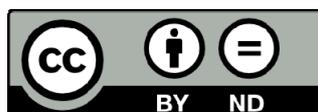




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Proteína inmunodominante P116
del patógeno humano *Mycoplasma pneumoniae*:
un recipiente para el colesterol
y otros lípidos esenciales**

Jesús Martín Romero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0. Spain License.

**PROTEÍNA INMUNODOMINANTE P116 DEL PATÓGENO
HUMANO *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*: UN RECIPIENTE PARA
EL COLESTEROL Y OTROS LÍPIDOS ESENCIALES**

JESÚS MARTÍN ROMERO

Codirigido por

Prof. Ignacio Fita Rodríguez y Dr. David Vizarraga Revuelto



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Programa de Biotecnología

Barcelona, 2022

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA

PROTEÍNA INMUNODOMINANTE P116 DEL PATÓGENO HUMANO *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*: UN RECIPIENTE PARA EL COLESTEROL Y OTROS LÍPIDOS ESENCIALES

Tesis presentada por Jesús Martín Romero, matriculado en el programa de Biotecnología en la Universidad de Barcelona, para obtener el título de Doctor. Se profundiza en la estructura y función de la proteína P116, esencial para el metabolismo de lípidos de *Mycoplasma pneumoniae* y principal diana de la respuesta inmune humoral.

Este proyecto se ha llevado a cabo mediante una beca FPI otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad Español en el grupo de Biología Estructural en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), bajo la supervisión del Profesor Ignacio Fita Rodríguez y el Doctor David Vizarraga Revuelto, y con Josefa Badía Palacín como tutora.

JESÚS MARTÍN ROMERO

IBMB-CSIC



IGNACIO FITA RODRÍGUEZ

IBMB-CSIC



JOSEFA BADIA PALACÍN

Universidad de Barcelona

DAVID VIZARRAGA REVUELTO

CRG (Centro de Regulación Genómica)



*Con el conocimiento se lucha contra la ignorancia
y se abre la esperanza.*

Agradecimientos

El mundo de la investigación es tan apasionante como frustrante. Investigar es un proceso lento cargado de errores y aprendizajes, y realizar una tesis doctoral te lo demuestra de primera mano. Los experimentos siempre suelen llevar más tiempo del que calculas y es habitual que los resultados no sean como se esperaban. Las sorpresas, tanto positivas como negativas, son constantes, y uno tiene que reaccionar rápido y adaptarse, como cualquier ser vivo en la Tierra en general, para seguir adelante y realizar pequeños progresos.

En estos 4 años y medio he aprendido mucho, no solo acerca de ciencia, biotecnología o de *Mycoplasma pneumoniae*, sino también acerca de cómo gestionar mi vida de la mejor manera. A ello han ayudado varias personas que han participado en este tiempo dejando su marca en mí:

En primer lugar, agradecer enormemente al Profesor Ignacio Fita por darme la oportunidad de desarrollar la tesis en su laboratorio y creer en mí desde el principio, aun sabiendo que venía de un campo de la biología ciertamente lejano al de la estructura de proteínas. Tu humildad, honestidad, comprensión y confianza han sido un gran ejemplo, así como el respeto igualitario hacia todos los que te rodean. Siempre estaré agradecido a tu continuo soporte hasta el final y por permitir que realice la tesis.

Agradecer a todos los miembros de CRI2 porque siempre me hicieron sentir como uno más desde el principio, una pequeña familia, aunque solo haya podido experimentar las etapas finales de un lugar que ahora se despide. A Ramiro, que aunque fue una corta estancia, fue de los que más me enseñó y espabiló de primera mano en un principio. A Alicia por su experiencia, consejos y anécdotas de todo tipo, a David Aparicio por sus opiniones y disposición de ayuda. A Rosa, por su paciencia explicándome y enseñándome tantas metodologías, así como por tantos momentos divertidos en el laboratorio y en esas comidas que a veces se nos alargaban más de la cuenta. Hablando de todo tipo de temas en grupo se nos pasaban los minutos volando. A toda la gente de CRI1: Montse, Esther, Sara, Jorge, Mireia, Dani, Adriá, Cristina. Todos siempre habéis tenido una actitud de apoyo y ayuda completa, ha sido un placer teneros de vecinos y compartir tantos momentos de todo tipo. Agradecer a Román, Joan y Laura del servicio de purificación y plataforma de cristalización, por su constante trabajo y disposición de ayuda en todo momento. Teneros cerca ha sido una gran suerte.

En especial agradecer al codirector de esta tesis Dr. David Vizarraga, al cual considero un gran amigo y apoyo. Admiro tu tenacidad a la hora de investigar, creo sin duda que vales para analizar objetivamente todos los resultados y planificar las mejores ideas posibles. Ha sido una suerte compartir estos años contigo y que se me pudiera contagiar un poco de tu entusiasmo hacia un área que para mí era como una jungla desconocida. Y de tu rapidez para todo, algo que siempre viene bien a alguien tranquilo y parsimonioso como yo. No sé si nuestros caminos laborales se volverán a cruzar, pero ten por seguro que por mi parte estaremos siempre en contacto y viéndonos todo lo que se pueda. Espero que todo te vaya genial porque es lo que mereces.

A mis amigos de Madrid, que desde la distancia y en los encuentros siempre son un apoyo, una válvula de escape al estrés, un desahogo y pura diversión. A Zazu, María, Marta, David, Dani, Javi, Abel, Paula, Larry,... un abrazo enorme. Agradecer a Lara, porque ella fue la que me animó y aconsejó empezar una tesis doctoral y probar la investigación más profunda. En parte estoy aquí por tus palabras. A Sam porque en la distancia siempre nos tendremos un enorme cariño. A las amistades de Barcelona, que aunque pocas, son de calidad y han sido un soporte este tiempo, y el motivo probable por el que volveré por estas tierras.

A toda mi familia por su apoyo incondicional, somos pocos, pero unidos. En especial a mi hermano y mis sobrinos, que en la distancia les echo de menos, y siempre es un alivio verles. A mis padres por su soporte constante, ayuda en los malos momentos y por dejarme siempre hacer lo que he creído mejor para mí. Agradecer de corazón a mi prima Aveli por ayudarme con el diseño de la portada de esta tesis, tienes tanta bondad como creatividad.

Me gustaría dedicar esta tesis a mis abuelos. En estos tiempos donde envejecer te aparta inexorablemente de la sociedad, deberíamos todos tener más en cuenta a personas de edad avanzada. Al fin y al cabo, todos (casi todos) vamos a envejecer y morir, y sentirte totalmente excluido hacia el final de tus días no debe ser agradable. Gracias a mis abuelos por su enorme cariño siempre y por creer en mí. Sin vosotros literalmente no estaría vivo. Gracias en especial a mi abuela Avelina, recientemente fallecida, y natural de Fuenlabrada, como yo, con mucho orgullo, porque vivir lejos de tu tierra siempre te hace valorarla más que cuando la tienes cerca.

Abreviaturas

°C	Grado centígrado
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
Å	Angstrom
aá	Aminoácido
AC	Anticuerpo
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CARDS	Síndrome de dificultad respiratoria adquirida en la comunidad
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cúmulo de diferenciación 8
Crio-EM	Crio-microscopía electrónica
Crio-ET o CET	Crio-tomografía electrónica
CTF	Función de transferencia de contraste
dRI	Detector de índice de refracción
e-	Electrón
EC/CE	Colesterol esterificado
EFTEM	Energía de microscopía electrónica de transmisión filtrada
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
FBS	Suero bovino fetal
FC	Colesterol libre
FSC	Correlación de capa de Fourier
g	Fuerza g o fuerza centrífuga relativa
g	Gramo
Gal	Galactosa

gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
Glc	Glucosa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCl-Gua	Cloruro de guanidinio
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDL-[3H]	Lipoproteína de alta densidad marcada con colesterol tritiado
IbpM	Proteína de unión a inmunoglobulina
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IgE	Inmunoglobulina tipo E
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IL-1β	Interleucina-1- β
IL-8	Interleucina-8
Kb	Kilobase
Kd	Constante de disociación
KDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
M	Molar
mART	N-terminal mono-ADP ribosil-transferasa
MALS	Dispersión de luz multiangular
MC	Monoclonal (anticuerpo)
min	Minuto
MgPar	Elementos repetitivos de <i>Mycoplasma genitalium</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MW/PM	Peso molecular
N₂	Nitrógeno
Nap	Complejo de adhesión
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos

NF-κB	Factor nuclear κβ
NLRP3	Receptores antigénicos de la familia de las pirinas
nl	Nanolitro
nm	Nanomolar
nm	Nanómetros
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Marco abierto de lectura
OT	Organela terminal
PAA	Ácido fosfonoacético
PC	Policlonal (Anticuerpo)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
Phe (F)	Fenilalanina
PA	Poliacrilamida
PGA	Ácido poliglicólico
PPI	Suero pre-inmunización
qPCR	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa
RepMps	Elementos repetitivos de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Segundo
SAD	Difracción anómala de una longitud de onda
SARS	Síndrome respiratorio agudo grave
SEC	Cromatografía por exclusión de tamaño
Se-Met	Seleniometionina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SM	Esfingomielina
SPR	Resonancia de plasmón superficial

TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Trp (W)	Triptófano
μg	Microgramos
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
V_e	Volumen de elución
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
WT	Tipo natural

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. Introducción general de los <i>Mycoplasmas</i>.....	2
2. Características de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>.....	6
2.1 Adhesión y estructura de la Organela Terminal.....	7
2.2 Motilidad y modelos de movimiento.....	9
2.3 Nutrición y metabolismo de lípidos.....	10
2.4 División celular.....	11
2.5 Evasión del sistema inmune.....	13
2.6 Patogenicidad.....	16
3. Epidemiología y tratamiento de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	18
3.1 Epidemiología.....	18
3.2 Diagnóstico y tratamiento.....	20
4. Otros micoplasmas del clúster Pneumoniae.....	23
4.1 <i>Mycoplasma genitalium</i>	23
4.2 <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	24
5. Lipoproteínas y proteínas transportadoras de lípidos.....	25
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
1. Lista de equipos utilizados.....	32
2. Lista de materiales.....	33
3. Cultivos bacterianos y vectores de expresión.....	34
4. Procedimientos microbiológicos.....	35
5. Tecnología del DNA recombinante.....	36
6. Métodos de producción y análisis de proteínas.....	39
6.1 Preparación de extractos celulares totales.....	39
6.2 Técnicas cromatográficas de purificación de proteínas.....	39
6.3 Desnaturalización, vaciado y renaturalización de P116.....	40
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	41

6.5 Experimentos de proteólisis limitada.....	41
6.6 Metilación reductora de residuos de lisinas.....	42
7. Métodos biofísicos para la caracterización proteica.....	42
7.1 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	42
7.2 Dispersión de luz en múltiples ángulos – cromatografía de gel filtración (SEC-MALS).....	43
8. Western Blott.....	44
9. Criomicroscopía electrónica (Crio-EM).....	45
9.1 Crio-EM de partícula única.....	45
9.2 Procesamiento de partículas individuales.....	45
10. Aislamiento de HDL y determinación de transferencia de colesterol por radiactividad.....	46
11. Espectrometría de masas.....	47
12. Difracción de rayos X en cristales de proteínas.....	48
12.1 Cristalización de proteínas.....	48
12.2 Floppy-Choppy.....	49
12.3 Microseeding.....	50
12.4 Crioprotección de cristales de proteínas.....	50
12.5 Recogida, procesado y escalado de datos de difracción de rayos X.....	50
13. Resolución de la estructura tridimensional.....	51
13.1 Construcción y refinado de los modelos moleculares.....	51
13.2 Validación de la estructura.....	51
14. Generación de anticuerpos policlonales y monoclonales.....	52
15. Microscopía de inmunofluorescencia.....	53
16. Microcinematografía de lapso de tiempo – Ensayo de inmunoadherencia.....	53
17. Inmunoensayo ELISA.....	54
RESULTADOS.....	55
1. Estructura de la P116.....	55
1.1 Clonaje, expresión y purificación de P116.....	55
1.2 Cristalización de P116.....	59
1.3 Determinación de la estructura de P116.....	61
1.4 Descripción de la estructura de P116.....	64
1.5 Otros constructos de P116 y mutantes.....	73
2. Caracterización de los ligandos de P116.....	79

2.1 Lípidos esenciales fosfatidilcolina y esfingomielina.....	79
2.2 Interacción de P116 con lipoproteínas humanas.....	83
2.3 Detección del traspaso de colesterol libre y esterificado.....	87
3. Localización celular de P116.....	89
4. Implicación en adhesión y motilidad de P116.....	90
5. Proteínas MPN_212 y MPN_161.....	91
6. Inmunoensayo ELISA.....	92
7. Estructura de P116 vacía.....	94
8. Conservación de secuencia de P116 en el clúster Pneumoniae.....	98
DISCUSIÓN.....	99
CONCLUSIONES.....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	110
ANEXO 1. Regiones citoplasmáticas de adhesinas de <i>Mycoplasma genitalium</i>.....	120
ANEXO 2. Microscopía de rayos X sobre células de <i>Mycoplasma genitalium</i>.....	127

RESUMEN

Mycoplasma pneumoniae es una bacteria patógena humana sin pared celular que causa neumonías atípicas y otras infecciones respiratorias. Es una de las pocas especies de procariotas que necesitan lípidos en la integridad de su membrana citoplasmática, los cuales debe captar del medio o de la célula hospedadora debido a que en su genoma no tiene los mecanismos para sintetizarlos. En este proyecto hemos caracterizado la proteína P116 de membrana y altamente inmunogénica, que además es esencial para la supervivencia de las células de *M. pneumoniae*.

A partir de criomicroscopía electrónica (Crio-EM) de partícula única (single particle) se reveló una organización homodimérica para los ectodominios de esta proteína. Cada subunidad consta de un dominio distal N-terminal y un dominio central de dimerización presentando un nuevo plegamiento y estructura bastante novedosa. Una de las características más notables del dominio central de la estructura es una gran cavidad con una superficie interna accesible al solvente, pero completamente hidrófoba. Los aminoácidos que recubren la cavidad están altamente conservados entre las proteínas ortólogas en el clúster taxonómico de *M. pneumoniae*, lo que indica la importancia de la conservación de esta estructura en especies muy emparentadas. En el interior de esta cavidad hidrofóbica se encontró una densidad adicional intensa en el mapa de la Crio-EM, indicando que esta cavidad está llena de moléculas en forma de cadena, lo que explica el exceso de masa (alrededor de 13kDa) determinado para P116 en estas muestras.

Mediante técnicas de análisis molecular cualitativo se determinaron las sustancias que aparecían en la densidad extra del mapa: la espectrometría de masas demostró la presencia de los lípidos esenciales de *M.pneumoniae*, fosfatidilcolina y esfingomielina, unidos a la P116. Las subunidades de P116 vacías se obtuvieron mediante desnaturalización y reconstitución después de un riguroso tratamiento con detergente. Además, se comprobó mediante marcación de colesterol con tritio radiactivo, como tanto colesterol libre como colesterol esterificado incorporado en lipoproteínas de alta densidad (HDL) humanas, se transfiere a P116 cuando se incuban juntas.

La microscopía de fluorescencia con anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra el ectodominio de P116, muestra una distribución ubicua de la proteína sobre toda la superficie del micoplasma. Además, en ensayos de inhibición de adherencia se comprobó que la P116 no tiene un papel relevante en la misma, lo que contrasta con la bibliografía.

Los constructos de P116 que carecen del dominio N-terminal, al expresarse también resultan en dímeros que, en esta ocasión, muestran una reducción del 50% en el reconocimiento antigénico por el suero de pacientes infectados por *M.pneumoniae*. Lo que indica que el dominio N-terminal es altamente inmunogénico y, a pesar de su pequeño tamaño comparado con el dominio central, concentra la mitad de epítomos.

Los resultados reflejados en esta tesis muestran que P116 tiene un papel esencial en la captura y almacenamiento de moléculas lipídicas del ambiente del hospedador para la organización estructural de la membrana y propósitos metabólicos de *M.pneumoniae*.

INTRODUCCIÓN

1.- Introducción general de los Micoplasmas

Los micoplasmas son un género de bacterias pertenecientes al dominio *Eubacteria* del filo *Firmicutes*, basándose en un análisis del ARN ribosómico de la subunidad 16S del ribosoma. Su taxonomía se incluye en la clase *Mollicutes*, un grupo de organismos filogenéticamente relacionado con bacterias grampositivas, careciendo generalmente de pared celular y con tendencia a pequeño tamaño. Las designaciones taxonómicas actuales incluidas en la clase *Mollicutes* comprenden 4 órdenes, 5 familias, 8 géneros y alrededor de 200 especies conocidas que se han detectado en animales vertebrados, artrópodos y plantas (Maniloff, 1992). Dentro de la clase *Mollicutes*, pertenecen al orden *Mycoplasmatales* y a la familia *Mycoplasmataceae*, que consiste en los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Ambos géneros de organismos contienen un genoma muy pequeño y reducido. Actualmente se han identificado **más de 120 especies** del género *Mycoplasma*, siendo *Mycoplasma pneumoniae* una de las especies mejor descritas, responsable de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior en humanos. Otros micoplasmas patógenos humanos importantes son *Mycoplasma genitalium*, patógeno de transmisión sexual de las vías urogenitales y *Mycoplasma hominis*, patógeno que produce infecciones en el tracto genitourinario, en especial en mujeres (trompas de Falopio), e infecciones sistémicas en neonatos (Roca, 2006).

La mayoría de micoplasmas tienen necesidad estricta por un hospedador y alta especificidad por éste dentro de cada especie. Actúan como comensales o parásitos de animales y plantas, aunque **algunos pueden ser también saprófitos** (organismos libres que viven sobre materia orgánica en descomposición) (Ganter, 2019 & Parker, 2018). Se han encontrado en medios terrestres y acuáticos, y se han descrito infecciones de micoplasmas en regiones alrededor de todo el mundo, lo que pone en prueba que estas bacterias están **ampliamente distribuidas por todo el globo** (Kornspan, 2011). Se han encontrado infecciones en todas las clases de vertebrados acuáticos y terrestres, así como en otros grupos invertebrados como los artrópodos. La lista de especies hospedadoras que pueden albergar micoplasmas va aumentando a medida que llegan nuevas identificaciones de especies de los mismos. También se han aislado especies y cepas saprofitas de una serie de hábitats entre los que se incluyen aguas residuales, estiércol, suelo y humus. Para poder continuar con su replicación estas especies viven en ambientes intra y extracelulares donde dependen de fragmentos de células vivas o muertas (Ganter, 2019).

Sus principales características incluyen una forma esférica o de pera, un tamaño mínimo que oscila entre **0,3 y 0,8 micras** (las bacterias y células más pequeñas conocidas si omitimos la cuestionable existencia de las nanobacterias (Altundag, 2021), el pequeño tamaño de sus genomas que oscila entre **500-1400kb** (entre sus especies se encuentran los seres vivos conocidos con el menor genoma), la

baja cantidad de guanina y citosina en el DNA genómico (20-40% de media entre especies) y la **ausencia de pared celular** (Garnier, Foissac et al. 2001).

Los estudios de secuencias de ARNr 16S sugieren que los micoplasmas están más estrechamente relacionados con el subgrupo de eubacterias grampositivas que incluye bacilos, estreptococos y lactobacilos. Según Maniloff, Mollicutes se separó de la rama Streptococcus de bacterias grampositivas con bajo contenido de G+C y genomas bacterianos relativamente pequeños hace unos 600 millones de años. Ahora se cree que sus pequeños genomas son el resultado de una reducción gradual en el tamaño del genoma de un ancestro común en un proceso conocido como **evolución degenerativa**. La naturaleza de la presión selectiva que condujo a la evolución de Mollicutes no se conoce con precisión (Schmidl, 2010)

Debido al pequeño tamaño de sus genomas los micoplasmas tienen **capacidades biosintéticas muy limitadas**. A través de la evolución de las diferentes especies de micoplasmas, **muchas rutas metabólicas se han perdido**, como la capacidad de sintetizar aminoácidos, cofactores, ácidos nucleicos y diversos lípidos, entre otras moléculas. Los micoplasmas necesitan obtener la mayoría de nutrientes del hospedador que colonizan o, en laboratorios, de medios complejos enriquecidos con todas las sustancias que los micoplasmas no pueden sintetizar para poder crecer (Roca, 2006).

A diferencia del resto de bacterias grampositivas, los micoplasmas **no poseen pared celular**, por lo que requieren de un **fuerte citoesqueleto** compuesto de fibras que mantenga y module la forma y estructura de la célula. La ausencia de pared también los hace muy sensibles a sustancias como alcoholes, detergentes o lisis por choque osmótico pero, a su vez, les otorga resistencia frente a los antibióticos de la familia β -lactámicos (inhiben la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared celular). La ausencia de pared hace que la membrana de estos microorganismos esté recubierta de una gran cantidad de lipoproteínas, glicolípidos, lipoglucanos, colesterol y de una serie de proteínas ancladas a membrana involucradas en la adhesión, variación antigénica, movimiento y transporte de metabolitos (Razin, 2010).

El hecho de carecer de pared celular tiene una serie de ventajas que contribuyen a la supervivencia y éxito de estas especies. **Viven en medios intra o extracelulares controlados osmóticamente por las células hospedadoras**, por lo que no es un problema no disponer de pared celular. Al tener solo membrana plasmática es **más fácil ajustar su forma y tamaño** para optimizar la eficiencia de movilidad y acceso a nutrientes una vez en el interior de sus hospedadores. In vivo se ha visto cómo **pueden cambiar su forma desde esférica hasta filamentosa**, con todos los estados intermedios presentes. Ésto permite también su buena adaptación a diferentes medios (Razin, 1998).

Aunque estos organismos pueden prosperar dentro de un ambiente osmóticamente estable, son extremadamente **susceptibles a la desecación**, un hecho que tiene un gran impacto en la necesidad de un manejo adecuado de las muestras clínicas de las que se intentará el aislamiento cultural. También elimina la posibilidad de infección aérea a distancia, ya que no pueden sobrevivir en el exterior (Roca, 2006).

