los genes *lytA* y *ejl*, así como la comparación entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas LYTA y EJL, revela una clara similitud en ambos casos (apartado 7.8.).

#### 7.6.4. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína EIL.

La proteína EIL mostraba propiedades similares a las observadas en las proteínas LYTA y LYTA101. Así, cuando se ensayaron los extractos crudos de *E. coli* HB101 (pNE103) se detectó actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo que contenían colina, sin embargo no se pudo detectar actividad significativa sobre paredes celulares que contenían etanolamina (Tabla 15). Además, la preincubación de los extractos con colina 140 mM (*conversión*) incrementaba considerablemente la actividad lítica de pared (Tabla 15). Haciendo uso de esta propiedad, la proteína EIL de un extracto crudo de *E. coli* HB101 (pNE103) se purificó a homogeneidad electroforética en un solo paso mediante una cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa. La proteína EIL purificada (Figura 44, calle 3) presenta una  $M_r$  de 37.500, ligeramente superior a la  $M_r$  deducida de la secuencia del gen *ejl*, 36.535. En la Tabla 16 se resumen las propiedades bioquímicas más importantes de la proteína EIL. Esta enzima lítica es una amidasa con una actividad específica que : i) es considerablemente inferior a la que presentan otras amidasas de neumococo (las enzimas LYTA y LYTA101); ii) es dependiente de colina, ya que la actividad sobre paredes que contienen colina es 180 veces superior a la observada sobre paredes que contienen etanolamina; iii) se inhibe en presencia de colina; y iv) se activa en presencia de desoxicolato.

Las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo y que requieren el proceso de *conversión* (LYTA, LYTA101, CL, CL7 y HBL) cuando se purifican mediante cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa se encuentran *convertidas* aún después de ser sometidas a una diálisis frente a 300 volúmenes de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5. Sin embargo, la proteína EIL requiere el proceso de *conversión* para alcanzar su actividad enzimática máxima aún después de haber sido purificada en presencia de colina 140 mM (Tabla 17). La amidasa EIL posee, por lo tanto, una propiedad bioquímica nueva que no se detecta en ninguna de las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos conocidas, y que consiste en recuperar el estado de baja actividad catalítica (*desconversión*) mediante diálisis de la colina en un corto período de tiempo (Tabla 17). Esta propiedad contrasta con el proceso de *desconversión* que requiere la amidasa

**TABLA 17.** Actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo de la proteína E JL purificada.

Ensayo enzimático	A.E. (unidades/ $\mu$ g proteína)
Sin <i>conversión</i> <sup>a</sup>	10
Con <i>conversión</i> <sup>b</sup>	75
Con <i>conversión</i> y posterior diálisis <sup>c</sup>	10

A.E., actividad específica. La actividad enzimática se determinó como se describe en el apartado 9.1.3. de Materiales y Métodos, utilizando como sustrato paredes celulares de neumococo que contienen colina.

<sup>a</sup> La proteína E JL se ensayó después de su purificación mediante una cromatografía en DEAE-celulosa (apartado 12.1. de Materiales y Métodos).

<sup>b</sup> La proteína E JL purificada se ensayó después de haber sido sometida a una preincubación de 15 minutos a 4 °C en presencia de colina 140 mM (proceso de *conversión*).

<sup>c</sup> La proteína purificada y *convertida* con colina 140 mM se dializó durante 12 horas frente a 300 volúmenes de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5.

LYTA y que consiste en una diálisis de la colina durante un período de tiempo no inferior a 20 días (Briese y Hakenbeck, 1985).

### **7.7. Expresión de las amidasas LYTA101 y EIL en *S. pneumoniae* 101/87.**

Dado que la amidasa EIL se puede distinguir de la amidasa LYTA101 debido a su característica *desconversión* por simple diálisis (apartado 7.6.4.), se intentó determinar si ambas enzimas se expresaban durante el crecimiento de la cepa de neumococo 101/87. Para ello, se obtuvieron extractos crudos de *S. pneumoniae* 101/87 en la fase exponencial y en la fase estacionaria de crecimiento. Cuando se valoró la actividad hidrolítica de dichos extractos sobre paredes celulares de neumococo, no se detectó ninguna actividad que fuese *desconvertible*. Este resultado permite afirmar que es la amidasa LYTA101 la enzima lítica que se está expresando mayoritariamente en la cepa 101/87, si bien no se puede descartar totalmente una expresión minoritaria de la amidasa EIL.

### **7.8. Comparación de las secuencias de nucleótidos, y de las secuencias de aminoácidos derivadas, de los genes *lytA*, *lytA101*, *ejl* y *hbl*.**

La comparación de las secuencias de nucleótidos de los genes *lytA*, *lytA101*, *ejl* y *hbl* [gen lítico del fago de neumococo HB-3 (Tabla 1)] se muestra en la Figura 52. Cuando se cuantifica la semejanza entre las regiones estructurales de los 4 genes (Tabla 18) se observa que éstas son homólogas. Los genes *lytA* y *hbl* son los que presentan mayor semejanza (87,2%), mientras que los genes *lytA101* y *hbl* son los que muestran un menor valor de semejanza (78,2%). Resulta interesante destacar que en los genes *lytA101* y *ejl* las regiones que codifican para los motivos P6 de las proteínas correspondientes presentan una delección de 6 pb que no se observa en los genes *lytA* y *hbl* (Figura 52). Los mapas físicos deducidos de estas secuencias de nucleótidos se detallan en la Figura 53. Aunque los 4 genes son homólogos en sus regiones estructurales, las diferencias observadas en sus mapas físicos explican el distinto perfil de fragmentos de restricción en los *Southern-blots* del DNA de la cepa R6 y 101/87 cuando se emplea el gen *lytA* como sonda (apartado 7.6.1.). Como se aprecia en la Figura 52, la similitud entre los 4 genes se pierde a partir del codón de terminación de la traducción, si bien los genes *ejl* y *hbl* mantienen conservadas cortas secuencias de nucleótidos en su región 3' no codificante. Las regiones 5' no codificantes de los genes *lytA* y *lytA101* son homólogas (93,8% de semejanza), pero esta homología no se extiende a las regiones 5' no codificantes de los genes *ejl* y *hbl*. Sin embargo, las regiones 5' no codificantes de estos dos últimos genes, al igual que ocurría con sus regiones 3' no codificantes,



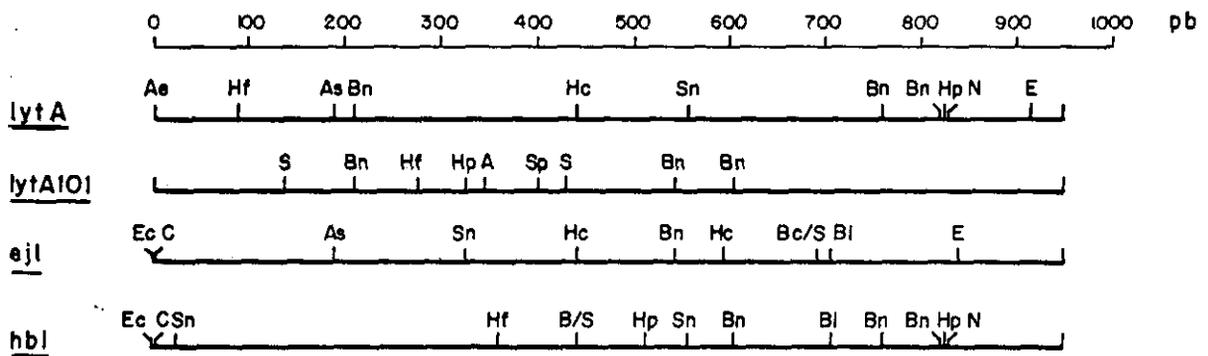
**TABLA 18.** Porcentaje de semejanza entre las regiones estructurales de los genes *lytA*, *lytA101*, *ejl* y *hbl*.

Genes	Genes			
	<i>lytA</i>	<i>lytA101</i>	<i>ejl</i>	<i>hbl</i>
A)				
<i>lytA</i>	--	81,1	81,3	87,2
<i>lytA101</i>	81,1	--	81,1	78,2
<i>ejl</i>	81,3	81,1	--	83,6
<i>hbl</i>	87,2	78,2	83,6	--
B)				
<i>lytA</i>	--	82,2	80,4	82,6
<i>lytA101</i>	82,2	--	80,5	76,6
<i>ejl</i>	80,4	80,5	--	83,6
<i>hbl</i>	82,6	76,6	83,6	--
C)				
<i>lytA</i>	--	79,8	82,6	92,8
<i>lytA101</i>	79,8	--	81,8	80,2
<i>ejl</i>	82,6	81,8	--	83,7
<i>hbl</i>	92,8	80,2	83,7	--

A) Se comparan las regiones estructurales completas.

B) Se comparan las regiones estructurales que codifican para los dominios N-terminales de las enzimas.

C) Se comparan las regiones estructurales que codifican para los dominios C-terminales de las enzimas.



**Figura 53.** Comparación de los mapas físicos de las regiones estructurales de los genes *lytA*, *lytA101*, *ejl* y *hbl*.

Los mapas físicos de las regiones estructurales de los cuatro genes se han deducido del análisis de su secuencia de nucleótidos. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción señaladas son : A, *AccI*; Ae, *Asel*; As, *AsuI*; B, *BamHI*; Bc, *BclI*; Bl, *BalI*; Bn, *BanI*; C, *ClaI*; E, *EcoRI*; Ec, *EcoRV*; Hc, *HinII*; Hf, *HinI*; Hp, *HinPI*; N, *NcoI*; S, *Sau3AI*; Sn, *SnaBI*; Sp, *SspI*.

mantienen conservadas cortas secuencias de nucleótidos próximas al codón de iniciación de la traducción (Figura 52).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las 4 enzimas con actividad amidásica y de las lisozimas CPL1, CPL7 y CPL9, se muestra en la Figura 54. La estructura general de las 4 amidasas y de las lisozimas CPL1 y CPL9 es la misma, todas están estructuradas en un dominio N-terminal y un dominio C-terminal en el que, a su vez, se distinguen 6 motivos, P1 a P6 (Figura 54). Los dominios N-terminales de las amidasas son homólogos entre sí y diferentes a los de las lisozimas, sin embargo, los dominios C-terminales de las seis enzimas son homólogos entre sí. El motivo P6 de las enzimas LYTA101, EJL, CPL1 y CPL9 presenta una delección de 2 aminoácidos localizada en idéntica posición y que no se observa en las amidasas LYTA y HBL. La comparación de los 6 motivos del dominio C-terminal, y una secuencia consenso para cada uno de ellos, se muestra en la Figura 55. Como se observa en dicha figura, hay un gran predominio en aminoácidos aromáticos, manteniéndose especialmente conservada la secuencia WYY. Los 16 últimos aminoácidos del dominio C-terminal presentan también una gran semejanza en las seis enzimas (Figura 54). La lisozima CPL7, la única enzima de las siete que se comparan que hidroliza paredes celulares de neumococo que no contienen colina, muestra un dominio C-terminal completamente distinto al de las otras seis proteínas, con 2,8 motivos idénticos repetidos (M1, M2 y M3) (Figura 54). En la Tabla 19 se muestra el porcentaje de semejanza entre las secuencias de aminoácidos de las amidasas LYTA, LYTA101, EJL y HBL. La mayor semejanza entre las regiones estructurales de los genes *lytA* y *hbl* se traduce también en una mayor semejanza (90,6%) entre las proteínas LYTA y HBL (Tabla 19).

### **7.9. Determinación del mapa físico del gen *ejl* en el cromosoma de la cepa 101/87.**

Para determinar el mapa físico del gen *ejl* en el cromosoma de la cepa 101/87, se realizaron *Southern-blots* del DNA de dicha cepa digerido con varias enzimas de restricción y se hibridaron con el gen *lytA* (Figura 49 A y B), o con el fragmento *HindIII* de 0,5 kb del plásmido pNB101 (Figura 56 A), fragmento localizado en posición 3' del gen *ejl*, a 0,4 kb del codón de terminación de la traducción (Figura 50). La información que se obtiene del análisis de estos *Southern-blots* permite construir un mapa físico de la región del DNA de la cepa 101/87 que contiene al gen *ejl*, dicho mapa se muestra en la Figura 56 B. Sin embargo, nunca se ha obtenido un único fragmento de DNA que hibride con el gen *lytA*, por este motivo todavía no se conoce la distancia que separa al gen *ejl* del gen *lytA101* en el cromosoma de la cepa 101/87.

LYTA	G	W	Q	K	N	D	T	G	Y	W	Y	V	H	S	D	G	S	Y	P	K	D			
LY101	G	W	Q	Q	N	D	T	G	T	W	Y	V	H	S	D	G	S	Y	P	K	D			
EJL	G	W	K	K	N	D	T	G	T	W	Y	V	Y	S	D	G	S	Y	P	K	D			
HBL	G	W	Q	K	N	G	T	G	Y	W	Y	V	H	S	D	G	S	Y	S	K	D			
CPL1	T	W	K	Q	D	S	K	G	W	W	F	R	R	N	N	G	S	F	P	Y	N			
CPL9	T	W	K	Q	D	S	K	G	W	W	F	R	R	N	N	G	S	F	P	Y	N			
	G	W	K	N		T	G	W	W	V			S	D	G	S	Y	P	K	D		<b>P1</b>		
LYTA	K	F	E	K	I	N		G	T	W	Y	Y	F	D	S	S	G	Y	M	L	A	D		
LY101	K	F	E	K	V	N		G	T	W	Y	Y	F	D	G	S	G	Y	M	L	A	D		
EJL	K	F	E	K	V	N		G	T	W	Y	Y	F	D	G	S	G	Y	M	L	A	D		
HBL	K	F	E	K	I	N		G	T	W	Y	Y	F	D	G	S	G	Y	M	L	S	D		
CPL1	K	W	E	K	I	G		G	V	W	Y	Y	F	D	S	K	G	Y	C	L	T	S		
CPL9	K	W	E	K	I	G		G	V	W	Y	Y	F	D	S	K	G	Y	C	L	T	S		
	K	F	E	K	I	N		G	T	W	Y	Y	F	D	S	G	Y	M	L	D		<b>P2</b>		
LYTA	R	W	R	K	H	T	D	G	N	W	Y	W	F	D	N	S	G	E	M	A	T			
LY101	R	W	K	K	H	T	D	G	N	W	Y	W	F	D	Q	S	G	E	M	A	T			
EJL	R	W	K	K	H	S	D	G	N	W	Y	W	F	D	Q	S	G	E	M	A	T			
HBL	R	W	K	K	H	T	D	G	N	W	Y	Y	F	D	Q	S	G	E	M	A	T			
CPL1	E	W	L	K	D	N	E	K	W	Y	Y	L	K	D	N	G	A	M	A	T				
CPL9	E	W	L	K	D	N	E	K	W	Y	Y	L	K	D	N	G	A	M	V	T				
	R	W	K	H			D		W	Y	F				B	G	E	M	A	T		<b>P3</b>		
LYTA	G	W	K	K	I	A	D	K	W	Y	Y	F	N	E	E	G	A	M	K	T				
LY101	G	W	K	K	I	A	E	K	W	Y	Y	F	D	G	E	G	A	M	K	T				
EJL	G	W	K	K	I	A	E	K	W	Y	Y	F	D	V	E	G	A	M	K	T				
HBL	G	W	K	K	I	A	D	K	W	Y	Y	F	D	V	E	G	A	M	K	T				
CPL1	G	W	V	L	V	G	S	E	W	Y	Y	M	D	D	S	G	A	M	V	T				
CPL9	G	W	V	L	V	G	S	E	W	Y	Y	M	D	D	S	G	A	M	V	T				
	G	W	K	K	I	A	E		W	Y	Y	F	D	E	G	A	M	K	T			<b>P4</b>		
LYTA	G	W	V	K	Y	K	D		T	W	Y	Y	L	D	A	K	E	G	A	M	V	S	N	
LY101	G	W	V	K	Y	K	E		T	W	Y	Y	L	D	S	Q	N	G	D	M	V	S	H	
EJL	G	W	V	K	Y	K	D		T	W	Y	Y	L	D	S	K	D	G	N	M	V	S	N	
HBL	G	W	V	K	Y	K	D		T	W	Y	Y	L	D	A	K	E	G	A	M	V	S	N	
CPL1	G	W	V	K	Y	K			N	N	W	Y	Y	M	T	N	E	R	G	N	M	V	S	N
CPL9	G	W	V	K	Y	K			N	N	W	Y	Y	M	T	N	E	R	G	N	M	V	S	N
	G	W	V	K	Y	K			T	W	Y	Y	L	D		G		M	V	S	N		<b>P5</b>	
LYTA	A	F	I	Q	S	A	D	G	T	G	W	Y	Y	L	K	P	D	G	T	L	A			
LY101	A	F	V	K	S	N	D		G	W	Y	Y	L	K	E	D	G	T	I	A				
EJL	E	F	I	R	A		G	Q	G	W	Y	Y	I	K	P	D	G	T	M	A				
HBL	A	F	I	Q	S	A	D	G	T	G	W	Y	Y	L	K	P	D	G	T	L	A			
CPL1	E	F	I	K	S	G	K		G	W	Y	F	M	N	T	N	G	E	L	A				
CPL9	E	F	I	K	S	G	K		G	W	Y	F	M	N	T	N	G	E	L	A				
	F	I							G	W	Y	Y		K	D	G	T	L	A			<b>P6</b>		

**Figura 55.** Comparación de los motivos P1 a P6 de los dominios C-terminales de las amidasas LYTA, LYTA101, EJL y HBL, y de las lisozimas CPL1 y CPL9.

Los aminoácidos de las secuencias se representan en código de una letra. LY101 hace referencia a la amidasa LYTA101. Los seis motivos se indican con las siglas P1 a P6 en el margen derecho de la figura. Los espacios en blanco se han creado para conseguir un mejor alineamiento de las secuencias en cada motivo. En negrita se representa la secuencia consenso deducida para cada uno de los motivos. Se ha considerado como posición consenso aquella que se encuentra representada en las seis enzimas y en la que el porcentaje de semejanza entre los aminoácidos que la ocupan es superior al 50%.

```

CPL1 MVKKNDLFVDV
CPL9 MVKKNDLFIDV
CPL7 MVKKNDLFVDV

LYTA MEINVSKLRTDLPQGVQPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWRKDP ELG
LY101 MEIDVSKLRTDLPQGVQPYRQVHAHSTGNRNSTVQNEADYHYR KDP ELG
EJL MDIDTSRLRTDLPQGVQPYRQVHAHSTGNRNSTAQNEADYHWRKDP ELG
HBL MDIDRNRLRTGLPQGVQPYRQVHAHSTGNRNSTVQNEADYHWRKDP ELG

CPL1 SSHNGYDITGILEQMGTNTI I K I SESTTYLNPCLSAQVEQSNPIG F Y H F A R F G G D V A E A E R E
CPL9 SSHNGYDITGILEQMGTNTI V K I SESTTYLNPCLSAQVEQSTPIG F Y H F A R F G G D V A E A E R E
CPL7 ASHQGYDISGILEEAGTTNTI I K V SESTSYLNPCLSAQVSQSNPIG F Y H F A W F G G N E E E A E A E

LYTA FF SHIVGNGCIMQVGPVDNGAWDVGGG WNAETYA AVELIESHSTKEEFMTDYRLYI ELLRNLA
LY101 FF SHVCGNGRVMQVGPVDNGAWDVGGG WNAEGYA QVELIESHESKEEF LIDYRLYI ELLRNLA
EJL FF SHVVGNGRVMQVGPVNNGSWDVGGG WNAETYA AVELIESHSTEEEFMEDYRLYI ELLRNLA
HBL FF SHVVGNGFRIMQVGPVNNGSWDVGGG WNAETYA AVELIESHSTKEEFMADYRLYI ELLRNLA

CPL1 AQFFLDNVPMQVKYLVLVDYEDDPSGDAQANTNACLRFMQMIADAGYKPIIYYSYKPFTHDNVDY
CPL9 AQFFLDNVPTQVKYLVLVDYEDDPSGNAQANTNACLRFMQMIADAGYTPIIYYSYKPF TLDNVDY
CPL7 ARYFLDNVPTQVKYLVLVDYEDHASASVQRNTTACLRFMQIIAEAGYTPIIYYSYKPF TLDNVDY

LYTA DEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVDYPYPYLAKWGISREQFKHDIENGLTIE T
LY101 VEAGIPKTLDTDDLAGIKTHEYCTNNQPDNNSDHIDPYPYLAKWGISREQFKQDIENGLTIEA
EJL DEADLPKTLDTDDLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVDYPYPYLAKWGSREQFKQDIENGLTIEA
HBL DEAGLPKTLDTDDLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVDYPYPYLASWGISREQFKQDIENGLSAA T

CPL1 QQILAQFPNSLWIAGYGLNDGTANFEYFSPMDGIRWWQYSSNPFDKNIVLLDDEEDDKPKTAG
CPL9 QQILAQFPNSLWIAGYGLNDGNADFEYFSPMDGIRWWQYSSNPFDKNIVLLDDEEDEKPKTAG
CPL7 QQILAQFPNSLWIAGYGLNDGTANFEYFSPMDGIRWWQYSSNPFDKNIVLLDDEKEDNINNE N

LYTA |-----P1-----|-----P2-----|-----P3-----|
LY101 GWQKNDTGWYVHSDGSYPKDKFEKINGTWY YFDSSGYMLADRWRKHHTDGNWYWF D N S G E M A T
EJL GWQNDTGWYVHSDGSYPKDKFEKNGTWY YFDGSGYMLADRWRKHHTDGNWYWF D Q S G E M A T
HBL GWKKNNDTGWYVYSDGSYPKDKFEKNGTWY YFDGSGYMLADRWRKHSDGNWYWF D Q S G E M A T
CPL1 TWKQDSKGWFRNNGSFPYNKWEKIGGVWY YFDSKGYCLTSEWLKDNE KWY Y L K D N G A M V T
CPL9 TWKQDSKGWFRNNGSFPYNKWEKIGGVWY YFDSKGYCLTSEWLKDNE KWY Y L K D N G A M V T
CPL7 TLKSLTTVANEVIQGLWNGQERYDSL ANRGYDPQAVQDKVNEILNAREIADLTTVANEVIQ G
|-----M1-----|

LYTA |-----P4-----|-----P5-----|-----P6-----|
LY101 GWKKIADKWY YFNEEGAMKTGWVKYKDTWY YLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWY Y L K P D G T L A
EJL GWKKIAEKWY YFDGEGAMKTGWVKYKETWY YLDSQNGDMVSHAFVKS NDGWY Y L K E D G T I A
HBL GWKKIAEKWY YFDVEGAMKTGWVKYKDTWY YLDSKDGNMVSNEFIRA GQGWY Y I K P D G T M A
CPL1 GWVLVGSEWY YMDDSGAMVTGWVKYKNNWY YMTNERGNMVSNEFIKS GKGWY F M N T N G E L A
CPL9 GWVLVGSEWY YMDDSGAMVTGWVKYKNNWY YMTNERGNMVSNEFIKS GKGWY F M N T N G E L A
CPL7 LWGNGQERYDSL ANRGYDPQAVQDKVNEILNAREIADLTTVANEVIQGLWNGQERYDSL ANR
-----M2----- |-----M3-----

LYTA DRPEFTVEPDGLITVK
LY101 DRPEFSIEPDGLITMK
EJL DKLEFTVEPDGLITTK
HBL DKPEFTVEPDGLITVK
CPL1 DNPSFTKEPDGLITVA
CPL9 DNPSFTKEPDGLITVA
CPL7 GYDPQAVQDKVNELLS
-----|

```

Figura 54. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las amidasas LYTA, LYTA101, EJL y HBL, y de las lisozimas CPL1, CPL9 y CPL7. Los aminoácidos de las secuencias se representan en código de una letra. LY101 hace referencia a la amidasa LYTA101. La flecha indica las cisteínas que se mantienen conservadas en la posición 136 de las cuatro amidasas. P1 a P6, señalan las posiciones de los seis motivos de los dominios C-terminales de las cuatro amidasas y de las lisozimas CPL1 y CPL9. M1 a M3, señalan las posiciones de los 2,8 motivos repetidos del dominio C-terminal de la lisozima CPL7. Los espacios en blanco en las secuencias correspondientes a los motivos P3 de las proteínas CPL1 y CPL9, y P6 de las proteínas LYTA101, EJL, CPL1 y CPL9 se han creado para conseguir un mejor alineamiento de los motivos.

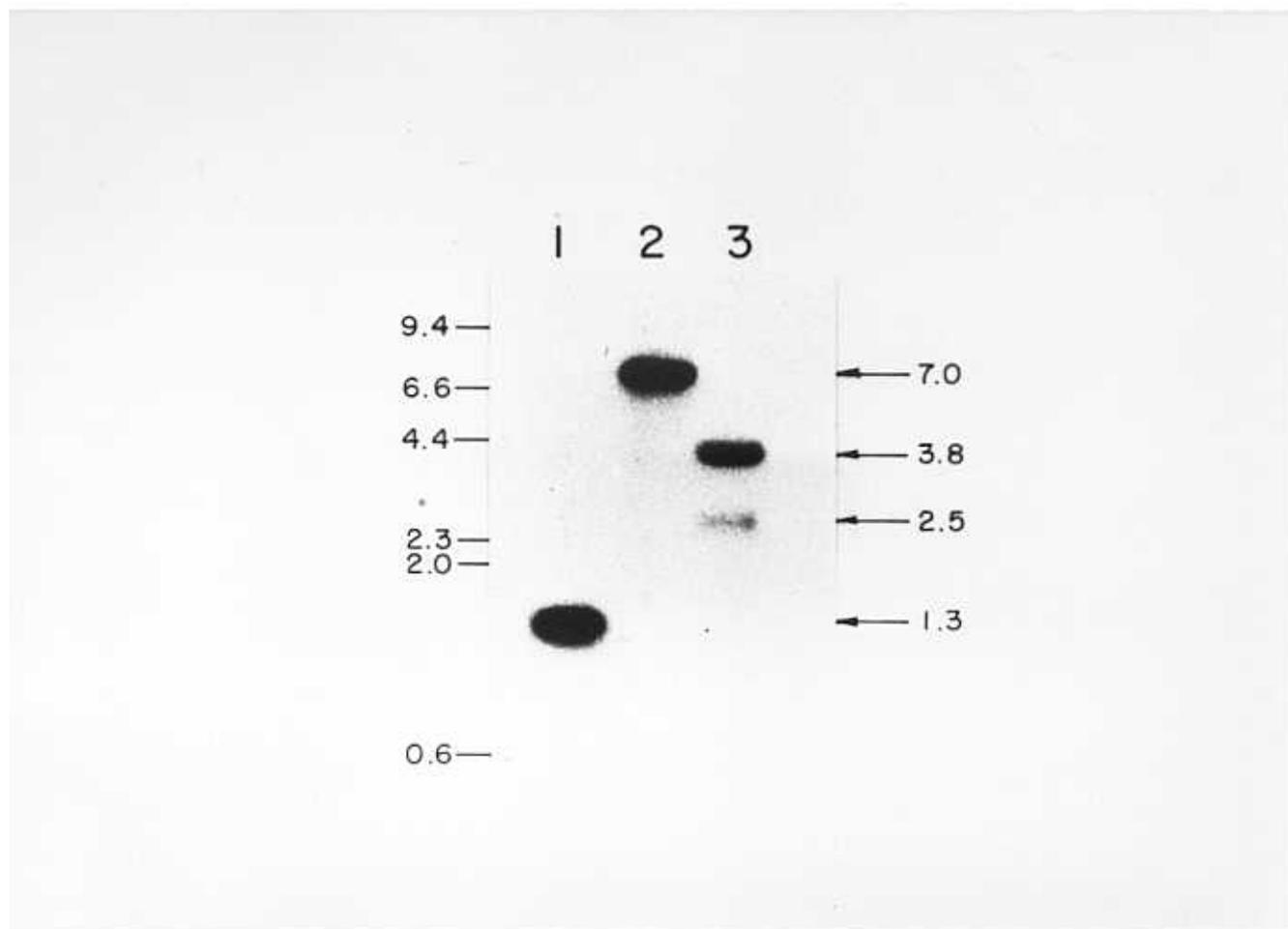
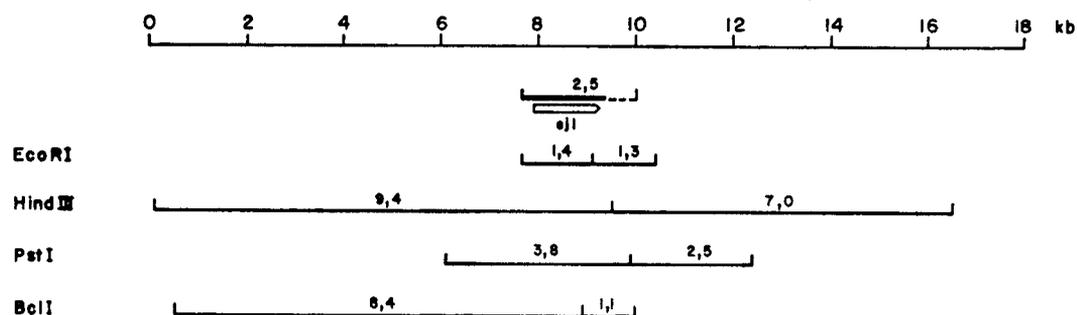
**TABLA 19.** Porcentaje de semejanza entre las amidasas LYTA, LYTA101, EYL y HBL.

Proteínas	Proteínas			
	LYTA	LYTA101	EYL	HBL
A)				
LYTA	--	84,6	85,6	90,6
LYTA101	84,6	--	85,8	84,0
EYL	85,6	85,8	--	87,8
HBL	90,6	84,0	87,8	--
B)				
LYTA	--	87,0	88,1	88,1
LYTA101	87,0	--	88,1	85,8
EYL	88,1	88,1	--	91,0
HBL	88,1	85,8	91,0	--
C)				
LYTA	--	81,7	82,4	93,7
LYTA101	81,7	--	82,9	81,7
EYL	82,4	82,9	--	83,9
HBL	93,7	81,7	83,9	--

A) Se comparan las proteínas completas.

B) Se comparan los dominios N-terminales de las proteínas.

C) Se comparan los dominios C-terminales de las proteínas.

**A****B**

**Figura 56.** Determinación del mapa físico del gen *ejl* en el cromosoma de la cepa 101/87.

**Panel A.** *Southern-blot* del DNA cromosómico de la cepa 101/87 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (calle 1), *HindIII* (calle 2), o *PstI* (calle 3). El *Southern-blot* se realizó como se detalla en el apartado 25.1. de Materiales y Métodos, utilizando como sonda para las hibridaciones el fragmento *HindIII* de 0,5 kb del plásmido pNB101 (Figura 50). En el margen izquierdo de la figura se muestran los tamaños en kb de los fragmentos de restricción utilizados como marcadores. Las flechas del margen derecho indican la posición y el tamaño de los fragmentos que hibridan con la sonda de DNA empleada.

**Panel B.** Mapa físico de la región del cromosoma de la cepa 101/87 que contiene al gen *lytA101*. En la parte superior de la figura se representa el fragmento de restricción de 2,5 kb clonado en el plásmido pNE103 (Figura 50). En trazo grueso se indica la región de 1,5 kb que ha sido secuenciada. El gen *ejl* se señala con una flecha. En la parte inferior de la figura se muestra la posición de los fragmentos originados mediante digestión del DNA de la cepa 101/87 con las enzimas de restricción que se detallan y que hibridan con el inserto de 2,5 kb clonado en el plásmido pNE103.

## **7.10. Caracterización de un fago atemperado de *S. pneumoniae* 101/87.**

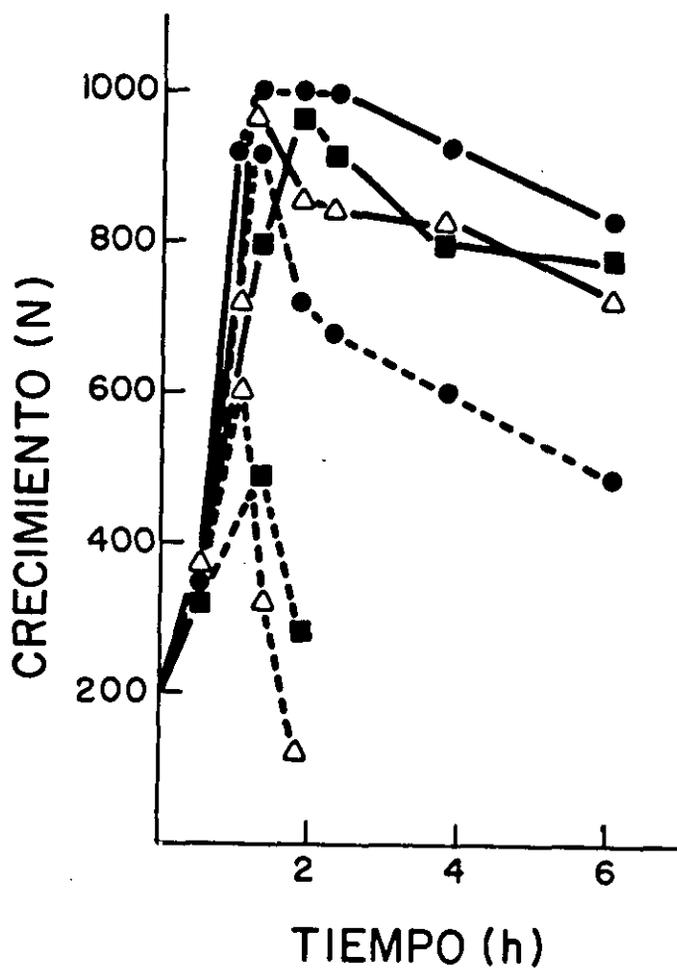
### **7.10.1. Tratamiento de *S. pneumoniae* 101/87 con mitomicina C.**

Dado que la cepa 101/87 de neumococo presenta dos genes, *lytA101* y *ejl*, que codifican para enzimas líticas de pared, y dado que Moynet y Tiraby (1980) habían postulado que las cepas de neumococo lisogénicas no son transformables, se podía especular con la posibilidad de que *S. pneumoniae* 101/87 fuese una cepa lisogénica para un fago atemperado portador de su propia enzima lítica de pared, un caso similar al ya descrito para el fago de neumococo HB-3 (Romero y cols., 1990 a).

Un método rápido y sencillo para comprobar si una cepa bacteriana contiene un fago atemperado consiste en tratar un cultivo de ésta con un agente capaz de inducir el ciclo lítico del fago (mitomicina C, radiación ultravioleta, etc.), de forma que si el cultivo sufre lisis tras la inducción con el agente es muy probable que dicha cepa sea portadora de un fago atemperado. En neumococo, una concentración de 0,07  $\mu\text{g/ml}$  de mitomicina C en el medio de cultivo es suficiente para inducir la lisis de la cepa 746 (cepa lisogénica para un fago de la familia HB, Tabla I). Cuando las cepas R6 (control negativo), 746 (control positivo) y 101/87 se cultivaron en medio C+Y y a una concentración celular de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml se les añadió una dosis de mitomicina C de 0,07  $\mu\text{g/ml}$ , su respuesta fue la que se muestra en la Figura 57. Mientras que las cepas 746 y 101/87 detuvieron su crecimiento y comenzaron una rápida lisis celular después de haber transcurrido una hora desde la adición de la mitomicina C, la cepa R6 continuó creciendo hasta el final de la fase exponencial y su lisis fue mucho más lenta. En ausencia de mitomicina C las tres cepas alcanzaban la fase estacionaria de crecimiento. Este resultado sugería la existencia de un fago atemperado en la cepa 101/87.

### **7.10.2. Aislamiento y purificación del fago EJ-1.**

La demostración directa de la existencia de un fago atemperado en la cepa 101/87 sería la visualización al microscopio electrónico de partículas fágicas procedentes de un cultivo de esta cepa inducido con mitomicina C. Con este objetivo, se procedió a la inducción de la cepa 101/87 con mitomicina C. Después de la correspondiente lisis del cultivo, el sobrenadante de éste se sometió a dos centrifugaciones diferenciales en gradientes de CsCl según se indica en el apartado 27. de Materiales y Métodos. La observación de la preparación al microscopio electrónico reveló



**Figura 57.** Curvas de crecimiento de las cepas de neumococo R6, 101/87 y 746, en presencia de mitomicina C. Las cepas R6 (●), 101/87 (■) y 746 (△) se cultivaron en medio C+Y a 37 °C. A tiempo cero ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, 200 N) se añadieron 0,07 µg/ml de mitomicina C al cultivo (línea discontinua), y se continuó la incubación en oscuridad. En línea continua se representa el crecimiento de los cultivos en ausencia de mitomicina C. El crecimiento y la lisis se siguieron por nefelometría.

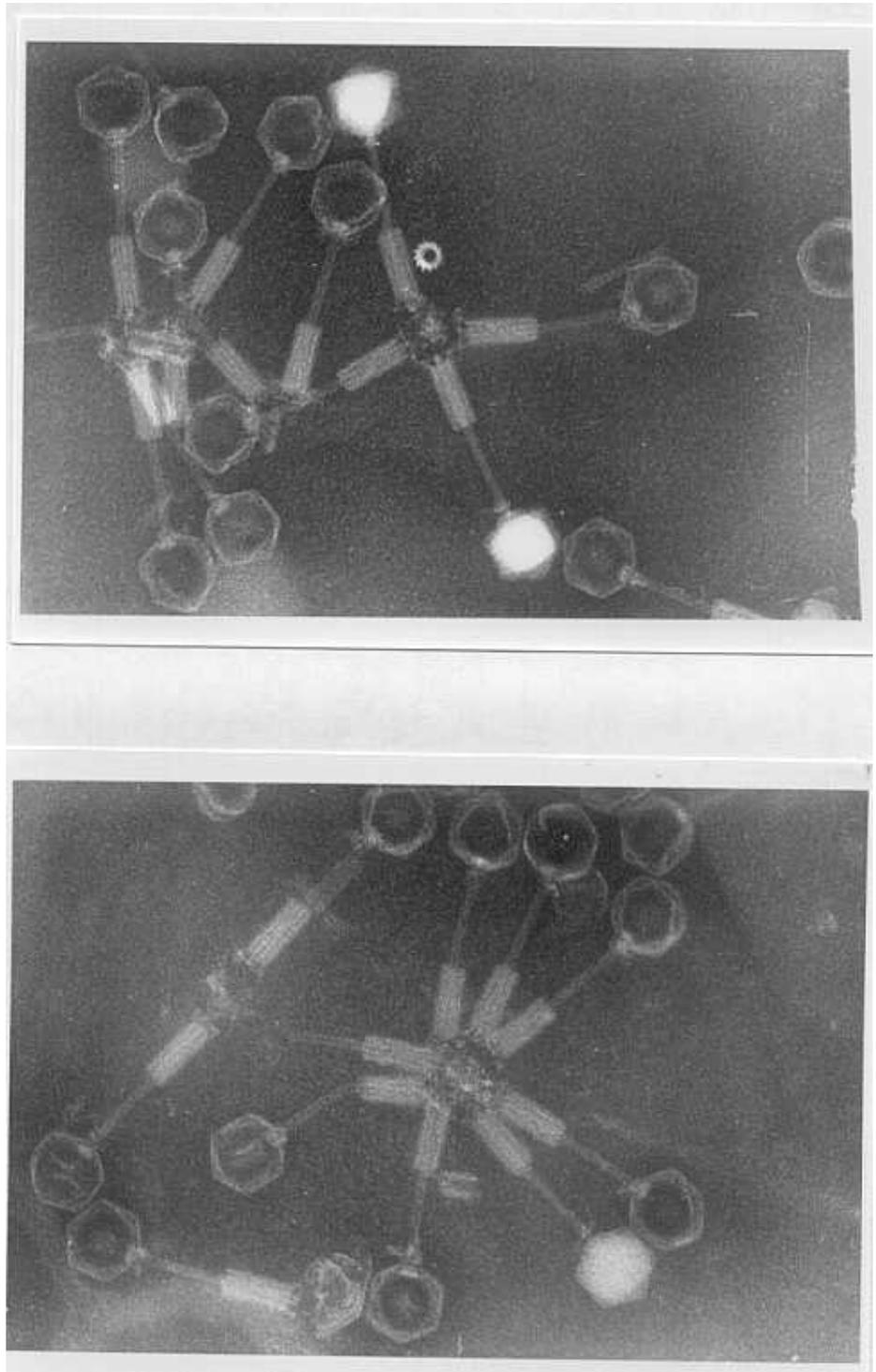
la presencia de partículas fágicas, la mayoría de ellas vacías de DNA, incluso cuando éstas se sometían a una fijación previa con glutaraldehído (Figura 58). El nuevo fago, EJ-1, presenta una morfología distinta a la de todos los fagos de neumococo hasta ahora descritos, los de las series Cp (Ronda y cols., 1981), Dp (López y cols., 1977), w (Tiraby y cols., 1975) y HB (Bernheimer, 1979).

### 7.10.3. Características estructurales del fago EJ-1.

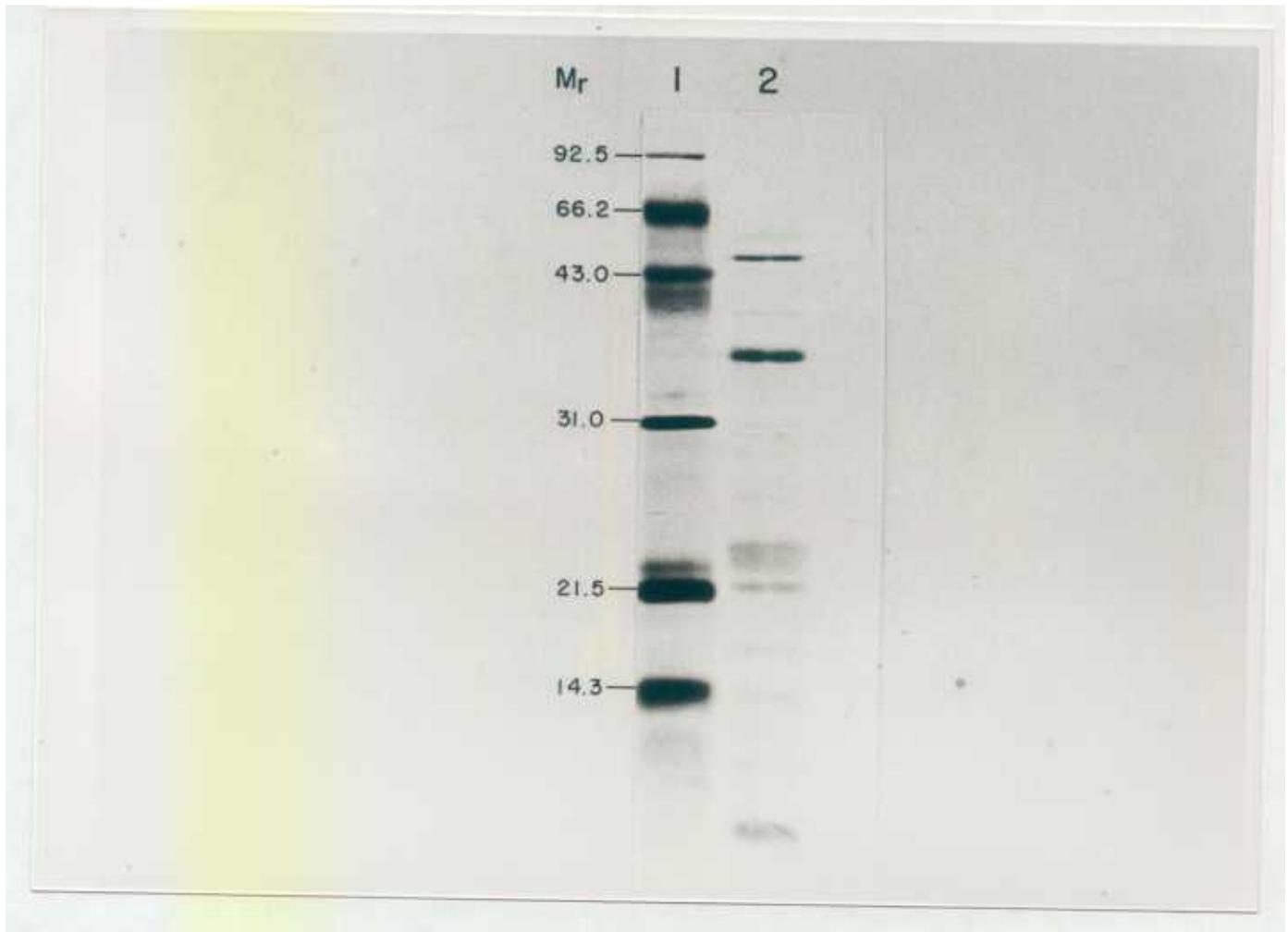
EJ-1 es un fago que, por su morfología, pertenece al Tipo A-1 según el sistema de clasificación de Bradley (1967) y Ackermann (1974). Tiene una cabeza de contorno hexagonal, unida por un collar a una cola larga, contráctil y estriada, en cuyo extremo distal se aprecia una placa basal rematada por finas espículas (Figura 58). El fago EJ-1 presenta una densidad de flotación en gradientes de CsCl de 1,485 g/cm<sup>3</sup>, y un perfil de proteínas como el que se muestra en la Figura 59, con dos proteínas mayoritarias de 48,0 kd y 36,0 kd, y al menos quince proteínas minoritarias de las cuales cuatro (24,0; 23,0; 21,0 y 8,5 kd) se encuentran en mayor proporción que las once restantes. Este perfil de proteínas es distinto a los hasta ahora descritos para otros fagos de neumococo (Romero y cols., 1990 c). Ninguna de las proteínas del fago EJ-1 reacciona con el anticuerpo frente a la amidasa LYTA mediante análisis por la técnica de *Western-blot*. En la Tabla 20 se resumen algunas propiedades del virión EJ-1 y se comparan con las observadas en los fagos de neumococo Cp-1, Dp-1 y HB-3.