Otra característica que hace únicos a los micoplasmas entre otras bacterias, es su necesidad de utilizar **esteroides** para regular la fluidez de su membrana celular, lo cual se hace incorporando grandes

cantidades de colesterol externo, ya sea captando desde las células hospedadoras o usando los suplementos del medio utilizado para su crecimiento *in vitro*. Además, los micoplasmas usan un **código genético alternativo** en el cual el codón UGA codifica para triptófano en lugar de para un codón STOP. Ésto provoca que trabajar con proteínas de micoplasma sea ciertamente laborioso cuando se necesitan expresar de forma recombinante en un vector como *Escherichia coli*, ya que los tripletes UGA para triptófano han de ser mutados (Inamine, 1990).

A pesar de todas estas limitaciones, los reducidos genomas de micoplasmas han atraído la atención de la comunidad científica que intenta identificar el mínimo genoma necesario para la vida. El concepto de genoma mínimo está basado en la idea de que un genoma puede reducirse a un mínimo conjunto de genes suficientes para sustentar todas las rutas metabólicas biológicas dentro de una célula sintética viable, **eliminando todos los genes no esenciales** mientras se mantienen aquellos esenciales para el metabolismo y la replicación. Así, la mayor parte de genes son destinados a la producción de energía para la célula. (Lluch-Senar, 2015)

Las infecciones de micoplasmas en animales suelen producirse mediante secreciones respiratorias, por contacto directo como el transplacentario o mordeduras y a través de aerosoles en medio aéreo. Además, la transmisión a través de artrópodos como **vectores** está extendida, como es el caso de *Mycoplasma haemofelis* entre felinos. Sin embargo, ningún **micoplasma fitopatógeno** puede ser transmitido por vía mecánica de planta a planta ni por las semillas. Si una planta es infectada por micoplasmas, su descendencia estará libre de esta infección (Garnier, 2001). Entre las plantas las infecciones se ocasionan debido a insectos chupadores y picadores como los homópteros, que ejercen de vehículo. Estos insectos aspiran la savia elaborada del floema de una planta enferma, reteniendo los micoplasmas que contiene. La transmisión de micoplasma es del tipo circulante y persistente. Ésta no se efectúa hasta después de un periodo de latencia que corresponde a la circulación y a la multiplicación en el insecto. Así, el vector queda infectado toda su vida. Los síntomas provocados en plantas son muy variados, desde amarillamiento a perturbaciones en morfología de las flores, enanismo, polifilia, etc. Estos síntomas resultan básicamente de perturbaciones de funciones floémicas, donde se modifica el transporte y la transferencia de moléculas esenciales para el desarrollo y sales minerales, modificación de acción de los factores de crecimiento y de desarrollo (fitohormonas) (Garnier, 2001)

En primer lugar, para que se desarrolle una infección por micoplasmas parásitos, éstos necesitan adherirse a células de su hospedador. Este proceso involucra el uso de un sistema de proteínas de adhesión principales y auxiliares. El micoplasma hace contacto con la célula diana, la cual puede ser de casi cualquier tipo. El inicio de la infección implica la **adherencia a las células de un tejido específico** del hospedador donde los micoplasmas se multiplican y pueden persistir durante largos periodos de tiempo. Una vez llevado a cabo el proceso de adhesión, se desencadenan una serie de procesos patogénicos que pueden ser muy variados (Razin, 1996).

Una vez adherido al tejido hospedador, los microtúbulos del parásito se extienden y penetran la célula del hospedador. Ésto permite al organismo obtener varios metabolitos como colesterol, glucosa y aminoácidos entre otros. En este proceso es donde causa daño a las células hospedadoras.

Comúnmente los micoplasmas se encuentran alrededor de las membranas plasmáticas de la célula hospedadora, pero en ocasiones también **pueden penetrar en el interior de su citoplasma**, con muy pocas evidencias de casos donde puedan penetrar en el interior de la membrana nuclear (Priscilla, 2008). Ya sea como parásitos intra o extracelulares, se ha demostrado que pueden causar daño inflamatorio o secretando exotoxinas entre otros (Young, 2010).

Algunos micoplasmas tienen capacidad de motilidad gracias a proteínas de membrana que funcionan como adhesinas además de una compleja estructura en uno de los extremos del cuerpo. Varias especies de micoplasmas pueden **deslizarse hacia delante** gracias a esta protrusión del citoesqueleto compuesta por varias proteínas que conectan con la superficie y dirigen el movimiento (Waites, 2004).

Los micoplasmas son capaces de **fermentar** sustancias disponibles para producir ATP. Poder generar su propia fuente de energía les da cierta independencia, pero son dependientes de sus hospedadores para varias funciones metabólicas, ya que **han perdido el uso de su cadena de transporte de electrones (ETC)**. La respiración se consigue a través de fermentación (anaeróbicamente) sin el uso de la ETC (Großhennig, 2013). Cabe destacar que la mayoría de los micoplasmas viven en el hospedador como **comensales** de los epitelios de las mucosas, sin causar prácticamente daños sobre el organismo donde se desarrollan (Roca, 2006)

2.- Características de *Mycoplasma pneumoniae*

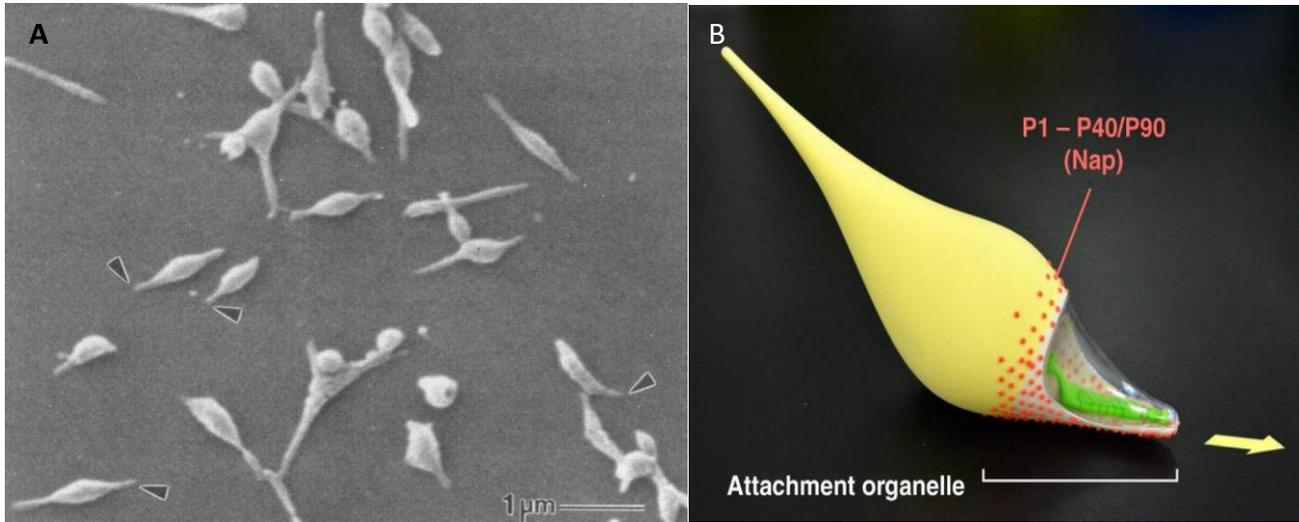


Figura 1.1 A. Micrografía electrónica de barrido de células de *M. pneumoniae*. Se muestran micoplasmas completos, con las organelas terminales indicadas por puntas de flecha (Waites, 2004). B. Modelo impreso en tres dimensiones de una célula de *M. pneumoniae*, destacando la localización de la Organela Terminal, los Naps superficiales en rojo y la dirección del movimiento de deslizamiento. (Vizarraga, 2020)

M. pneumoniae es un patógeno humano responsable de infecciones del **tracto respiratorio** superior e inferior. Es el **representante más característico** del cluster Pneumoniae de micoplasmas, donde también se encuentran *M. genitalium* y *Mycoplasma gallisepticum*. Este cluster está formado por ocho especies agrupadas en base a la similitud en sus secuencias de ARNr y de la presencia de una **Organela Terminal (OT)**. Se estima que esta bacteria es responsable de hasta el 40% de las neumonías adquiridas en la comunidad en personas de todas las edades. Además de ser un patógeno respiratorio grave, puede inducir manifestaciones clínicamente significativas en sitios extrapulmonares y/o efectos inmunológicos en hasta el 25 % de las infecciones (Williams, 2018).

M. pneumoniae parasita exclusivamente a humanos, mientras que otros micoplasmas humanos también se han detectado en primates (Jun He, 2016).

Tiene forma de pera alargada y su tamaño es de 1-2 μm de largo y 0.1-0.2 μm de ancho, con una morfología en la que pueden diferenciarse cuatro partes: **botón, cuello, cuerpo y cola**. Se une a las células diana del huésped por medio de una estructura polar, que forma el botón y el cuello, conocida como OT y se desliza en la dirección de esta estructura diferenciada a una velocidad de aproximadamente 1 μm/s (ver Figura 1.1). La motilidad deslizante en *M. pneumoniae* y especies emparentadas, como *M. genitalium*, es causada por un mecanismo único completamente diferente

de la motilidad de *Mycoplasma mobile*. La adherencia de *M. pneumoniae* a las células del tracto respiratorio está mediada por una red de adhesinas y proteínas accesorias de citoadherencia.

El genoma de *M. pneumoniae* se secuenció por completo en 1996 y consta de 816.394 pb con 687 genes, de los cuales el 57% son considerados esenciales (Lluch-Senar, 2015). Por comparar con una bacteria conocida, el genoma de *E. coli* comprende 4.600.000 pb y alrededor de 4.300 genes, lo que lo hace más de cinco veces más grande que el de *M. pneumoniae*.

Las colonias típicas de *M. pneumoniae* rara vez superan los 100 µm de diámetro cuando se cultivan en un medio enriquecido como el agar SP4 y requieren un examen bajo un microscopio estereoscópico para visualizar sus características morfológicas (Kornspan, 2011).

2.1.- Adhesión y estructura de la Organela Terminal

Debido a que *M. pneumoniae* es principalmente un patógeno extracelular que depende de una estrecha asociación con las células hospedadoras para sobrevivir, ha desarrollado un orgánulo de unión complejo y especializado para facilitar su existencia parasitaria, como lo demuestra la microscopía electrónica.

Este orgánulo de unión denominado **OT** consta de una estructura de punta especializada con un núcleo formado por un **filamento central denso** en forma de varilla rodeado por un espacio claro que está envuelto por una extensión de la membrana celular del organismo. La estructura de la punta es una red de adhesinas, proteínas interactivas y proteínas accesorias de adherencia que cooperan estructural y funcionalmente para movilizar y concentrar las adhesinas en la punta del organismo (Razin, 2010).

Mediante crio-microscopía electrónica (crio-EM) se han identificado **tres regiones** en la OT:

- 1) **Botón terminal**: Zona más próxima a la membrana y que sugiere ser la encargada de transmitir la información del exterior del micoplasma. Se encuentran proteínas como la P65 y HMW3.
- 2) **Zona electrodensa**: Zona central alargada, de unos 300 nm de longitud, encargada de conectar las otras dos partes de la OT. Su función se considera principalmente estructural, aunque en ella se han encontrado proteínas (HMW1 y HMW2) con motivos de unión a ATP relacionadas con adhesión y movimiento.
- 3) **Complejo rueda**: Zona próxima al cuerpo del micoplasma y posiblemente la encargada de transmitir la información entre la OT y el resto del cuerpo del micoplasma. Se encuentran proteínas como la P200 y P41.

Además de esas tres regiones, anclado a la membrana de la OT del micoplasma existe un complejo denominado Nap, formado principalmente por las adhesinas P1 y P40/P90 y probablemente también por otras proteínas.

Los componentes asociados a la membrana son los que juegan un papel fundamental en la adhesión y, sobre todo, las adhesinas son las encargadas de realizar esta función. Se ha demostrado que la

pérdida de adherencia de *M.pneumoniae* resulta en la ausencia de infectividad (Razin, Yogev et al. 1998).

La pérdida de actividad de P1 por mutación espontánea o por tratamiento con tripsina da como resultado avirulencia por adherencia reducida de micoplasmas a células eucariotas (Williams, 2018). La reversión espontánea al fenotipo citoadherente se acompaña de la reaparición de las proteínas implicadas, la restauración del Nap estructural y funcionalmente y el retorno de la infectividad total. Otra prueba del papel funcional de P1 como adhesina proviene de la evidencia de que los anticuerpos monoclonales contra P1 bloquean la adherencia en un modelo de hámster con enfermedad respiratoria por micoplasma, mientras que los anticuerpos producidos contra algunas otras proteínas de *M. pneumoniae* no tienen efecto sobre la adherencia (Krause, 1983)

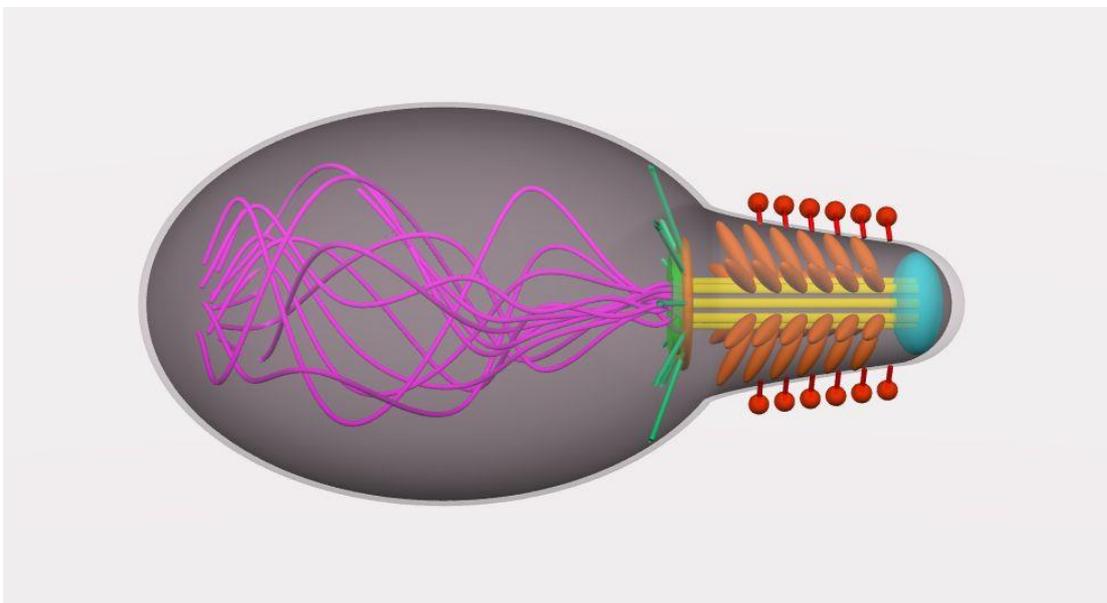


Figura 1.2. Un modelo del citoesqueleto de *Mycoplasma pneumoniae*, que muestra algunas de las estructuras proteicas clave implicadas en la adhesión y motilidad deslizante. El botón terminal (azul) con un núcleo central de túbulo conectados a él que se extienden a lo largo de la OT (amarillo). Filamentos radiales(naranja) conectan este núcleo del túbulo a la membrana celular. En la base del núcleo electrodenso, éste se conecta al complejo rueda (verde y naranja) conectado a la membrana celular por filamentos radiales (bastones verdes) y a los filamentos del citoesqueleto que atraviesan el cuerpo celular (magenta). Algunas de las proteínas de adhesión que recubren el exterior de la membrana de la OT (bolas y bastones rojos) (Gregory, 2006).

Estudios in vivo han demostrado que *M. pneumoniae* se une a la superficie de las células hospedadoras mediante la unión a moléculas de **ácidos siálicos** a través del Nap, ya que al eliminarlos mediante neuramidasa la adhesión del micoplasma se reduce drásticamente. Los ácidos siálicos son oligosacáridos hidrofílicos cargados negativamente y uno de los principales constituyentes de muchos de los oligosacáridos, glicoproteínas y glicolípidos de las membranas de las células eucariotas y de las mucosas. La **adhesina P40/P90 se ha demostrado que es la principal encargada en la adhesión a estos ácidos siálicos** a través de un bolsillo (Vizarraga, 2020). En concreto puede unirse al tipo α -2,3

y α -2,6, pero solo la unión a los ácidos siálicos α -2,3 permite el deslizamiento de *M. pneumoniae* (Williams, 2018)

La expresión de la adhesina P1 por sí sola no es suficiente para mediar la adherencia de *M. pneumoniae* a ciertas células hospedadoras y se necesita la actividad cooperativa de otras proteínas (Rottem, 2003). P30 es una de varias proteínas adicionales que se han implicado en el proceso de adherencia, según el conocimiento de que los anticuerpos desarrollados contra P30 pueden bloquear la hemadsorción de *M. pneumoniae* (Krause, 1983 & Seto, 2005). Balish y Krause (Relich, 2011) sugirieron recientemente que P30 puede estar involucrado en la motilidad deslizante, así como en la coordinación de la división celular con la biogénesis de la OT.

Entre las proteínas involucradas en el proceso de adhesión se encuentran sobre todo P1 y P40/P90, componentes del Nap, y P30 como proteína auxiliar de la adhesión. Un estudio llevado a cabo en *M. pneumoniae* demuestra una relación estrecha con P1 y P65, lo que sugiere que P30 pudiera participar en el movimiento y adhesión llevado a cabo por P1 y/o un papel en la transmisión de la información entre el exterior y el interior del micoplasma (Relich, 2011).

En varias ocasiones también se ha citado a la **proteína P116** de superficie como adhesina, ya que anticuerpos contra esta proteína parece que han inhibido la adhesión. También se ha encontrado que es una importante proteína **inmunorreactiva** y su gen MPN213 está codificado en un operón junto con la proteína MPN212 (Drasbek, 2004). La secuenciación del gen de 3093 pb reveló dos ORF que codifican una proteína de 16 kDa (MPN212) y una de 116 kDa (P116). Es un antígeno de superficie sensible a la tripsina y teóricamente implicada en la citoadherencia de *M. pneumoniae* al epitelio de las vías respiratorias(x). Las ubicaciones de los genes de *M. pneumoniae* G07_orf1030 y G07_orf135 mostraron homología con los genes MG074 y MG075 de *M. genitalium* que están en el mismo orden y en la misma orientación transcripcional (Duffy, 1997). Se ha demostrado que P116 recombinante es antigénica a través de ensayos ELISA y en análisis de inmunotransferencia utilizando sueros de pacientes (Svenstrup, 2002). El anticuerpo anti-P116 impidió la unión de *M. pneumoniae* a las células HEp-2 independientemente de P1. Estos resultados indicaron que P116 es una proteína **expuesta a la superficie e implicada en la adhesión directa o indirectamente** (Chaudhry, 2007 & Tabassum, 2010)

2.2.- Motilidad y modelos de movimiento

Ciertas especies de micoplasmas, en particular todas las pertenecientes al cluster Pneumoniae, son capaces de desplazarse. No obstante, los micoplasmas no poseen motores moleculares dedicados al movimiento como pueden ser los flagelos, los cilios y otros dispositivos presentes en muchas bacterias, por lo que debe tratarse de otro componente el que realice dicha función (Mayer, 2003 & Miyata, 2004). En *M. pneumoniae*, se ha demostrado que tanto P1 como P30 están involucradas en el movimiento del micoplasma. Así pues, proteínas que están localizadas en la OT se han identificado como objetivos directos que afectan al deslizamiento del micoplasma, lo que indicaría que **esta**

protuberancia, aparte de tener un efecto sobre la adhesión, también coordinaría el movimiento del micoplasma. El mecanismo exacto de motilidad aún no se conoce con detalle.

Se ha demostrado que *M. pneumoniae* se une y se desliza sobre el vidrio y otras superficies sólidas, con el organismo moviéndose con la OT en el extremo delantero.

Se conocen dos tipos de modelos de movimiento para los micoplasma, el modelo ciempiés descrito para *M. mobile*, el cual se basa en el movimiento de un ciempiés y el modelo oruga descrito para los micoplasmas del cluster pneumoniae, el cual se basa en un deslizamiento como si fuera una oruga (Miyata, 2007).

En el **modelo de oruga** propuesto para *M.pneumoniae* la OT se extiende y luego se adhiere a la superficie a través de las proteínas de adhesión mientras que el núcleo electrodenso de los túbulos se contrae, transmitiendo fuerza al resto del citoesqueleto a través del complejo rueda, tirando del cuerpo celular hacia adelante. El micoplasma puede alcanzar velocidades de **0.3-0.5 $\mu\text{m/s}$** mediante este mecanismo (Gregory, 2006).

2.3.- Nutrición y metabolismo de lípidos

M. pneumoniae posee **actividades biosintéticas y metabólicas muy limitadas** para proteínas, carbohidratos y lípidos en comparación con las bacterias convencionales. Al igual que otros mollicutes, busca precursores de ácidos nucleicos y aparentemente no sintetiza purinas ni pirimidinas de novo (Razin, 1998). Durante muchos años se ha sabido que la fermentación de glucosa a ácido láctico por medio de la fosforilación del sustrato efectuada por ácido fosfoglicérico quinasa y piruvato quinasa es un medio por el cual *M. pneumoniae* genera ATP (Werner, 2010).

Los micoplasmas son **capaces de sintetizar fosfolípidos y glicolípidos**, aunque ésto representa un gasto elevado de energía, por lo que en general los lípidos también se obtienen exógenamente. La mayoría del genoma del micoplasma tiene como finalidad la producción de adenosín trifosfato (ATP) por la fermentación principalmente de glucosa a ácido láctico y acético o, alternativamente, a partir de pequeños carbohidratos o glicerol (Großhennig, 2018).

Desde hace más de 40 años se ha comprobado como *M.pneumoniae*, al igual que otras especies de micoplasmas, **necesitan captar grandes cantidades de fosfolípidos y colesterol exógenos para poder desarrollarse** (Razin, 2010 & Morrison-Plummer, 1986). Se examinó que en células en crecimiento activo la captación de estos lípidos se intensificaba, mientras que cuando se inhibía el crecimiento descendía mucho la capacidad de captación de lípidos. Se discute la posibilidad de que el contacto entre los donantes de lípidos y la membrana del micoplasma involucre receptores específicos que están mejor expuestos en células en crecimiento activo (Razin, 1980).

La membrana del micoplasma se compone de aproximadamente dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos y contiene varias lipoproteínas que se sabe que regulan las respuestas inmunitarias del hospedador. Se han confirmado varios efectos inmunomoduladores, tanto activadores como

evasivos, de estas lipoproteínas de micoplasma sobre el sistema inmune del hospedador (Christodoulides, 2018).