### 7.10.4. Características fisiológicas del fago EJ-1.

Cuando el fago EJ-1 se ensaya en diferentes medios de cultivo, C+Y o K-CAT (Porter y Guild, 1976), y a diferentes temperaturas, 30 ó 37 °C, no produce descendencia fágica (no lisa las células de neumococo en medio líquido ni forma placas de lisis en medio sólido) empleando como cepa receptora la R6 o la CPI000, una cepa de neumococo (Tabla 1) que carece de las endonucleasas de restricción DpnI y DpnII, enzimas que podrían impedir la replicación del fago. Tampoco se ha observado descendencia fágica en la cepa 101/87 o en *S. oralis* NCTC 11427, bacteria que puede ser infectada con otros fagos de neumococo (Ronda y cols., 1989). Dado que hay varios casos descritos de fagos atemperados que sólo son capaces de infectar productivamente la cepa que lisogenizan siempre que ésta se cure previamente (Teuber y Lembke, 1983), se intentó la curación de la cepa 101/87 con mitomicina C, pero no se consiguió ningún resultado positivo. Para comprobar si el fago EJ-1 purificado había perdido su capacidad infectiva como consecuencia del proceso de purificación, se analizó la infección de neumococo



**Figura 58.** Microfotografías al microscopio electrónico del fago EJ-I purificado. La preparación de fago se ha teñido con ácido fosfotúngstico según se indica en el apartado 27.1. de Materiales y Métodos. Se aprecia también la cola del fago seccionada transversalmente [fotografía superior; aumentos ( $\times 175.560$ )] y longitudinalmente [fotografía inferior; aumentos ( $\times 184.680$ )]



**Figura 59.** Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15% de las proteínas del fago EJ-1. Las proteínas se visualizaron tiñendo el gel con nitrato de plata (Amersham). Calle 1, proteínas marcadoras, su  $M_r$  ( $\times 10^{-3}$ ) se muestra en el margen izquierdo de la figura. Calle 2, proteínas del fago EJ-1. La muestra se preparó hirviendo durante 10 minutos 30  $\mu$ l de la preparación de fago purificado en presencia de 30  $\mu$ l de tampón de ruptura (apartado 13. de Materiales y Métodos).

**TABLA 20.** Características de los fagos EJ-1, Dp-1, Cp-1 y HB-3.

Características	Fagos			
	EJ-1	Dp-1	Cp-1	HB-3
<b>a) <u>Virión</u></b>				
Densidad de flotación (g/cm <sup>3</sup> )	1,48	1,48	1,46	N.D.
Contorno de la cabeza	Hex.	Hex.	Hex.irr.	Hex.
Diámetro de la cabeza (nm)	57	60	60 x 45	65
Longitud de la cola (nm)	130	155	20	156
Placa basal	Si	No	No	Si
Nº proteínas estructurales detectadas	17	5	11	3
<b>b) <u>DNA</u></b>				
Tipo	B.L.	B.L.	B.L.	B.L.
Presencia de proteína covalentemente unida	No	No	Si	Si
Tamaño (kb)	42 ± 3	58	19	40

Abreviaturas utilizadas : N.D., no determinada; Hex., hexagonal; Hex.irr., hexagonal irregular; B.L., DNA bicatenario lineal.

Los fagos Dp-1, Cp-1 y HB-3 se describen en la Tabla 1.

con el sobrenadante de un cultivo de *S. pneumoniae* 101/87 inducido con mitomicina C, pero tampoco en este caso se obtuvo descendencia fágica.

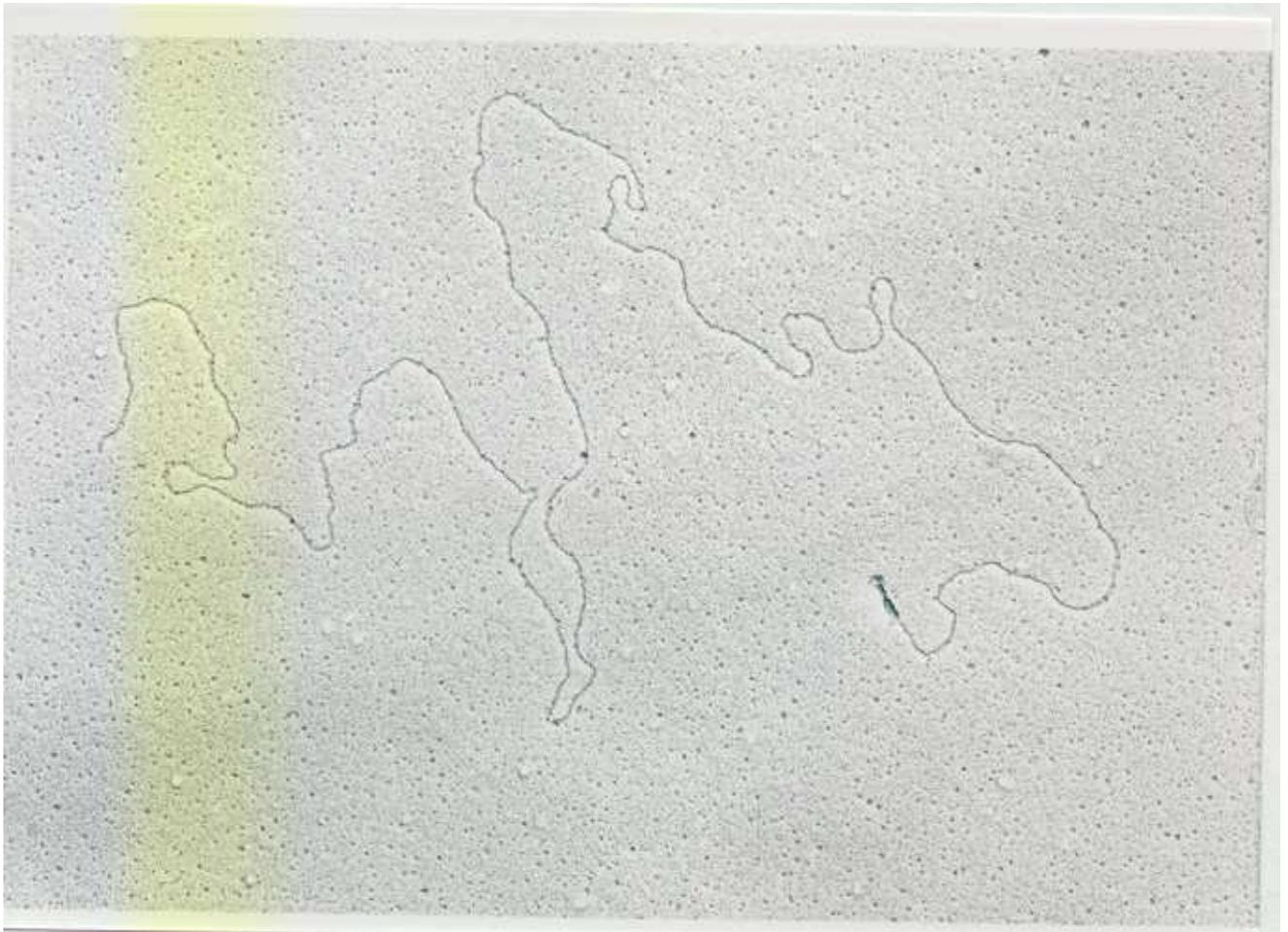
Para determinar si se producía la liberación de partículas fágicas cuando los cultivos de la cepa 101/87 se autolisaban al final de la fase estacionaria de crecimiento, se concentró 100 veces el sobrenadante de un autolisado de *S. pneumoniae* 101/87 (apartado 27. de Materiales y Métodos) y se analizó al microscopio electrónico. Dado que no se observaron partículas fágicas, se puede suponer que la autólisis de la cepa 101/87 no se debe a una inducción del profago al final de la fase estacionaria de crecimiento.

#### 7.10.5. Características del DNA del fago EJ-I.

Mediante técnicas de microscopía electrónica se determinó que el DNA del fago EJ-I es de doble cadena, lineal y con un tamaño aproximado de 45 kb (Figura 60). Cuando el DNA de dicho fago, una vez aislado y purificado, se analiza mediante una electroforesis en geles de agarosa, se observa que penetra en el gel sin ninguna dificultad tanto si se ha tratado previamente con proteinasa K como si no ha sido sometido a la acción de esta proteasa, lo que indica que no posee proteínas unidas covalentemente. En la Tabla 21 se detalla el tamaño de los fragmentos que se originan al digerir el DNA de EJ-I con varias enzimas de restricción. El tamaño del DNA del fago EJ-I deducido de los análisis de restricción (Tabla 21),  $40 \pm 2$  kb, es ligeramente inferior al calculado mediante técnicas de microscopía electrónica. En la Tabla 20 se comparan las propiedades del DNA del fago EJ-I con las correspondientes a los fagos Dp-I, Cp-I y HB-3.

#### 7.11. Demstración del origen fágico del gen *ejl*.

Dado que *S. pneumoniae* 101/87 era lisogénico para el fago EJ-I y presentaba dos genes distintos que codificaban para enzimas líticas de pared, se podía pensar que uno de esos dos genes perteneciese a la bacteria mientras que el otro fuese un gen del fago, un caso análogo al ya descrito para el fago HB-3 y su gen lítico de pared, gen *hbl* (Romero y cols., 1990 a). Las siguientes características sugerían un origen fágico para el gen *ejl*: i) la proteína EJL no es activa, o al menos su actividad no es detectable, en la cepa 101/87 (apartado 7.7.), lo que sugiere que el gen *ejl* no se expresa en la bacteria, una propiedad habitual en los genes fágicos durante el ciclo lisogénico; ii) el gen *ejl*, al contrario de lo que ocurre con el gen *lytA101*, no presenta homología en su región 5' no codificante con el gen *lytA* (gen de origen bacteriano) (apartado 7.8.); iii) los genes *lytA101* y *ejl* se localizan en fragmentos de restricción *EcoRI* de 7,2 y 1,4 kb,



**Figura 60.** Microfotografía al microscopio electrónico de una partícula fágica aislada de agua Ej-1. Se observa el DNA bicatenario lineal extruído del virión. La muestra se ha obtenido como se indica en el apartado 27.1. de Materiales y Métodos. Aumentos (x 39.682).

**TABLA 21.** Tamaño de los fragmentos originados mediante digestión del DNA del fago EJ-I con las enzimas de restricción que se detallan.

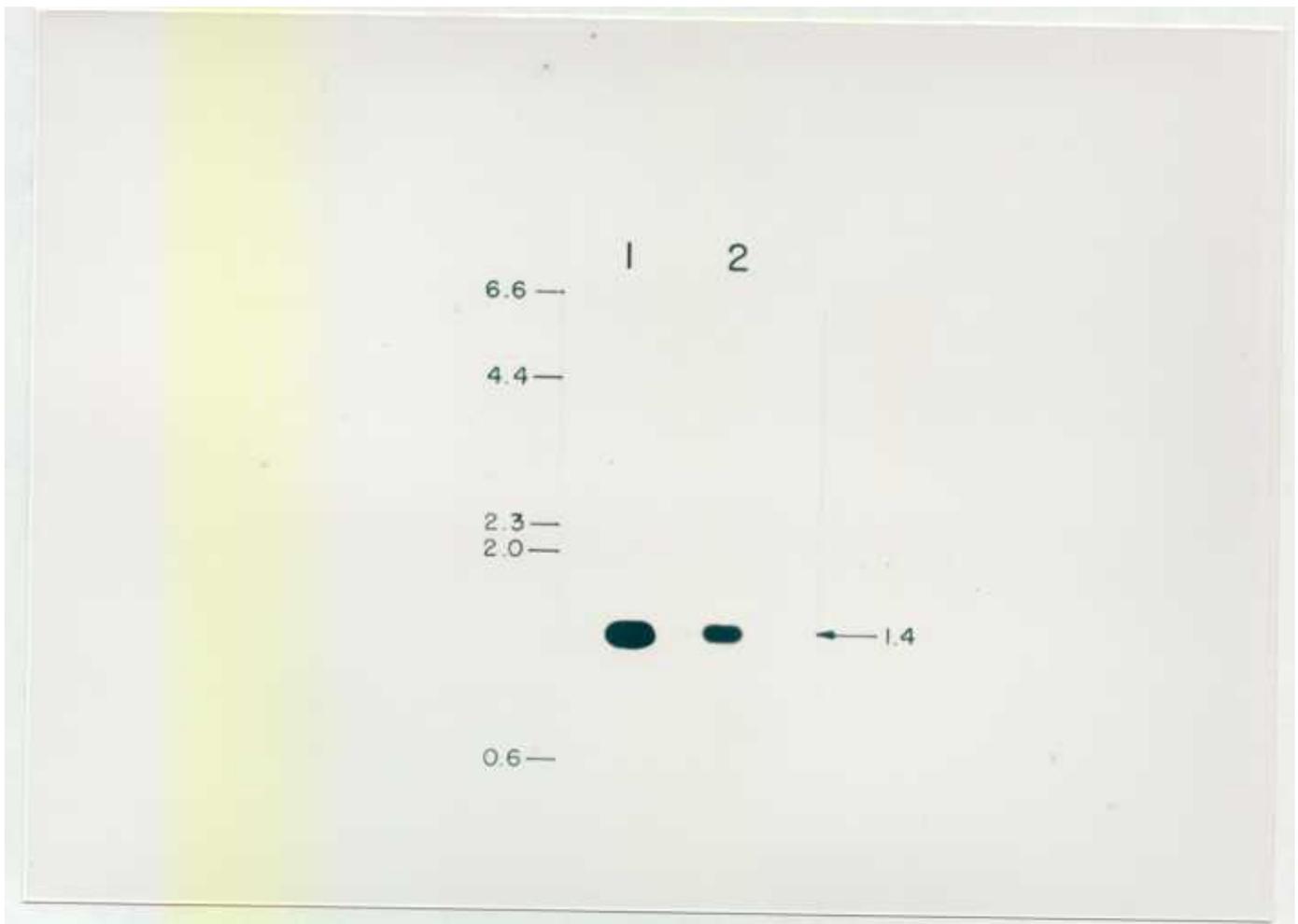
Enzima	Tamaño de los fragmentos (kb)			Tamaño del DNA del fago (kb)
<i>BclI</i>	23,0			41,2
	8,4			
	7,6			
	2,2			
<i>DraI</i>	8,0	2,7	0,9	41,1
	7,4	2,3	0,8	
	4,8	1,7	0,7	
	4,7	1,6		
	4,2	1,3		
<i>EcoRI</i>	21,0	1,7		39,8
	12,5	1,4		
	2,1	1,1		
<i>HindIII</i>	12,5	3,0	1,1	40,1
	7,0	2,1	0,9	
	5,2	1,9	0,8	
	3,3	1,6	0,7	
<i>PstI</i>	10,5	3,8		41,8
	8,4	3,5		
	5,8	3,1		
	5,6	1,1		

Los fragmentos de restricción se separaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. El tamaño de los fragmentos se ha calculado utilizando como marcadores de tamaño los fragmentos resultantes de la digestión del DNA del fago lambda con la enzima de restricción *HindIII*.

El tamaño del DNA del fago EJ-I se ha calculado sumando los tamaños de los fragmentos de restricción correspondientes.

respectivamente (Figura 49 A); el DNA del fago EJ-1 posee un fragmento de restricción *EcoRI* de 1,4 kb pero carece de un fragmento *EcoRI* de 7,2 kb.

Para comprobar si el gen *ejl* pertenece al genoma del fago EJ-1 se realizó un *Southern-blot* del DNA de dicho fago y del plásmido pNE100, ambos digeridos con la endonucleasa de restricción *EcoRI*, y se hibridó con el fragmento *EcoRI* de 1,4 kb del plásmido pNE100, fragmento que contiene la casi totalidad de la región estructural del gen *ejl* (Figuras 50 y 53). En ambos casos se observó una única banda de hibridación que correspondía al fragmento de restricción *EcoRI* de 1,4 kb (Figura 61), lo que confirmaba la hipótesis previa sobre el origen fágico del gen *ejl*.



**Figura 61.** Southern-blot del DNA del fago EJ-1 y del plásmido pNE100. El Southern-blot se realizó como se describe en el apartado 25.1. de Materiales y Métodos. Se empleó como sonda de DNA el fragmento *Eco*RI de 1,4 kb del plásmido pNE100 (Figura 50). Calle 1, pNE100 digerido con *Eco*RI. Calle 2, DNA del fago EJ-1 digerido con *Eco*RI. En el margen izquierdo de la figura se muestran los tamaños en kb de los fragmentos de restricción utilizados como marcadores. En el margen derecho se indica la posición (flecha) y el tamaño en kb de los fragmentos que hibridan con la sonda empleada.

**IV.DISCUSION**

## **I. CARACTERIZACION DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCION DEL GEN *lytA*.**

El primer objetivo de esta Tesis se centró en la caracterización de la unidad de transcripción del gen *lytA*. La determinación del sitio de iniciación de la transcripción de dicho gen mediante el empleo de la nucleasa S1 reveló que el promotor del gen *lytA* no se localizaba en el fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb (Figura 8), en contra de lo que previamente se había postulado en base al análisis de la secuencia de este fragmento (García y cols., 1986 c). Por este motivo se decidió estudiar el fragmento de restricción *Sau3AI* de 2,3 kb clonado en el plásmido pGL65 y que contiene al gen *lytA* (Figura 8). Mediante ensayos de transcripción-traducción *in vitro* utilizando extractos de *E. coli* y mediante la expresión de los plásmidos pED1 y pED2 (Figura 9) en *S. pneumoniae*, se comprobó que el fragmento *Sau3AI* codificaba para una actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo, lo que sugería la presencia del promotor del gen *lytA* en dicho fragmento. La utilización del plásmido pGA46, un plásmido para la búsqueda de promotores, permitió localizar en *E. coli* un promotor en el fragmento *Sau3AI-HindIII* de 0,38 kb (Figura 8).

La secuenciación del fragmento *Sau3AI* (Figuras 10 y 11) y el empleo de la técnica de la nucleasa S1 para la determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *lytA* (Figura 12), demostraron que éste se localizaba, tanto en *S. pneumoniae* como en *E. coli*, a 240 pb del codón de iniciación de la traducción del gen (Figura 11). Sin embargo, en *E. coli* se detectó un segundo sitio de iniciación de la transcripción (P2) situado a 43 pb del primero (P1) y a 197 pb del inicio de la traducción (Figura 11). Dado que este segundo sitio de iniciación no se detecta en *S. pneumoniae* y dado que la región -35 propuesta tampoco se ha descrito hasta la fecha para ningún promotor de *E. coli*, no se puede descartar la posibilidad de que este RNA mensajero más corto se origine como consecuencia de un procesamiento en *E. coli* del RNA mensajero transcrito a partir de P1.

La existencia de varias posibles regiones -10 y -35 en el promotor P1 podría favorecer la interacción del promotor con la RNA polimerasa, un mecanismo de estimulación de la transcripción ya descrito para algunos promotores de *E. coli* (Travers y cols., 1983; Travers, 1984). El hecho de que las regiones -10 y -35 propuestas para el promotor P1 del gen *lytA* sean similares a las que presentan los promotores de *E. coli* reconocidos por la subunidad  $\sigma_{70}$  de la RNA polimerasa, está de acuerdo con los resultados obtenidos por Morrison y Jaurin (1990) para otros 17 fragmentos de DNA de neumococo con actividad promotora en *E. coli*, y sugiere la existencia en neumococo de una subunidad  $\sigma$  mayoritaria similar a la subunidad  $\sigma_{70}$  de *E. coli*. De forma similar a lo observado en los fragmentos del DNA de neumococo que presentan actividad promotora en *E. coli* (Morrison y Jaurin, 1990), en la región -44 de P1 se localiza la secuencia

AAAA, que también existe en los promotores de otras bacterias Gram-positivas (Graves y Rabinowitz, 1986) y en algunos promotores de *E. coli* (Galas y cols., 1985). En el DNA de neumococo las regiones intergénicas tienen un elevado contenido en pares de bases AT (80%) respecto al 61% que caracteriza al DNA total de esta especie, lo que podría favorecer la aparición de estructuras activadoras de la transcripción (curvaturas en el DNA) que explicarían la alta frecuencia de promotores fuertes en los genes de neumococo (Morrison y Jaurin, 1990), una de las causas que se han argumentado para tratar de explicar la inestabilidad de los plásmidos que contienen clonados fragmentos de DNA de neumococo en *E. coli* (apartado 4.5. de la Introducción).

Es interesante destacar la gran longitud (240 pb) de la región *leader* del gen *lytA*, que contrasta con la excepcionalmente corta (2 pb) del gen *polA* de *S. pneumoniae* (López y cols., 1989). Aunque hasta la fecha no se conocen otras regiones *leader* para genes de neumococo, el análisis de las dos que se han descrito sugiere que en esta bacteria, al igual que ocurre en *E. coli*, la estructura de los genes presenta una gran diversidad. Una de las funciones que cumplen las regiones *leader* de gran longitud es la de originar estructuras secundarias relacionadas con mecanismos de regulación génica. Sin embargo, el análisis de la región *leader* del gen *lytA* no reveló la existencia de ninguna estructura similar a las que se han descrito en *E. coli* (Rosenberg y Court, 1979; Friesen y cols., 1983) que permitiese suponer un control transcripcional o traduccional para el gen *lytA*. No obstante, la región *leader* del gen *lytA* podría ejercer la función de estabilizar la estructura del RNA mensajero incrementando la vida media de éste y actuando así como un mecanismo de regulación de la expresión génica (Green e Inouye, 1984; Gorski y cols., 1985; Belasco y Higgins, 1988).

La localización y caracterización del promotor del gen *lytA* permite afirmar que el fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb que contiene dicho gen (Figura 8) no posee ningún promotor detectable. Por ello, la expresión del gen *lytA* en los plásmidos que contienen clonado el fragmento *HindIII* de 1,2 kb se realizará bajo el control de promotores localizados en los propios vectores plasmídicos. Stuber y Bujard (1981) han demostrado la existencia en pBR322 de un promotor localizado en la región estructural del gen de resistencia a tetraciclina (Brosius y cols., 1982), que es responsable de la expresión del gen de resistencia al cloranfenicol en el plásmido pBR329 (Covarrubias y Bolívar, 1982). La existencia de este promotor permite explicar la expresión del gen *lytA* en el fragmento *HindIII* de 1,2 kb clonado en el plásmido pGL80 (García y cols., 1986 c).

Dado que hasta la fecha no se ha descrito la presencia de ningún promotor localizado en la región 3' no codificante del gen *tet* en el plásmido pLS1 (Lacks y cols., 1986 a) o en su derivado pLSE1 (Ronda y cols., 1988), la expresión del gen *lytA* en los plásmidos pRG2 (Ronda y cols.,

1987) y pLSE5 (Ronda y cols., 1988), plásmidos que contienen clonado en la diana de restricción *Hind*III de pLS1 y pLSE1, respectivamente, el fragmento *Hind*III de 1,2 kb, probablemente sea debida a la actividad promotora del gen *tet* mediante un mecanismo de *readthrough*. Esta misma situación explicaría la expresión del gen *lytA* en el plásmido pLSE3 (Figura 14 A). Por lo tanto, estos resultados revelan que los plásmidos pLS1 y pLSE1 pueden ser utilizados como vectores de expresión cuando el fragmento de DNA clonado en la diana de restricción *Hind*III del vector se orienta en la dirección del gen *tet*.

El terminador de la transcripción del gen *lytA* se localiza a 27 pb del codón de terminación de la traducción del gen (Figura 11) y es reconocido tanto por la RNA polimerasa de *S. pneumoniae* como por la de *E. coli*. Posee la estructura característica de los terminadores de la transcripción rho-independientes de procariotas (Figura 13) (Rosenberg y Court, 1979), por lo que es muy probable que la terminación de la transcripción del gen *lytA* se produzca mediante un mecanismo independiente de la interacción del factor rho con la RNA polimerasa. El otro terminador de la transcripción que se conoce en neumococo, el correspondiente al gen *polA* (López y cols., 1989), también posee una estructura similar.

Un método directo para aislar y caracterizar señales reguladoras de la transcripción génica es el empleo de vectores para búsqueda de promotores. Estos vectores se han empleado en una gran variedad de microorganismos (An y Friesen, 1979; Brosius, 1984; Morrison y Jaurin, 1990; Casadaban y cols., 1983; Feitelson, 1988; Malo y Loughlin, 1988; Van Gorcom y cols., 1986; Williams y cols., 1981) y algunos permiten el estudio del promotor clonado en varios sistemas ya que presentan un amplio espectro de huésped (Dhaese y cols., 1984; Goldfarb y cols., 1981; Myers y cols., 1986; Zukowski y cols., 1983; Zvonok y cols., 1988). Dado que en *S. pneumoniae* no se disponía de ningún vector para el aislamiento y análisis de promotores, y aprovechando la caracterización de la unidad de transcripción gen *lytA*, se diseñó un plásmido para tal fin, el plásmido pLSE4 (Figura 14).

La clonación en pLSE4 de un fragmento de DNA con actividad promotora de la transcripción implica la expresión del gen *lytA*, una expresión fácilmente cuantificable mediante un ensayo de actividad enzimática de gran sensibilidad que permite valorar la fuerza relativa de los promotores clonados (Tabla 2). El hecho de que el plásmido pLSE4 tenga un amplio espectro de huésped (apartado 2.1. de Resultados), aumenta considerablemente su utilidad como vector para la búsqueda de promotores, ya que posibilita el estudio de la regulación de éstos tanto en el huésped natural como en sistemas heterólogos (bacterias Gram-positivas o Gram-negativas) (Tabla 2). Hasta la fecha, se ha analizado la expresión del gen *lytA* en *S. pneumoniae*, *S. oralis* y *E. coli*, y en los tres sistemas se detecta actividad amidásica. En *S. oralis* la actividad de la amidasa LYTA está más estrictamente regulada que en *S. pneumoniae* (Ronda y cols., 1988). En *E. coli*

existen cepas recombinantes que poseen unos niveles de actividad amidásica 1.800 veces superiores a los que se detectan en las cepas de neumococo (García y cols., 1987 b) y que, sin embargo, no presentan autólisis ni anomalías apreciables en su crecimiento, ya que la enzima LYTA que se sintetiza no puede degradar paredes celulares que no contienen colina en su composición. Por lo tanto, la utilización de *S. oralis* y *E. coli* como huéspedes alternativos permite la clonación en pLSE4 de promotores fuertes que, de otra forma, podrían ser tóxicos para neumococo debido a los elevados niveles de actividad amidásica en la célula.

Morrison y Jaurin (1990) han realizado una clonación al azar de fragmentos de DNA de neumococo con actividad promotora en *E. coli* utilizando como vector el plásmido pJAC4 (Jaurin, 1987). Sin embargo, de sus resultados no se puede concluir que dichos fragmentos se comporten como promotores en neumococo, para ello sería necesario su clonación en el sistema homólogo. El plásmido pLSE4 ofrece la posibilidad de realizar la clonación al azar de fragmentos de DNA de neumococo con actividad promotora de la transcripción tanto en *S. pneumoniae* como en *S. oralis*, ya que en ambas bacterias se dispone de una técnica muy simple (García y cols., 1985 b; Ronda y cols., 1988), basada en filtros de nitrocelulosa, con la que se puede identificar un solo clon que sintetiza amidasa LYTA (fenotipo DOC<sup>+</sup>) de entre 10.000 clones que no sintetizan esta enzima (fenotipo DOC<sup>-</sup>). Además, se puede evitar el posible efecto tóxico para neumococo de los promotores fuertes clonados en pLSE4 cultivando las cepas correspondientes en presencia de colina 140 mM, condiciones que inhiben la actividad amidásica tanto *in vivo* como *in vitro* (Briese y Hakenbeck, 1985) pero que no interfieren con la determinación del fenotipo DOC mediante la técnica de los filtros.

Como se conoce la secuencia de nucleótidos que flanquea la región de clonación múltiple (región *polilinker*) de pLSE4 (Figura 14 B), es posible construir oligonucleótidos específicos que utilizados como *primers* permitan la secuenciación del promotor clonado mediante la técnica de secuenciación de DNA de doble cadena desarrollada por Zhang y cols. (1988).

El plásmido pLSE3 (Figura 14) podría ser utilizado para aislar y caracterizar señales de terminación de la transcripción. La clonación de estas señales en la región *polilinker* del plásmido debería impedir la transcripción del gen *lytA* dando lugar a un fenotipo DOC<sup>-</sup>, en *S. pneumoniae* y *S. oralis*, y a una ausencia de actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo.

## **2. REGULACION CELULAR DE LA AMIDASA LYTA.**

Las autolisinas son enzimas que deben estar estrictamente reguladas en la célula dada su capacidad para hidrolizar la pared celular y provocar la autólisis de la bacteria. Aunque el único mecanismo regulador que se ha postulado para la amidasa LYTA en la célula de neumococo se basa en el efecto inhibitorio de los residuos de colina del LTA de la membrana sobre la actividad catalítica de la enzima, así como la dependencia de la presencia de colina en los ácidos teicoicos de la pared celular para su actividad (Höltje y Tomasz, 1975 a, b; Briese y Hakenbeck, 1985), el control de la expresión del gen *lytA* no se había estudiado hasta el momento.

Cuando se analizó la síntesis de la amidasa LYTA durante el crecimiento de la cepa tipo de neumococo, la cepa R6, se observó que dicha síntesis era constitutiva (Figura 15). Mediante el análisis de las cepas de neumococo M31 (pED1) y M31 (pED2), que contienen clonado el gen *lytA* en el plásmido pLS1 con un número de copias de 20 y 60 respectivamente (Tabla 3), se observó de nuevo una expresión constitutiva para dicho gen (Tabla 3). La expresión del gen *lytA* en el plásmido pED1 podría deberse tanto al promotor del propio gen como a la actividad promotora del gen *tet* del plásmido pLS1, lo que explicaría que los niveles de actividad hidrolítica de pared de la cepa M31 (pED1) sean superiores a los de la cepa M31 (pED2) a pesar del mayor número de copias del plásmido pED2 en la cepa M31 (Tabla 3).

El crecimiento de las cepas M31 (pED1) y M31 (pED2) durante la fase exponencial era similar al mostrado por la cepa R6, si bien su fase estacionaria era mucho más corta que la de la cepa tipo (Figura 16). Un comportamiento semejante ya había sido descrito previamente para *S. pneumoniae* M31 (pRG2) (Ronda y cols., 1987), cepa que también expresa niveles elevados de actividad amidásica. Estos resultados indican que neumococo puede mantener bajo control (inhibición) durante la fase exponencial de crecimiento niveles de amidasa LYTA hasta siete veces superiores a los habitualmente detectados en esta bacteria, aunque este control desaparece al comienzo de la fase estacionaria.

Aunque los resultados discutidos anteriormente indican que la expresión del gen *lytA* es constitutiva en todas las cepas analizadas, no se puede descartar un mecanismo de regulación de la expresión génica sincronizado con el ciclo de división celular. Experimentos en este sentido requerirían el uso de cultivos sincrónicos.

Para estudiar la regulación celular en neumococo de una amidasa LYTA truncada en su extremo C-terminal y que no requiere el proceso de *conversión* para alcanzar su actividad enzimática máxima *in vitro*, se construyó el plásmido pED3 (Figura 17). La enzima truncada purificada presentaba una actividad específica que era un 3,5% de la mostrada por la enzima LYTA intacta, y no requería *conversión* (Tabla 4), un resultado que coincidía con los datos

obtenidos previamente por Sánchez-Puelles y cols. (1987) en otras proteínas LYTA truncadas. La cepa M31 (pED3) expresa una actividad amidásica que representa el 70% de la detectada en la cepa R6 (Tabla 5), esta expresión es constitutiva y suficiente para producir la autólisis del cultivo al final de la fase exponencial de crecimiento o en presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 18).

Aunque la amidasa LYTA truncada se comporta *in vivo* como una autolisina, hay dos características que diferencian a la cepa M31 (pED3) de la cepa R6 : i) no presenta fase estacionaria de crecimiento, una respuesta similar a la observada para las cepas M31 (pED1) y M31 (pED2); ii) no se lisa en presencia del detergente desoxicolato (fenotipo DOC<sup>-</sup>). El fenotipo DOC<sup>-</sup> de la cepa M31 (pED3) no es debido a una inhibición específica de la actividad amidásica por el detergente, ya que éste incrementa ocho veces dicha actividad en ensayos *in vitro* (Tabla 4). Este comportamiento paradójico, es decir, mostrar un fenotipo DOC<sup>-</sup> y al mismo tiempo autólisis celular, también se ha detectado en la cepa de neumococo 101/87 y se discutirá en el apartado 4. La conclusión que se deriva de estos resultados es que, si bien la amidasa LYTA truncada se regula básicamente de forma análoga a la amidasa LYTA intacta, algunos aspectos de esta regulación son distintos para estas dos enzimas, y estas diferencias son debidas exclusivamente a la delección de los últimos 11 residuos de la molécula de amidasa LYTA.

Dado que la amidasa LYTA se sintetiza de forma constitutiva en la célula, su regulación deberá realizarse a un nivel post-traducciona. La translocación de la enzima a través de la membrana citoplásmica para alcanzar su sustrato, la pared celular, podría ser un factor importante en la regulación de su actividad (Höltje y Tomasz, 1975 a). La localización subcelular de la amidasa LYTA en *S. pneumoniae* ya había sido estudiada por Lacks y Neuberger (1975) mediante formación de autoplastos, y por Briese y Hakenbeck (1985) empleando técnicas clásicas de fraccionamiento celular. Los resultados de estos estudios revelaron que la amidasa se localizaba preferentemente en la membrana citoplásmica de la bacteria. Briese y Hakenbeck (1985) postularon que la proteína LYTA se uniría a la membrana celular por interacción específica con los residuos de colina del LTA, interacción que permitiría también la *conversión in vivo* de la enzima (apartado 4.6.1.1.3. de la Introducción). Como el LTA se localiza en la cara externa de la membrana celular (apartado 4.3.2.3. de la Introducción), la amidasa LYTA debería ser translocada a través de dicha membrana.

En células-EA la amidasa LYTA se localizaba exclusivamente en la fracción soluble, aunque la cantidad de enzima detectada en estas células era similar a la detectada en células que se multiplicaban en medio que contenía colina, lo que sugería un papel importante para los residuos de colina del LTA en la localización subcelular de la autolisina LYTA (Briese y Hakenbeck, 1985). Cuando se cultivan células-EA no se detecta amidasa LYTA en el medio de cultivo, por lo que la

enzima debería localizarse en el citoplasma celular o asociada débilmente a las estructuras periféricas de la célula. Una prueba indirecta a favor de esta segunda posibilidad era que *in vitro* el efecto inhibitor del LTA que contiene colina sobre la actividad de la amidasa LYTA desaparecía después de un tratamiento con lipasa (Briese y Hakenbeck, 1985), lo que indicaba que las interacciones de esta proteína con la porción lipídica del LTA también podrían contribuir al anclaje de la amidasa a la membrana celular. Por otro lado, aceptar una localización citoplásmica para la amidasa LYTA cuando neumococo se cultiva en un medio que contiene etanolamina y una localización de membrana cuando el medio contiene colina, supondría admitir que este aminoalcohol no sólo es fundamental para el anclaje de la enzima a la membrana sino también para el proceso de translocación de la proteína a través de ésta. No obstante, los métodos de localización subcelular empleados por Lacks y Neuberger (1975) y por Briese y Hakenbeck (1985) tampoco permitían descartar la posibilidad de que la enzima LYTA se localizase en el citoplasma de la célula cuando *S. pneumoniae* se cultiva en un medio que contiene colina. Durante el fraccionamiento subcelular se puede producir una redistribución de las proteínas de forma que la amidasa LYTA del citoplasma, una vez rotas las células, se asocia a la fracción de membrana mediante la interacción con los residuos de colina del LTA. Los artefactos en el estudio de la localización subcelular de las proteínas son relativamente frecuentes (Rogers, 1979), así por ejemplo Tommassen y cols. (1985) han demostrado que una proteína que inicialmente se consideraba localizada en la membrana externa de *E. coli* mediante métodos clásicos de fraccionamiento subcelular, se detecta en el citoplasma de la bacteria cuando se analiza mediante técnicas inmunocitoquímicas. Del mismo modo, los análisis inmunocitoquímicos de dos proteínas del grupo D (Beacham, 1979), la tiorredoxina y el factor de elongación Tu, revelaron que mientras la primera sí se encontraba asociada a la envoltura celular (Nygren y cols., 1981), el factor de elongación Tu se localizaba soluble en el citoplasma (Schilstra y cols., 1984), y no asociado a la membrana como previamente se había sugerido de los resultados obtenidos mediante métodos de fraccionamiento subcelular (Jacobson y cols., 1976). Hasta la fecha, el análisis inmunocitoquímico es la técnica que se considera más segura para determinar la localización de las proteínas en la célula, ya que reduce considerablemente la probabilidad de que las proteínas sufran redistribuciones durante su estudio (Tommassen y cols., 1985). Por ello, era necesario confirmar mediante técnicas inmunocitoquímicas si la localización subcelular propuesta para la amidasa LYTA en neumococo era la correcta.

Cuando se utilizaron células intactas de *S. pneumoniae* cultivadas en medio que contenía colina, se observó que al menos parte de la amidasa LYTA se localizaba en la periferia celular accesible al anticuerpo, concretamente en la región del septo de la célula (Figura 19 A y B), un resultado que confirmaba la participación de la amidasa LYTA en el proceso de separación de las

células hijas (Ronda y cols., 1987). La localización periférica de la amidasa LYTA también estaba de acuerdo con los experimentos realizados por Berry y cols. (1989) según los cuales la enzima era accesible a los anticuerpos anti-amidasa aún en presencia del polisacárido capsular. Por el contrario, cuando *S. pneumoniae* se cultivaba en medio Cden-EA no se observaba marcaje en ninguna región de la célula (Figura 19 C), lo que indicaba que la amidasa en estas condiciones no era accesible al anticuerpo.

Dada la imposibilidad de utilizar las técnicas inmunocitoquímicas para el análisis de secciones ultrafinas de las células de *S. pneumoniae*, y debido a que en esta bacteria la metodología para realizar el fraccionamiento subcelular se encuentra poco desarrollada, se decidió emplear *E. coli* CM21 [HB101 (pGL80)] como sistema de estudio alternativo. Esta bacteria Gram-negativa se ha utilizado en numerosas ocasiones para estudiar la secreción de proteínas heterólogas, debido a que *E. coli* es el microorganismo para el que se conocen un mayor número de técnicas de localización subcelular y en el que la genética del mecanismo de secreción proteica está más desarrollada (apartado 3.7. de la Introducción). La cepa CM21 de *E. coli* expresa una actividad amidásica (LYTA) que es 300 veces superior a la detectada en la cepa R6 de neumococo (García y cols., 1986 c), lo que facilita el análisis inmunocitoquímico de secciones celulares ultrafinas. Además, *E. coli* CM21 es equivalente a *S. pneumoniae* cultivado en medio Cden-EA en el sentido de que ambas bacterias carecen de colina en su composición, por lo que el estudio de la localización subcelular de la amidasa LYTA en *E. coli* permitiría determinar si el posible mecanismo de translocación de la enzima a través de la membrana es o no dependiente de la presencia de colina en la célula.

Los análisis inmunocitoquímicos realizados con *E. coli* CM21 revelaron que la amidasa LYTA presentaba una gran afinidad por la envoltura celular (Figura 20), y que esta propiedad era inherente a la enzima, no pudiéndose atribuir a la presencia de colina en las membranas de *E. coli*. Una localización similar de la proteína debería esperarse en *S. pneumoniae* cultivado en medio Cden-EA, es decir, también en el sistema homólogo la amidasa interaccionaría con la membrana celular impidiéndose su liberación al medio de cultivo. Los resultados del análisis de las fracciones subcelulares de *E. coli* CM21 obtenidas mediante diferentes procedimientos de fraccionamiento (Tablas 6 y 7; Figura 21), y los resultados de la *conversión in vivo* de la amidasa LYTA en presencia de colina en células plasmolisadas (apartado 4.2.3. de Resultados), confirmaban las conclusiones obtenidas mediante técnicas inmunocitoquímicas. Todos estos estudios indicaban que aproximadamente el 80% de la amidasa de la célula se localizaba en la periferia celular, bien soluble (15%) o bien asociada por interacciones débiles (65%) a la cara periplásmica de la membrana interna de *E. coli*. Los resultados obtenidos con el mutante de secreción *E. coli* NL8 (pGL80), mutante *lky* que libera al medio de cultivo el 87% de la  $\beta$ -lactamasa (Tabla 8), revelaron

que aproximadamente el 15% de la amidasa LYTA se secretaba al medio de cultivo (Tabla 8), confirmando los datos derivados del choque osmótico (Tabla 6) y de la formación de esferoplastos (Tabla 7) en *E. coli* CM21, según los cuales un 15% de la enzima LYTA se localizaba soluble en el espacio periplásmico de la célula.

La amidasa LYTA de neumococo no parece sufrir ningún procesamiento en su translocación a través de la membrana citoplásmica de *E. coli* CM21. Esta afirmación se basa en tres observaciones experimentales : i) la secuencia de aminoácidos N-terminal de la amidasa liberada en la fracción periplásmica del choque osmótico no reveló diferencias con la secuencia de aminoácidos deducida del gen *lytA*; ii) las bandas de proteína observadas en experimentos con maxicélulas (García y cols., 1985 a) no indicaban la existencia de más de una especie molecular para la amidasa LYTA; iii) la comparación de las  $M_r$  que presentaban las enzimas LYTA purificadas de las fracciones periplásmica y citoplásmica del choque osmótico tampoco reveló diferencias, si bien la movilidad electroforética de la enzima purificada de la fracción citoplásmica era ligeramente superior (Figura 22), por lo que no se puede descartar completamente alguna modificación de la enzima periplásmica durante el proceso de translocación. Cuando se analiza la estructura primaria de la proteína LYTA (García y cols., 1986 c), no se detecta ninguna secuencia que sea característica de un péptido señal N-terminal. Tampoco ha sido posible la identificación de alguna secuencia señal interna que pudiese explicar la secreción de la proteína sin necesidad de un procesamiento del precursor, como ya se ha descrito para la secreción de la ovoalbúmina (Pugsley y Schwartz, 1985). Los mecanismos de secreción proteica que no involucran un péptido señal (apartado 3.5. de la Introducción) requieren proteínas adicionales específicas para cada caso y, por lo tanto, es muy improbable que la amidasa LYTA de neumococo pueda utilizar uno de esos mecanismos de secreción especiales ya que esta enzima no se encuentra de forma natural en *E. coli*. Por ello, es necesario pensar en un mecanismo alternativo para la secreción de la proteína LYTA en *E. coli*. Algunos mecanismos alternativos ya se han descrito para la pseudosecreción de la cloranfenicol acetil-transferasa en *B. subtilis* (Le Grice y cols., 1987) o para la secreción de la proteína S de *M. xanthus* (Pugsley y Schwartz, 1985).

Los resultados discutidos permiten especular con la posibilidad de que la amidasa LYTA en *S. pneumoniae* pueda asociarse a la cara interna de la membrana celular, probablemente a través de la interacción entre la carga negativa de los fosfolípidos de membrana y alguno(s) de los 42 aminoácidos cargados positivamente de la enzima (García y cols., 1986 c). Posteriormente, la proteína sería translocada a la cara externa de la membrana a través de un mecanismo que no implica el procesamiento de un péptido señal y que podría ser común para la secreción de otras autolisinas. La amidasa LYTA, una vez localizada en la cara externa de la membrana celular, interaccionaría con el LTA que contiene colina, lo que provocaría tanto la *conversión* de la

enzima como la inhibición de su actividad (Briese y Hakenbeck, 1985). La amidasa LYTA se mantendría así regulada (inhibida) durante la mayor parte del ciclo celular, y sólo localmente (en la región del septo de la célula) y en determinados momentos de dicho ciclo (durante la separación de las células hijas) la enzima quedaría libre de regulación y ejercería su actividad (apartado 4.6.1.1.7. de la Introducción). La actividad amidásica se vería también libre del efecto inhibitor del LTA mediante alteraciones que ocurren en la célula al final de la fase estacionaria de crecimiento (ausencia de nutrientes) o mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo (Tomasz, 1979; Horne y cols., 1977).