Así, la membrana plasmática interactúa directamente con los donantes de lípidos exógenos, ya que la síntesis de lípidos endógenos está muy restringida. En específico se comprobó como la **fosfatidilcolina** y **esfingomielina** son dos lípidos esenciales que el micoplasma debe captar, así como colesterol libre y esterificado. Se plantea la hipótesis de que *M.pneumoniae* (y otras sps. de micoplasmas) tienen **receptores para lipoproteínas séricas** y vesículas de fosfolípido-colesterol que facilitan la transferencia de colesterol y fosfolípidos a la membrana celular en crecimiento (Gaspari, 2020).

Se encontró como el tratamiento suave con tripsina sobre células de micoplasma en crecimiento disminuyó su capacidad de absorción de colesterol en aproximadamente un 50 %, respaldando la existencia de receptores proteicos para las lipoproteínas en la superficie de micoplasmas (Razin, 1982).

Además, en varios experimentos de crecimiento in vitro de *M. pneumoniae* los micoplasmas podían captar estos lípidos esenciales directamente de lipoproteínas de suero humano con igual eficacia en su desarrollo que en medios suplementados con sueros especiales conteniendo estos lípidos (Slutzky, 1976 & Washburn, 1979).

En un estudio clínico se reportó una prevalencia inusualmente mayor de *M. pneumoniae* por pruebas serológicas (36,1%) y PCR (43,3%) en pacientes con aterosclerosis. Aunque la hipótesis de la asociación de *M. pneumoniae* y la acumulación de placas en las arterias del corazón (CAD) aún no se ha probado, la prevalencia inusualmente alta de *M. pneumoniae* en pacientes con CAD indica una asociación, si no, en el desarrollo de aterosclerosis. La posible contribución de *M. pneumoniae* al proceso de aterosclerosis, especialmente en la presencia de infecciones con altas cargas, parece que podría ir relacionado, pero se requieren estudios más amplios que establezcan una relación firme (Yang, 2021 & Nussinovitch, 2010).

2.4.-División celular

La reproducción en micoplasmas es asexual y ocurre mediante **fisión binaria** o por división desigual (**gemación**), donde se originan nuevas células a partir de protuberancias de la célula madre (Mayer, 2003). Esta división comienza con la **replicación del ADN** que comienza en el sitio cerca del gen dnaA. Después de la replicación, los cromosomas migran a los polos opuestos de la célula antes de que la célula se divida, asegurando así que cada una de las células hijas contenga el material de ADN adecuado (Seto, 2001).

Un estudio in vivo con proteínas de la OT de *M. pneumoniae* marcadas con fluorescencia mostró que la duplicación de la OT se produce inmediatamente antes que la citoquinesis, es decir, antes que se de la división de las células, y que los procesos de adhesión y deslizamiento son fundamentales en la división celular ya que ayudan a separar las dos OTs de las células hijas (Miyata, 2006).

Después de la división celular, cada una de las células hijas contiene material genético de la progenitora, así como citoplasma y ribosomas. En los casos en que se inhibe la replicación, se ha demostrado que las células comienzan a ramificarse.

Se reproduce por fisión binaria, ligada temporalmente con la duplicación de la OT, que migra al polo opuesto de la célula durante la replicación y antes de la separación del nucleoide.

En algunos casos, *M.pneumoniae* producen cuerpos elementales que se forman como brotes en la superficie de las células madre. Estos cuerpos elementales, que tienen menos de 180nm (algunos pueden tener un diámetro de hasta 400nm) se asemejan a partículas de virus que son infecciosas y permiten que continúe el ciclo de vida del patógeno (Gregory, 2006).

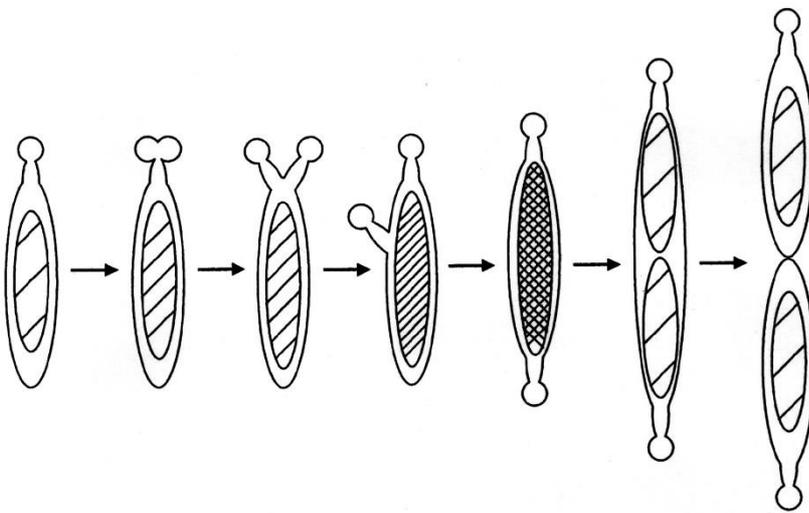


Figura 1.4. Esquema propuesto para la división celular y la duplicación de la estructura de unión terminal en *M. pneumoniae*. (Seto, 2001)

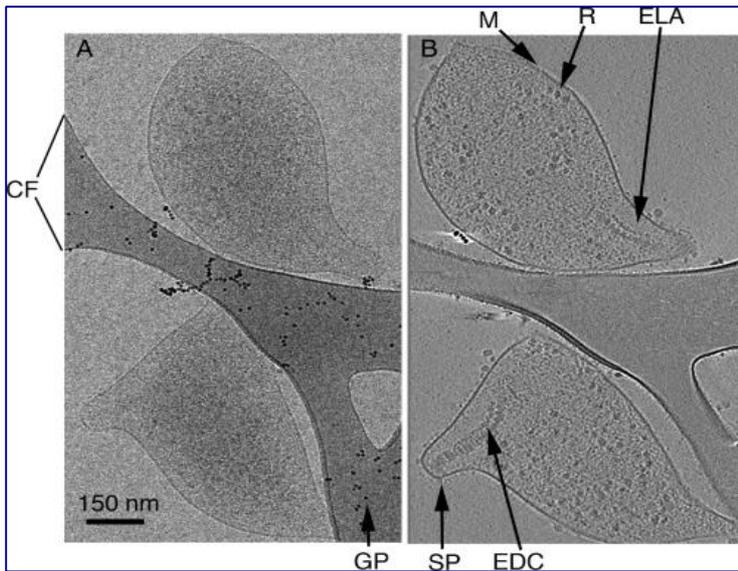


Figura 1.5. Micrografía electrónica y reconstrucción tomográfica de una célula de *M. pneumoniae* en división. A) Un ejemplo de imagen de proyección inclinada de la serie de inclinación de una sola celda hidratada congelada. La célula parece a punto de dividirse y se estira sobre la película de carbono de la rejilla. B) Un corte central de 15nm a través de la reconstrucción tridimensional de la misma celda perpendicular al haz. Los complejos macromoleculares individuales son visibles, incluidos los dos núcleos densos en electrones de la célula. CF, película de carbono; EDC, núcleo denso en electrones; ELA, área electrolúcida; GP, partícula de oro; M, membrana; R, partícula similar a un ribosoma; SP, proteínas de superficie. (Krause, 2018)

2.5.- Evasión del sistema inmune

Muchas especies de micoplasmas que infectan a animales son conocidas por su capacidad para inducir **enfermedades crónicas** en las que es extremadamente difícil eliminar el organismo. Por lo tanto, estos organismos deben haber desarrollado medios por los cuales puedan evadir o modular con éxito la respuesta inmune del hospedador (Ganter, 2019).

M. pneumoniae posee proteínas y glicolípidos antigénicos en su superficie que provocan respuestas de anticuerpos en individuos infectados (Krause, 1982). La proteína P1 es el objetivo de muchos de los anticuerpos que produce el hospedador en respuesta a la infección, y también se ha utilizado como diana para el desarrollo de ensayos serológicos (Seto, 2005). Después de una infección inicial, el sistema inmune normal responde produciendo rápidamente anticuerpos que alcanzan su punto máximo después de 3 a 6 semanas, seguidos de una disminución gradual durante meses o años. Como resultado del largo período de incubación, la respuesta de anticuerpos suele ser evidente cuando aparecen los síntomas. La elevación de IgMs específicas de *M. pneumoniae* a menudo se puede interpretar como evidencia de infección aguda, ya que estos anticuerpos generalmente aparecen dentro de la primera semana de la infección inicial y aproximadamente 2 semanas antes de que aparezcan anticuerpos IgG (Jun He, 2016).

M. pneumoniae tiene **múltiples estrategias** para escapar de las respuestas inmunitarias del hospedador a fin de garantizar la supervivencia del patógeno. Las respuestas inmunitarias inadecuadas contra el patógeno invasor dan como resultado una proliferación descontrolada y daños en los tejidos del hospedador. Algunos de estos métodos:

1.- Mimetismo molecular. Los patógenos que comparten una relación estructural con su hospedador se toleran como propios, al igual que los constituyentes del hospedador [xxx]. La mímica molecular se basa en la **generación de posibles epítomos antigénicos en el micoplasma que también existen en las células del hospedador**, lo que conduce a la activación de células T autorreactivas específicas para el autoantígeno correspondiente [Atkinson, 2008]. El antígeno de *M. pneumoniae* imita los componentes de la célula hospedadora, por lo que la respuesta inmunitaria del hospedador inducida por el patógeno provoca respuestas autoinmunes y lesiones en múltiples órganos. Por ejemplo, la región C-terminal de las proteínas P1 y P30 en *M. pneumoniae* muestran altos niveles de homología con la troponina, las proteínas del citoesqueleto, la queratina y el fibrinógeno del hospedador [Waites, 2004]. Los anticuerpos producidos en respuesta a las infecciones por *M. pneumoniae* se dirigirán a varios tejidos del hospedador y formarán complejos inmunitarios, lo que **agrava la respuesta autoinmunitaria** y provoca lesiones inflamatorias en los tejidos extrapulmonares (Kannan, 2006).

2.- Variación antigénica. La variación de los antígenos de superficie se ha observado en las adhesinas P1 y P40/P90, mostrando diferentes variaciones en su secuencia (Vizarraga, 2020). Se demostró el intercambio de genes entre secuencias de ADN homólogas (**RepMP**) en *M. pneumoniae* (Williams, 2018). Las RepMP son **secuencias repetitivas** presentes en genes que codifican proteínas de superficie como las adhesinas. La recombinación homóloga entre estas secuencias de RepMP **genera cambios de secuencia** dentro de los genes de estas proteínas, lo que da como resultado variaciones de las adhesinas de superficie y facilita la evasión de la vigilancia inmunitaria del hospedador [xxx]. Una diferencia entre *M. pneumoniae* y *M. genitalium* es que tanto P1 como P40/P90 presentan más copias para variar su secuencia (o genoma) con respecto a sus ortólogas, P140 y P110, lo que hace a *M. pneumoniae* poseer un método de evasión más sofisticado (Nakane, 2015) Además, tanto en *M. pneumoniae* como *M. genitalium* estas secuencias RepMPs que afectan a P1/P140 permiten clasificar a la población de micoplasmas de cada especie (Williams, 2018).

El papel de las modificaciones postraduccionales de algunas proteínas de *M. pneumoniae* (p. ej., P1, P40-P90) es un aspecto relativamente nuevo de la epigenética bacteriana. La modificación postraduccionales de las proteínas de citoadherencia por parte de la proteína quinasa PrkC es esencial para el desarrollo y la función de la OT. La adhesina P1 está sujeta a un extenso procesamiento posterior a la traducción formando 22 proteoformas, que son formas moleculares específicas de un producto proteico que surge de un gen específico. Cada una de las proteoformas retiene la capacidad de unirse a las moléculas hospedadoras o a sus imitadores estructurales y son accesibles desde la superficie (Jun He, 2016 & Hakim, 2021). Hay muchas cuestiones que requieren más estudio, como si las variaciones de antígeno causadas por modificaciones postraduccionales pueden afectar la patogenicidad de *M. pneumoniae*.

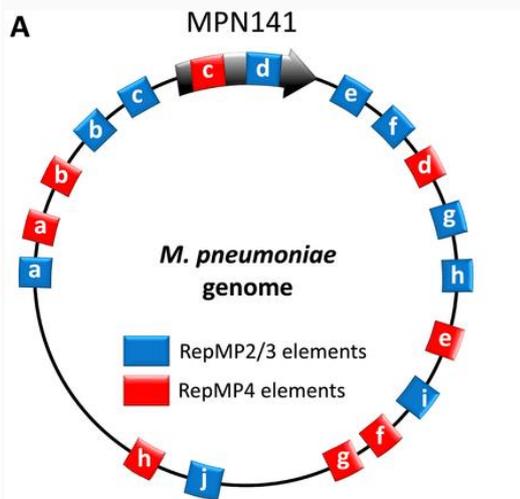


Figura 1.3. Elementos repetitivos en el genoma de *Mycoplasma pneumoniae*. **A** El gen P1 (ORF MPN141) de *M. pneumoniae* contiene dos elementos de ADN variables, RepMP2/3 y RepMP4. Múltiples variantes de elementos RepMP2/3 y RepMP4 están dispersas dentro del genoma de *M. pneumoniae*. Hay diez variantes de RepMP2/3 y cada variante está etiquetada de 'a' a 'j' en azul. Para RepMP4, hay ocho variantes y cada variante está etiquetada de 'a' a 'h' en rojo (Figura adaptada de Hakim, 2021).

3.- Inmunomodulación. Se ha observado que en algunas especies de micoplasmas existen proteínas capaces de unirse a inmunoglobulinas del tipo A (IgA) humanas y no humanas y escindirlas (Kapatais-Zoumbos, 1985). La proteína de unión a inmunoglobina (IbpM) es una proteína de superficie codificada por MPN400 que se une fuertemente a varias inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) producidas por el hospedador. Blötz demostró que *M. pneumoniae* requería IbpM para producir efectos citotóxicos en las células hospedadoras y, por lo tanto, se considera un factor virulento (Blötz, 2020).

Se ha detectado como *Mycoplasma hyopneumoniae* puede **secuestrar el factor H del complemento** del sistema inmune de tal manera que se presenta como un tejido hospedador y, por lo tanto, escapan del ataque del complemento. *M. hyopneumoniae* se une al factor H a través de proteínas de unión al factor H, como el factor de elongación termoinestable (EF-Tu). La unión del factor H ocurre de manera multifactorial; el factor H no solo es aprovechado por *M. hyopneumoniae* a través de su actividad reguladora para ayudar a los micoplasmas a escapar de la destrucción del complemento, sino que también aumenta la adhesión de *M. hyopneumoniae* a las células epiteliales traqueales porcinas, en parte a través del EF-Tu (Yanfei, 2020). Mientras tanto, la alta identidad de secuencia entre las proteínas EF-Tu en los micoplasmas mencionados anteriormente implicaba la universalidad del mecanismo. Este es el primer informe de que los micoplasmas pueden escapar de la destrucción del complemento al unirse al factor H (Józsi, 2017).

4.- Supervivencia intracelular. Los micoplasmas se conocen principalmente como patógenos de las mucosas que residen extracelularmente en las superficies epiteliales. Sin embargo, durante los últimos años, se ha demostrado el potencial de varias especies de micoplasmas para **fusionarse y**

entrar en células hospedadoras que normalmente no son fagocíticas (Priscilla, 2008). Ésto no sorprende que ocurra con microorganismos que carecen de una pared celular rígida que normalmente están estrechamente asociados con las superficies de las células hospedadoras. Las células de *M. pneumoniae* intracelulares tiene mecanismos para protegerse contra la fagocitosis y los antibióticos. Esto puede explicar por qué la infección por *M. pneumoniae* puede convertirse en una enfermedad pulmonar crónica, como la neumonía refractaria resistente a los macrólidos, debido a la falta de un tratamiento antibiótico oportuno y eficaz. Una existencia intracelular que secuestre a *M. pneumoniae* podría facilitar el establecimiento de estados latentes o crónicos, eludir los mecanismos inmunitarios micoplasmicidas, facilitar su capacidad para cruzar las barreras mucosas y obtener acceso a los tejidos internos. La fusión de la membrana de la célula del micoplasma con la del hospedador también puede provocar la liberación de varias enzimas hidrolíticas producidas por el micoplasma, así como la inserción de componentes de la membrana del micoplasma en la membrana de la célula hospedadora, un proceso que podría alterar potencialmente los sitios de reconocimiento del receptor y afectar a la inducción y expresión de citoquinas (Gregory, 2006). En la actualidad, se desconoce hasta qué punto *M. pneumoniae* invade y se replica intracelularmente in vivo. Por lo tanto, queda por demostrar la importancia clínica de estos eventos teóricos asociados con la fusión celular.

5.- Otros mecanismos. *M. pneumoniae* tiene un mecanismo antioxidante para protegerse contra reacciones oxidativas como el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Waites, 2004); una **nucleasa** codificada por MPN491 puede degradar las trampas extracelulares de neutrófilos (NET), lo que ayuda al patógeno a escapar del ataque inmunitario de las células hospedadoras. (Waites, 2009) Varios estudios reportaron que *M. pneumoniae* puede agruparse formando **biofilms** en vidrio y que la formación de esta biopelícula se impide al usar inhibidores de la adhesión, como pueden ser anticuerpos contra P1 o cortando los ácidos siálicos de la superficie a través de neuraminidasas. (Cao, 2010) Estas agrupaciones masivas de células protegen a muchos micoplasmas dejándolos inaccesibles al sistema inmune del hospedador o a tratamientos antibióticos. A pesar de esto, no parecen utilizar detección de quórum para detectar la presencia de otras bacterias y comunicarse para formar estas biopelículas. La mayoría de las bacterias utilizan la detección de quórum en la formación de biopelículas, pero se cree que los micoplasmas forman estas estructuras sin comunicación entre las células componentes (Feizi, 1967 & Kornspan, 2011).

2.6.- Patogenicidad

La bacteria *M. pneumoniae* se propaga por contacto de persona a persona a través de gotitas respiratorias y es exclusivamente un patógeno humano. Es principalmente un patógeno extracelular que ha desarrollado esta OT especializada para una estrecha asociación con las células hospedadoras. Este apego es fundamental para la supervivencia de la bacteria y su capacidad para infectar. La estrecha asociación entre *M. pneumoniae* y las células hospedadoras impide que los mecanismos de eliminación mucociliar del hospedador eliminen la bacteria. **Ésta se adhiere y daña las células**

epiteliales respiratorias en la base de los cilios, lo que activa la respuesta inmune innata y produce **efectos citotóxicos locales** (Marston, 1997).

También se está acumulando evidencia del papel contribuyente de este organismo en enfermedades pulmonares crónicas como el asma, el cual aparecería debido a la liberación de citoquinas mediadas por *M.pneumoniae* en pacientes infectados (Kannan, 2006).

M. pneumoniae causa infecciones del tracto respiratorio superior e inferior y, en la mayoría de los casos, los síntomas clínicos son inespecíficos (Waites, 2004). La **traqueobronquitis** es el tipo más común de infección de las vías respiratorias inferiores, cuya incidencia es unas 20 veces mayor que la de la neumonía, y entre el 10 y el 40 % de las infecciones de las vías respiratorias causadas por *M. pneumoniae* acabarán convirtiéndose en neumonía (Roca, 2006). Si bien la mayoría de los casos de neumonía causada por *M. pneumoniae* son benignos, algunos casos pueden convertirse en neumonía grave y neumonía refractaria con derrame pleural, disfunción multiorgánica y secuelas graves a largo plazo, como bronquiolitis obliterante y bronquiectasias. (Waites, 2009)

Las infecciones respiratorias causadas por *M. pneumoniae* también se asocian con una amplia gama de **manifestaciones extrapulmonares**, a veces de mayor gravedad e importancia clínica que la infección respiratoria primaria, como meningoencefalitis, miocarditis, nefritis, aterosclerosis y erupciones mucocutáneas (Porath, 1997). Más importante aún, *M. pneumoniae* induce enfermedades mucocutáneas que incluyen el síndrome de Stevens-Johnson y la mucositis asociada a *M. pneumoniae*. Estas enfermedades mucocutáneas se asocian frecuentemente con inflamación sistémica y mayor riesgo de aparición de secuelas a largo plazo. (Waites, 2009)

Si bien *M. pneumoniae* vive principalmente en la superficie de las células epiteliales respiratorias, puede invadir tejidos y replicarse intracelularmente. La **endocitosis** de *M. pneumoniae* por parte de las células hospedadoras podría:

- Ayudar en el establecimiento de un estado de **enfermedad latente** o crónica
- Facilitar a la bacteria en la **evasión de una respuesta inmune**
- Interferir** con la eficacia de ciertas terapias farmacológicas.

M. pneumoniae produce una variedad de factores de virulencia, que incluyen adhesinas, glicolípidos, metabolitos tóxicos, toxina del síndrome de dificultad respiratoria adquirida en la comunidad (CARDS) y polisacáridos capsulares.

Estos metabolitos y toxinas liberados por *M. pneumoniae* pueden inducir daños en los tejidos del hospedador como **lesión por inflamación**, incluyendo citotoxicidad, daño oxidativo, apoptosis y daño inmunopatológico (Cao, 2010)

Las células de *M.pneumoniae* alteran el metabolismo de los carbohidratos, la ingesta de aminoácidos y la síntesis de proteínas de la célula hospedadora, dando como resultado el **agotamiento de los**

nutrientes (Waites, 2004). Además, **los radicales de oxígeno** generados por el patógeno en la célula hospedadora pueden provocar la **destrucción de los cilios**.

Otras alteraciones provocadas son: cambios en los sitios de reconocimiento a receptores (por la introducción de componentes de la membrana del micoplasma en la membrana de la célula hospedadora), introducción de moléculas como nucleasas, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), agotamiento de precursores para la síntesis de nucleótidos obtenidos a través de las nucleasas que secretan y que están relacionadas con la inducción de apoptosis por la fragmentación internucleosomal de la cromatina (Waites, 2004).