### **3. RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN LA AMIDASA LYTA.**

Como ya se ha comentado en el apartado 4.6.3. de la Introducción, el estudio comparativo de las secuencias de aminoácidos de las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos sugiere una estructura modular para estas proteínas. Dicha estructura convierte a estas enzimas en un modelo muy interesante para establecer relaciones evolutivas entre ellas y aporta un nuevo ejemplo a favor de la teoría modular de la evolución de las proteínas. Esta teoría postula que algunos de los procesos de la evolución molecular que permite a los organismos adaptarse a las nuevas condiciones ambientales se llevarán a cabo gracias a la organización modular de los genes y las proteínas (Blake, 1978). Este mecanismo evolutivo consiste en el intercambio de módulos o dominios funcionales ya existentes, y es de gran efectividad ya que un único suceso de recombinación entre dos de estos módulos puede originar un nuevo gen y, por lo tanto, una nueva proteína híbrida funcional (Gilbert, 1978). La teoría modular también se puede aplicar a los organismos eucarióticos, ya que los genomas de éstos parecen organizarse de forma que se facilite el reordenamiento ocasional de secuencias de DNA con la consiguiente aparición de nuevos genes que codifiquen dominios proteicos en nuevas combinaciones (Alberts y cols., 1983).

Existen distintas concepciones de la teoría modular atendiendo al tamaño de la unidad fundamental, el módulo o dominio. Botstein (1980) fue el primero en proponer que los genomas de los fagos se han originado por agrupación a lo largo de la evolución de elementos funcional y genéticamente intercambiables (módulos). En este caso el concepto de módulo equivale a una agrupación de genes que cumple una función biológica específica. Esta misma idea se aplica también a los virus que infectan a organismos superiores (Botstein, 1980; Gibbs, 1987). Para otros autores, cada módulo equivale a un gen o a una región de éste que codifica para un dominio proteico (Doolittle, 1985). Por último, también se ha propuesto que los pequeños péptidos de conformación definida son los módulos primordiales que constituyen las proteínas (DuBose y Hartl, 1989).

A pesar de que la peculiar interacción y proximidad espacial entre fagos y bacterias proporciona numerosos ejemplos de funciones biológicas compartidas, hasta el momento son pocos los casos descritos de similitud entre genes de fago y bacteria (Campbell, 1988). En dichos casos se ha sugerido que los genes del fago y la bacteria podrían ser el resultado de un intercambio recíproco (Stroynowsky, 1981; Lauster y cols., 1989). Aunque la destrucción de la pared celular bacteriana se ha considerado como un clásico ejemplo de función biológica compartida, sólo recientemente se ha descrito por primera vez, y a nivel de secuencia, la homología entre una enzima lítica de fago y la de su bacteria huésped (García y cols., 1988). De

los resultados que se derivan de la comparación de las secuencias de las enzimas líticas de pared de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos y teniendo en cuenta la hipótesis que postula para las lisozimas un tipo de evolución inducida por los cambios en la estructura de la pared celular (Jollès y Jollès, 1984), se ha sugerido que la característica presencia de colina en la pared celular de neumococo actúa como un elemento de fuerte presión selectiva que conserva los dominios C-terminales de las enzimas, dominios que serían los responsables de la especificidad en el reconocimiento del sustrato (García y cols., 1988). Por el contrario, la especificidad catalítica de las enzimas residiría en su dominio N-terminal (García y cols., 1988; García y cols., 1990).

Dado que la construcción de genes y proteínas quiméricas activas es la mejor prueba experimental a favor de la teoría modular de la evolución de las proteínas (Nelles y cols., 1987; Kobilka y cols., 1988; Devlin y cols., 1989), se decidió la construcción de proteínas quiméricas mediante la recombinación *in vitro* del gen bacteriano *lytA* con los genes fágicos *cpl1* y *cpl7*, con el objetivo de demostrar experimentalmente la hipótesis sobre la organización modular de las enzimas líticas de pared de neumococo y de sus bacteriófagos.

Las enzimas líticas quiméricas entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL1 se construyeron (Figura 23) en base a la similitud que presentaban las enzimas parentales en sus dominios C-terminales (García y cols., 1988). Sin embargo, las quimeras entre la amidasa LYTA y la lisozima CPL7 (Figura 29) se originaron mediante el intercambio de dominios no homólogos. En ambos casos se obtuvieron proteínas quiméricas activas (Figuras 25 y 32) cuyas propiedades bioquímicas además de ser una combinación de las que presentaban las enzimas parentales podían atribuirse a los dominios concretos que habían sido intercambiados (Tablas 9, 10, 11 y 12). Todas las enzimas quiméricas construídas eran activas *in vivo* cuando se ensayaban en el sistema homólogo mediante experimentos de curación fenotípica (Figuras 28 y 34).

Los estudios realizados con las proteínas quiméricas demostraron que el centro activo de las enzimas líticas de pared de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos se localiza en el dominio N-terminal de su molécula. En efecto, las quimeras LC y LC7 eran amidasas (Figuras 26 y 30) porque su dominio N-terminal correspondía al de la amidasa LYTA; recíprocamente, las quimeras CL y CL7 eran lisozimas (Figuras 26 y 30) porque su dominio N-terminal correspondía al de la lisozima CPL1 o CPL7, respectivamente.

Por otra parte, las quimeras construídas demuestran que el dominio C-terminal de las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos participa tanto en el reconocimiento del sustrato como en el proceso de *conversión* e inhibición de la actividad enzimática en presencia de colina. Así, mientras que las quimeras CL, LC y CL7 sólo degradan eficientemente paredes celulares de neumococo que contienen colina y su actividad se inhibe en presencia de este aminoalcohol (Tablas 10, 11 y 12; Figura 27), la quimera LC7 degrada paredes celulares que

contienen colina o etanolamina en su composición (Tablas 11 y 12) y su actividad no se inhibe específicamente en presencia de colina. En el primer caso, quimeras CL, LC y CL7, los dominios C-terminales provienen de las enzimas parentales LYTA y CPLI, ambas dependientes de colina para su actividad (García y cols., 1988). Para el caso concreto de la quimera LC7, el dominio C-terminal corresponde al de la lisozima CPL7, una proteína cuya actividad es independiente de la presencia de colina en el sustrato (García y cols., 1990)

Las enzimas LYTA, CL y CL7, requieren el proceso de *conversión* para alcanzar su actividad enzimática máxima, por el contrario, las proteínas CPLI, CPL7, LC y LC7, no requieren *conversión* (Tablas 9 y 11; Figura 24). Este comportamiento demuestra que el proceso de *conversión* característico de la amidasa LYTA se extiende también a las proteínas híbridas que contienen el dominio C-terminal de esta enzima, el resto de las quimeras no requieren *conversión* ya que sus dominios C-terminales pertenecen a las enzimas no *convertibles* CPLI y CPL7.

El dominio C-terminal de las enzimas, sin embargo, también parece influir en algunas propiedades catalíticas atribuidas al dominio N-terminal, como por ejemplo en la dependencia de la actividad enzimática con respecto al pH. Así, la amidasa LYTA y la lisozima quimérica CL7 que posee el dominio C-terminal de la amidasa LYTA presentan mayor actividad a pH 6,5 que a pH 4,5, situación que se invierte con la lisozima CPL7 y la amidasa quimérica que posee el dominio C-terminal de la lisozima CPL7 (Figura 33). No obstante, no se conoce hasta el momento ninguna explicación para esta observación experimental.

Las proteínas quiméricas construidas demuestran, de forma experimental, la hipótesis sobre la organización modular de las enzimas líticas de pared en el sistema de neumococo y sus bacteriófagos, hipótesis previamente postulada en base exclusivamente a la comparación de secuencias (García y cols., 1988; García y cols., 1990). Los dos dominios que estructuran estas enzimas cumplen los requisitos básicos de todo módulo (Botstein, 1980) ya que son intercambiables y conservan su función independientemente uno del otro. Este carácter modular se confirma por el hecho de que cuando se clonan e hiperexpresan los dominios C-terminales de la amidasa LYTA y la lisozima CPLI, sin la presencia de los correspondientes dominios N-terminales, las proteínas truncadas resultantes conservan su afinidad por la colina pero carecen de actividad enzimática (Sánchez-Puelles y cols., 1990).

La clonación e hiperexpresión del dominio N-terminal de la amidasa LYTA en *E. coli* (Figura 38), reveló que éste también era capaz de ejercer su función por sí solo, ya que hidrolizaba las paredes celulares de neumococo. Sin embargo, la actividad específica del dominio N-terminal disminuía considerablemente en relación con la que presentaba la amidasa LYTA intacta (Tabla 13), aunque degradaba con igual eficacia paredes celulares que contenían colina o etanolamina (Tabla 13). Estos resultados demuestran la ventaja evolutiva que representa la

adquisición del dominio C-terminal para que la molécula de amidasa LYTA alcance su máxima actividad enzimática, y son otra prueba más a favor de la implicación del dominio C-terminal de la molécula en el reconocimiento específico de la colina de la pared celular. El dominio N-terminal de la amidasa LYTA codificado por el plásmido pGL300 (Figura 38) se sintetiza como una proteína que en geles de poliacrilamida-SDS presenta una  $M_r$  de 28.000 (Figura 39), ligeramente superior a la  $M_r$  esperada de 21.525 (190 aminoácidos); aunque la causa de esta movilidad anómala se desconoce por el momento, casos similares ya se han descrito para otras proteínas.

Las enzimas quiméricas proporcionan un modelo experimental para la formación de genes ancestrales mediante fusión de diferentes módulos genéticos, así como un sistema para estudiar los procesos moleculares que intervienen en la fusión de esos módulos durante la evolución (Houghton y cols., 1989). Por ello, es muy probable que el intercambio de dominios inducido artificialmente en el laboratorio con las enzimas hidrolíticas de la pared de neumococo pueda tener su reflejo en la naturaleza. Así, la lisozima CL7 muestra propiedades bioquímicas similares a las de la lisozima CPL1 del fago Cp-1, con la particularidad de que la proteína quimérica requiere *conversión* (Tabla 11) debido a la adquisición del dominio C-terminal de la amidasa LYTA, una propiedad que podría no ser relevante *in vivo* ya que neumococo habitualmente contiene colina en su pared celular. Se puede especular con la posibilidad de que durante la evolución mutaciones puntuales en un gen ancestral similar al gen *cl7* pudieron generar, por reemplazamiento gradual de aminoácidos, una lisozima indistinguible de la enzima CPL1. Es interesante destacar que la lisozima CL7 presenta una actividad específica sobre paredes celulares que contienen colina que es 4,4 veces superior a la que muestra la lisozima parental CPL7 (Tabla 12), lo que sugiere que la adquisición del dominio C-terminal que reconoce específicamente los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared podría representar una ventaja evolutiva para la bacteria y para los fagos que la infectan cuando se multiplican en un medio que contiene colina. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la amidasa LC7, que no contiene el dominio C-terminal que reconoce específicamente residuos de colina, muestra una actividad sobre paredes celulares que contienen colina que es 37 veces inferior a la de la amidasa LYTA (Tabla 12). La importancia del dominio C-terminal que reconoce colina en la actividad de la proteína intacta explica que dicho dominio se encuentre conservado en todas estas enzimas líticas de pared (este aspecto se ampliará en el apartado 4.). Por otra parte, la amidasa LYTA también podría haber evolucionado mediante la fusión de un dominio N-terminal con actividad amidásica con un dominio C-terminal de otra enzima, fágica o bacteriana, dependiente de colina. Sin embargo, todavía no se ha descrito una amidasa que degrade paredes celulares de neumococo que no contengan colina y que pudiese representar el dominio N-terminal ancestral de la amidasa LYTA.

Aunque todavía queda por resolver la cuestión referente a si las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos se han originado en la naturaleza mediante un intercambio de dominios similar al realizado en el laboratorio, esta hipótesis parece plausible ya que se han descrito diferentes mecanismos que facilitan el intercambio de secuencias de DNA entre los genomas de las bacterias y los fagos. Así por ejemplo, regiones de gran similitud de nucleótidos en el DNA del fago y la bacteria facilitan la recombinación específica entre éstos y, con ello, el reordenamiento y evolución de los genomas tanto del fago como de la bacteria (Stroynowsky, 1981; Romero y cols., 1990 b). La recombinación ilegítima es otro mecanismo mediante el cual los genomas fágicos se constituyen como un mosaico de genes de origen no fágico (Hunkapiller y cols., 1982) (apartado 4.). Sonea (1987) considera que los fagos (profagos) y los plásmidos ofrecen a las especies bacterianas la posibilidad de tener un acceso casi generalizado a la dotación de genes de otras especies bacterianas, comportándose así como quimeras capaces de adaptarse a las nuevas condiciones ambientales haciendo uso de un banco genético extraordinariamente rico (Sonea, 1988).

La quimera LC7 es, en el sistema de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos, la primera amidasa descrita que degrada indistintamente paredes celulares de neumococo que contienen colina o etanolamina. Por ello, se decidió clonar el gen *lc7* en *S. pneumoniae* (Figura 35) para comprobar si esta nueva enzima cuando se expresa en el sistema homólogo (Figura 36) mantiene su funcionalidad. Los resultados que se presentan en la Figura 37 A y B demuestran que la amidasa LC7 se comporta *in vivo* como una autolisina y, lo que es más importante, que esta enzima se encuentra regulada (inhibida) durante la fase exponencial de crecimiento, un comportamiento similar al que presenta la amidasa LYTA. Dado que la actividad de la enzima LC7 no se inhibe en presencia de colina (Tabla 12), la regulación celular (inhibición) de la amidasa LYTA por los residuos de colina del LTA de la membrana citoplásmica (Höltje y Tomasz, 1975 a; Briese y Hakenbeck, 1985), no puede ser considerado el único mecanismo de control para esta enzima en neumococo, lo que implica que deben existir otros mecanismos de regulación que impidan la autólisis de las células hasta el final de la fase estacionaria de crecimiento. En este sentido, el hecho de que la amidasa LYTA presente una tendencia intrínseca a interactuar con la membrana celular aún cuando ésta no contiene colina (apartado 2.), permite especular con la posibilidad de que esta interacción sea también un mecanismo para su regulación en *S. pneumoniae*, independientemente de que esta bacteria se cultive en presencia de colina o etanolamina. La liberación de LTA y lípidos de membrana al medio de cultivo cuando las células de neumococo alcanzan el final de la fase estacionaria de crecimiento podría ser la señal que marque el comienzo de la autólisis celular al quedar la autolisina libre de inhibición (Horne y cols., 1977; Waks y Tomasz, 1978).

Los resultados que se deducen de la Figura 37 D demuestran de forma directa que *S. pneumoniae* no se lisa en medio Cden-EA debido a que carece de una autolisina que hidrolice las paredes celulares que contienen etanolamina, ya que los transformantes que expresan el gen *lc7* sí se autolisan en este medio de cultivo. No obstante, es importante destacar que los transformantes que sintetizan la amidasa LC7 cuando se cultivan en medio Cden-EA forman cadenas celulares, aunque de menor longitud que las observadas en las cepas parentales que no expresan la enzima LC7. Un resultado similar se observó cuando las células se crecieron en medio C+Y en presencia de colina al 0,6%, concentración que inhibe la actividad de la amidasa LYTA (Giudicelli y Tomasz, 1984 a; Briese y Hakenbeck, 1985). Estas observaciones sugieren que la amidasa LYTA de neumococo no es la única enzima involucrada en el proceso de separación de las células hijas, sino que otras enzimas líticas de pared dependientes de colina, como podría ser por ejemplo la segunda autolisina presente en *S. pneumoniae*, una glucosaminidasa (García y cols., 1989), participarán también en este proceso. La participación de la glucosaminidasa en la separación de las células hijas al final del ciclo de división celular se sugiere cuando se analiza el crecimiento de *S. pneumoniae* M31. Esta cepa cultivada a 37 °C en medio C+Y forma pequeñas cadenas celulares de unas 8 unidades por término medio (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a), cadenas que pasan a ser de cientos de unidades cuando la cepa se cultiva en medio Cden-EA; mientras que las células de *S. pneumoniae* M31 cultivadas en medio C+Y a 30 °C, temperatura a la cual la glucosaminidasa presenta su máxima actividad, forman mayoritariamente estructuras diploideas, la morfología típica de neumococo (López y cols., 1990 a).

#### **4. CARACTERIZACION DEL SISTEMA LITICO DE LA CEPA 101/87.**

La cepa de origen clínico *S. pneumoniae* 101/87 se clasificó como un neumococo atípico ya que a pesar de su resistencia a la optoquina, de no presentar cápsula y de no lisarse en presencia de desoxicolato (fenotipo DOC<sup>-</sup>), su DNA hibridaba con una sonda específica de neumococo que codifica para los 148 primeros aminoácidos del dominio N-terminal de la amidasa LYTA (Fenoll y cols., 1990). El característico fenotipo DOC<sup>-</sup> de *S. pneumoniae* 101/87 fue el motivo que despertó nuestro interés en el estudio de esta cepa. Era interesante conocer las causas que motivaban que una cepa de neumococo de origen clínico mostrase resistencia a la lisis por desoxicolato, ya que la lisis causada por este detergente es una de las características que definen a *S. pneumoniae* y se emplea como prueba habitual para la identificación de esta especie en laboratorios clínicos. En la cepa tipo de neumococo la lisis de los cultivos por desoxicolato se debe a la actividad de la principal enzima autolítica de esta bacteria, la amidasa LYTA (apartado 4.6.1.1.4. de la Introducción), por lo que el estudio de las causas que originan el fenotipo DOC<sup>-</sup> de *S. pneumoniae* 101/87 podría aportar nuevos datos sobre la regulación de la amidasa LYTA en neumococo. Las cepas de neumococo caracterizadas hasta la fecha en el laboratorio y que presentan un fenotipo DOC<sup>-</sup>, o bien carecen del gen *lytA*, como ocurre con la cepa M31 (Sánchez-Puelles y cols., 1986 a), o bien expresan una amidasa LYTA inactiva, como ocurre con las cepas M32 (López y cols., 1986) y M12 (García y cols., 1986 b). Recientemente, se han descrito varias cepas atípicas de neumococo de origen clínico con fenotipo DOC<sup>-</sup> (Fenoll y cols., 1990), pero sólo una de ellas, *S. pneumoniae* 101/87, ha sido objeto de estudio.

Para determinar la causa del fenotipo DOC<sup>-</sup> de la cepa 101/87 era necesario responder a una serie de preguntas. El primer interrogante que se planteaba era si la cepa 101/87 expresaba una autolisina activa. El análisis de los extractos crudos de la cepa 101/87 mediante la técnica de *Western-blot* demostró la existencia de una proteína que reaccionaba con los anticuerpos anti-amidasa LYTA (Figura 41), y la curva de crecimiento de *S. pneumoniae* 101/87 reveló la autólisis de los cultivos al final de la fase estacionaria (Figura 40). Estos dos resultados demostraban la presencia de una autolisina activa en la cepa 101/87. La regulación celular de esta autolisina parecía ser similar a la de la amidasa LYTA, ya que la velocidad de crecimiento de las cepas R6 y 101/87 era semejante y en ambas la autólisis sólo ocurría al final de la fase estacionaria de crecimiento (Figura 40). Además, dicha autólisis se inhibía al añadir al medio de cultivo colina al 2%, y se activaba como consecuencia del tratamiento con penicilina (Figura 40), un comportamiento similar al descrito para la cepa R6.

A pesar de que la actividad hidrolítica sobre paredes celulares de neumococo determinada mediante ensayos *in vitro* de los extractos crudos de la cepa 101/87 representa un 50% con respecto a la detectada en los extractos crudos de la cepa R6 (Tabla 14), esta diferencia no es suficiente para poder explicar el fenotipo DOC<sup>-</sup> de *S. pneumoniae* 101/87. Así, ya se han descrito cepas de neumococo con un nivel de actividad hidrolítica de pared *in vitro* inferior al que presenta *S. pneumoniae* 101/87 que, sin embargo, muestran un fenotipo DOC<sup>+</sup>, entre éstas cabe destacar la cepa M31 (pNLC7) (apartado 5.2.4.) y la South African CMR40 (Liu y Tomasz, 1985), que poseen un 10% y un 15%, respectivamente, de la actividad que se detecta en la cepa R6. Por otra parte, en ensayos *in vitro* se observó que el desoxicolato no sólo no inhibía la actividad hidrolítica de pared de la cepa 101/87 sino que la activaba 5 veces (Tabla 16), lo que descartaba como posible explicación del fenotipo DOC<sup>-</sup> de esta cepa la inhibición de su actividad lítica por el detergente.

De los datos discutidos hasta el momento se deduce que el fenotipo DOC<sup>-</sup> de la cepa 101/87 no es debido ni a la ausencia de actividad hidrolítica de pared en *S. pneumoniae*, ni a una inhibición específica de dicha actividad en presencia de desoxicolato. Únicamente la cepa de laboratorio *S. pneumoniae* EM3 presenta un comportamiento similar (apartado 2.), en este caso debido a que las células sintetizan una amidasa LYTA truncada mediante delección de los 11 últimos aminoácidos de la molécula. Para comprobar si el fenotipo DOC<sup>-</sup> de la cepa 101/87 también era debido a la síntesis de una enzima autolítica con anomalías estructurales, se procedió a la clonación y expresión en *E. coli* del gen que codifica para dicha enzima. La hibridación del DNA de la cepa 101/87 con la región del gen *lytA* que codifica para los 148 primeros aminoácidos de la enzima LYTA (Fenoll y cols., 1990) permitía utilizar este gen como una sonda para la identificación del posible gen homólogo de la cepa 101/87.

La construcción de genotecas de la cepa 101/87 en los plásmidos pUC18 y pUC19 de *E. coli* permitió el aislamiento y clonación de dos genes, *lytA101* y *ejl*, que mostraban similitud con el gen *lytA* de la cepa R6 (Figuras 48 y 49). El gen *lytA101* se localiza en el inserto *Hind*III de 1,7 kb del plásmido recombinante pNH101 (Figura 42); el gen *ejl* se localiza en el inserto de 2,5 kb del plásmido recombinante pNE103 (Figura 50). En la Figura 56 se muestra un mapa físico del gen *ejl* en el cromosoma de *S. pneumoniae* 101/87, sin embargo todavía no se conoce ni la orientación relativa ni la distancia que separa a los genes *lytA101* y *ejl* en el cromosoma de la bacteria.