M. pneumoniae produce un **factor de virulencia único**, ya mencionado, conocido como toxina del síndrome de dificultad respiratoria adquirida en la comunidad (**CARDS**). Esta toxina ayuda en la colonización influyendo en la inflamación y la disfunción de las vías respiratorias. Codificada por el gen MPN372 es una toxina vacuolizante y ribosiladora de difosfato de adenosina (ADP). La estructura de la toxina CARDS comprende una molécula triangular en la que los dominios N-terminal mono-ADP ribosil-transferasa (mART) y C-terminal tándem β-trefoil se asocian para formar una arquitectura general única diferente de otras toxinas bacterianas ADP-ribosiladoras bien reconocidas (Kannan, 2006). La toxina CARDS demuestra una alta afinidad de unión a la proteína A del surfactante humano y a la anexina A2 cuando está presente en el epitelio de las vías respiratorias y exhibe actividades biológicas específicas que incluyen la ribosilación y la vacuolización del mono-ADP. Se une a los receptores de la superficie celular de los mamíferos y se internaliza rápidamente en función de la dosis y el tiempo. El proceso de internalización está mediado por moléculas de **clatrina**, que forman un andamiaje molecular para la absorción de la toxina CARDS. Ésta es citotóxica para las células de mamíferos mediante la activación del inflammasoma asociado a NLRP3 y además promueve la liberación de interleuquinas IL-1β e IL-18 (Koufos, 2016). La toxina CARDS aumenta la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF-α de manera dependiente de la dosis y la actividad. También es capaz de inducir una inflamación de tipo alérgico en animales (Jun He, 2016), pero no hay pruebas convincentes de que la toxina CARDS sea un factor causal del asma asociada a *M. pneumoniae*.

3.- Epidemiología y tratamiento de *Mycoplasma pneumoniae*

3.1.-Epidemiología

M. pneumoniae puede causar enfermedad al dañar el revestimiento del sistema respiratorio (garganta, pulmones, tráquea), aunque algunas personas pueden tener la bacteria en la cavidad orofaríngea **sin estar enfermas**.

Cuando alguien infectado con *M. pneumoniae* tose o estornuda, crea pequeñas gotas respiratorias que contienen la bacteria y otras personas cercanas pueden infectarse si inhalan estos **aerosoles**.

La mayoría de las personas que pasan poco tiempo con alguien que está enfermo de *M. pneumoniae* no se infectan. Sin embargo, la bacteria a menudo se propaga entre las personas que viven juntas, ya que pasan mucho tiempo cerca. Los brotes de *M. pneumoniae* ocurren principalmente en entornos concurridos como escuelas, residencias universitarias, cuarteles militares, hogares de ancianos y hospitales (Roca, 2006).

Produce **infecciones respiratorias** en personas de todas las edades, pero especialmente **en niños y adultos jóvenes**. El proceso que más frecuentemente ocasiona es la infección respiratoria alta, pero es el principal patógeno causante de neumonías adquiridas en la comunidad desde los 5 hasta los 30 años. Su papel en la etiología de las neumonías hospitalarias es mínimo. Ocasiona fundamentalmente neumonías atípicas, es decir, que no afectan a todo un lóbulo del pulmón. Posee un **período de incubación de dos o tres semanas**. Tras este periodo, se desarrolla la denominada **neumonía atípica**, con síntomas como tos seca, dolor en el pecho y fiebre, pudiendo aparecer otros síntomas como otitis, congestión o faringitis. Los síntomas suelen ser leves, pero existe un 18% de casos que necesitan hospitalización en los cuales el oxígeno en sangre es bajo o tienen dificultades para respirar. Sin embargo, las ratios de mortalidad son bajas y oscilan dependiendo de la población entre un 0.5 - 5% entre la población total infectada. En casos de graves sintomatologías este porcentaje sube hasta alrededor del 30%, sobre todo entre pacientes de avanzada edad (Cao, 2010). También se ha demostrado que *M. pneumoniae* está presente en **coinfecciones** con otro tipo de bacterias que afectan a las vías respiratorias como puede ser *Streptococcus pneumoniae* y también con virus, como el reciente SARS Cov-2, aumentando los síntomas y la tasa de mortalidad (Choubey, 2021)

Las infecciones por este patógeno suelen ocurrir de modo esporádico, aunque no es raro que ocurran de un modo secuencial, en varios miembros de una misma familia. También se han descrito brotes, especialmente en poblaciones cerradas, como colegios o cuarteles. Las infecciones en adultos con frecuencia son consecuencia del contagio procedente de niños convivientes afectados. Las infecciones por *M. pneumoniae* ocurren **en todas las regiones del mundo** y a lo largo de todo el año, aunque en las zonas con climas templados parece más frecuente al final del verano y en el otoño. **Cada cinco años** aproximadamente ocurre una epidemia de esta infección. Un estudio reportó que esta epidemia cíclica podría estar relacionada con cambios climáticos, ya que en América de Norte el brote ocurre a finales de verano u otoño, mientras que en Japón la incidencia mensual de casos de *M. pneumoniae* parece corresponderse con la oscilación del Sur-El Niño y el Dipolo del Océano Índico. En los Estados Unidos, *M. pneumoniae* es la bacteria más común que causa neumonía en niños hospitalizados y la segunda bacteria más común que causa neumonía en adultos hospitalizados (Waites, 2004)

Las infecciones primarias por *M. pneumoniae* no proporcionan suficiente inmunidad, de modo que son posibles las **reinfecciones** (Atkinson, 2008).

3.2.- Diagnóstico y tratamiento

La mayoría de infecciones por *M. pneumoniae* son banales y quedan sin diagnosticar, ya que sus síntomas son similares a los producidos por otros microorganismos, como diversos virus, y además no existe ningún procedimiento diagnóstico sencillo y rápido. Suele solicitarse su diagnóstico en casos de clínica prolongada y sugestiva y cuando ocurren manifestaciones extrarrespiratorias compatibles con la infección (Roca, 2006).

Las numerosas especies de micoplasmas comensales que comúnmente habitan en la orofaringe humana, especialmente las especies más habituales, *Mycoplasma orale* y *Mycoplasma salivarium*, pueden ocasionalmente causar confusión diagnóstica con *M. pneumoniae* si llegan al tracto respiratorio inferior o si las muestras diagnósticas del tracto respiratorio inferior están contaminadas con secreciones orofaríngeas. Sin embargo, con raras excepciones, que generalmente involucran a personas inmunodeprimidas, las especies de micoplasmas comensales orofaríngeos no son patógenas.

Una característica que se ha utilizado históricamente para identificar la especie y distinguirla de los micoplasmas comensales de la orofaringe es la capacidad de *M. pneumoniae* para **reducir el tetrazolio** (indicador redox) de forma aeróbica o anaeróbica.

Las pruebas más fiables para el diagnóstico de neumonía por *M. pneumoniae* son las serológicas y PCR. Las serológicas son principalmente los inmunoensayos, concretamente los **ELISAs** que consisten en la detección de la unión antígeno-anticuerpo (Atkinson, 2008).

La disponibilidad de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como el **ensayo PCR**, ha hecho que los métodos de identificación más antiguos, como la reducción de tetrazolio y la hemadsorción con eritrocitos de cobayo, sean menos importantes que antes.

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) que detectan el fragmento N-terminal de la proteína P116 y la región C-terminal de la proteína P1 son prometedores para el serodiagnóstico (Porath, 1997 & Waites, 2009). Se demostró que los ensayos ELISA de IgM de pacientes basados en constructos cortos de las proteínas P116 y P1 recombinantes mejoran la especificidad del ensayo.

Otras técnicas que se utilizan menos frecuentemente debido a su baja eficiencia y/o rapidez son los cultivos de bacterias, las radiografías y las pruebas de aglutinación. Las pruebas de aglutinación reconocen anticuerpos aglutinantes (anticuerpos inespecíficos que aglutinan eritrocitos humanos a bajas temperaturas) que se forman tras la infección por *M. pneumoniae* (Feizi, 1967).

En general, las infecciones causadas por *M. pneumoniae* son leves. Una vez que alguien se infecta con la bacteria, los síntomas suelen aparecer después de 1 a 3 semanas. Los síntomas dependen del tipo de infección, siendo la **traqueobronquitis** (resfriado en el pecho) la más común, pero puede ocurrir neumonía (infección pulmonar). Los síntomas comunes de la neumonía por *M. pneumoniae* que pueden ayudar al diagnóstico incluyen:

-Tos que puede producir mucosidad, fiebre y escalofríos, dificultad para respirar, dolor en el pecho y sensación de cansancio.

La neumonía causada por *M. pneumoniae* se considera atípica porque las características, como los síntomas y la duración de la enfermedad, son diferentes a las de la neumonía típica. Los síntomas pueden ser más leves que los de la neumonía típica, pero tienden a durar más. Además, la infección puede aparecer de manera diferente en una radiografía de pulmón.

La mayoría de las personas se recuperarán de una infección causada por *M. pneumoniae* sin antibióticos. Sin embargo, si alguien desarrolla neumonía (infección pulmonar) los médicos suelen recetar **antibióticos**, ya que pueden ayudar a los pacientes a recuperarse más rápido de la infección si se comienzan a tomar desde el principio. Hay varios tipos de antibióticos disponibles para tratar la neumonía causada por *M. pneumoniae*, aunque algunas cepas son resistentes a algunos antibióticos utilizados para el tratamiento (Young, 2010).

Todos los micoplasmas carecen de pared celular y, por lo tanto, todos **son inherentemente resistentes a los antibióticos betalactámicos**, diseñados para destruir las paredes celulares bacterianas (p. ej., penicilina). El tratamiento eficaz de las infecciones por *M. pneumoniae* suele abordarse con macrólidos, tetraciclinas o fluoroquinolonas. Los médicos tienen en cuenta la edad del paciente y los patrones locales de resistencia a los antibióticos:

- Macrólidos (p. ej., azitromicina): niños y adultos
- Fluoroquinolonas: adultos
- Tetraciclinas (p. ej., doxiciclina): niños mayores y adultos

Los médicos no suelen recetar fluoroquinolonas y tetraciclinas a niños pequeños en circunstancias normales, ya que las tetraciclinas causan la decoloración de los huesos y los dientes en ellos. Las fluoroquinolonas también pueden afectar el músculo, la articulación y el tendón. En cambio, los **macrólidos**, que tienen menos efectos secundarios, han sido el fármaco de elección para tratar la infección por *M. pneumoniae* en los últimos años. Los macrólidos son un tipo de antibióticos que actúan sobre la subunidad ribosomal 50S e interfieren en la síntesis proteica. Sin embargo, los médicos deben practicar un uso prudente de los macrólidos debido a la aparición de **cepas de *M. pneumoniae* resistentes a los macrólidos** (Cao, 2010).

La resistencia a los macrólidos ha estado surgiendo en *M. pneumoniae* desde la década de 2000. Este problema es especialmente preocupante en Asia, donde las tasas de resistencia han llegado al 90%. Los Estados Unidos y Europa también han informado de resistencia a los macrólidos. Los datos actuales sugieren que la prevalencia de resistencia a los macrólidos en *M. pneumoniae* puede rondar el 10 % en los Estados Unidos, con variabilidad regional.

Los estudios han informado que los pacientes con infecciones debidas a cepas resistentes a los macrólidos pueden tener fiebre y tos durante más tiempo que los pacientes infectados con cepas sensibles a los macrólidos. Estas cepas también pueden estar asociadas con más complicaciones extrapulmonares y características clínicas y radiológicas graves. El fracaso del tratamiento antibiótico ha provocado un aumento de la tasa de mortalidad en los últimos años (Roca, 2006). Por lo tanto, el

desarrollo de vacunas contra infecciones por *M. pneumoniae* es una solución potencial para la prevención de infecciones causadas por el patógeno.

Si bien *M. pneumoniae* generalmente causa infecciones leves, pueden ocurrir **complicaciones** graves que requieren atención en un hospital. Las infecciones graves por *M. pneumoniae* pueden causar o empeorar la neumonía, ataques de asma o nuevos síntomas de asma, encefalitis (inflamación del cerebro), anemia hemolítica (muy pocos glóbulos rojos, lo que significa menos células para suministrar oxígeno al cuerpo), disfunción renal (problemas renales), trastornos de la piel como síndrome de Stevens-Johnson, eritema multiforme y necrólisis epidérmica tóxica (Razin, 1996).

Así, *M. pneumoniae* puede causar diferentes tipos de infecciones además de la neumonía. En los casos donde los antibióticos no surtan efecto y persista la enfermedad, se puede suministrar corticosteroides (para reducir la inflamación) o utilizar terapia inmunomoduladora (Razin, 1998).

VACUNAS

El interés en el desarrollo de una vacuna para *M. pneumoniae* ha sido evidente desde principios de la década de 1960, poco después de que el organismo se identificara y aislara con éxito en cultivo y gran parte de su epidemiología se hiciera evidente. El interés fue fomentado por la falta de inmunidad protectora natural después de la infección primaria (Cao, 2010).

Existen varios tipos de vacunas contra *M. pneumoniae*, incluidas las vacunas inactivadas, vivas atenuadas y de subunidades. Estas vacunas se administran principalmente por vía nasal o con aguja hipodérmica. Las vacunas de células enteras pueden ser vacunas inactivadas o vivas atenuadas. Se descubrió que **las vacunas inactivadas provocan respuestas inmunitarias débiles, y algunas personas que no produjeron anticuerpos después de la vacunación experimentaron respuestas inmunitarias graves al reinfectarse con *M. pneumoniae***. Las vacunas basadas en proteínas de adhesión de *M. pneumoniae* (P1, P30 y P116) se han considerado como opciones prometedoras. La inoculación hipodérmica con una **vacuna de subunidad proteica da como resultado una protección inmunitaria eficaz** (Tabassum, 2010). Sin embargo, la generación de una vacuna de subunidades de proteínas puede ser un desafío porque está acompañada de varias deficiencias y **dificultades técnicas** inevitables. El nivel de expresión de proteínas in vitro suele ser muy bajo. Además, la purificación de proteínas recombinantes es un proceso complicado (Jiang, 2021). Las vacunas de subunidades de proteínas no tienen capacidad de autorreplicación en comparación con las vacunas vivas atenuadas o las vacunas de ADN, por lo que generalmente se requiere inmunización múltiple (Zhou, 2020). La subunidad proteica puede perder su conformación natural cuando se expresa en sistemas heterólogos (Chen, 2016). Las vacunas de ADN desencadenan inmunidad tanto mediada por células como humoral, pero el ADN inyectado no se puede replicar de manera uniforme en las células de los mamíferos. Estos desafíos deben superarse en el futuro para desarrollar vacunas efectivas.

Las infecciones por *M. pneumoniae* en pacientes inmunocompetentes inducen **respuestas de anticuerpos que se dirigen principalmente contra las proteínas asociadas a la OT de *M. pneumoniae*** (Dumke, 2016). Así, la vacuna basada en adhesinas puede inducir inmunoglobulinas específicas que inhiben la adherencia de *M. pneumoniae* al epitelio respiratorio del hospedador (Jiang, 2021). Sin

embargo, debido a su inmunogenicidad humoral débil cuando se usa sola sin adyuvante de aluminio, una proteína de fusión con un adyuvante, como el fragmento HN-144 de la cápside del virus de la hepatitis B, es una estrategia de inmunización preferida.

4.- Otros micoplasmas del Clúster Pneumoniae

4.1.- *Mycoplasma genitalium*

M. genitalium pertenece, como *M. pneumoniae*, al cluster Pneumoniae de micoplasmas y es un patógeno humano de las **vías urogenitales**, considerado por la OMS como un patógeno emergente de transmisión sexual. *M. genitalium* posee una morfología más achatada que *M. pneumoniae*. Es más ancho (0.3-0.4 μm), pero de menor longitud (0.6-0.7 μm) que *M. pneumoniae*. En su morfología celular también se distinguen las mismas cuatro partes, aunque la presencia de cola no es aparente en *M. genitalium*, pero sí que es muy evidente la presencia de la protuberancia correspondiente a la OT (Svenstrup, 2002). El genoma de *M. genitalium* posee un tamaño de 580 kb, codificando un total de 482 genes, de los cuales 387 (el 80%) son esenciales (Scheffer, 2017). *M. genitalium* fue aislado en los años 80 a partir de muestras de pacientes que presentaban uretritis no gonocócica. Causa infecciones urogenitales humanas variadas. Una característica distintiva de esta bacteria es su capacidad para establecer infecciones crónicas que pueden persistir a pesar de la finalización de las terapias antibióticas apropiadas y sistemas inmunitarios intactos y funcionales. La adherencia íntima y la colonización de la superficie de los micoplasmas a las células hospedadoras son características patogénicas importantes. Sin embargo, su naturaleza intracelular facultativa es poco conocida, en parte debido a las dificultades para desarrollar y estandarizar sistemas modelo de interacción celular (Priscilla, 2008).

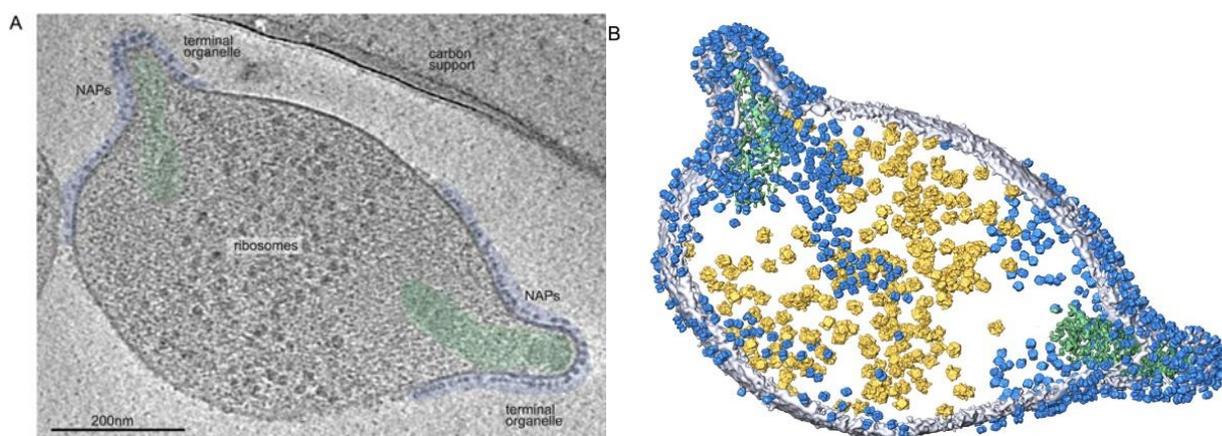


Figura 1.6. A) Un corte de 0,85 nm de espesor a través del tomograma de una célula de *M. genitalium*. Se diferencian significativamente su forma y la OT llena de NAPs. Los núcleos de las OT se resaltan en verde y los NAP se resaltan en azul. Las 2 OT exhibidas por esta célula son típicas de una división celular en proceso. B) Representación de isosuperficie de la

célula en A, que muestra la distribución 3D de NAP en la superficie de la membrana plasmática. La membrana plasmática es de color gris claro, las OT son de color verde, los ribosomas son de color amarillo y los NAP son de color azul (Scheffer, 2017)

4.2.- *Mycoplasma gallisepticum*

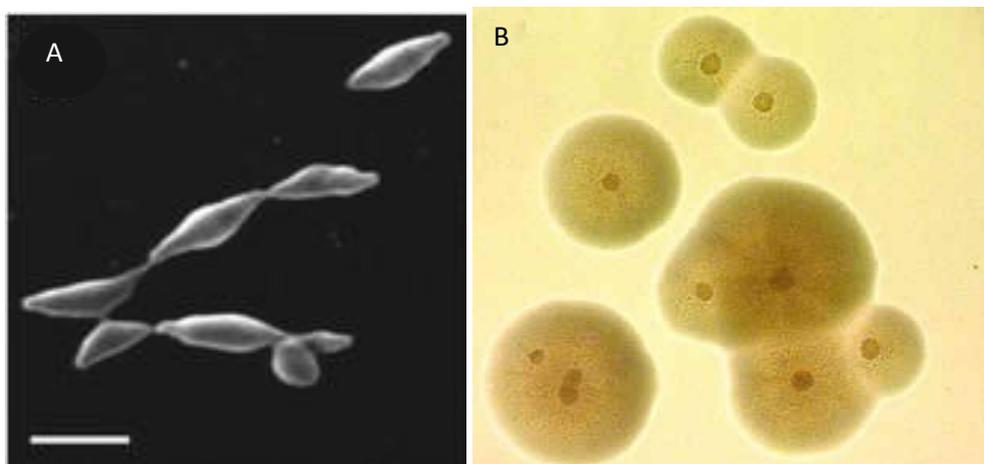


Figura 1.7. A) Morfología de las células de *M. gallisepticum*. La microscopía electrónica de barrido revela la morfología típica en forma de matraz de *M. gallisepticum* con una OT pronunciada B) Colonias en crecimiento de la cepa S6 de *M.gallisepticum* en placas de agar, en forma típica de "huevo frito" con una zona central granular opaca embebida en el agar y una zona traslúcida periférica (Gharaibeh, 2011).

Uno de los principales problemas de salud en la industria avícola es la infección por esta bacteria, que causa enfermedades respiratorias crónicas en pollos y otras aves. La enfermedad afecta la producción de huevos y puede propagarse rápidamente a través de toda la bandada de aves, ya que la principal vía de transmisión es desde la madre a su progenie (Levisohn, 2000)

Con características similares a *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* infecta los tejidos de la tráquea, conjuntivas, cornetes nasales y sacos aéreos de las aves. Los síntomas de *M. gallisepticum* pueden desarrollarse lentamente y persistir durante semanas. El primer síntoma suele ser una secreción nasal seguida de una condición espumosa o burbujeante en los ojos. Las aves pueden mostrar una tos seca persistente, estornudos y estertores traqueales. La mala condición física y la pérdida de peso suelen ser evidentes al poco tiempo. Internamente, se puede ver una marcada hinchazón de las fosas nasales, los senos paranasales, la tráquea y los bronquios. Los sacos de aire suelen ser gruesos y opacos y pueden contener un exudado viscoso (Gharaibeh, 2011).

Tiene una distribución mundial y es de gran importancia económica, ya que provoca pérdidas millonarias en la industria aviar. La variación fenotípica de los principales antígenos de superficie ocurre con alta frecuencia, lo que es una explicación probable de la infección crónica por *M. gallisepticum* a pesar de una fuerte respuesta inmunitaria. En los casos en que el control de la infección por *M. gallisepticum* no sea factible, se está evaluando como opción la vacunación, especialmente con vacunas vivas de la bacteria desarrolladas recientemente (Gharaibeh, 2011).

5.- Lipoproteínas y proteínas transportadoras de lípidos humanas

En este proyecto se experimenta con lipoproteínas y han permitido obtener resultados importantes, por esta razón se incluye este apartado centrado en su naturaleza y función.

Las lipoproteínas son moléculas complejas que constan de un núcleo hidrofóbico central lleno de lípidos apolares, principalmente ésteres de colesterol y triglicéridos. Este núcleo hidrofóbico está rodeado por una membrana que consta de fosfolípidos, colesterol libre y **apolipoproteínas**. (Christodoulides, 2018)

El **colesterol y los triglicéridos** son insolubles en agua y por tanto estos lípidos deben ser transportados en asociación con estas proteínas. Las lipoproteínas circulan por el **plasma sanguíneo** y se pueden dividir en siete clases según el tamaño, la composición lipídica y las apolipoproteínas que las componen (quilomicrones, remanentes de quilomicrones, VLDL, IDL, LDL, HDL y Lp. Los remanentes de quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y Lp son todos proaterogénicos, mientras que HDL es antiaterogénico (Murphy, 2000)

Tipos de lipoproteínas:

1.-Quilomicrones. Partículas grandes ricas en triglicéridos producidas por el intestino, que están involucradas en el transporte de los triglicéridos y el colesterol de la dieta a los tejidos periféricos y al hígado. Estas partículas contienen apolipoproteínas AI, A-II, A-IV, AV, B-48, C-II, C-III y E. Apo B-48 es la proteína estructural central y cada partícula de quilomicroón contiene una molécula de Apo B-48. El tamaño de los quilomicrones varía según la cantidad de grasa ingerida. Una comida rica en grasas conduce a la formación de partículas de quilomicrones grandes debido a la mayor cantidad de triglicéridos que se transportan, mientras que en ayunas las partículas de quilomicrones son pequeñas y transportan cantidades reducidas de triglicéridos.

2.-Remanentes de quilomicrones. La eliminación de triglicéridos de los quilomicrones por parte de los tejidos periféricos da como resultado partículas más pequeñas llamadas remanentes de quilomicrones. En comparación con los quilomicrones, estas partículas están enriquecidas en colesterol y son proaterogénicas.

3.-Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Estas partículas son producidas por el hígado y son ricas en triglicéridos. Contienen apolipoproteína B-100, C-I, C-II, C-III y E. Apo B-100 es la proteína estructural central y cada partícula de VLDL contiene una molécula de Apo B-100. Al igual que los quilomicrones, el tamaño de las partículas de VLDL puede variar dependiendo de la cantidad de triglicéridos transportados en la partícula. Cuando aumenta la producción de triglicéridos en el hígado, las partículas de VLDL secretadas son grandes. Sin embargo, las partículas de VLDL son más pequeñas que los quilomicrones.

4.-Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL; remanentes de VLDL). La eliminación de los triglicéridos de las VLDL por parte del tejido muscular y adiposo da como resultado la formación de partículas IDL enriquecidas en colesterol. Estas partículas contienen apolipoproteína B-100 y E. Estas partículas IDL son proaterogénicas.

5.-Lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas partículas se derivan de partículas VLDL e IDL y están aún más enriquecidas en colesterol. LDL transporta la mayor parte del colesterol que está en la circulación. La apolipoproteína predominante es la B-100 y cada partícula de LDL contiene una molécula de Apo B-100. LDL consiste en un espectro de partículas que varían en tamaño y densidad. Se observa una gran cantidad de partículas LDL pequeñas y densas en asociación con hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDL, obesidad, diabetes tipo 2 (es decir, pacientes con síndrome metabólico) y estados infecciosos e inflamatorios. Estas partículas de LDL pequeñas y densas se consideran más proaterogénicas que las partículas de LDL grandes por varias razones. Las partículas de LDL pequeñas y densas tienen una menor afinidad por el receptor de LDL, lo que da como resultado un tiempo de retención prolongado en la circulación. Además, entran más fácilmente en la pared arterial y se unen con mayor avidez a los proteoglicanos intraarteriales, lo que los atrapa en la pared arterial. Por último, las partículas de LDL pequeñas y densas son más susceptibles a la oxidación, lo que podría resultar en una mayor absorción por parte de los macrófagos.

6.-Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas partículas juegan un papel importante en el transporte inverso del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, que es un mecanismo potencial por el cual las HDL pueden ser **antiaterogénicas**. Además, las partículas de HDL tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas y antiapoptóticas, que también pueden contribuir a su capacidad para inhibir la aterosclerosis. Las partículas de HDL están enriquecidas en colesterol y fosfolípidos. Las apolipoproteínas A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E están asociadas con estas partículas. **Apo A-I** es la proteína estructural central y cada partícula de HDL puede contener múltiples moléculas de Apo A-I. Las partículas de HDL son muy heterogéneas y pueden clasificarse según su densidad, tamaño, carga o composición de apolipoproteínas (Feingold, 2021).

Las apolipoproteínas tienen cuatro funciones principales que incluyen: 1) desempeñar un papel estructural, 2) actuar como ligandos para los receptores de lipoproteínas, 3) guiar la formación de lipoproteínas y 4) actuar como activadores o inhibidores de enzimas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas (Breslow, 1985)

Estas lipoproteínas desempeñan un papel clave en la absorción y el transporte de lípidos de la dieta por el intestino delgado, en el transporte de lípidos desde el hígado a los tejidos periféricos y en el transporte de lípidos desde los tejidos periféricos al hígado y al intestino (transporte inverso de colesterol) (Smith, 1978 & Trigatti, 2017).

La ruta de las **lipoproteínas exógenas** comienza con la incorporación de los lípidos de la dieta en los quilomicrones del intestino. En la circulación, los triglicéridos transportados en los quilomicrones son metabolizados en el músculo y el tejido adiposo por la lipoproteína lipasa que libera ácidos grasos libres, que posteriormente son metabolizados por el músculo y el tejido adiposo y se forman remanentes de quilomicrones (Trigatti, 2017). Luego, los remanentes de quilomicrones son absorbidos por el hígado. La ruta de las **lipoproteínas endógenas** comienza en el hígado con la formación de VLDL. Los triglicéridos transportados en VLDL se metabolizan en el músculo y el tejido adiposo por la lipoproteína lipasa que libera ácidos grasos libres y se forman IDL. Las IDL se

metabolizan aún más a LDL, que son captadas por el **receptor de LDL en numerosos tejidos**, incluido el hígado, el sitio predominante de captación. El **transporte inverso de colesterol comienza con la formación de HDL** en el hígado y el intestino. Estas pequeñas partículas de HDL pueden luego adquirir colesterol y fosfolípidos que salen de las células, un proceso mediado por ABCA1 (transportador regulador de las HDL) que da como resultado la formación de HDL maduro. Las HDL maduras pueden adquirir colesterol adicional de las células a través de ABCG1, SR-B1 o difusión pasiva. Después las HDL transportan el colesterol al hígado, ya sea directamente al interactuar con SR-B1 hepático o indirectamente al transferir el colesterol a VLDL o LDL, un proceso facilitado por **CETP** (proteína de transferencia de ésteres de colesterol). La salida de colesterol de los macrófagos a las HDL juega un papel importante en la protección contra el desarrollo de la **aterosclerosis**.

Una función secundaria de las lipoproteínas es transportar compuestos hidrofóbicos y anfipáticos extraños tóxicos, como endotoxinas bacterianas, desde áreas de invasión e infección (Feingold, 2021).

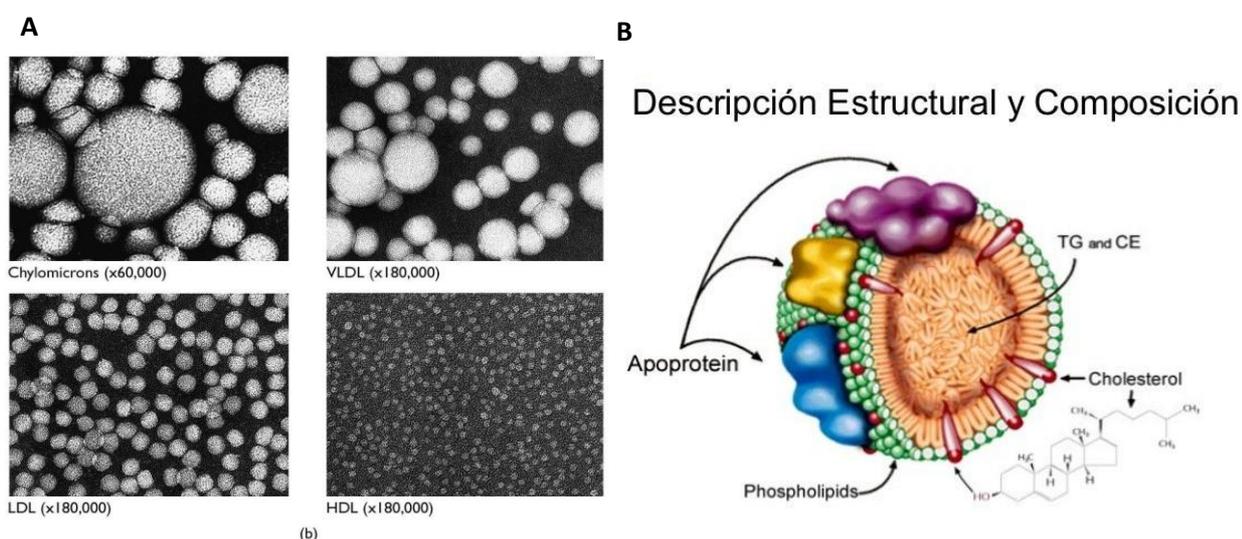


Figura 1.8. A) Lipoproteínas al microscopio electrónico, donde se observa su diferente tamaño. B) Estructura básica interna de lipoproteína. TG triglicéridos CE colesterol esterificado (figura modificada de Murphy, 2000)

CETP

La CETP es una proteína de **55 kDa** que se glicosila y se expresa en varios tejidos, incluido el tejido adiposo y el hígado. Los primates, conejos, hámsters, reptiles y peces expresan CETP, mientras que los ratones, ratas y perros no lo hacen (Charles, 2012). En humanos, la CETP se expresa en gran medida en el tejido adiposo, y su expresión es mayor en los adipocitos pequeños con menor contenido de lípidos [4]. Una vez en la circulación sanguínea, la CETP media el **intercambio de colesterol esterificado de HDL por triglicéridos (TG)** de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B. El flujo neto de lípidos da como resultado una **reducción del colesterol HDL** y, debido a eso, se

cree que la CETP aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular. La CETP juega un papel clave en la homeostasis del colesterol, especialmente en la redistribución de colesterol entre partículas y en el transporte reverso de colesterol, por lo que la modificación de su actividad puede modificar el desarrollo y la evolución de la aterosclerosis. Los efectos de la inhibición de CETP incluyen: reducción de colesterol LDL y aumento del colesterol HDL y apo A-1, aumento en el tamaño de las partículas LDL y HDL, y reducción del colesterol en las partículas ricas en triglicéridos. En consonancia, la inducción de **expresión de la actividad CETP en ratones aumenta la susceptibilidad a la aterosclerosis** mientras que la inhibición de la actividad CETP en conejos tiende a reducir su desarrollo (Cilpa-Karhu, 2015).

Así, en las últimas décadas, la inhibición farmacológica de la CETP se ha postulado como una terapia antiaterogénica. Al menos cuatro inhibidores de la CETP se han sometido a ensayos clínicos. A pesar de los importantes contratiempos iniciales en los ensayos clínicos debido al aumento de la mortalidad o la inutilidad (Charles, 2012), el reciente ensayo REVEAL de anacetrapib mostró una reducción significativa en la incidencia de eventos coronarios mayores. Por lo tanto, la hipótesis de que **los inhibidores de la CETP son antiaterogénicos** en humanos aún se está probando (Raposo, 2021). Además de su actividad en la modulación del metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas, la CETP también puede ser importante para la homeostasis de los lípidos en los adipocitos. Estudios previos informaron que la CETP estimula la captación selectiva de ésteres de colesterol de las HDL por adipocitos humanos aislados y por varios tejidos en ratones transgénicos de CETP, incluido el tejido adiposo (Civeira, 2010). Además, se demostró previamente que la sobreexpresión de CETP en células de liposarcoma SW872 aumenta la hidrólisis de TG, reduce la síntesis de TG y, por lo tanto, reduce el contenido de TG.

Se pudo demostrar que la **CETP estimula la lipólisis y la termogénesis**, aumentando el gasto energético corporal y promoviendo una reducción significativa de la grasa corporal. Estos hallazgos indican un nuevo papel antiadipogénico para la CETP, destacando un factor relevante a considerar en el contexto de la obesidad (Raposo, 2021).

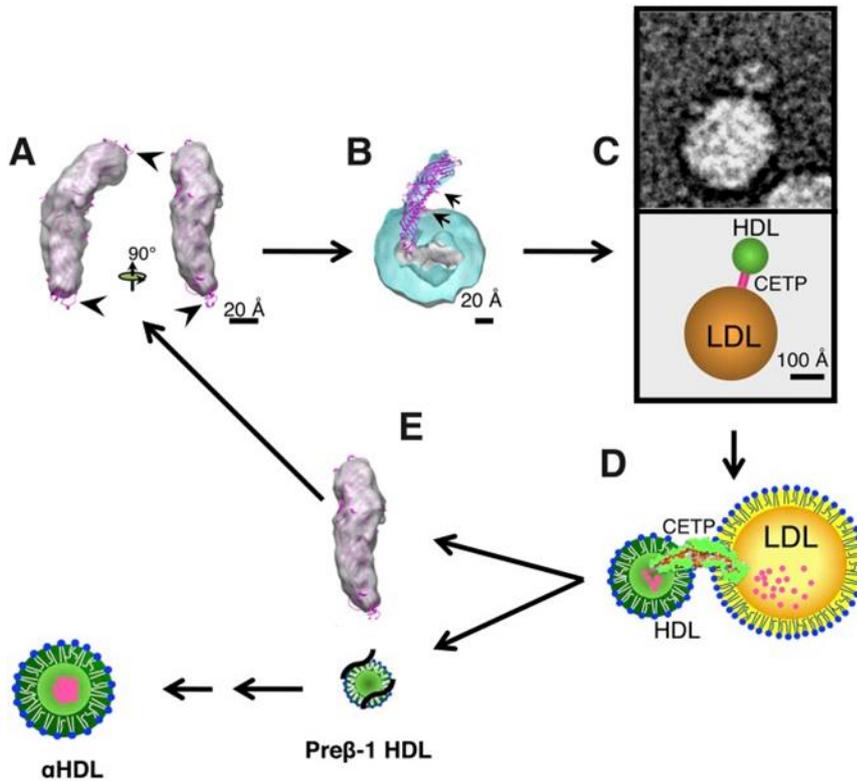


Figura 1.9. Mecanismos moleculares y funcionales de la CETP. **(A) Detección.** La envoltura molecular tridimensional de CETP por EM se muestra en gris, y la estructura cristalina de rayos X de la superposición de CETP se muestra en magenta. Las flechas indican bucles libres que se extienden fuera de la región densa en electrones de CETP, con un bucle inferior que muestra la minihélice. **(B) Penetración y acoplamiento.** Sección transversal de la envoltura molecular por EM tridimensional de CETP que penetra en el núcleo de colesterol esterificado (CE) (gris) de rHDL esférica (turquesa), con superposición de la estructura cristalina de rayos X de CETP (magenta) y flechas que indican las posiciones de cada poro de fosfolípido; la flecha inferior también indica la región de la hélice α X. **(C) Formación del complejo ternario.** Imagen por EM (arriba) y diagrama (abajo) del complejo ternario que muestra CETP uniendo la partícula rHDL esférica más pequeña y la partícula LDL esférica más grande. **(D) Intercambio de lípidos.** Ilustración de las interacciones de la CETP con las lipoproteínas en el complejo ternario y la transferencia de lípidos resultante, en la que los pequeños círculos magenta representan el CE que se mueve de la partícula HDL más pequeña a la partícula LDL más grande. Proponemos la siguiente secuencia de eventos: i) la unión de CETP a las lipoproteínas puede crear fuerzas que resulten en la torsión de los dos dominios distales de CETP. ii) La torsión es la clave para abrir el túnel para el intercambio de lípidos entre las lipoproteínas. iii) El lípido neutro, por ejemplo, CE, migraría a través de la estructura del túnel hidrofóbico. iv) El flujo y la dirección de la transferencia de lípidos se establecerían mediante las siguientes fuerzas termodinámicas dominantes: concentraciones diferenciales de CE, cambios en la **hidrofobicidad dentro de la cavidad central de CETP que favorecen la transferencia de CE desde el dominio N-terminal al dominio C-terminal** y la energía entrópica creada por la sustancia química. El potencial de CE en HDL, debido a su empaquetamiento más ordenado, obliga al CE de las lipoproteínas menos ordenadas (líquido fundido) ricas en CE (LDL) o ricas en triglicéridos (VLDL). **(E) disociación de HDL.** Ilustración que muestra la disociación de HDL en CETP libre (gris) y la disociación de HDL relativamente libre de CE que da como resultado la formación de pre β -1 HDL (líneas negras y estructura lipídica pequeña), que posteriormente se convierte (flechas) en α -especies de HDL (Cilpa-Karhu, 2015 & Charles, 2012).

PLTP

La proteína de transferencia de fosfolípidos interviene en la transferencia de fosfolípidos y colesterol libre de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LDL y VLDL) a las HDL, en sentido contrario al papel principal de las CETP. También median en el intercambio de fosfolípidos entre las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Al igual que la CETP, su peso molecular es también de 55kDa.

Juega un papel importante en la remodelación de las HDL, lo que implica modular su tamaño y composición. Es clave en la captación de colesterol de las células y tejidos periféricos que posteriormente se transporta al hígado para su degradación y excreción (Cheung, 2010).

Se expresa de forma ubicua en especies de vertebrados, incluidos los humanos. Tiene la capacidad de unirse y transferir varios compuestos anfipáticos, incluidos fosfolípidos, colesterol no esterificado, diacilglicéridos y tocoferoles. Los análisis filogenéticos revelaron que PLTP pertenece a la familia de genes de transferencia de lípidos/proteína de unión a lipopolisacáridos (LT/LBP), al igual que la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), con la que además comparte el mismo tipo de estructura terciaria y plegamiento (Rao, 1997 & Cheung, 2010).

Ambas CETP y PLTP presentan una analogía estructural y funcional con la P116 de *M.pneumoniae*, como la presencia de una cavidad hidrofóbica y su papel en la captación de lípidos.

OBJETIVOS

El objetivo inicial de la Tesis doctoral era entender el proceso de adhesión y del movimiento de deslizamiento que presentan los micoplasmas del grupo Pneumoniae, en particular *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma pneumoniae*. Para ello es crítico caracterizar, tanto a nivel bioquímico como estructural, las proteínas que pueden participar en el proceso de adhesión. Ya se caracterizó el principal mecanismo de adhesión de *M. pneumoniae* y *M. genitalium*, denominado NAP, en anteriores trabajos.

Por su condición de proteína de membrana y su aparente relación con los procesos de adhesión, además de su gran inmunogenicidad, esta tesis se focalizó en el estudio de la proteína P116 y se plantearon los objetivos siguientes:

Objetivos iniciales:

- 1.- Determinación de la estructura tridimensional de P116 de *M.pneumoniae* mediante cristalografía de rayos X o microscopía electrónica.
- 2.- Caracterización de sus complejos con otras proteínas.
- 3.- Capacidad inmunogénica de la proteína en sueros de pacientes.
- 4.- Análisis de la participación de P116 en los procesos de adhesión y motilidad de *M. pneumoniae*.
- 5.- Localización de P116 en las células de *M. pneumoniae*.
- 6.- Función de la P116 en el metabolismo de *M.pneumoniae*, relacionado con la supervivencia básica del organismo.

Objetivos de segunda fase tras primeros resultados:

- 7.- Identificación de los sustratos hidrofóbicos con los que interactúa fuertemente P116.
- 8.- Descripción de mutantes que afectan funcional y/o estructuralmente a P116.
- 9.- Caracterización de la estructura vacía (sin ligandos) y rellena de P116.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Lista de equipos utilizados

- Instrumentos de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) y de alta eficacia (HPLC): ÄKTApurifier 10, ÄKTA Basic, ÄKTApurifier 100 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). Sistemas de cromatografía NGC™ Quest 10 y NGC™ Quest 10 Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc. Berkeley, CA, USA)
- Sistema de disrupción celular constante (Constant systems, Low March, Daventry, UK)
- Baño termostático analógico Optima P GD100, GRANT® (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Robot de pipeteo y máquina de cristalización Oryx8 (Douglas Instruments, Hungerford, UK)
- Robot de pipeteo Crystal Phoenix (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA, USA)
- Centrífugas compactas refrigeradas (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, De, USA)
- Instrumento de caracterización SEC-MALS Dawn® Heleos II. Cromatógrafo de líquidos Prominence (Shimadzu) conectado a un detector DAWN HELEOS II de dispersión de luz multiángulo (MALS) y un detector de índice de refracción (dRI) Optilab T-REX (Wyatt technology, Santa Barbara, CA, USA)
- Instrumento de DLS Zetasizer Nano (Malvern, Worcestershire, UK)
- Autoanalizador COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza)
- Espectrofotómetros Nano-drop® (Thermo Scientific, Wilmington, De, USA) y UV Mini 1240 UV-Vis (Shimadzu, Kioto, Japón)
- Espectrómetro de masas Sciex TOF/TOF 4800 Maldi equipado con un láser Nd:YAG (355nm) (Connecticut, MA, USA)
- Espectrómetros NMR 600 y 800 MHz Bruker Digital Avance (San Francisco, CA, USA)
- Estéreo microscopio (lupa) SMZ 800N con sistema de iluminación (Nikon, Tokio, Japón)
- Microscopio de Rayos X de Transmisión (TXM) de campo completo. Instalado en línea de luz MISTRAL en el sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallés, Barcelona, España)
- Microscopio electrónico Titan Krios (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, De, USA) equipado con un filtro de energía GIF Quantum S.E. post-columna y un detector K2 Summit (Gatan Inc.).
- Microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000-E (Nikon, Tokio, Japón)

- Sistema de imágenes refrigerado Crystal Farm™ (Bruker Nonius, MA, USA)
- Termociclador para PCR Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA)
- Sonicador ultrasónico Vibra-Cell VCX 750W (Sonics, Newtown, USA)
- Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK)
- Unidad de difracción de rayos X instalada en línea de luz XALOC en el sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallés, Barcelona, España)
- Contador de centelleo polivalente LS 6500 (Beckman Coulter, CA, USA)

2.- Lista de materiales

- Proteasas: HRV-3C, Tripsina, Quimotripsina, Trombina, Papaína (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), SUMO Protease (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Oligonucleotidos sintetizados por Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Polimerasa PFU Ultra II Fusion HS DNA (Agilent, CA, USA)
- Columnas para cromatografía de proteínas (GE Healthcare Life Sciences. Uppsala, Sweden).
- Complete EDTA-free (Roche, Basilea, Switzerland)
- Concentradores de filtrado centrífugo Amicon® Ultra (Sigma Aldrich, MO, USA)
- Cribados de cristalización (Plataforma automatizada cristalografía, Barcelona, España)
- E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek, Norcross, USA)
- E.Z.N.A® Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, USA)
- Kit de metilación reductora de lisinas (Hampton research, CA, USA)
- Enzima de clonación In-Fusion™ (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA)
- Marcador de peso molecular de proteínas SeeBlue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Marcador de peso molecular de DNA Perfect DNA™ 1kb Ladder (Novagen, Madison, WI, USA)
- Membranas de transferencia Immobilon-PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA)
- One-Step Blue® teñidor de proteínas en geles de poliacrilamida (Biotium, CA, USA)
- Placas de cristalización Limbro de 24 pocillos (Hampton research, CA, USA)

- SYBR[®] Safe Teñidor de DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- SeeBlue[®] pre-stained molecular weight standards (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- X-GAL solution 20mg/mL (Thermo Scientific, Wilmington, De, USA)

3.- Cultivos bacterianos y vectores de expresión

***E. coli* DH5 α .** Genotipo: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ^- . Cepa utilizada para amplificación y clonaje de DNA plasmídico.