El gen *lytA101* codifica para una enzima (LYTA101) de 316 aminoácidos, 36.472 Da (Figuras 43 y 44) que presenta las siguientes propiedades (Tablas 15 y 16) : i) es una amidasa; ii) requiere el proceso de *conversión*; iii) su actividad es dependiente de la presencia de colina en la pared celular; iv) su actividad se inhibe en presencia de colina y se activa en presencia de desoxicolato. El gen *ejl* también codifica para una enzima (EJL) de 316 aminoácidos y 36.535 Da (Figuras 44 y

51) que posee propiedades similares a las descritas para la enzima LYTA101 (Tablas 15 y 16) pero que, sin embargo, se diferencia de las amidasa LYTA y LYTA101 en dos características: i) su actividad específica es 9-12 veces inferior (Tabla 16); ii) recupera el estado de baja actividad catalítica (*desconversión*) con gran rapidez mediante diálisis de la colina empleada en el proceso de *conversión* (Tabla 17), propiedad bioquímica nueva que no se detecta en ninguna de las enzimas líticas de pared de neumococo y sus bacteriófagos conocidas hasta la fecha. Haciendo uso de esta propiedad bioquímica nueva de la amidasa EYL se ha podido determinar que en la cepa 101/87 sólo se expresa mayoritariamente la amidasa LYTA101, si bien no se puede descartar totalmente una expresión minoritaria de la amidasa EYL. El hecho de que la actividad catalítica de la autolisina LYTA101 se inhiba en presencia de colina (Tabla 16) explica la ausencia de autólisis de la cepa 101/87 cuando se cultiva en medio C+Y que contiene colina al 2%. Sin embargo, la amidasa LYTA101, que posee propiedades análogas a las de la amidasa LYTA de la cepa R6, no presenta ninguna característica especial estructural y/o funcional que permita explicar el fenotipo DOC<sup>-</sup> de *S. pneumoniae* 101/87.

La cepa M31 que contiene el plásmido (pED4) (Figura 45) se comporta de forma análoga a la cepa R6 cuando se cultiva en ausencia o en presencia de penicilina (Figura 46), lo que demuestra que la amidasa LYTA101 también actúa en *S. pneumoniae* M31 como una autolisina. Además, la cepa M31 (pED4) se lisa en presencia de desoxicolato, lo que prácticamente descarta la posibilidad de que el fenotipo DOC<sup>-</sup> de *S. pneumoniae* 101/87 sea debido a una propiedad intrínseca a la propia molécula LYTA101, ya que cuando ésta se expresa en una cepa de neumococo isogénica con la cepa tipo pero con una delección del gen *lytA* sí ocasiona la lisis celular en presencia del detergente. No obstante, el hecho de que la actividad hidrolítica de pared en los extractos crudos de M31 (pED4) sea 3,5 veces superior a la detectada en los extractos de la cepa R6 (Tabla 14), permite especular con la posibilidad de que el fenotipo DOC<sup>+</sup> de *S. pneumoniae* M31 (pED4) sea la consecuencia de un nivel elevado de actividad lítica, de forma que si éste se rebajase hasta el que presenta la cepa R6 el fenotipo resultante podría ser DOC<sup>-</sup>. La comprobación de esta posibilidad requeriría el aislamiento de una cepa M31 con el plásmido pED4 en bajo número de copias.

Los resultados discutidos anteriormente sugieren que el fenotipo DOC<sup>-</sup> de *S. pneumoniae* 101/87 podría ser debido a una anomalía en la envoltura de las células de esta cepa que al mismo tiempo explicaría su resistencia a la infección con fagos de neumococo, aunque todavía no se pueda descartar la existencia de alguna alteración en la estructura-función de la amidasa LYTA101 que no haya sido identificada mediante los análisis bioquímicos realizados. Es probable que la causa de que las células de la cepa 101/87 no se lisen en presencia de desoxicolato sea una alteración localizada en la membrana, ya que el otro componente de su envoltura, la pared celular, es

sensible a la acción hidrolítica de la amidasa LYTA (apartado 7.2.2. de Resultados). Esta alteración de la membrana celular impediría la particular desestabilización que provoca el desoxicolato mediante un mecanismo que no tiene por qué ser equiparable al inducido por otros detergentes. Dos datos experimentales apoyan esta idea: 1) el Tritón X-100 sí causa la lisis de la cepa 101/87; 2) la autolisina LYTA añadida desde el exterior a las células de la cepa 101/87 (curación fenotípica) y que por tanto no tiene que atravesar la membrana plasmática para alcanzar la pared celular, sufre un proceso de desregulación en presencia de desoxicolato que ocasiona la lisis celular. Se puede especular así con la posibilidad de que la membrana plasmática, u otro componente del aparato de translocación de las células de *S. pneumoniae* 101/87, impida la secreción de la amidasa LYTA101 hasta el final de la fase estacionaria de crecimiento; o que la interacción de la amidasa LYTA101 con la membrana celular no libere a la enzima del mecanismo inhibitorio que la regula en la célula hasta el final de la fase estacionaria. Esto explicaría que las células de la cepa 101/87 formen largas cadenas en vez de las estructuras diploideas típicas de neumococo. Durante la fase exponencial de crecimiento de *S. pneumoniae* 101/87 la acción de ciertos detergentes, como por ejemplo el Tritón X-100, permitiría la actuación de la amidasa LYTA101 y la consiguiente lisis del cultivo, mientras que otros detergentes, sin embargo, no causarían este efecto, y el desoxicolato sería uno de ellos.

*S. pneumoniae* EM3 es otro ejemplo de una cepa de neumococo que presenta actividad hidrolítica de pared pero que posee un fenotipo DOC<sup>-</sup> (apartado 2.). Aunque en este caso concreto la ausencia de lisis celular en presencia de desoxicolato se debe a una anomalía estructural en la molécula de amidasa LYTA que reduce considerablemente su actividad, hasta el momento se desconoce cómo influye la delección de los 11 últimos aminoácidos de la enzima en este fenotipo. Los estudios sobre la localización subcelular de la amidasas LYTA101 en *S. pneumoniae* 101/87 y LYTA truncada en *S. pneumoniae* EM3 aportarán nuevos datos que permitan un mejor conocimiento de la causa que origina el fenotipo DOC<sup>-</sup> en estas cepas. No obstante, y a la luz de los conocimientos actuales, el fenotipo DOC<sup>-</sup> en neumococo puede explicarse en base a : 1) actividad autolítica muy reducida o inexistente, como ocurre en la mayoría de los casos; 2) anomalías estructurales de la enzima autolítica que no suponen una reducción considerable en la actividad hidrolítica *in vitro* de la cepa, como es el caso de *S. pneumoniae* EM3; 3) anomalías no relacionadas directamente con la enzima autolítica y que no implican una actividad hidrolítica reducida del cultivo, como probablemente sea el caso de la cepa 101/87.

*S. pneumoniae* 101/87 es una bacteria que contiene dos genes, *lytA101* y *ejl*, que codifican para enzimas líticas de pared, y no es transformable utilizando las técnicas clásicas de transformación genética de neumococo. Estas dos características sugerían la posibilidad de que dicha cepa fuese lisogénica para un fago atemperado portador de su propia enzima lítica de pared.

Esta posibilidad se basaba en dos observaciones experimentales : i) Moynet y Tiraby (1980) habían observado que la cepa de neumococo lisogénica para el fago w-2 no era transformable; ii) recientemente Romero y cols. (1990 a) han demostrado que el genoma del fago HB-3, un fago atemperado de neumococo, posee un gen lítico de pared homólogo al gen *lytA* de la bacteria huésped.

La inducción de la cepa 101/87 con mitomicina C (Figura 57) reveló la existencia de un nuevo bacteriófago, el fago EJ-1, que pertenece al Tipo A-1 en el sistema de clasificación de Bradley (1967) y Ackermann (1974) (Figura 58). Este fago se diferencia de todos los bacteriófagos de neumococo hasta ahora descritos, los fagos líticos de las series Cp (Ronda y cols., 1981) y Dp (López y cols., 1977), y los fagos atemperados de las series w (Tiraby y cols., 1975) y HB (Bernheimer, 1979), tanto por su morfología (Tabla 20) como por su perfil de proteínas (Figura 59). Además, el fago EJ-1 posee una cola contráctil (Figura 58), una característica que todavía no se ha descrito para ninguno de los fagos conocidos de neumococo.

El fago EJ-1, purificado u obtenido en extractos crudos, ensayado en diferentes medios y temperaturas de cultivo, no produce descendencia fágica en ninguna de las cepas de neumococo utilizadas. Estos resultados, junto con el hecho de que la mayoría de las cabezas de fago que se observan al microscopio electrónico (Figura 58), incluso después de una fijación con glutaraldehído, estén vacías de DNA, sugiere la posibilidad de que EJ-1 pueda ser un fago defectivo. Sin embargo, no se puede descartar que este fago en otras condiciones de cultivo distintas a las ensayadas pueda infectar en ciclo lítico. Algunos fagos atemperados sólo son capaces de infectar a la cepa que lisogenizan, siempre que ésta se cure previamente (Teuber y Lembke, 1983), pero tampoco se ha conseguido la curación de la cepa 101/87 para el fago EJ-1, si bien ya han sido descritos otros casos de cepas lisogénicas resistentes a la curación (Duchrow y cols., 1985; Sonnen y cols., 1990). La observación al microscopio electrónico de un autolisado concentrado de la cepa 101/87 no reveló la existencia de partículas fágicas, lo que permite suponer que la autólisis de la cepa 101/87 no es debida a una inducción espontánea del profago al final de la fase estacionaria de crecimiento.

El DNA del fago EJ-1, al igual que el DNA de otros fagos de neumococo, es lineal y de doble cadena (Figura 60). Tiene un tamaño similar al del fago HB-3, 40-45 kb (Tablas 20 y 21), pero a diferencia de éste, no lleva proteína unida covalentemente (Tabla 20).

El análisis mediante *Southern-blot* del DNA del fago EJ-1 demostró que el gen *ejl* pertenecía al genoma de dicho fago (Figura 61). Dos características del gen *ejl* confirmaban su origen fágico : i) sólo presentaba similitud con las regiones estructurales de los genes *lytA* y *lytA101*, igual que ocurría con el gen *hbl* del fago atemperado HB-3 (Figura 52); ii) la enzima EJL no tenía actividad detectable en la cepa 101/87, por lo que era muy probable que el gen *ejl* no se expresase en la

bacteria, situación que se ha descrito para otros genes fágicos durante el ciclo lisogénico. El hecho de que las proteínas del fago EJ-1 purificado no reaccionen con el anticuerpo anti-amidasa LYTA sugiere que la amidasa EJL no se encapsula en el virión durante la inducción del profago con mitomicina C.

El hecho de que *S. pneumoniae* 101/87 sea una cepa lisogénica permite especular con la posibilidad de que otras cepas atípicas de neumococo de origen clínico (Fenoll y cols., 1990) sean también portadoras de fagos atemperados, y que esta situación sea la causa de las propiedades anómalas de estas cepas que dificultan su identificación y clasificación en los laboratorios clínicos. La comprobación experimental de esta hipótesis requerirá el análisis de otras cepas atípicas así como la curación de las mismas de los posibles fagos atemperados.

La comparación de las secuencias de nucleótidos de los genes *lytA*, *lytA101*, *ejl* y *hbl* (Figura 52 y Tabla 18), pone de manifiesto la similitud entre sus regiones estructurales y sugiere un origen común para estos genes que habrán divergido hace relativamente poco tiempo. Es interesante destacar que la similitud entre los 4 genes se pierde totalmente a partir del codón de terminación de la traducción del gen. Para los dos genes de origen bacteriano, *lytA* y *lytA101*, esta pérdida de similitud se debe a una delección en el cromosoma de la cepa 101/87 que se extiende en dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción del gen *lytA101* hasta una posición localizada a una distancia de 1-2,1 kb de dicho codón (Figura 47). El hecho de que esta ausencia de similitud se atribuya a una delección en el cromosoma de la cepa 101/87 y no a una inserción en el cromosoma de la cepa R6, se basa en que el análisis de varias cepas de neumococo de origen clínico reveló, para la mayoría de éstas, la existencia del fragmento de restricción *HindIII* de 1,2 kb que caracteriza al gen *lytA* de la cepa R6 (Fenoll y cols., 1990). Dado que en las regiones 5' no codificantes de los genes *lytA* y *lytA101* se mantiene la similitud (Figura 52), es lógico suponer que el promotor de este último se localice por delante del fragmento *HindIII* de 1,7 kb, separado del codón de iniciación de la traducción del gen por una distancia aproximada de 240 pb. Debido a que el promotor que regula la expresión de los genes *lytA* y *lytA101* parece ser el mismo, y ya que las amidasas LYTA y LYTA101 purificadas tienen una actividad específica similar (Tabla 16), una de las causas que podrían explicar los diferentes niveles de actividad lítica que presentan las cepas R6 y 101/87 (Tabla 14) sería la presencia de distintos terminadores de la transcripción en los dos genes anteriormente mencionados. En efecto, la delección en el extremo 3' del gen *lytA101* ocasiona la pérdida del terminador de la transcripción característico del gen *lytA* (Figura 11), y origina un nuevo marco de lectura abierto (ORF) a 12 pb del codón de terminación de la traducción del gen. Este ORF, que se extiende desde el nucleótido 963 hasta el nucleótido 1341 de la secuencia que se muestra en la Figura 43, carece, sin embargo, de un sitio de unión al ribosoma y de un codón ATG para la iniciación de la

traducción, por lo que es muy probable que no se traduzca en una proteína. No obstante, la ausencia en esta región de estructuras que caracterizan a los terminadores de la transcripción podría sugerir que la deleción originada en el DNA de la cepa 101/87 fuese la responsable de la pérdida de la región 5' del ORF, la cual sí estaría presente en el cromosoma de la cepa R6.

La similitud que existe entre los genes *lytA* y *lytA101* en sus regiones 5' no codificantes no se extiende, sin embargo, a las regiones 5' no codificantes de los genes fágicos *ejl* y *hbl* (Figura 52). Cuando se comparan por separado las regiones 5' y 3' no codificantes de los dos genes fágicos se observa que, si bien el grado de semejanza no es grande, 33,8% y 37,5% respectivamente, hay cortas secuencias conservadas en posiciones equivalentes. El significado que puedan tener estas secuencias conservadas se desconoce por el momento, pero cabría la posibilidad de que estuviesen involucradas en procesos de regulación de la expresión génica en el genoma del fago. En este sentido, las secuencias conservadas en el extremo 3' se localizan a ambos lados de los terminadores de la transcripción propuestos (Figura 52), terminadores del tipo rho-independiente que se sitúan en posiciones equivalentes de los dos genes. Por otro lado, las secuencias conservadas en el extremo 5' no codificante de los genes *ejl* y *hbl* están próximas al sitio de unión al ribosoma (RBS) (Figura 52). El RBS se encuentra situado en el extremo 3' del anterior marco de lectura abierto (ORF2 en la Figura 51; Romero y cols., 1990 b), una característica que se observa también en los genes fágicos *cpl1*, *cpl7* y *cpl9* (García y cols., 1987 a; García y cols., 1990), así como en los genes que codifican las proteínas líticas de los fagos  $\phi 29$  y PZA que infectan a *B. subtilis* (Vlcek y Paces, 1986), y que sugiere una estructura de operón, estructura que ya ha sido demostrada para los genes que codifican las lisozimas de los fagos  $\phi 29$  y PZA. Una interpretación alternativa a la existencia de cortas secuencias conservadas en las regiones 5' y 3' no codificantes de los genes *ejl* y *hbl* hace referencia a la posibilidad de que estas secuencias representen las regiones que conectan las agrupaciones de módulos funcionales que se observan en los fagos que pertenecen a la misma familia (Campbell, 1988), agrupaciones que para el caso concreto de neumococo se han demostrado para los genes que codifican las enzimas líticas de los fagos Cp (García y cols., 1990).

El hecho de que la similitud entre los dos genes bacterianos y los dos genes fágicos se circunscriba a la región estructural de los mismos está de acuerdo con el concepto de gen como unidad modular intercambiable (Botstein, 1980), y sugiere que el módulo funcional está definido por las secuencias estructurales y no por las secuencias flanqueantes, ya que tanto el fago como la bacteria desarrollarán mecanismos específicos para regular su transcripción (López y García, 1990). Las cepas de neumococo lisogénicas para los fagos EJ-1 y HB-3 constituyen un marco fisiológico favorable para que tengan lugar recombinaciones entre regiones de los genes líticos del fago y de la bacteria, ya que ambos se encuentran situados en la misma molécula de DNA y, por

lo tanto, muy próximos físicamente. Tales recombinaciones podrían realizarse, como ya se ha discutido en el apartado 3., entre regiones homólogas (recombinación homóloga) o mediante recombinación ilegítima (Hunkapiller y cols., 1982), la desaparición brusca de la similitud en las secuencias flanqueantes de los genes *ejl* y *hbl* con respecto a las secuencias flanqueantes de los genes *lytA* y *lytA101*, podría ser una consecuencia de dicha recombinación ilegítima, mecanismo que permite cambios más radicales en la funcionalidad de los genes y por ello una forma más eficaz para adaptarse a cambios importantes del entorno (Campbell, 1988). Sin embargo, no se puede descartar que la mayor divergencia en las regiones flanqueantes se deba a la necesidad evolutiva de utilizar diferentes mecanismos de regulación de la expresión génica en los fagos y en la bacteria. Es interesante destacar que tanto el gen *lytA101* como el gen *ejl* poseen una delección de 6 nucleótidos en la región que codifica para el motivo P6 de las correspondientes amidasas (Figura 52), mientras que los genes del fago (*hbl*) y la bacteria (*lytA*) en la cepa lisogénica de neumococo 746 no poseen tal delección (A. Romero, comunicación personal), lo que sugiere, de nuevo, un intercambio de genes entre el fago y la bacteria en estado lisogénico. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que cuando se analiza la relación evolutiva entre los cuatro genes mediante el método de máxima parsimonia (Farris, 1970) utilizando el programa de ordenador PARS (Dopazo, 1988), el árbol topológico que se obtiene es el siguiente :



Los genes *lytA* y *hbl*, por un lado, y los genes *lytA101* y *ejl*, por otro lado, constituyen dos ramas evolutivas del árbol con un ancestro común. Este resultado indica que el parentesco evolutivo que existe entre los genes *lytA* y *hbl* es superior al que existe entre éstos y los genes *lytA101* y *ejl*, y viceversa. Sin embargo, cualquier conclusión de tipo evolutivo debe ser analizada con precaución a la vista del elevado porcentaje de semejanza que existe entre los cuatro genes (Tabla 18), que puede enmascarar el resultado y conducir a interpretaciones erróneas (Dopazo, 1988).

A la luz de los conocimientos actuales son varios los autores que han llegado a la conclusión de que la relación biológica primaria entre fagos y bacterias no tiene únicamente como fin último la destrucción de la bacteria sino que, por el contrario, no es aventurado pensar que entre el fago y la bacteria se establecen relaciones más complejas que propiciarían los intercambios modulares que se habrían llevado a cabo entre los propios fagos, entre los fagos y sus huéspedes naturales o entre los fagos y otras bacterias que se pueden considerar como huéspedes alternativos apoyando el concepto de bacteria como quimera adaptable (Sonea, 1987; Sonea, 1988) que ya se ha discutido en el apartado 3. Un dato más a favor de esta idea lo constituye el

hecho de que algunos fagos de neumococo son también capaces de infectar a *S. oralis* (Ronda y cols., 1989), una bacteria que no sólo está genéticamente relacionada con *S. pneumoniae*, sino que además comparte con ésta las propiedades de poseer colina en sus ácidos teicoicos y de adquirir competencia natural para la transformación genética (Ronda y cols., 1988).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las amidasas LYTA101 y EJL con las amidasas LYTA y HBL así como con las lisozimas CPL1, CPL7 y CPL9 (Figura 54 y Tabla 19), ratifica la hipótesis de la estructura modular de las enzimas hidrolíticas de pared de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos. Los dominios C-terminales de las enzimas que dependen de colina para su actividad, las amidasas y las lisozimas CPL1 y CPL9, son homólogos (Figuras 54 y 55), con un gran predominio en aminoácidos aromáticos. Los 6 motivos (P1-P6) que caracterizan a los dominios C-terminales de las amidasas LYTA y HBL (García y cols., 1988; Romero y cols., 1990 b) y a las lisozimas CPL1 y CPL9 (García y cols., 1988; García y cols., 1990), se observan también en las amidasas LYTA101 y EJL (Figuras 43, 51, 54 y 55). En la Figura 55 se muestra una secuencia consenso para cada uno de los motivos, en la que destaca un núcleo de aminoácidos aromáticos, WYFF, especialmente conservado en la región central de los motivos P2, P3 y P4. Otros residuos conservados en posiciones concretas son los de triptófano o fenilalanina, lisina, ácido aspártico, metionina y glicina. El hecho de que el core de aminoácidos aromáticos se conserve especialmente en los motivos centrales, P2, P3 y P4, junto con la observación de que la delección del motivo P6 y parte del motivo P5 en la amidasa LYTA no ocasiona una pérdida en el reconocimiento de la colina (Sánchez-Puellles y cols., 1987), sugiere un papel importante para dicho núcleo de aminoácidos aromáticos en el reconocimiento y la unión de la colina. Puede aplicarse aquí el concepto de que la velocidad de mutación es específica no sólo de una proteína sino que también lo es de cada dominio funcional de la misma (Kimura y Ohta, 1974). Dado que el grado de libertad para modificar una determinada secuencia está estrechamente ligado a su funcionalidad, es evidente que resultará más difícil modificar las secuencias que desempeñan un papel funcional más crítico. Por ello, la necesidad de mantener una gran precisión en el reconocimiento de la colina presente en la pared celular impide que en el dominio C-terminal de las amidasas y de las lisozimas CPL1 y CPL9 se produzcan grandes cambios (López y García, 1990).

En el motivo P6, tanto las lisozimas CPL1 y CPL9 como las amidasas LYTA101 y EJL presentan, en idéntica posición, una delección de dos aminoácidos que no se observa en las amidasas LYTA y HBL, y cuyo significado se desconoce por el momento. Tampoco es posible explicar en base a la comparación de las secuencias de aminoácidos algunas propiedades de estas enzimas, tales como la peculiar *desconversión* de la amidasa EJL o el proceso de *conversión* que caracteriza a todas las amidasas, si bien en este último caso se ha demostrado que los 11

aminoácidos del extremo C-terminal de la molécula de amidasa LYTA intervienen en la *conversión* (Sánchez-Puelles y cols., 1987). Cuando se comparan los 16 últimos aminoácidos del dominio C-terminal de las amidasas y de las lisozimas CPL1 y CPL9 se observa que se encuentran muy conservados en todos los casos (Figura 54). La única diferencia entre la amidasa LYTA (requiere *conversión*) y la lisozima CPL1 (no requiere *conversión*) en los últimos 11 aminoácidos de sus moléculas, es la sustitución de los residuos 309 (valina) y 318 (lisina) de la amidasa por los residuos de lisina y alanina, respectivamente, en la lisozima. El resultado de este análisis parece sugerir que estos dos aminoácidos del extremo C-terminal de la amidasa LYTA son importantes en el proceso de *conversión*.

Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de las amidasas el porcentaje de semejanza que se observa para todas ellas es muy elevado (Tabla 19), aunque las enzimas LYTA y HBL, al igual que ocurría a nivel de nucleótidos con los genes *lytA* y *hbl*, muestran una mayor semejanza. Las cuatro proteínas son moléculas ricas en aminoácidos hidrofílicos, con un ligero predominio de los aminoácidos ácidos sobre los aminoácidos básicos, que se ve incrementado en las amidasas LYTA101 y EJL. Merece la pena destacar el hecho de que las amidasas de origen fágico tienen una única cisteína, mientras que en las amidasas LYTA y LYTA101 el número de cisteínas es de dos; sin embargo, se mantiene conservada la cisteína de la posición 136 en las cuatro enzimas (Figura 54), lo que sugiere que en las amidasas de origen bacteriano las cisteínas no forman probablemente un puente disulfuro, o de formarse, éste no debe ser de vital importancia para el mantenimiento de la estructura. La cisteína de la posición 136 se localiza en una región de la molécula que se encuentra absolutamente conservada en las cuatro proteínas, con predominio de aminoácidos hidrofílicos y con tendencia a adquirir una conformación secundaria del tipo lámina  $\beta$  según las predicciones de Lim y Garnier (Lim, 1974; Garnier y cols., 1978).

Los resultados presentados en esta Tesis han permitido conocer un poco más sobre la estructura, función y regulación de la amidasa LYTA de *S. pneumoniae* utilizando técnicas de ingeniería de proteínas. No obstante, estos estudios deberán ser completados en un futuro próximo mediante el empleo de otras técnicas que permitan un análisis más directo de la estructura proteica.

**V. CONCLUSIONES**

Las conclusiones que se derivan de los resultados presentados en este trabajo de investigación son las siguientes :

1. El sitio de iniciación de la transcripción (P1) del gen *lytA* en *S. pneumoniae* y en *E. coli* se ha localizado, en ambos casos, 240 pb por delante del codón de iniciación de la traducción del gen. En *E. coli* se ha observado un segundo sitio de iniciación de la transcripción (P2) a 197 pb del inicio de la traducción que probablemente represente un sitio de procesamiento en *E. coli* del RNA mensajero transcrito a partir de P1. Las regiones -35 y -10 propuestas para el promotor P1 son similares a las que presentan los promotores reconocidos por la subunidad  $\sigma_{70}$  de la RNA polimerasa de *E. coli*.

2. El análisis de la secuencia de la región *leader* (240 pb) del gen *lytA* no ha revelado la existencia de ninguna estructura que permita suponer un control transcripcional o traduccional para el gen *lytA*.

3. El terminador de la transcripción del gen *lytA* posee la estructura característica de los terminadores rho-independientes de procariotas y se localiza a 27 pb del codón de terminación de la traducción del gen, siendo reconocido por las RNA polimerasas de *S. pneumoniae* y de *E. coli*.

4. Se ha desarrollado el plásmido de amplio espectro de huésped pLSE4 para el aislamiento y caracterización de promotores en bacterias Gram-positivas (*S. pneumoniae* y *S. oralis*) y Gram-negativas (*E. coli*). La expresión del gen *lytA* en estos tres sistemas es fácilmente cuantificable mediante un ensayo de actividad enzimática de gran sensibilidad, lo que permite determinar la fuerza relativa de los promotores clonados. El nuevo vector posibilita asimismo la secuenciación de dichos promotores.

5. La síntesis de la amidasa LYTA en la cepa tipo de neumococo R6 es constitutiva en todas las fases del ciclo celular. En las cepas *S. pneumoniae* M31 (pED1) y *S. pneumoniae* M31 (pED2), que sintetizan niveles de amidasa LYTA hasta siete veces superiores a los habitualmente detectados en la cepa R6, la expresión del gen *lytA* también es constitutiva y las células pueden mantener dichos niveles de actividad bajo control (inhibición) durante la fase exponencial de crecimiento.

6. La clonación y expresión en *S. pneumoniae* mediante el plásmido pED3 de una amidasa LYTA truncada en sus últimos once aminoácidos, que no requiere *conversión*, y cuya actividad específica representa un 3,5% de la posee la amidasa LYTA intacta, reveló que la forma truncada de la enzima se sintetiza constitutivamente y que su regulación en la célula es básicamente análoga a la de la amidasa LYTA intacta. Sin embargo, la cepa M31 (pED3) se autolisa al final de la fase exponencial de crecimiento y es resistente a la acción del desoxicolato, aún cuando la actividad

detectada en los extractos crudos representa un 70% de la que se observa en los extractos crudos de la cepa R6.

7. En *S. pneumoniae* la amidasa LYTA se localizó mediante técnicas inmunocitoquímicas preferentemente en la región del septo de la célula, lo que está de acuerdo con la participación de esta autolisina en el proceso de separación de las células hijas.

8. En *E. coli* aproximadamente el 80% de la enzima LYTA se localiza en la periferia celular, bien en forma soluble (15%) o asociada mediante interacciones débiles a la cara periplásmica de la membrana interna de la célula (65%).

9. La amidasa LYTA de neumococo se transloca a través de la membrana citoplásmica de *E. coli* sin sufrir aparentemente ningún procesamiento. El análisis de la estructura primaria de la proteína no revela la existencia de secuencias características de un péptido señal N-terminal o de una señal interna que pudiese explicar el mecanismo de secreción de la enzima.

10. La construcción de enzimas quiméricas funcionales entre la amidasa LYTA y las lisozimas CPL1 y CPL7 constituye una demostración experimental de la hipótesis que postula la organización modular de las enzimas hidrolíticas de pared de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos. Así, el centro activo se localiza en el dominio N-terminal de la molécula, mientras que el dominio C-terminal participa tanto en el reconocimiento del sustrato como en el proceso de *conversión* e inhibición de la actividad enzimática en presencia de colina. Asimismo, el dominio C-terminal también parece influir en la dependencia de la actividad enzimática con respecto al pH.

11. El análisis de la proteína obtenida mediante la clonación e hiperexpresión en *E. coli* de la región del gen *lytA* que codifica para el dominio N-terminal de la amidasa LYTA, demuestra que este dominio posee independencia funcional y sugiere que la adquisición del dominio C-terminal representa una ventaja evolutiva para alcanzar una actividad enzimática óptima.

12. La amidasa quimérica LC7 se encuentra sometida a regulación celular en *S. pneumoniae*, aunque se comporta como una autolisina independiente de colina.

13. Se ha caracterizado el sistema autolítico de la cepa de origen clínico *S. pneumoniae* 101/87, una cepa que aunque se autolisa presenta un fenotipo  $\text{DOC}^-$ , no es transformable y no se infecta productivamente con fagos de neumococo. Para ello, se han clonado y secuenciado los genes *lytA101* y *ejl*, genes que codifican para las enzimas hidrolíticas de pared LYTA101 y EJL, respectivamente.

14. Las enzimas LYTA101 y EJL se han caracterizado como amidasas que poseen propiedades similares a las de la amidasa LYTA, si bien la proteína EJL presenta menor actividad específica y una peculiar *desconversión* que no se observa en las otras enzimas.

15. La expresión de la amidasa LYTA101 en *S. pneumoniae* M31 restituye la capacidad autolítica en esta cepa y origina un fenotipo  $\text{DOC}^+$ . Este hecho, junto con la observación de

que las enzimas LYTA101 y EJL se activan en presencia de desoxicolato, sugiere que la causa directa del fenotipo DOC<sup>-</sup> característico de la cepa 101/87 no se debe a un defecto funcional de estas amidasas.

**16.** Se ha aislado y caracterizado un nuevo fago atemperado de neumococo, el fago EJ-1, que lisogeniza la cepa 101/87. Pertenece al Tipo A-1 de la clasificación de Bradley y presenta características que lo diferencian claramente de los fagos de neumococo hasta ahora descritos, aunque no se ha podido obtener infección lítica productiva en ninguno de los huéspedes utilizados.

**17.** El DNA del fago EJ-1 es lineal y de doble cadena, con un tamaño aproximado de 40-45 kb, y codifica para la amidasa EJL.

**18.** La comparación de las secuencias de nucleótidos de los genes *lytA*, *lytA101*, *ejl* y *hbl* revela una clara similitud en sus regiones estructurales que indica un origen común para todos ellos. La similitud entre los dos genes bacterianos (*lytA* y *lytA101*) se pierde a partir del codón de terminación de la traducción debido a una deleción en el DNA de la cepa 101/87.

**19.** Los resultados presentados en esta Tesis permiten concluir que los dominios que estructuran la molécula de las enzimas hidrolíticas de pared de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos son intercambiables y conservan su función independientemente uno del otro. Estas enzimas constituyen un sistema modelo que apoya la teoría modular de la evolución de las proteínas y el concepto de bacteria como quimera adaptable.

**VI. BIBLIOGRAFIA**

- Ackermann, H. W. 1974. *Path. Biol.* **22**: 909-917.
- Akriegg, A., Ayad, S. R. y Barker, G. R. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 1062-1067.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1983. En *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. NY.
- Alloing, G., Trombe, M.-C. y Claverys, J.-P. 1990. *Mol. Microbiol.* **4**: 633-644.
- An, G. y Friesen, J. D. 1979. *J. Bacteriol.* **140**: 400-407.
- Appleyard, R. K. 1954. *Genetics* **39**: 440.
- Archibald, A. R. 1976. *J. Bacteriol.* **127**: 956-960.
- Armstrong, J. J., Baddiley, J., Buchanan, J. G., Carss, B. y Greenberg, G. R. 1958. *J. Chem. Soc.* 4344-4354.
- Arraj, J. A. y Marinus, M. G. 1983. *J. Bacteriol.* **153**: 562-565.
- Austrian, R. 1981. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 183-189.
- Austrian, R. 1989. *Rev. Infect. Dis.* **11**: S598-S602.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. y McCarty, M. 1944. *J. Exp. Med.* **79**: 137-158.
- Balganesh, T. S., Reiners, L., Lauster, R., Noyer-Weidner, M., Wilke, K. y Trautner, T. A. 1987. *EMBO J.* **6**: 3543-3549.
- Ballester, S., Alonso, J. C., López, P. y Espinosa, M. 1990. *Gene* **86**: 71-79.
- Banas, J. A., Russell, R. R. B. y Ferreti, J. J. 1990. *Infect. Immun.* **58**: 667-673.
- Barany, F. y Tomasz, A. 1980. *J. Bacteriol.* **144**: 698-709.
- 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. W. de Gruyter, Berlín.
- Barroso, L. A., Wang, S. Z., Phelps, C. J., Johnson, J. L. y Wilkins, T. D. 1990. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4004-4005.
- Bayer, M. E. 1975. En *Membrane Biogenesis* (Tzagolof, A., ed.) pp. 393-427. Plenum Press, New York.
- Beacham, I. R. 1979. *Int. J. Biochem.* **10**: 877-883.
- Beachey, E. H. y Offek, I. 1976. *J. Exp. Med.* **143**: 759-771.
- Bean, B. y Tomasz, A. 1977. *J. Bacteriol.* **130**: 571-574.
- Beck, E. 1980. *Nucleic Acids Res.* **8**: 3011-3027.
- Belasco, J. G. y Higgins, C. F. 1988. *Gene* **72**: 15-23.
- Benner-Lugger, D. y Boos, W. 1988. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 579-587.
- Berk, A. J. y Sharp, P. A. 1977. *Cell* **12**: 721-732.
- Bernheimer, H. P. 1979. *J. Bacteriol.* **138**: 618-624.
- Berry, A. M., Lock, R. A., Hansman, D. y Paton, J. C. 1989. *Infect. Immun.* **57**: 2324-2330.

- Beveridge, T. J. 1981. *Int. Rev. Citol.* **72**: 229-317.
- Bierbaum, G. y Sahl, H.-G. 1985. *Arch. Microbiol.* **141**: 249-254.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. 1979. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blake, C. C. F. 1978. *Nature* **273**: 267.
- Blassi, U., Halfman, G. y Lubitz, W. 1984. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed.) pp. 213-218. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Blobel, G. y Dobberstein, B. 1975. *J. Cell Biol.* **67**: 852-862.
- Blumberg, P. M. y Strominger, J. L. 1974. *Bacteriol. Rev.* **38**: 291-335.
- Boizet, B., Lahbib-Mansais, Y., Dupont, L., Ritzenthaler, P. y Mata, M. 1990. *Gene* **94**: 61-67.
- Bolívar, F. 1978. *Gene* **4**: 121-136.
- Bolívar, F., Rodríguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. y Falcow, S. 1977. *Gene* **2**: 95-113.
- Botstein, D. 1980. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **354**: 484-491.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix, D. 1969. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-474.
- Bradford, M. M. 1976. *Anal. Biochem.* **72**: 248-256.
- Bradley, D. E. 1967. *Bact. Rev.* **31**: 230-314.
- Briese, T. y Hakenbeck, R. 1984. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed.) pp. 201-206. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Briese, T. y Hakenbeck, R. 1985. *Eur. J. Biochem.* **146**: 417-427.
- Briggs, M. S. y Gierasch, L. M. 1986. *Adv. Protein Chem.* **38**: 109-180.
- Briles, E. B. y Tomasz, A. 1970. *J. Cell Biol.* **47**: 786-790.
- Briles, E. B. y Tomasz, A. 1973. *J. Biol. Chem.* **248**: 6394-6397.
- Briles, E. B. y Tomasz, A. 1975. *J. Gen. Microbiol.* **86**: 267-274.
- Brent, R. y Ptashne, M. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4204.
- Brosius, J. 1984. *Gene* **27**: 151-160.
- Brosius, J., Cate, R. L. y Pelmutter, A. P. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**: 9205-9210.
- Brundish, D. E. y Baddiley, J. 1968. *Biochem. J.* **110**: 573-582.
- Campbell, A. 1988. En *The Bacteriophages* (Calendar R., ed) pp. 1-14. Plenum Publishing Corp., New York.
- Casadaban, M. J., Martínez-Arias, A., Shaphira, S. K. y Chou, J. 1983. *Methods Enzymol.* **100**: 293-308.
- Caulfield, M. P., Furlong, D., Tai, P. C. y Davis, B. D. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4031-4035.

- Cleveland, R. F., Höltje, J.-V., Wicken, A. J., Tomasz, A., Daneo-Moore, L. y Shockman, G. D. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**: 1128-1135.
- Covarrubias, L. y Bolívar, F. 1982. *Gene* **17**: 79-89.
- Chatterjee, A. N., Wong, W., Young, F. E. y Gilpin, R. W. 1976. *J. Bacteriol.* **125**: 961-997.
- Chen, J.-D. y Morrison, D. A. 1987. *Gene* **55**: 179-187.
- Chen, J.-D. y Morrison, D. A. 1988. *Gene* **64**: 155-164.
- Chetty, C. y Kreger, A. 1981. *Infect. Immun.* **31**: 339-344.
- Cheung, H. y Freese, E. 1985. *J. Bacteriol.* **161**: 1222-1225.
- Chou, P. Y. y Fasman, G. D. 1978. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 251-276.
- de Graaf, F. K. y Oudega, B. 1986. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **125**: 183-205.
- Devlin, J. J., Devlin, P. E., Clark, R., O'Rourke, E. C., Levenson, C. y Mark, D. F. 1989. *Biotechnology* **7**: 286-292.
- Dhaese, P., Hussey, C. y Van Montagu, M. 1984. *Gene* **32**: 181-194.
- Doolittle, R. F. 1985. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 233-237.
- Doolittle, R. F. 1986. University Science Books. Mill Valley, CA.
- Dopazo, J. 1988. *Comput. Appl. Biosci.* **4**: 307.
- Dove, S. Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D. y Johnson, J. L. 1990. *Infect. Immun.* **58**: 480-488.
- Doyle, R. J., Chaloupka, J. y Vinter V. 1988. *Microbiol. Rev.* **52**: 554-567.
- Dubos, R. J. 1937. *J. Exp. Med.* **66**: 101-112.
- DuBose, R. F. y Hartl, D. L. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 9966-9970.
- Duchrow, M., Gert-Wieland, K. y Giffhorn, F. 1985. *Arch. Microbiol.* **142**: 141-147.
- Farris, J. S. 1970. *Syst. Zool.* **19**: 83-91.
- Fein, J. E. 1979. *J. Bacteriol.* **137**: 933-946.
- Fein, J. E. y Rogers, C. W. 1976. *J. Bacteriol.* **127**: 1427-1442.
- Feitelson, J. S. 1988. *Gene* **66**: 159-162.
- Fenoll, A., Martínez-Suárez, J. V., Muñoz, R., Casal, J. y García J. L. 1990. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: 396-401.
- Ferreti, J. J., Gilpin, M. L. y Russell, R. R. B. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 4271-4278.
- Fischer, W. 1988. *Adv. Microb. Physiol.* **29**: 233-302.
- Fischer, H. y Tomasz, A. 1984. *J. Bacteriol.* **157**: 507-513.
- Fischer, H. y Tomasz, A. 1985. *J. Bacteriol.* **163**: 46-54.
- Fognini-Lefebvre, N., Lazzaroni, J. C. y Portalier, R. 1987. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 391-395.

- Formanek, H. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 55-60. W. de Gruyter, Berlín.
- Forsberg, C.-W. y Rogers, H. J. 1974. *J. Bacteriol.* **118**: 358-368.
- Fouche, P. B. y Hash, J. H. 1978. *J. Biol. Chem.* **253**: 6787-6793.
- Fox, S. W. 1984. En *Beyond Neodarwinism* (Ho, M. y Sauders, P. T., eds.) pp 15-60. Academic Press.
- Fox, M. S. y Hotchkiss, R. D. 1957. *Nature* **179**: 1322-1325.
- Friesen, J. D., Tropak, M. y An, G. 1983. *Cell* **32**: 361-369.
- Galas, D. J., Eggert, M. y Waterman, M. S. 1985. *J. Mol. Biol.* **186**: 117-128.
- García, E. 1990. *Microbiología 1990* (Casadesús, J. y Ruíz-Berraquero, F., eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla (en prensa).
- García, E., Rojo, J. M., García, P., Ronda, C., López, R. y Tomasz, A. 1982. *FEMS Microbiol. Lett.* **14**: 133-136.
- García, P., García, E., Ronda, C., López, R. y Tomasz, A. 1983a. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 489-497.
- García, P., García, E., Ronda, C., Tomasz, A. y López, R. 1983b. *Curr. Microbiol.* **8**: 137-140.
- García, P., López, R., Ronda, C., García, E. y Tomasz, A. 1983c. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 479-487.
- García, P., Méndez, E., García, E., Ronda, C. y López, R. 1984. *J. Bacteriol.* **159**: 793-796.
- García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P. y López, R. 1985a. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 225-230.
- García, E., Ronda, C., García, J. L. y López, R. 1985b. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**: 77-81.
- García, P., García, E., Ronda, C., López, R., Jiang, R. Z. y Tomasz, A. 1986a. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1401-1405.
- García, J. L., Sánchez-Puelles, J. M., García, P., López, R., Ronda, C. y García, E. 1986b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 614-619.
- García, P., García, J. L., García, E. y López, R. 1986c. *Gene* **43**: 265-272.
- García, J. L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C. y López, R. 1987a. *J. Virol.* **61**: 2573-2580.
- García, J. L., García, E. y López, R. 1987b. *Arch. Microbiol.* **149**: 52-56.
- García, E., García, J. L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J. M. y López, R. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 914-918.
- García, P., García, J. L., García, E. y López, R. 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 251-256.
- García, P., García, J. L., García, E. y López, R. 1990. *Gene* **86**: 81-88.
- García-Bustos, J. F. y Tomasz, A. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 447-453.
- García-Bustos, J. F., Chait, B. T. y Tomasz, A. 1987. *J. Biol. Chem.* **262**: 15400-15405.

- García-Bustos, J. F., Chait, B. T. y Tomasz, A. 1988. *J. Bacteriol.* **170**: 2143-2147.
- García-Bustos, J. F. y Tomasz, A. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 114-119.
- García-Bustos, J. F. y Tomasz, A. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5415-5419.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J. y Robson, B. 1978. *J. Mol. Biol.* **120**: 97-120.
- Garvey, K. J., Saedi, M. S. e Ito, J. 1986. *Nucleic Acids Res.* **14**: 10001-10008.
- Gasc, A. M., Kauc, L., Sicard, M. y Goodgal, S. H. 1990. En *Program and Abstracts of 3rd. International ASM Conference on Streptococcal Genetics*. (Dunny, G. M., Cleary, P. P. y McKay, L. L., eds.) pp.21. ASM, Minneapolis.
- Ghuysen, J. M. 1977. En *The Synthesis, Assembly and Turnover of Cell Surface Components* (Poste, G. y Nicolson, G. L., eds.) pp. 463-595. Elsevier/ North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Gibbs, A. 1987. *J. Cell Sci. Suppl.* **7**: 319-337.
- Gibson, T. J. 1984. Tesis Doctoral. Universidad de Cambridge, Inglaterra.
- Gilbert, W. 1978. *Nature* **271**: 501.
- Gilmore, K. S., Russell, R. R. B. y Ferreti, J. J. 1990. *Infect. Immun.* **58**: 2452-2458.
- Giudicelli, S. y Tomasz, A. 1984a. *J. Bacteriol.* **158**: 1188-1190.
- Giudicelli, S. y Tomasz, A. 1984b. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed.) pp. 207-212. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Glauner, B. y Schwarz, U. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 29-34. W. de Gruyter, Berlín.
- Goldfarb, D. S., Doi, R. H. y Rodríguez, R. L. 1981. *Nature* **293**: 309-311.
- Goodell, E. W. y Schwarz, U. 1985. *J. Bacteriol.* **162**: 391-397.
- Gorski, K., Roch, J.-M., Prentki, P. y Krisch, H. M. 1985. *Cell* **43**: 461-469.
- Graves, M. C. y Rabinowitz, J. C. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**: 11409-11415.
- Green, P. J. e Inouye, M. 1984. *J. Mol. Biol.* **176**: 431-442.
- Griffith, F. 1928. *J. Hyg.* **27**: 113-159.
- Hakenbeck, R., Waks, S. y Tomasz, A. 1978. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 302-311.
- Hall, J., Hazlewood, G. P., Barker, P. J. y Gilbert, H. J. 1988. *Gene* **69**: 29-38.
- Handwerger, S. y Tomasz, A. 1985. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 368-386.
- Harkness, R. E. e Ishiguro, E. E. 1983. *J. Bacteriol.* **155**: 15-21.
- Harley, C. B. y Reynolds, R. P. 1987. *Nucleic Acids Res.* **15**: 2343-2361.
- Hawley, D. K. y McClure, W. R. 1983. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2237-2255.
- Hill, J. y Wannamaker, L. 1981. *J. Bacteriol.* **145**: 696-703.
- Hobby, G. L., Meyer, K. y Chafee, E. 1942. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **50**: 281-285.