***E. coli* BL21(DE3).** Genotipo: F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)* λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB⁺*]_{K-12}(λ^S). Cepa utilizada para expresión de proteínas recombinantes.

Una cepa de *E. coli* B con DE3, un profago λ que porta los genes de la ARN polimerasa T7 y *lacIq*. Los plásmidos transformados que contienen la expresión impulsada por el promotor T7 se reprimen hasta la inducción por IPTG de la ARN polimerasa T7 a partir de un promotor *lac*. Deriva de B834 (Jeong, 2009) por transducción a Met⁺.

- **Vectores de expresión.**

Los vectores de expresión pOPIN están basados en la enzima de clonación In-Fusion[™] (Clontech Laboratories, CA, USA), y es un sistema de clonación independiente de ligadura. Facilitan la recombinación de secuencias homólogas entre los productos de PCR y el vector de entrada linealizado. Permite la clonación direccional de productos de PCR en cualquier vector y en cualquier sitio de linealización. La reacción de clonación tarda tan solo 15 minutos y permite la recombinación en un solo paso de grandes fragmentos de PCR. Todos los vectores pOPIN fueron proporcionados por el grupo de investigación del IRB Nicholas Simon Berrow (Zhu, 2007).

pOPINE. Vector de expresión resistente a ampicilina basado en el vector pTriEx2, el cual codifica para un tag KHHHHHH en el C-terminal de la proteína clonada.

pOPINF. Vector de expresión resistente a ampicilina basado en el vector pTriEx2, el cual codifica para un tag MAHHHHHSSGLEVL en el N-terminal de la proteína clonada.

pOPINS. Vector de expresión resistente a kanamicina basado en el vector pET28a (Novagen, Madison, WI, USA), el cual codifica para un tag MGSSHHHHH-SUMO en el N-terminal de la proteína clonada. Este tag añadido mejora la solubilidad de la proteína, funcionando como un compañero potencial de fusión y solubilización. El tag de His de SUMO puede ser fácilmente eliminado mediante corte por SUMO proteasa seguido de purificación en columna HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden).

pOPINM. Vector de expresión resistente a ampicilina basado en el vector pTriEx2, el cual codifica para un tag MAHHHHHSSG-MBP-LEVLFGQP en el N-terminal de la proteína clonada. Este tag también ayuda a la solubilización y al plegamiento de la proteína. El tag de His de MBP puede ser cortado mediante la proteasa HRV-3C seguido de purificación en columna HisTrap™ HP o MBPTrap™ HP. (Berrow, 2007)

4.- Procedimientos microbiológicos

- Composición del medio de cultivo

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB)/agar (1L): 10g triptona, 5g extracto de levadura, 10g NaCl y 15g agar. El medio se autoclava, se deja enfriar hasta unos 60°C, se añaden los antibióticos apropiados y se distribuye el medio en placas de petri, añadiendo aproximadamente unos 25mL.

Medio de cultivo LB (1L): 10g triptona, 5g extracto de levadura, 10g NaCl (autoclavado).

- Antibióticos y suplementos

Carbamicilina 34mg/ml disuelto en agua y filtrado a través de filtro de 0.22µm.

Kanamicina 50mg/ml disuelto en agua y filtrado a través de filtro de 0.22µm

Isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) 1000x: 1M de IPTG se prepara en agua y es filtrado a través de un filtro de 0.22µm. Se utiliza para inducir la expresión de los genes que están bajo el promotor lacZ.

- Transformación de células de *E.coli* por choque térmico

Las células competentes de *E.coli* de la cepa conveniente se descongelan en hielo y se añaden 50µL de células a 1µL de muestra en un eppendorf estéril. La mezcla se incuba en hielo durante 15 minutos tras los cuales es sumergida en un baño maría a 42°C durante 45segundos, seguido de una incubación de 2 minutos en hielo. Se añaden 0.3mL de LB a las células transformadas y se incuban a 37°C en agitación durante 1 hora. El producto resultante es plaqueado en placas petri de LB/agar suplementadas con el antibiótico correspondiente. Se incuban a 37°C durante toda la noche (Green, 2018).

- Condiciones generales de cultivo de *E.coli*

Las células de *E.coli* se cultivan en placas de LB con agar en presencia del antibiótico apropiado durante unas 16 horas a 37°C. Posteriormente se selecciona una colonia que ha crecido aislada y se inocula en 5mL de medio LB durante toda la noche a 37°C en agitación (220rpm) para obtener un pequeño cultivo saturado de células. Estos precultivos se inoculan en erlenmeyers de 0.5L de medio LB cada uno, según los litros totales de cultivo que interese producir. Estos cultivos se colocan a 37°C con una agitación de 220rpm hasta que alcancen una OD₆₀₀ ≈0.6-0.8. Las células se dejan atemperar hasta 20°C, induciéndose con IPTG en una concentración final de 0.7mM. Se incuban los cultivos en agitación durante unas 16 horas a 21°C. Los cultivos son suplementados con el antibiótico correspondiente.

- Cepas bacterianas, cultivos de tejidos y condiciones de crecimiento para *M.pneumoniae*

Realizado por el grupo de Jaume Piñol en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

La cepa ***M. pneumoniae* M129** se cultivó en frascos de cultivo celular que contenían **medio SP4** y se incubó a 37 °C y 5% CO₂ . Los micoplasmas adheridos a la superficie se recolectaron usando un raspador de células y se resuspendieron en medio SP4. Al cultivar células de micoplasma en portaobjetos de cámara de 8 pocillos IBIDI, cada pocillo se sembró con alrededor de 10⁵ CFU (unidades formadoras de colonia) y se incubó durante 12-24 h en 200 µL de SP4 suplementado con 3% gelatina.

Las células de mieloma NSI (Köhler, 2005) se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10% y 50 µg/mL de gentamicina (RPMI completo). Los hibridomas se seleccionaron en RPMI completo complementado con medios HAT y BM-Condimed (Sigma Aldrich).

5.- Tecnología del DNA recombinante

- Clonación de P116 (30-957) de *M.pneumoniae*

Se amplifican regiones correspondientes al gen MPN213 (proteína P116) de *Mycoplasma pneumoniae* a partir de clones sintéticos mediante la PCR y utilizando los oligonucleótidos:

5'- AGGAGATATACCATGAACAAGACCCACCAGGTTGAG 3' (Primer forward)

5' GTGATGGTGATGTTTACCCAGACGGTCAACGGTGATTTG 3' (Primer reverse)

Diseñados con respecto al fragmento amplificado y al vector plasmídico en el que será insertado: pOPINE. La reacción de PCR también se utiliza para incorporar mutaciones de sustitución de aminoácidos puntuales en el gen de P116 por mutagénesis dirigida.

PRIMERS P116	SECUENCIA 5'-->3'
FWD 13	5'AGGAGATATACCATGGGCACCGTTGGCACCACCGCG 3'
FWD 30	5' AGGAGATATACCATGAACAAGACCCACCAGGTTGAG 3'
FWD 246	5' AGGAGATATACCATGGGTGTTGATGTGTTCGAG 3'
FWD 82	5' AGGAGATATACCATGAGCAGCCCGCAGCAACTG 3'
FWD 53	5' AGGAGATATACCATGAGCGTGAAGCTGCCGAAAG 3'
FWD TRP 681	5' TTCCCGGTTATGGTGCGGCGAAGGGTGTTGTG 3'
FWD F490D	5' TTCGGCGAGGCGGACGATGTTGATAAAATCGCG 3'
FWD F337D	5' CCGGGTCTGGGCAAGGATGTGAAGGACCTGATC 3'
FWD F711D	5' AGCATTCTGACCTGGATGGTGATATGCTGTTC 3'
REV 957	5' GTGATGGTGATGTTTACCCAGACGGTCAACGGTGATTG 3'
REV 818	5' GTGATGGTGATGTTTTTGAAAAATCTGCTTGGTG 3'
REV 845	5' GTGATGGTGATGTTTGCTGATGTCCAGCTCCAG 3'
REV TRP 681	5' CACAACACCCTTCGCCGCACCATAACCCGGGAA 3'
REV F490D	5' AAGCCGCTCCGCCTGCTACAACCTATTTTAGCGC 3'
REV F337D	5' GGCCAGACCCGTTCTACTTCTGGACTAG 3'
REV F711D	5' TCGTAAGCACTGGACCTACCACTATACGACAAG 3'

Tabla 2.1. Primers diseñados empleados para fabricar los diferentes constructos de P116 con los que se experimentó, así como los mutantes que dieron resultados significativos. Diseñados para insertarse en el plásmido pOPINE.

Las reacciones de PCR estándar se llevan a cabo en un volumen final de 50µL conteniendo: 0.2mM dNTPs, 0.4µM de cada oligonucleótido, 100ng de DNA del gen de P116 y 1µL de polimerasa PFU Ultra II (Agilent) en agua. Se aplican entonces los siguientes ciclos de temperatura:

- 1.- Desnaturalización → 95°C, 2min
- 2.- Desnaturalización → 95°C, 45s
- 3.- Hibridación → 60°C, 30s
- 4.- Elongación → 72°C, 1-4 min (depende del tamaño del fragmento)
- 5.- Extensión final → 72°C, 5min

Los pasos del 2 al 4 se repiten durante **30 ciclos**, pudiendo cambiar la temperatura de elongación según el tamaño del fragmento a ser amplificado. Los productos resultantes se cargan en un gel de agarosa para verificar si su tamaño corresponde con el del fragmento de interés, tras verificarlo, se recortan las bandas de los fragmentos deseados desde el gel y se extrae su DNA mediante E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, USA).

Los productos amplificados por PCR y el vector de expresión pOPINE se introducen con la enzima recombinasa In-Fusion en una reacción de ligación del constructo amplificado en el plásmido deseado. Para fragmentos de tamaño entre 0.5kb y 10kb, como casi 3kb de este caso, la concentración ideal de DNA que se necesita es de 50 a 100ng/µL. En la reacción de ligación debe haber 10µL totales, conteniendo 1µL del plásmido pOPIN que vaya a usarse más el inserto a ligarse en agua libre de DNAasas junto con la enzima liofilizada. Se incuba la mezcla durante 15 minutos a 50°C.

Se transforma la mezcla resultante de la reacción In-Fusion en células de *E. coli* DH5α para amplificar el DNA plasmídico, que es extraído posteriormente mediante el kit E.Z.N.A[®] Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek, Norcross, USA). La placa sobre la que crecerán colonias de *E. coli* DH5α se impregna con 40µL de X-Gal (Thermo Scientific, Wilmington, De, USA) y de IPTG 100mM para poder verificar las posibles colonias que hayan crecido sin incorporar el plásmido junto con el gen de nuestro interés a expresar. Las bacterias que tengan el plásmido pero éste no tenga la secuencia recombinante pueden romper el X-gal presente en el agar del medio, tornándose sus colonias de color azul. Las bacterias que han sido transformadas correctamente, no pueden procesar X-gal y permanecen con su coloración blanca natural.

Los productos de PCR e IN-Fusion correctamente transformados fueron posteriormente secuenciados para confirmar que la secuencia era la deseada.

- Mutagénesis dirigida

Se utilizó esta técnica para introducir mutaciones puntuales en la secuencia nativa del DNA de P116, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos (ver Tabla 2.1).

En la mutagénesis dirigida de dos pasos, primero se elongan dos fragmentos independientes en dos PCRs distintas: uno va del N-terminal hasta el lugar de la mutación y el otro va desde la mutación

hasta el C-terminal. Los tiempos y ciclos usados para estas primeras PCRs son iguales que los comentados en el apartado anterior. Después se juntan estos dos fragmentos obtenidos para que hibriden y den el fragmento total en una reacción de PCR donde los tiempos y temperaturas se corresponden con los siguientes pasos:

- 1.- Desnaturalización → 95°C, 1min
- 2.- Desnaturalización → 95°C, 30s
- 3.- Hibridación → 52°C, 1min
- 4.- Elongación → 68°C, 16min
- 5.- Extensión final → 68°C, 10min

Los pasos del 2 al 4 se repiten durante **16 ciclos**. Tras ésto, los productos resultantes se dejan enfriar para después cargarlos en un gel de agarosa y corroborar que obtenemos constructos del tamaño deseado. Después se prosigue con la reacción de In-Fusion y transformación en células *E.coli* DH5α como en una clonación estándar, llevando a secuenciar el plásmido con el gen mutado introducido y comprobando que se ha mutado adecuadamente.

6.- Métodos de producción y análisis de proteínas

6.1.-Preparación de extractos celulares totales

Los cultivos celulares se centrifugan a 4500rpm durante 20 minutos a 4°C y los precipitados (pellet) resultantes se resuspenden en tampón 0.15M NaCl, 0.02M Tris-HCl pH 7.4 que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Roche, Basilea, Switzerland) en una proporción de 10mL de tampón de lisis por litro de cultivo. Se procede al lisado de células mediante disruptor celular o sonicador Vibra-Cell VCX 750W y los sobrenadantes, que contienen la proteína de interés, se obtienen centrifugando los extractos celulares a 20000rpm durante 30 minutos a 4°C. Se filtran los sobrenadantes mediante filtros de 0.22 μm antes de ser inyectados en alguna columna de cromatografía líquida.

6.2.-Técnicas cromatográficas de purificación de proteínas

Para llevar a cabo estudios de biología estructural, así como análisis bioquímicos, se deben aislar las proteínas de interés. El alto nivel de pureza necesario para el análisis de las proteínas por técnicas de biología estructural se consigue, generalmente, a través de pasos de purificación por cromatografía líquida. En cada uno de estos pasos una parte de la proteína se pierde, de manera que el protocolo de purificación de cada proteína consiste en conseguir el máximo grado de pureza empleando el menor número de pasos posibles. Éstos son seleccionados dependiendo del tamaño de la proteína, de su carga eléctrica y solubilidad. Los métodos cromatográficos se realizaron en equipos automatizados de FPLC y HPLC.

- Cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado (IMAC)

El lisado celular es inyectado en una columna HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) previamente equilibrada en tampón de lisis (0.15M NaCl, 0.02M Tris-HCl, 0.03M imidazol, pH 7.4). En este caso la proteína diana, que contiene una cola de 6 histidinas en el C-terminal, se une específicamente a los iones de Ni²⁺ de la columna. La elución de la proteína se lleva a cabo mediante un gradiente lineal de 0 a 0.4M de imidazol.

- Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía líquida de intercambio iónico permite separar proteínas según su carga eléctrica. La columna Mono Q (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) está preparada para el intercambio aniónico, conteniendo una fase estacionaria con carga positiva que atrae a las moléculas cargadas negativamente. La elución de las proteínas retenidas por la matriz de la columna se consigue así aplicando un gradiente de sal, en nuestro caso de 0 a 1M de NaCl, resultando en la neutralización o en el cambio de los grupos funcionales de la proteína.

- Cromatografía de gel filtración (SEC)

La SEC es un método para separar macromoléculas basado en su radio hidrodinámico en solución. El volumen en el cual la macromolécula es eluída es directamente proporcional al tiempo en el que es retenida en la columna e inversamente proporcional a su peso molecular. La SEC se utilizó siempre como último paso de purificación, permitiendo la evaluación de la homogeneidad y del estado de oligomerización de la muestra. Se utilizaron columnas de gel filtración Superdex (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) y el rango de separación se escogió según el tamaño de la proteína a purificar.

6.3.-Desnaturalización, vaciado y renaturalización de P116

Se probaron diferentes métodos para tratar de eliminar el contenido lipídico de la cavidad hidrofóbica presente en la proteína P116, incluyendo el tratamiento con agentes desnaturalizantes agresivos como el cloruro de guanidinio y la urea, utilizando métodos de diálisis para cambios de buffer y columnas sin conseguir vaciar con éxito la proteína. Finalmente, para obtener P116 vacía con éxito, se añadió detergente Triton X-100 al 1,3 % a la muestra de proteína y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. De forma detallada el proceso seguiría de la siguiente manera:

1.- Colocar la P116 nativa en un tampón Tris 0.02M, imidazol 0.02M, Triton X-100 0.002M, pH 7.4. La proporción de Triton X-100 a añadir es de aprox. 1.3mL por cada 1L de tampón.

2.- Incubar 6 miligramos (o más) de la muestra P116 durante 1 hora a temperatura ambiente en este tampón con detergente. Luego, utilizando una columna Histrap HP de 5mL, inyectar esta muestra y lavar con 5 volúmenes de columna con este tampón con Triton X-100 mientras la proteína ya está atrapada en la columna Histrap HP. Luego lavar con otros 5 volúmenes de columna al menos con tampón sin detergente (solo Tris 0.02M e imidazol 0.02 M a pH 7,4). A continuación, separar y recoger la proteína de la columna con un gradiente con tampón de imidazol 0.4M.

Utilicé este método para limpiar el detergente de la muestra y recuperar la proteína, aunque comprobé que añadiendo un lavado con urea posterior al tratamiento con detergente también se vaciaba adecuadamente.

6.4.-Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó según los protocolos estándares (Shapiro, Vinuela et al. 1967, Weber and Osborn 1969). Las muestras se desnaturizaron por el calor a 95°C durante 5min en presencia de 5% (w/v) de dodecilsulfato sódico (SDS) y 0.025% (w/v) de azul de bromofenol, y luego se cargaron en el gel. Éste se corre a un voltaje constante de 190Ma. El marcador de peso utilizado es el SeeBlue[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), el cual utiliza los siguientes estándares de proteína preteñidos: miosina (250kDa), BSA (98kDa), glutamato deshidrogenasa (64kDa), alcohol deshidrogenasa (50kDa), anhidrasa carbónica (36kDa), mioglobina (30kDa), lisozima (16kDa), aptrotinina (6kDa) y cadena B de la insulina (4kDa).

Tinciones de geles de poliacrilamida con One-Step Blue[®]

La tinción de geles de poliacrilamida con el teñidor One-Step Blue[®] es un método cuantitativo y específico que detecta de 10 a 20ng de proteína por banda. El producto es una solución de tinción de gel de proteína azul visible. Sin necesidad de pasos de fijación o lavado, es una opción mejorada respecto al azul de Coomassie, con mayor sensibilidad.

El procedimiento de tinción consta de solo un paso, dejando el gel tiñéndose durante al menos 20minutos. El desteñido es opcional, simplemente con un lavado con agua.

6.5.-Experimentos de proteólisis limitada

Estas pruebas se llevan a cabo para identificar fragmentos de la proteína de interés que se comportan como dominios globulares más estables que el constructo entero y que, por tanto, tengan más posibilidades de cristalizar de forma más ordenada. Estos experimentos se basan en el hecho de que las proteínas más globulares son más resistentes a la proteólisis y que un simple análisis de los

productos de digestión en gel de poliacrilamida desnaturalizante permite una fácil identificación de estos fragmentos por su tamaño y sabiendo los posibles lugares de corte de las enzimas utilizadas (Fontana, Fassina et al. 1986). Se utilizaron mezclas de la proteína P116 a 0.2mg/mL en presencia de las siguientes diluciones de las proteasas tripsina (1mg/mL), quimotripsina (1mg/mL), enteroquinasa (1mg/mL), trombina (1mg/mL) y papaína (1mg/mL): 1/3, 1/9, 1/25, 1/83 y 1/250; y CaCl₂ en tampón Tris-HCl 0.02M pH 7.4. Con papaína se añadió tampón K₂HPO₄ 1M y EDTA 0.025M para que la reacción transcurra en condiciones adecuadas. Las reacciones de proteólisis se bloquearon pasado el tiempo adecuado agregando tampón de carga de geles de poliacrilamida desnaturalizante.

6.6.-Metilación reductora de residuos de lisinas.

Se utiliza para alterar propiedades de cristalización de proteínas cuando se dificulta este proceso con la proteína nativa. Cambia las propiedades de la proteína (pI, solubilidad e hidropatía) que pueden promover la cristalización a través de la mejora del embalaje del cristal. Se siguió estrictamente el manual del kit de metilación reductora (Hampton Research) con soluciones de borano de dimetilamina, formaldehído y DTT. La metilación puede alterar la superficie de la proteína en una forma en que las condiciones de cristalización para la proteína nativa puede que no produzcan cristales de la forma metilada.

7.- Métodos biofísicos para la caracterización proteica

La determinación estructural de proteínas requiere comprender su comportamiento en solución, así como su estabilidad y propensión a sufrir cambios conformacionales o a agregar en función de las condiciones experimentales (composición del tampón utilizado, temperatura, tiempo). Éstos son los principales motivos por los cuales se realizan algunas técnicas biofísicas que permiten caracterizar las proteínas en solución.

7.1.-Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de DLS permite evaluar la monodispersidad de soluciones proteicas puras y estimar el radio hidrodinámico de partículas en solución de una manera rápida y sensible (Pecora, 2000). Los ensayos de DLS se realizaron a temperatura ambiente con 50µL de muestra de P110 citoplasmática a 1mg/mL de concentración en tampón 0.15M de NaCl, Tris-HCl 0.02M pH 7.4 utilizando el instrumento de DLS Zetasizer Nano (Malvern Instruments)

7.2.-Dispersión de luz en múltiples ángulos-cromatografía de gel filtración (SEC-MALS)

Generalmente se ha utilizado la cromatografía de gel filtración para caracterizar de manera aproximada el peso molecular de proteínas. Este peso molecular se puede determinar cuando se usan como referencia proteínas de peso molecular conocido, pero hay limitaciones en la técnica, como el hecho de que la elución de la proteína no solo depende de su masa, sino también de la forma y tendencia de ésta a interactuar con la matriz de la columna. La técnica de dispersión de luz (Light Scattering) también se ha utilizado durante muchos años como método para determinar el peso molecular, la forma y las oligomerizaciones de proteínas en solución (Wyatt, 1993). Cuando la luz pasa a través de un medio, como puede ser un solvente, la interacción con las moléculas produce una dispersión del haz de luz emitido. Esta dispersión puede ser detectada y su intensidad puede ser registrada en diferentes ángulos del haz de luz. La ventaja de usar MALS acoplado a un sistema de cromatografía de exclusión molecular es que permite determinar el peso molecular absoluto, el tamaño (radio de giro, R_g) y la conformación de las proteínas porque se puede calcular la cantidad de luz dispersada de cada ángulo, solventando los problemas asociados a detectores de bajo ángulo. La cantidad de luz dispersada se relaciona con la masa según la ecuación:

$$K^*c/R(\Phi,c)=1/M_wP(\Phi)+2A_2c$$

Donde $R(q,c)$ es el exceso del ratio Raleigh de la solución en función del ángulo dispersado q y la concentración c . Es directamente proporcional a la intensidad de la luz dispersada por el solvente. C es la concentración del soluto. M_w es la media del peso molecular. A_2 es el segundo cociente de expansión virial de la presión osmótica. K^* es la constante $4\pi^2(dn/dc)^2n_0^2/N_a\lambda_0^4$. N_a es el número de Avogadro y la $P(\Phi)$ describe la dependencia angular de la luz dispersada y se puede relacionar con el radio rms (Zimm, 1948).

Para realizar estos experimentos se cargaron entre 50-100 μ L (según concentración de cada muestra) de diferentes constructos de P116 en diferentes condiciones de tampón y aditivos. Los pesos moleculares resultantes se midieron usando una columna en un sistema de cromatografía líquida Prominence (Shimadzu) conectado a un detector DAWN HELEOS II de dispersión de luz multiángulo (MALS) y un detector de índice de refracción (dRI) Optilab T-REX (Wyatt technology). Se utilizaron las columnas Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare), así como una Superdex 200 10/300 GL (GE, Healthcare), previamente equilibradas con tampón Tris 0.02M y pH 7.4.

Se utilizó el software ASTRA[®] 7 (Wyatt Technology) para el procesamiento de datos y análisis de los resultados. Para los cálculos se asumió un valor dn/dc de 0,185 ml/g (típico de las proteínas).

8.- Western Blott

En nuestro caso se utilizó para valorar con mayor precisión la presencia de lipoproteínas en los posibles complejos formados al incubar la proteína P116 junto con varios tipos de lipoproteínas y observar mediante gel en condiciones nativas que se forman agregados de gran tamaño, a los cuales les dificulta penetrar en el gel.

En general es un método empleado para detectar una proteína específica en una muestra donde confluyen diferentes proteínas, comúnmente de sangre o tejido. El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. En nuestro caso se realizó un gel no desnaturante cargando 30µL de P116 incubada con HDL, LDL y VLDL. Se corre el gel durante unas 16 horas a bajo voltaje y a 4°C. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana previamente activada con metanol, después lavada y equilibrada con tampón de transferencia. La membrana de transferencia Immobilon-PVDF (Millipore) se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio, lo cual nos dará información acerca de su presencia cuantitativa en cada muestra.

Una vez transferido el anticuerpo a la membrana se sigue la siguiente metodología:

- Bloqueo de la membrana con tampón con leche en polvo
- Incubación con el anticuerpo primario de P116 diluido en el mismo tampón de bloqueo durante 16 horas y con una dilución 1/500 del anticuerpo.
- Lavar 3 veces con tampón conteniendo TBS-Tween durante 10 minutos cada vez.
- Incubación con anticuerpo secundario con fluorescencia (anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa 555, Invitrogen) 2 horas a temperatura ambiente y con una dilución 1/20000. Paso fundamental para poder detectar la presencia de P116 en cada banda del gel y amplificar la señal.
- Lavar 3 veces con tampón conteniendo TBS-Tween durante 10 minutos cada vez. Para eliminar uniones inespecíficas, aunque en nuestro caso apenas debía haber.
- Lavar solo con TBS para eliminar el tween y que la imagen salga más limpia, aumentando la nitidez en la señal.
- Detección mediante tampón y equipo revelador.

9.- Criomicroscopía electrónica (Crio-EM)

9.1.-Crio-EM de partícula única (single particle)

Realizado por el grupo del profesor Achilleas Frangakis en el Instituto Buchmann en Frankfurt, Alemania. Se aplicaron 3.5 μl de 100 $\mu\text{g/ml}$ de P116 purificada sobre rejillas planas R1.2 / 1.3 C descargadas por brillo (30 segundos) (Electron Microscopy Science, Hatfield, EEUU) y congeladas por inmersión en etano líquido (Vitrobot Mark IV, Thermo Fisher Scientific) en las siguientes condiciones: 100 % de humedad, 4 °C de temperatura, fuerza de transferencia (blot force) -3, tiempo de espera de 45 s, con un tiempo de transferencia (blotting) de 12 s.

Previo a la congelación los papeles de filtro se incubaron durante 1 hora en el Vitrobot al 100 % de humedad y 4°C. Se recogieron películas fraccionadas por dosis con un aumento de 130 000x (1,05 Å por píxel) en modo nanosonda EFTEM a 300 kV con un microscopio electrónico Titan Krios (Thermo Fisher Scientific) equipado con un filtro de energía GIF Quantum S.E. post-columna en modo de pico de pérdida cero y un detector K2 Summit (Gatan Inc.).

En total se recogieron 4376 micrografías a 34 fotogramas por micrografía y con un tiempo de fotograma de 0.2 s. La cámara fue operada en modo de conteo de fraccionamiento de dosis con una tasa de dosis de ~ 8 electrones por $\text{Å}^2 \text{s}^{-1}$, lo que resulta en un dosis total de 50 electrones por $\text{Å}^2 \text{s}^{-1}$. Los valores de desenfoque oscilaron entre -1 y -3,5 μm con un astigmatismo marginal (0,1 μm).

9.2.-Procesamiento de partículas individuales

Se utilizó CryoSPARC v3.2 para el procesamiento de los datos de crio-EM, a menos que se indique lo contrario. La corrección de movimiento inducido por haz y la estimación de CTF fueron realizados utilizando la propia implementación de cryoSPARC. Inicialmente se escogieron las partículas con el “selector de manchas” con un diámetro de 200 - 300 Å. Posteriormente las partículas fueron sometidas a clasificación 2D no supervisada. Para el procesamiento final los promedios 2D generados se tomaron como plantillas para la recolección automatizada de partículas. En total se recogieron y extrajeron 3463490 partículas con un tamaño de caja de 256 píxeles. Los falsos positivos seleccionados fueron eliminados por dos rondas de clasificación 2D no supervisada. Las 1.324.330 partículas restantes se usaron para generar una reconstrucción desde el principio con 3 clases diferentes. Para clasificar la gran heterogeneidad, las partículas se sometieron posteriormente a un refinamiento con tres clases. Para el procesamiento final se utilizaron 1.315.362 partículas. El movimiento de la muestra inducido por el haz fue corregido localmente para las partículas restantes. La CTF (función de transferencia de contraste) se refinó por grupo sobre la marcha dentro del refinamiento no uniforme. La resolución global obtenida del homodímero fue de **3.3 Å**. Para analizar la muestra con respecto a su flexibilidad, las partículas se sometieron al análisis de variabilidad 3D de cryoSPARC, que se utilizó para mostrar el movimiento continuo de la proteína.

10.- Aislamiento de HDL y determinación de la tasa de transferencia de colesterol por radiactividad

Se aisló HDL humana (rango de densidad 1,063-1,210 g/mL) del plasma de donantes sanos mediante ultracentrifugación de densidad de gradiente secuencial, utilizando bromuro de potasio para el ajuste de densidad, a 100.000 g durante 24 h con un rotor analítico de ángulo fijo (50.3, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se determinó la cantidad de colesterol y apolipoproteína (Apo)A1 enzimáticamente y por ensayo inmunturbidimétrico, respectivamente, utilizando kits comerciales adaptados para un autoanalizador COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

Las HDL radiomarcadas se prepararon como describen Cedó et al (Cedó, 2020).

Brevemente, 10 μCi de [1,2- ^3H (N)] colesterol libre o colesterol oleato de [1,2- ^3H (N)]colesteril oleato (Perkin Elmer, Boston, MA) se mezclaron con etanol absoluto y el solvente se secó bajo una corriente de N_2 . Se añadió HDL (0,5 mL, 2,25 g/L de ApoA1) a los tubos que contenían los radiotrazadores, según corresponda, y luego se incubaron durante 16 h en un baño a 37 °C. Las HDL etiquetadas (tanto ^3H -colesterol como ^3H -colesteril oleato que contienen HDL) se volvieron a aislar por gradiente de ultracentrifugación de densidad a 1,063–1,210 g/mL y dializadas frente a PBS mediante cromatografía de gel filtración.

Las actividades específicas de ^3H -colesterol y ^3H -colesteril oleato que contienen las HDL fueron 1221 y 185 cuentas por minuto (cpm)/nmol, respectivamente. La transferencia de colesterol a P116 (1 g/l) fue medida después de agregar [^3H] colesterol libre u [^3H] oleato de colesterilo, contenidos ambos en las HDL (0,5 g/L de APOA1) y siendo incubado durante 2 h a 37 °C. Las HDL y P116 fueron separadas mediante cromatografía de afinidad (Histrap™ HP). La radiactividad asociada con cada fracción de P116 y HDL fue medida a través del recuento de centelleo líquido utilizando el contador de centelleo polivalente LS 6500 (Beckman Coulter). El % de [^3H]colesterol transferido por mL fue determinado para cada condición. Las actividades específicas de cada radiotrazador se utilizaron para calcular los nmols de colesterol libre y éster de colesterilo transferidos de HDL a P116.

11.- Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

Los espectros de masas MALDI se registraron en un espectrómetro de masas Sciex TOF/TOF 4800 Maldi equipado con un láser Nd:YAG (355nm). Los análisis de masa de tiempo de vuelo se adquirieron en el modo de iones positivos de Reflectron para la fracción lipídica y en el modo de iones positivos lineales para las proteínas. Las soluciones de las muestras se diluyeron 1:2 o 1:5 en metanol antes del análisis. Se midieron las diferentes masas de las moléculas que están presentes en P116, P116 tratada con 1.3% Triton X-100 y P40/P90.

- Para la fracción lipídica

1µL de la solución muestra se mezcló con 1µL de la **solución matriz DHB** (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) (solución saturada en acetonitrilo); Se colocó 1µL de estas mezclas en la placa de muestra y se dejó secar al aire antes del análisis. Se registraron espectros desde valores de 300 a 1600 m/z y se observaron las especies predominantes en el rango de masa (m/z) 300-850 Da.

La identificación química de los lípidos predominantes en la muestra se realizó a partir de los valores de m/z detectados: [M+H]⁺ y [M+Na]⁺ para cada compuesto, según la bibliografía. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) basada en iones de fragmentos principales del espectro MS/MS después de realizar la selección de masa monoisotópica manual para cada especie molecular individual (aductos de H⁺ y Na⁺) confirmó la identificación lipídica (PC, SM).

- Para las Proteínas

1µL de solución matriz de SA (ácido sinapínico) (27mg/ml Acetona:H₂O 99:1) se colocó sobre la placa de muestra y se dejó secar. 1µL de la solución de muestra se colocó sobre la mancha de SA anterior y se deja secar; finalmente se esparció 1µL de solución matriz SA (10mg/ml H₂O:CH₃CN 1:1 0.1%TFA) sobre la mancha seca anterior y se dejó secar antes del análisis.

Los espectros fueron registrados en el rango de masas (m/z) 20000-150000 Da.

12.- Difracción de rayos X en cristales de proteína

12.1.-Cristalización de proteínas

La obtención de cristales de proteínas cuya difracción por rayos X proporcione una resolución de **3-3.5Å** o menor, que permita resolver la estructura, es el paso limitante de la cristalografía de proteínas. En el caso de la P116 no se consiguió bajar de los **8Å**, por lo que la resolución de la estructura vino gracias a mapas de alta resolución obtenidos por microscopía electrónica.

Para obtener cristales se realizan ensayos cuyo objetivo es provocar una sobresaturación de la solución proteica para que se de una precipitación ordenada en forma de cristal. Durante el proceso de cristalización se distinguen dos pasos: la nucleación y la fase de crecimiento del cristal. La fase de nucleación es favorecida por niveles de sobresaturación elevados, mientras que la fase de crecimiento del cristal es favorecida por niveles de saturación menores, ya que el objetivo es que el crecimiento sea lento y ordenado. (Jancarik, Kim 1991)

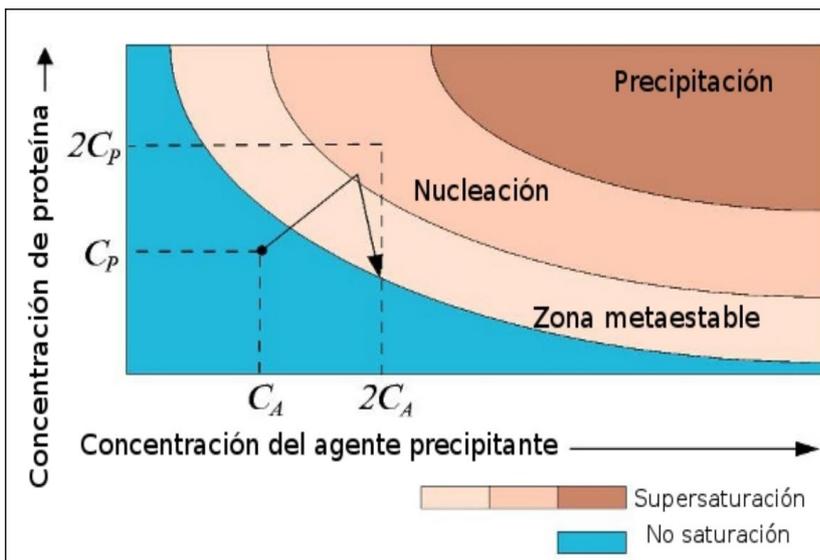


Figura 2.1. Diagrama de fases de los diferentes estados de saturación de una solución proteica, en función de la proteína y del agente precipitante. La **fase de crecimiento (o metaestable)** es la zona en la que se ve más favorecido el crecimiento del cristal. En la fase de nucleación, la concentración de ambos componentes es tal, que lo que se ve favorecido es la formación de núcleos de cristalización. Por último, está la fase de precipitado, que es donde las concentraciones de precipitante y proteína son tan altas que ésta última precipita de forma amorfa. El diagrama es específico para cada proteína y para cada precipitante, y no es extrapolable a otros casos. <https://temas-selectos-de-ciencias.blogspot.com/p/cristalografia.html>

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor, que consiste en establecer un equilibrio de vapor en una gota que contiene la proteína y la solución de cristalización que está en el reservorio. La gota de proteína con la solución de cristalización se cierra herméticamente sobre el reservorio para que se pueda dar el equilibrio entre fases. Con las

soluciones de cristalización se pueden testear diferentes condiciones, incluyendo el pH, precipitantes y aditivos. Normalmente, la concentración del agente precipitante es mayor que el de la gota de proteína y, por lo tanto, posee una presión de vapor inferior que el de la solución proteica, de manera que se producirá una evaporación de la solución proteica hacia el reservorio, resultando en la sobresaturación de la gota de proteína. Si las condiciones son favorables, esta sobresaturación dará lugar a la formación de cristales.

Existen dos maneras de llevar a cabo el método de difusión de vapor: el de **gota sentada** y el de **gota colgada**. En el método de la gota sentada la mezcla proteína/reservorio se deposita en un pequeño pocillo más elevado que el reservorio y se sella la placa con cinta adhesiva especial no porosa, impidiendo la evaporación hacia el exterior. Esta técnica se utilizó para los cribados de cristalización que fueron realizados en placas de 96 condiciones, en las cuales en general el robot dispensador (Oryx8 o Crystal Phoenix) depositaba gotas de 100-125nL de solución con la proteína más 100-125nL de la solución de cristalización del reservorio en cada pocillo. Cuando se obtenían resultados prometedores de estos cribados iniciales, se optimizaban las condiciones de cristalización a gran escala y manualmente, utilizando placas Limbro de 24 pocillos y usando el método de gota colgada. Con esta técnica la solución proteica con la solución de cristalización se deposita en un cubreobjetos que sellará el hueco con el reservorio.

Se probaron placas estándar como PAC-1, PAC-2, PAC-3, PAC-4, PEG Rx, PGA, PAC-7, PAC-16, etc. De las condiciones donde más cristalizaba P116, se realizaron numerosas placas manuales de optimización, probando relaciones de gota 1:1, 1:2 y 2:1 en cuanto a la proporción entre proteína y solución de cristalización. También se probaron placas añadiendo diferentes derivados y con glutaraldeído, realizando **cross-linking** para intentar aumentar la estabilidad de la proteína al formar cristales.

Las cristalizaciones se realizaron tanto a 20°C como a 4°C y las optimizaciones manuales se diseñaron variando las concentraciones de los componentes de la solución de cristalización, el pH, el precipitante o los aditivos (Chayen, 1998 & Dessau and Modis, 2011).

12.2.-Floppy-Choppy

Se utilizó esta técnica para tratar de obtener constructos de la P116 más estables para su cristalización in situ mientras la proteína se coloca para cristalizar, añadiendo a la mezcla pequeñas cantidades de proteasas, en las que previamente se ha comprobado que proteolizan la proteína en fragmentos relativamente grandes y estables, para tratar de mejorar la ordenación de las moléculas mientras se forman los cristales. En mi caso añadí varias concentraciones de **quimotripsina**, la proteasa que comprobé que generaba cortes más prometedores que fueran estables, y dejé incubar 30min a 20°C la mezcla para que la quimotripsina pudiera actuar. Después se colocaban las gotas manualmente en placas Limbro como se menciona en el apartado de cristalización de proteínas.

12.3.-Microseeding

En un eppendorf con una pequeña bolita de plástico se depositan gotas conteniendo unos 15-50 cristales del tipo que mejor difracten, donde se procede a machacarlos vorteano sucesiva y enérgicamente el eppendorf repetidas veces para que la bolita impacte contra los cristales. Tras esto se obtienen pequeños núcleos de cristales que se usarán como fuente de proteína para colocar nuevas gotas con su correspondiente solución de cristalización. Al partir de núcleos ya ordenados, teóricamente la proteína formará cristales de forma más sencilla y ordenada.

12.4.-Crioprotección de cristales de proteínas

Los cristales de proteína, a diferencia de los cristales de sal o de moléculas pequeñas, son muy sensibles a la manipulación, a la deshidratación y a los cambios de temperatura, por lo que se debe tener mucho cuidado al trabajar con ellos. Para manipularlos se usan loops o asas fabricados con materiales orgánicos que minimizan el impacto al tocarlos. Cuando se exponen los cristales proteicos a un haz de rayos X pueden sufrir daño por esta radiación y provocar que los datos de difracción pierdan resolución y calidad. Por este motivo es necesario que los cristales se congelen muy rápidamente y así evitar la formación de hielo cristalino en la muestra, lo que distorsionaría el orden interno del cristal e interferiría en el patrón de difracción obtenido. Por este motivo se añaden crioprotectores que provocan un estado vítreo del solvente. En nuestro caso, en general, los cristales fueron sumergidos en criotampones compuestos por la solución de cristalización a la que se le añade un **20-30% de glicerol**. A continuación, son pescados con un loop de dimensiones apropiadas al cristal y se congelan rápidamente en nitrógeno líquido. Los loops se depositan en dispositivos que se introducen en recipientes dewars rellenos de nitrógeno líquido para transportarlos hasta el lugar de difracción.

12.5.-Recogida, procesado y escalado de datos de difracción de rayos X

Todos los diferentes cristales de P116 se recogieron siempre en la línea XALOC del sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallés, Barcelona, España). Los datos se procesaron de forma automática con Xia2 (Winter, 2010), usando XDS (Kabsch, 2010), Aimless y Pointless (Evans, 2006) del conjunto de programas CCP4 (Collaborative, 1994).

13.- Resolución de la estructura tridimensional

13.1.-Construcción y refinado de los modelos moleculares

Los **mapas de densidad electrónica obtenidos a partir de la microscopía electrónica** fueron utilizados para reconstruir los modelos iniciales de manera manual con el programa **Coot** (Emsley, 2004). Los modelos fueron mejorados alternando ciclos de refinamiento con el programa **Phenix Real Space Refinement** (Afonine, 2013), y de construcción interactiva del modelo con el programa Coot. Usando el refinado variando las secuencias, cortando y añadiendo residuos, el propio programa modificaba los parámetros del modelo. Se probaron varios modelos y secuencias, eligiendo siempre la densidad que mejor se ajustaba al mapa. Además, gracias a los parámetros que se obtienen conforme construíamos o modificábamos, podíamos comprobar el grado de acierto.

El rastreo inicial del dominio central se realizó manualmente con Coot, y contenía numerosas lagunas y ambigüedades que se pulieron lentamente mediante el refinamiento de ciclos alternos, con el protocolo “Real Space” en el programa **Phenix** (Liebschner, 2019) y la reinterpretación y reconstrucción manual con Coot. Para el dominio N, el rastreo y la asignación de residuos específicos fue muy difícil, debido a la baja resolución local del mapa para este dominio, y solo se logró una interpretación parcial. Se identifican solo algunas hélices y hojas beta del dominio N, y del C terminal se pierde la secuencia a partir del residuo 867. La dificultad del modelaje vino porque hubo 2 mapas anteriores cuya resolución era bastante baja y no permitía identificar la secuencia de los elementos de estructura secundaria identificados. Posteriormente, conforme se fueron haciendo varios ciclos en Crio-EM se mejoró la resolución del mapa y se pudo ir construyendo el modelo exactamente.