- Holland, I. B., Mackman, N. y Nicaud, J.-M. 1986. *Bio/Technology* **4**: 427-431.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1974. *J. Biol. Chem.* **249**: 7032-7034.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1975a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1690-1694.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1975b. *J. Biol. Chem.* **250**: 6072-6076.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1976. *J. Biol. Chem.* **251**: 4199-4207.
- Höltje, J. V. y Van Duin, J. 1984. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed.) pp. 195-199. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Horne, D. y Tomasz, A. 1977. *J. Bacteriol.* **118**: 830-836.
- Horne, D., Hakenbeck, R. y Tomasz, A. 1977. *J. Bacteriol.* **132**: 704-717.
- Horne, D. y Tomasz, A. 1979. *J. Bacteriol.* **137**: 1180-1184.
- Horne, D. y Tomasz, A. 1985a. *J. Gen. Microbiol.* **3**: 533-541.
- Horne, D. y Tomasz, A. 1985b. *J. Bacteriol.* **161**: 18-24.
- Houghton, J. E., O'Donovan, G. A. y Wild, J. R. 1989. *Nature* **338**: 172-174.
- Howard, L. V. y Gooder, H. 1974. *J. Bacteriol.* **117**: 796-804.
- Hunkapiller, T. H., Huang, H., Hoong, L. y Campbell, J. H. 1982. En *The Impact of Modern Genetics on Evolutionary Theory* (Millman R., ed) pp. 164-189. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hurtley, S. M. 1990. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 211-212.
- Inciarte, M. R., Lázaro, J. M., Salas, M. y Viñuela, E. 1976. *Virology* **74**: 314-323.
- Inouye, S. e Inouye, M. 1985. *Nucleic Acids Res.* **13**: 3101-3110.
- Jacobson, G. R., Takacs, B. J. y Rosenbusch, J. P. 1976. *Biochemistry* **15**: 2297-2303.
- Jaurin, B. 1987. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8567.
- Jauris, S., Rücknagel, K. P., Schwarz, W. H., Kratzsch, P., Bronnenmeier, K. y Staudenbauer, W. L. 1990. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 258-267.
- Jennings, H. J. 1990. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **150**: 97-127.
- Jennings, H. J., Lugowski, C. y Young, N. M. 1980. *Biochemistry* **19**: 4712-4719.
- Jollès, P. y Jollès, J. 1984. *Mol. Cell. Biochem.* **63**: 165-189.
- Jurgens, V. J. y Wecknesser, J. 1985. *Ann. Inst. Pasteur* **136**: 41-44.
- Kamei, K., Saburo, H., Ikenaka, T. y Murao, S. 1988. *J. Biochem.* **104**: 832-836.
- Kawamura, T. y Shockman, G. D. 1983. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**: 65-69.
- Kieny, M. P., Lathe, R. y Lecocq, J. P. 1983. *Gene* **26**: 91-99.
- Kimura, M. y Ohta, T. 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 2848-2852.
- Kitano, K. y Tomasz, A. 1979. *J. Bacteriol.* **140**: 955-962.
- Klug, A. y Rhodes, D. 1987. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 464-469.

- Klugman, K. P. 1990. *Clin. Microb. Rev.* **3**: 171-196.
- Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K., Regan, J. W., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. 1988. *Science* **240**: 1310-1316.
- Koch, A. L. 1990. *Res. Microbiol.* **141**: 529-541.
- Koch, A. L., Kirchner, G., Doyle, R. J. y Burdett, I. D. J. 1985. *Ann. Inst. Pasteur* **136**: 91-98.
- Kojima, N., Araki, Y. e Ito, E. 1985. *J. Bacteriol.* **161**: 299-306.
- Koronakis, V., Koronakis, E. y Hughes, C. 1989. *EMBO J.* **8**: 595-605.
- Koshland, D. y Botstein, D. 1980. *Cell* **20**: 749-760.
- Kushner, S. R. 1978. En *Genetic engineering* (Boyer, H. B. y Nicosia, S., eds.) pp 17. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Labischinski, H., Barnikel, G., Nauman, D. y Keller, P. 1985. *Ann. Inst. Pasteur* **136**: 45-50.
- Lacks, S. A. 1966. *Genetics* **53**: 207-235.
- Lacks, S. A. 1970. *J. Bacteriol.* **101**: 373-383.
- Lacks, S. A. y Neuberger, M. 1975. *J. Bacteriol.* **124**: 1321-1329.
- Lacks, S. A., Dunn, J. J. y Greenberg, B. 1982. *Cell* **31**: 327-336.
- Lacks, S. A., López, P., Greenberg, B. y Espinosa, M. 1986a. *J. Mol. Biol.* **192**: 753-765.
- Lacks, S. A., Mannarelli, B. M., Springhorn, S. S. y Greenberg, B. 1986b. *Cell* **46**: 993-1000.
- Laemmli, U. K. 1979. *Nature* **227**: 680-685.
- Laitinen, H. y Tomasz, A. 1990. *J. Bacteriol.* **172**: 5961-5967.
- Lauster, R., Trautner, T. A. y Noyer-Weidner, M. 1989. *J. Mol. Biol.* **206**: 305-312.
- Le Grice, S. F. J., Gentz, R., Bannawarth, W. y Kocher, H. P. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 3362-3368.
- Leduc, M., Kasra, R., Singer, H. y Van Heijenoort, J. 1984. *FEMS Microbiol. Letters* **23**: 137-142.
- Lee, C. J. y Liu, T. Y. 1977. *Int. J. Biochem.* **8**: 573-580.
- Lichenstein, H. S., Hastings, A. E., Langley, K. E., Mendiaz, E. A., Rohde, M. F., Elmore R. y Zukowski, M. M. 1990. *Gene* **88**: 81-86.
- Lim, V. I. 1974. *J. Mol. Biol.* **88**: 873-894.
- Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L. A., Ito, K., Oliver, D. y Wickner, W. 1989. *EMBO J.* **8**: 961-966.
- Liu, H. H. y Tomasz, A. 1985. *J. Infect. Dis.* **152**: 365-372.
- López, R., Ronda, C., Tapia, A., Waks, S. y Tomasz, A. 1976. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**: 697-706.
- López, R., Ronda, C., Tomasz, A. y Portolés, A. 1977. *J. Virol.* **24**: 201-210.
- López, R., García, E. y Ronda, C. 1981. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 212-223.

- López, R., García, E., García, P., Ronda, C. y Tomasz, A. 1982a. *J. Bacteriol.* **151**: 1581-1590.
- López, C., Grubb, A. y Méndez, E. 1982b. *FEBS Lett.* **144**: 349-353.
- López, R., García, P. y García, E. 1983. *Microbiol. Espan.* **36**: 45-57.
- López, R., Méndez, E., García, E., Ronda, C. y García, P. 1984a. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed.) pp. 187-194. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- López, R., Ronda, C., García, P., Escarmís, C. y García, E. 1984b. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 67-74.
- López, R., Sánchez-Puelles, J. M., García, E., García, J. L., Ronda, C. y García, P. 1986. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 237-242.
- López, P., Espinosa, M., Greenberg, B. y Lacks, S. A. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 4320-4326.
- López, P., Martínez, S., Díaz, A., Espinosa, M. y Lacks, S. A. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 4255-4263.
- López, R y García, J. L. 1990. *Microbiología 1990* (Casadesús, J. y Ruíz-Berraquero, F., eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla (en prensa).
- López, R., Ronda, C. y García, E. 1990a. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 317-322.
- López, P., Greenberg, B. y Lacks, S. A. 1990b. *J. Bacteriol.* **172**: 4766-4774.
- Low, B. 1968. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**: 160.
- Lund, E. y Henrichsen, J. 1978. *Methods Microbiol.* **12**: 241-262.
- Lunn, C. A. y Pigiet, V. P. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**: 11424-11430.
- Manck, J. y Glaser, L. 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2386-2390.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Malo, M. S. y Loughlin, R. E. 1988. *Gene* **64**: 207-215.
- Markiewicz, Z. y Tomasz, A. 1990. *J. Bacteriol.* **172**: 2241-2244.
- Martin, B., Alloing, G., Boucraut, C. y Claverys, J.-P. 1989. *Gene* **80**: 227-238.
- Martínez, S., López, P., Espinosa, M. y Lacks, S. A. 1986. *Gene* **44**: 79-88.
- McDaniel, L. S., Yother, J., Waltman II, W. D. y Briles, D. E. 1987. En *Streptococcal Genetics* (Ferretti, J. J. y Curtis III, R., eds.) pp. 172-176. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- McDonnell, M., Ronda, C. y Tomasz, A. 1975. *Virology* **63**: 577-582.
- Messing, J. 1983. *Methods Enzymol.* **101**: 20-78.
- Messing, J., Crea, R. y Seeburg, P. H. 1981. *Nucleic Acids Res.* **9**: 309-321.
- Mindich, L. y Lehman, J. 1979. *J. Virol.* **30**: 489-496.
- Moreillon, P. y Tomasz, A. 1988. *J. Infect. Dis.* **157**: 1150-1157.
- Moreillon, P., Markiewicz, Z., Nachman, S. y Tomasz, A. 1990. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 33-39.

- Morrison, D. A. 1978. *J. Bacteriol.* **136**: 548-557.
- Morrison, D. A. y Jaurin, B. 1990. *Mol. Microbiol.* **4**: 1143-1152.
- Mosser, J. L. y Tomasz, A. 1970. *J. Biol. Chem.* **245**: 287-298.
- Moynet, D. J. y Tiraby, G. J. 1980. *J. Bacteriol.* **141**: 1298-1304.
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M. y Lusty, C. J. 1986. *Gene* **45**: 299-310.
- Nauman, D., Barnickel, G., Bradaczek, H., Labischinski, H. y Giesbrecht, P. 1982. *Eur. J. Biochem.* **125**: 505-515.
- Nelles, L., Lijnen, R., Collen, D. y Holmes, W. E. 1987. *J. Biol. Chem.* **262**: 10855-10862.
- Neufeld, F. 1900. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **34**: 454-464.
- Nikaido, H. y Vaara, H. 1985. *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32.
- Nossal, N. E. y Heppel, L. A. 1966. *J. Biol. Chem.* **241**: 3055-3062.
- Nöthling, R. y Hakenbeck, R. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 267-272. W. de Gruyter, Berlín.
- Nygren, H., Rozell, B., Holmgren, A. y Hansson, H.-A. 1981. *FEBS Lett.* **133**: 145-150.
- Oliver, D. 1985. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 615-648.
- Paces, V., Vıcek, C. y Urbanek, P. 1986. *Gene* **44**: 107-114.
- Perlman, D. y Halvorson, H. O. 1983. *J. Mol. Biol.* **167**: 391-409.
- Pelzer, H. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 105-111. W. de Gruyter, Berlín.
- Pooley, H. M., Shockman, G. D., Higgins, M. L. y Porres-Juan, J. 1972. *J. Bacteriol.* **109**: 423-431.
- Pooley, H. M. y Karamata, D. 1984. *J. Bacteriol.* **160**: 1123-1129.
- Porter, R. D. y Guild, W. R. 1976. *J. Virol.* **19**: 659-667.
- Potvin, C., Leclerc, D., Tremblay, G., Asselin, A. y Bellemare, G. 1988. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 241-248.
- Priebe, S., Hadi, S., Greenberg, B. y Lacks, S. A. 1988. *J. Bacteriol.* **170**: 190-196.
- Prudhomme, M., Martin, B., Mejean, V. y Claverys, J.-P. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 5332-5338.
- Pugsley, A. P. y Schwartz, M. 1985. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 3-38.
- Puyet, A., Greenberg, B. y Lacks, S. A. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 2278-2286.
- Puyet, A., Greenberg, B. y Lacks, S. A. 1990. *J. Mol. Biol.* **213**: 727-738.
- Radnis, B. A., Rhee, D.-K. y Morrison, D. A. 1990. *J. Bacteriol.* **172**: 3669-3674.
- Randall, L. L., Hardy, S. J. S. y Thom, J. R. 1987. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 507-541.
- Ranhand, J. M. 1973. *J. Bacteriol.* **115**: 607-614.

- Reisenfeld-Orn, I., Wolpe, S., García-Bustos, J. F., Hoffmann, M. K. y Tuomanen, E. 1989. *Infect. Immun.* **57**: 1890-1893.
- Reynolds, E. 1963. *J. Cell. Biol.* **17**: 208-212.
- Richards, J. H. 1986. *Nature* **323**: 187.
- Rogers, H. J. 1974. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **235**: 29-51.
- Rogers, H. J. 1979. En *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases* (Berkeley, R. C., Gooday, G. W. y Elwood, D. C., eds) pp. 237-267. Academic Press, London.
- Rogers, H. J., Perkins, H. R. y Ward, J. B. 1980. En *Microbial Cell Walls and Membranes*, pp. 437-460. Chapman and Hall, London.
- Rogers, H. J. y Thurman, P. F. 1985. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 591-599.
- Romero, A., López, R. y García, P. 1990a. *J. Virol.* **64**: 137-142.
- Romero, A., López, R. y García, P. 1990b. *J. Bacteriol.* **172**: 5064-5070.
- Romero, A., López, R., Lurz, R. y García, P. 1990c. *J. Virol.* **64**: 5149-5155.
- Ronda-Lain, C., López, R., Tapia, A. y Tomasz, A. 1977. *J. Virol.* **21**: 366-374.
- Ronda, C., López, R. y García, E. 1981. *J. Virol.* **40**: 551-559.
- Ronda, C., García, J. L., García, E., Sánchez-Puelles, J. M. y López, R. 1987. *Eur. J. Biochem.* **164**: 621-624.
- Ronda, C., García, J. L. y López, R. 1988. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 53-57.
- Ronda, C., García, J. L., y López, R. 1989. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 187-192.
- Rosenberg, M. y Court, D. 1979. *Annu. Rev. Genet.* **13**: 319-353.
- Ross, G. W. y O'Callaghan, C. H. 1975. *Methods Enzymol.* **43**: 69-85.
- Sabath, L. D., Lavadiere, M., Wheeler, N., Blazevic, D. y Wilkinson, B. J. 1977. *Lancet* **1**: 443-447.
- Saedi, M., Garvey, K. J. e Ito, J. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 955-958.
- Saier, M. H., Werner, P. K. y Müller, M. 1989. *Microbiol. Rev.* **53**: 333-366.
- Salton, M. R. J. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 3-8. W. de Gruyter, Berlín.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Puelles, J. M., Ronda, C., García, J. L., García, P., López, R. y García, E. 1986a. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289-293.
- Sánchez-Puelles, J. M., Ronda, C., García, E., Méndez, E., García, J. L. y López, R. 1986b. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**: 163-166.
- Sánchez-Puelles, J. M., García, J. L., López, R. y García, E. 1987. *Gene*. **61**: 13-19.
- Sánchez-Puelles, J. M., Sanz, J. M., García, J. L. y García, E. 1990. *Gene* **89**: 69-75.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

- Sanz, J. M., López, R. y García, J. L. 1988 *FEBS Lett.* **232**: 308-312.
- Sanz, J. M. y García, J. L. 1990. *Eur. J. Biochem.* **187**: 409-416.
- Schilstra, M. J., Slot, J. W., van der Meide, P. H., Posthuma, G., Cremers, A. F. M. y Bosch, L. 1984. *FEBS Lett.* **165**: 175-179.
- Schleiffer, K. H. y Kandler, O. 1972. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Schneider, K. y Beck, C. F. 1986. *Gene* **42**: 37-48.
- Sekiguchi, J., Ohsu, H., Kuroda, A., Moriyama, H. y Akamatsu, T. 1990. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1223-1230.
- Seto, H. y Tomasz, A. 1975. *J. Bacteriol.* **121**: 344-353.
- Seto, H., López, R. y Tomasz, A. 1975. *J. Bacteriol.* **122**: 1339-1350.
- Shearman, C., Underwood, H., Jury, K. y Gasson, M. 1989. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 214-221.
- Shine, J. y Dalgarno, L. 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342-1346.
- Shiroza, T., Ueda, S. y Kuramitsu, H. K. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 4263-4270.
- Shockman, G. D. y Barret, J. F. 1983. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 501-527.
- Shoemaker, N. B. y Guild, W. R. 1974. *Mol. Gen. Genet.* **128**: 283-290.
- Smith, H., Bron, S., van Ee, J. y Venema, G. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 3321-3328.
- Sollner-Webb, B. y Reeder, R. H. 1979. *Cell* **18**: 485-499.
- Sonea, S. 1987. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **503**: 251-260.
- Sonea, S. 1988. *Nature* **331**: 216.
- Sonnen, H., Schneider, J. y Kutzner, H. J. 1990. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 567-571.
- Sorensen, U. B. S., Blom, J., Birch-Andersen, A. y Henrichsen, J. 1988. *Infect. Immun.* **56**: 1890-1896.
- Southern, E. M. 1975. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spiess, E. y Lurz, R. 1988. *Methods in Microbiol.* **20**: 293-323.
- Stassi, D. L., López, P., Espinosa, M. y Lacks, S. A. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7028-7032.
- Stassi, D. L. y Lacks, S. A. 1982. *Gene* **18**: 319-328.
- Stroynowsky, I. T. 1981. *J. Bacteriol.* **148**: 91-100.
- Stuber, D. y Bujard, H. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 167-171.
- Styvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M. W., Bjornsen, T. y Strom, A. R. 1986. *J. Bacteriol.* **165**: 856-863.
- Swank, R. T. y Munkres, K. D. 1971. *Anal. Biochem.* **39**: 462-477.
- Teuber, M y Lembke, J. 1983. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 283-295.

- Tipper, D. J. y Strominger, J. L. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**: 1133-1141.
- Tomasz, A. 1964. *Bacteriol. Proc.* **29**
- Tomasz, A. 1966. *J. Bacteriol.* **91**: 1050-1061.
- Tomasz, A. 1967. *Science* **157**: 694-697.
- Tomasz, A. 1968. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**: 86-93.
- Tomasz, A. 1970. *J. Bacteriol.* **101**: 860-871.
- Tomasz, A. 1979. *Rev. Infect. Dis.* **1**: 434-467.
- Tomasz, A. 1981. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 190-211.
- Tomasz, A. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 155-163. W. de Gruyter, Berlín.
- Tomasz, A. 1984. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed) pp. 3-12. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam.
- Tomasz, A. y Hochtiss, R. D. 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**: 480-487.
- Tomasz, A. y Mosser, J. L. 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**: 58-66.
- Tomasz, A., Albino, A. y Zanati, E. 1970. *Nature* **227**: 138-140.
- Tomasz, A. y Westphal, M. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2627-2630.
- Tomasz, A. y Waks, S. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 1311-1319.
- Tomasz, A., Westphal, M., Briles, E. B. y Fletcher, P. 1975. *J. Supramol. Struct.* **3**: 1-16.
- Tomassen, J., Leunissen, J., van Damme-Jongsten, M. y Overduin, P. 1985. *EMBO J.* **4**: 1041-1047.
- Travers, A. A. 1984. *Nucleic Acids Res.* **12**: 2605-2618.
- Travers, A. A., Lamond, A. I., Mace, H. A. F. y Berman, M. L. 1983. *Cell* **35**: 265-273.
- Tsuchido, T., Hiraoka, T., Tanako, M. y Shibasaki, I. 1985. *J. Bacteriol.* **162**: 42-46.
- Tuomanen, E. 1986. *Rev. Infect. Dis.* **8**: S279-S291.
- Tuomanen, E., Durack, D. T. y Tomasz, A. 1986. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**: 521-527.
- Tuomanen, E., Pollack, H., Parkinson, A., Davidson, M., Facklam, R., Rich, R. y Zak, O. 1988. *J. Infect. Dis.* **158**: 36-43.
- Tiraby, G., Tiraby, E. y Fox, M. S. 1975. *Virology* **68**: 566-569.
- Ueda, S., Shiroza, T. y Kuramitsu, H. K. 1987. *Gene* **69**: 101-109.
- Van Gorcom, R. F. M., Punt, P. J., Pouwels, P. H. y Van den Hondel, C. A. M. J. J. 1986. *Gene* **48**: 211-217.
- Venglarcik, J. S., Blair, L. L. y Dunkle, L. L. 1983. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**: 232-235.
- Verma, M. 1986. *Current Microbiology* **13**: 299-301.
- Vlcek, C. y Paces, V. 1986. *Gene* **46**: 215-225.

- Waks, S. y Tomasz, A. 1978. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 293-301.
- Walker, J. A., Allen, R. L., Falmagne, P., Johnson, M. K. y Boulnois, G. J. 1987. *Infect. Immun.* **55**: 1184-1189.
- Weidel, W. y Pelzer, H. 1964. *Adv. Enzymol.* **26**: 193-232.
- Wheeler, J., Holland, J., Terry, J. y Blainey, J. 1980. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 27-33.
- Wickner, W. y Lodish, H. 1985. *Science* **230**: 400-407.
- Williams, D. M., Duvall, E. J. y Lovett, P. S. 1981. *J. Bacteriol.* **146**: 1162-1165.
- Williamson, R. y Tomasz, A. 1980. *J. Bacteriol.* **144**: 105-113.
- Winkelstein, J. A. 1981. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 289-298.
- Wolf-Watz, H. y Normak, S. 1976. *J. Bacteriol.* **128**: 580-586.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. 1985. *Gene* **33**: 103-119.
- Young, F. E. 1966. *J. Biol. Chem.* **241**: 3462-3467.
- Young, F. E. y Spizizen, J. 1963. *J. Biol. Chem.* **238**: 3126-3130.
- Zhang, H., Scholl, R., Browse, J. y Somerville, C. 1988. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1220.
- Zigelboim, S. 1980. Tesis Doctoral. Universidad Rockefeller, New York.
- Zuker, M. y Stiegler, P. 1981. *Nucleic Acids Res.* **9**: 133-148.
- Zukowski, M. M., Gaffney, D. F., Speck, D., Kauffmann, M., Findeli, A., Wisecup, A. y Lecocq, J.-P. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1101-1105.
- Zvonok, N. M., Horvath, E. y Bajszar, G. 1988. *Gene* **66**: 313-318.