Cuando el servidor de modelaje estructural **Alphafold** (Jumper, J et al. 2021) estuvo disponible, se obtuvieron predicciones de la estructura del dominio N que presentaban cierta variabilidad al usar diferentes tramos de la secuencia. Las mejores predicciones seleccionadas utilizando el modelo parcial ya disponible, permitieron completar la interpretación del mapa, aunque algunos residuos en el extremo N del dominio permanecieron difíciles de identificar y quedaron como alaninas. Así, se cogió el modelo del dominio N-ter que más se ajustaba a la densidad parcial que teníamos en el mapa para ese dominio y se utilizó como modelo en nuestra estructura final. Luego, todo el modelo P116 se refinó con Phenix y la estructura refinada final se depositó en el PDB con el código XXXX.

13.2.-Validación de la estructura

La validación de una estructura consiste en examinar tanto los datos experimentales como los del modelo para detectar errores o desviaciones y confirmar la idoneidad del modelo. Los indicadores utilizados para medir el buen ajuste del modelo a los datos experimentales en nuestro caso fueron: **Sidechain outliers** (cuáles residuos están fuera de la densidad del mapa o del mtz), **Clashscore**

(número de choques por cada 1000 átomos), diagrama de **Ramachandran** - en él se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido - y el **CC del modelo al mapa** (correlación del refinado que indica cómo se ajusta el modelo al mapa). Parámetros que miden la calidad del modelo, algo relevante para el refinado a partir de mapas obtenidos por microscopía electrónica. Otros factores como el R_{factor} , que estima el desacuerdo entre los factores de estructura observados y los calculados, indicando lo bien que el modelo predice las amplitudes de las reflexiones medidas, no fueron de importancia en nuestro caso.

La calidad del modelo también debe ser evaluada según parámetros estereoquímicos. Se analiza que haya ausencia de choques entre las cadenas laterales de los aminoácidos, que las distancias entre átomos y los ángulos de los enlaces sean geoméricamente adecuados y que los parámetros térmicos sean razonables. Además de estos parámetros es importante contrastar que las conformaciones que adoptan los enlaces N-C α y C α -C del enlace peptídico no dan lugar a aproximaciones interatómicas energéticamente improbables. Las torsiones del enlace peptídico presentan en principio libertad de giro, sin embargo, cada uno de estos ángulos está energéticamente limitado a intervalos definidos en el diagrama de *Ramachandran*, que muestra las regiones permitidas de estos ángulos para cada uno de los tipos de estructura secundaria. El conjunto de estos parámetros de nuestra estructura construida nos permitió valorar que se correspondía con el modelo del mapa obtenido.

14.- Generación de anticuerpos policlonales y monoclonales

Realizado en colaboración con el grupo de Jaume Piñol en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

Se inmunizaron en serie dos ratones BALB/C con cuatro inyecciones intraperitoneales, cada una de las cuales contenía 150 μ g del ectodominio P116 recombinante (residuos 30-957) en 200 μ L de PBS sin adyuvantes. La última inyección se administró cuatro días antes de la esplenectomía. Los linfocitos B aislados de los ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma NSI (Köhler, 2005) para obtener líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales como se describió anteriormente (Guasch et al., 2019).

Los sobrenadantes de líneas celulares de hibridoma derivadas de células fusionadas únicas se investigaron primero mediante cribado ELISA indirecto frente al ectodominio recombinante de P116. También se probaron clones positivos mediante Western blot contra perfiles de proteínas de lisados de células de *M. pneumoniae*, y por inmunofluorescencia usando células enteras de *M. pneumoniae* no permeabilizadas (ver más abajo). En este trabajo solo se seleccionaron y usaron clones con sobrenadantes que detectaban una sola banda de 116 kDa en los perfiles de proteínas y que también exhibían una tinción fluorescente consistente de células de *M. pneumoniae*.

Se obtuvieron sueros policlonales mediante punción cardiaca de ratones sacrificados correctamente justo antes de la esplenectomía y se valoraron utilizando diluciones en serie del antígeno. El título de cada suero policlonal fue determinado como el valor IC50 de cuatro parcelas logísticas de parámetros

y se encontró que era aproximadamente 1/4000 para ambos sueros. También se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-P1 y anti-P90/P40 mediante la inmunización de dos ratones BALB/C con las proteínas recombinantes P1 y P40/P90 como se describe anteriormente (Vizarraga et al., 2020). El título obtenido de anticuerpos anti-P1 policlonales y anti-P40/P90 fue de aproximadamente 1/2500 y 1/3000, respectivamente.

15.- Microscopía de inmunofluorescencia.

Realizado en colaboración con el grupo de Jaume Piñol en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

La tinción de inmunofluorescencia de células de micoplasma en portaobjetos de cámara fue similar a la descrita anteriormente (Nakane, 2015) con varias modificaciones. Las células se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,02 % (PBS-T) precalentado a 37°C y cada pocillo se fijó con 200µL de paraformaldehído al 3% (peso/volumen) y glutaraldehído al 0,1%. Las células se lavaron tres veces con PBS-T y los portaobjetos se trataron inmediatamente con BSA al 3% en PBS-T (solución de bloqueo) durante 30 minutos. Se eliminó la solución de bloqueo y cada pocillo se incubó 1 hora con 100µL de los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Para sueros policlonales de P116 usamos una dilución 1/2000 y se usó una dilución 1/10 para anticuerpos monoclonales de sobrenadantes de hibridoma. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron durante 1 hora con una dilución 1/2000 de un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa 555 (Invitrogen) en solución de bloqueo. Luego, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron durante 20 minutos con 100µL de una solución de Hoechst 33342 10µg/µL en PBS-T. Finalmente, los pocillos se lavaron una vez con PBS-T y se repusieron con 100µL de PBS antes de someterlos al examen microscópico. Las células se observaron por contraste de fase y epifluorescencia en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000-E. Las imágenes de contraste de fase, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, excitación 387/11nm, emisión 447/60nm) y las imágenes de Texas Red (excitación 560/20nm, emisión 593/40nm) de epifluorescencia se capturaron con una cámara Orca Fusion controlada por el software NIS-Elements BR.

16.- Microcinematografía de lapso de tiempo - Ensayo de inmunoaderencia

Realizado en colaboración con el grupo de Jaume Piñol en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

El efecto de los anticuerpos anti P116 y el suero policlonal anti P1 sobre la adhesión de las células de micoplasma se investigó mediante cinematografía de lapso de tiempo de células de *M. pneumoniae* que crecían en portaobjetos de cámara de 8 pocillos IBIDI. Previa observación, el medio se reemplazó

con PBS que contenía 10 % de suero fetal bovino y 3 % de gelatina precalentada a 37°C. También se describió un medio similar (Seto, 2005) para probar el efecto de los anticuerpos P1 sobre la adhesión y la motilidad deslizante del micoplasma. Después de incubar 10 minutos a 37°C y 5% de CO₂, el portaobjetos se colocó en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000-E equipado con Microscope Cage Incubation System (Okolab) a 37 °C. Las imágenes se capturaron a intervalos de 0,5s durante un tiempo total de observación de 10min, y los diferentes anticuerpos se dispensaron directamente en los pocillos después de los primeros 60 segundos de observación. Las frecuencias de células móviles y células desprendidas antes de añadir los diferentes anticuerpos se calcularon a partir de las imágenes recogidas entre 0 y 60 segundos de observación. Las frecuencias de células móviles y células desprendidas después de agregar los diferentes anticuerpos se calcularon a partir de las imágenes recopiladas en el último minuto de observación.

17.- Inmunoensayo ELISA

Realizado en colaboración con el grupo del investigador Oscar Quijada en el laboratorio de microbiología del Hospital Universitario Parc Taulí. Se seleccionaron sueros de 25 pacientes con una infección causada por *M. pneumoniae* basada en un resultado positivo con el kit Liaison *M. pneumoniae* IgG, IgM (DiaSorin). Del mismo modo, también se seleccionaron seis sueros de donantes sanos y con resultados negativos para el kit Liaison *M. pneumoniae* IgG, IgM. En ambos casos, se utilizó una dilución 1/100 de los sueros del paciente. Se realizaron ensayos ELISA indirectos en placas de 96 pocillos Immulon 4 HBX placas de 96 pocillos (ThermoFisher) incubando 1 µg de cada antígeno a 4°C durante la noche. Se añadieron diluciones 1/100 de cada suero de paciente a la placa y se detectaron usando un anticuerpo IgG antihumano conjugado con HRP (Thermofisher Scientific). Tras la incubación durante 30 minutos con 100 µl de sustrato (Thermofisher Scientific), se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico al 25% para detener la reacción y se leyó la absorbancia a 450 nm en un dispositivo Triturus ELISA instrument (Grifols). El filtro de referencia se fijó a 620 nm. La significación estadística de la sensibilidad y la intensidad de la señal se evaluó con los test de Fisher y de Mann-Whitney U, respectivamente.

RESULTADOS

Se ha conseguido caracterizar tanto estructural como funcionalmente la proteína P116 inmunodominante. Los resultados obtenidos en este proyecto desvinculan la participación de P116 en el proceso de adhesión del patógeno humano *M. pneumoniae*, algo que difiere con lo publicado hasta el momento de esta proteína, como más adelante se explica. La caracterización estructural ha requerido la aplicación de diversos tipos de microscopias, así como complementación con la reciente IA Alphafold que predice los ensamblajes de proteínas. La cristalografía ha sido una metodología de ayuda en la aproximación estructural, pero nunca se pudo alcanzar la alta resolución mediante esta vía. La caracterización funcional ha implicado el análisis de diversos mutantes, así como el estudio de las interacciones con una variedad de sustratos, principalmente hidrofóbicos.

1.- ESTRUCTURA DE LA P116

1.1.-Clonaje, expresión y purificación de P116

Se diseñaron dos constructos, que van desde el residuo 13 al 957 y del residuo 30 al 957, con la intención de expresar todo el **ectodominio** de la proteína inmunorreactiva P116 de *M.pneumoniae* (ver figura 3.1). Para ello se utilizó el vector pOPINE (plásmido de Ray Owens #26043, Addgene, Watertown, USA), que añade una cola de 6 histidinas en el C-terminal de la proteína.

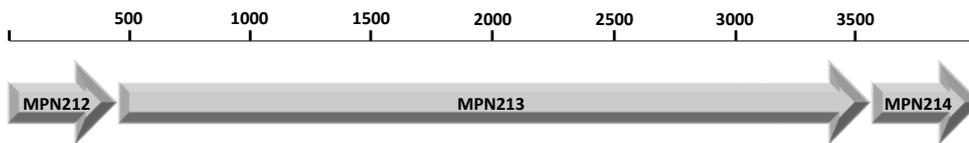
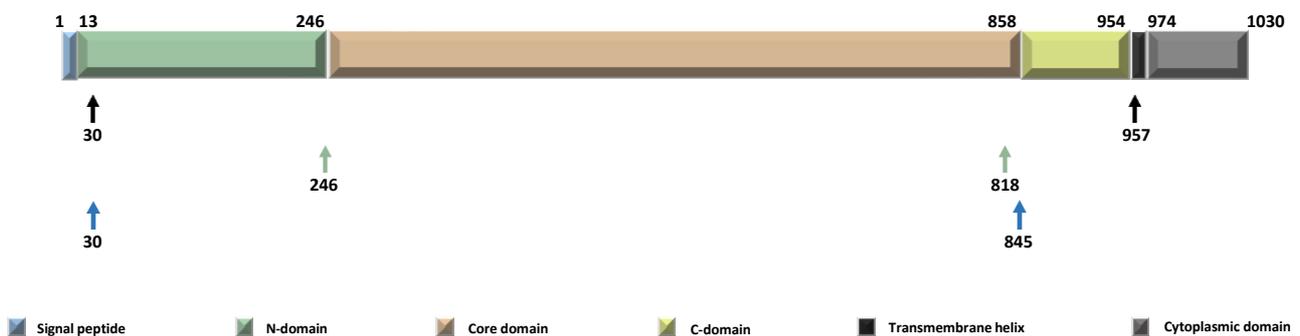
a**b**

Figura 3.1. Representación esquemática del operón en que se incluye la P116 y los constructos de MPN213 (P116). a) Operón del gen de P116 (MPN213) donde se muestra su posición en el genoma de *M. pneumoniae*. Se muestra que comparte ORF con MPN212 y MPN214. b) Se muestra la secuencia completa de la proteína P116, en diferentes colores cada dominio y en flechas señalando el origen y fin de los 3 principales constructos con los que se trabajaron en el proyecto

Para establecer el protocolo de expresión se realizaron varias pruebas de expresión usando siempre cepas bacterianas de *E.coli* BL21 (DE3), testando 2 temperaturas y tiempos de expresión (20°C, 16h y 37°C, 4h) e induciendo la expresión de proteína, una vez alcanzada una absorbancia de 0.6 en el cultivo celular, a concentración del inductor isopropil-b-D-tiogalactósido IPTG 0.6mM o en su ausencia.

Teniendo en cuenta que el peso molecular teórico del constructo diseñado de P116 es **105kDa**, calculado mediante el servidor ProtParam (Gasteiger, 2005), los extractos crudos resultantes de la disrupción de las células se analizaron por gel de poliacrilamida SDS-PAGE (15%) y la banda mayoritaria correspondía a la expresión a 20°C, 16h (overnight) y a 0.6mM de IPTG en esta cepa BL21 (DE3), siendo éstas las condiciones óptimas que se utilizaron regularmente para la expresión de todos los constructos de P116. A 37°C se observaba una banda de expresión, pero en menor cantidad, y cierta expresión también ocurre debido al goteo producido por el plásmido (sin IPTG). Se comprobó como prácticamente la totalidad de la proteína recombinante producida era **soluble** en estas condiciones (ver figura 3.2 a).

Con el protocolo establecido, se procedió a la sobreexpresión y purificación a gran escala, normalmente implicando la expresión en *E.coli* BL21 de 1-2L de cultivo LB.

La purificación consiste en un primer paso de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. Utilizando una columna HisTrap™ HP de 5mL (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) equilibrada con el tampón de carga 0.15M NaCl, PBS 1X pH 7.4, y un gradiente lineal de imidazol a una concentración final de tampón de elución 0.15M NaCl, PBS 1X, imidazol 0.4M pH7.4. La proteína eluye en 2 picos amplios como se puede observar en el análisis de un gel desnaturante SDS-PAGE al 15% (v/v) de acrilamida donde se cargaron las fracciones recogidas (Figura 3.2 b). El inicio del pico 1 contenía relativamente más contaminantes que el resto de alícuotas, por lo que se seleccionaron las fracciones correspondientes a la mitad posterior del pico 1 y el pico 2 completo para siguientes purificaciones. Estas alícuotas seleccionadas son concentradas mediante filtros de 50kDa para centrífugas (Amicon, Darmstadt, Alemania) y después inyectadas en una columna de gel filtración Superdex 200 10/300 o Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) según la cantidad de proteína total obtenida, y previamente equilibradas con el tampón 0.15M NaCl, 0.02M Tris-HCl pH 7.4. Se analizan las fracciones obtenidas de esta purificación en un gel de poliacrilamida desnaturante al 15% (V/v) de acrilamida donde se observa que la muestra ya presenta un aspecto realmente puro, sin prácticamente rastro de contaminantes (Figura 3.2.c).

El volumen de elución del pico 2 en la columna de gel filtración (Figura 3.2.c) oscilaba entre los 10ml y 11ml, lo que corresponde aproximadamente con el peso molecular del dímero de este constructo de P116 (unos 225kDa, sumando los 13kDa extra de las moléculas hidrofóbicas dentro de la cavidad). Ésto nos indicaba que la proteína en solución eluía en un punto muy diferente al de otras proteínas con el mismo tamaño molecular. Comparando con estándares para este tipo de columnas, otras proteínas con pesos moleculares mayores que el de P116 eluyen más tarde. En este punto podíamos sospechar que la P116 se encontraba en **estado dimérico** o que la forma de la proteína no era globular, haciendo que eluya en un V_e menor que el que le correspondería por su peso. Ambas suposiciones se confirmaron más tarde mediante el análisis por Sec-MALS y la Crio-EM. Para asegurar la naturaleza de las bandas de proteína, se llevaron a analizar por la técnica de identificación mediante su huella peptídica, la banda mayoritaria junto con la banda de contaminante de mayor intensidad, indicando que efectivamente la banda mayoritaria correspondía siempre a la P116.

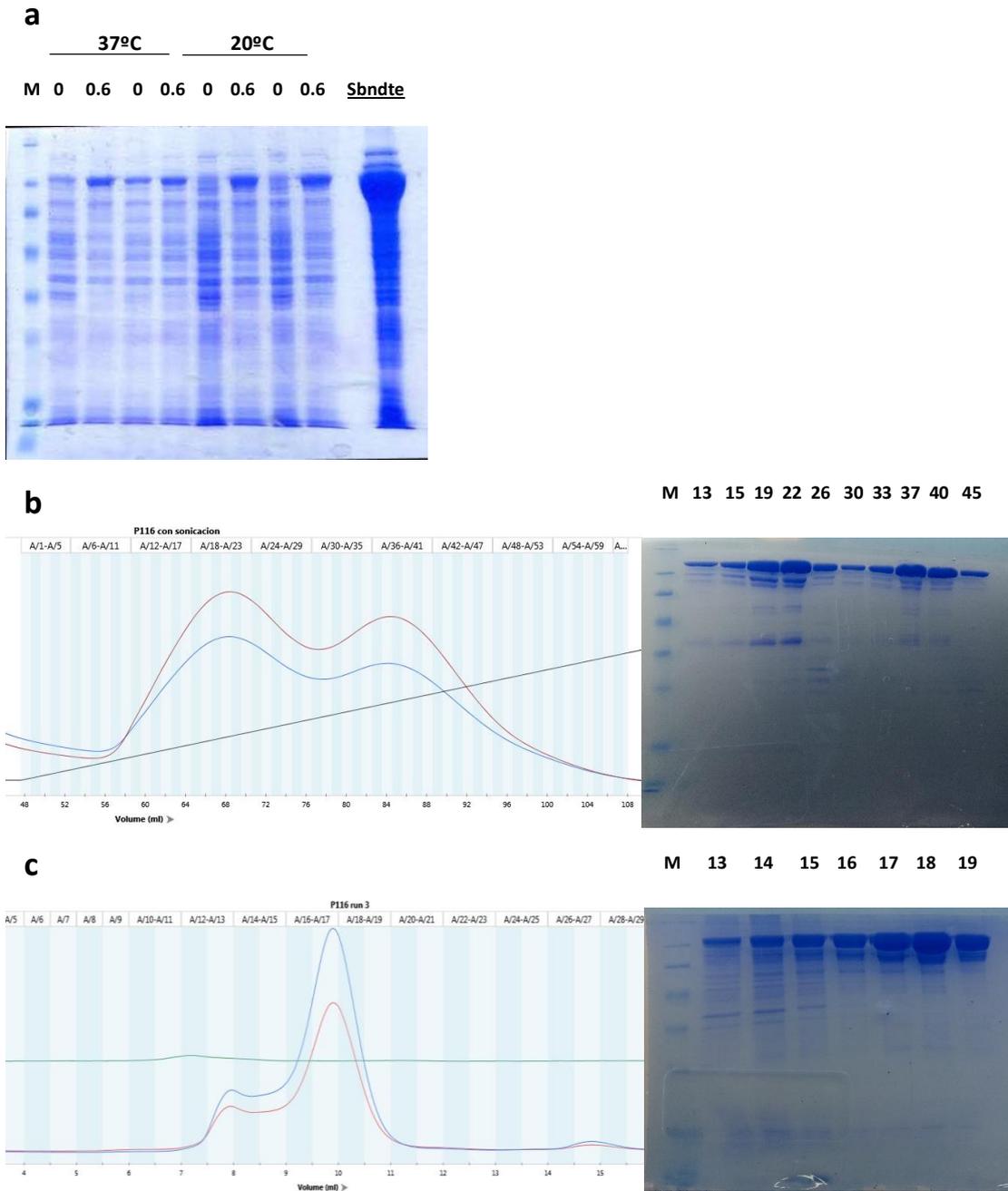


Figura 3.2 Cromatogramas y geles SDS-PAGE 15% (v/v) de acrilamida de la expresión y purificación de P116. a) Gel del test de expresión de P116 a dos temperaturas, con (0.6mM) y sin IPTG. También se carga el sobrenadante (sbdnte) tras centrifugar los pellets celulares, comprobando que la proteína se mantiene en fase soluble. b) Cromatograma de columna de afinidad HisTrap 5mL con su correspondiente análisis por gel de acrilamida SDS-PAGE. La línea roja corresponde a la absorbancia en 280nm (para proteínas) y la azul a la absorbancia en 260nm (para DNA) c) Cromatograma de columna de gel filtración Superdex 200 10 300 con su correspondiente análisis por gel de acrilamida SDS-PAGE. La línea azul corresponde a la absorbancia en 280nm (para proteínas) y la roja a la absorbancia en 260nm (para DNA) En ambos cromatogramas el eje de las X corresponde al volumen de elución y el de las Y a la intensidad de absorción a 280nm y 260nm (medido en mAU).

1.2.- Cristalización de P116

Se realizaron múltiples ensayos de cristalización de P116 a concentraciones desde 4.5mg/mL hasta 18mg/mL, llegando a la formación de cristales en todas las concentraciones y en una gran variedad de condiciones. Se utilizó la técnica de **difusión de vapor** tanto a 20°C como a 4°C. Se obtuvieron cristales rápidamente tan solo 3-4 días después de colocar las primeras gotas, ya desde el principio con una gran diversidad de morfologías y tamaños. La variedad de morfologías en las que la proteína cristalizaba era muy alta, siendo los cristales en forma de cubos y agujas romboidales de tamaño medio los que presentaban un mejor ordenamiento interno (Figura 3.3). Aparecían en muchas condiciones diferentes, destacando las de las placas de cristalización estandarizadas PAC 1, PAC 2, PAC 7, PGA y TOP 96, donde siempre era fácil conseguir un buen número de cristales. También en placas estandarizadas como PAC 22 se obtenían cristales en varias condiciones. En algunas condiciones incluso a las horas de colocar la gota ya se observaban microcristales, lo que demostraba una rápida capacidad de cristalización de P116.

El precipitante más favorable a la hora de obtener cristales de P116 son los PEGs de diversos pesos entre **PEG 8000 al 3350 al 20%**. En estas condiciones siempre se originaban cristales de mejor calidad. En placas con condiciones de PEG y PGA al 5% también aparecían numerosos cristales. El cloruro magnésico, cloruro potásico y el sulfato de amonio eran precipitantes recurrentes donde aparecían los cristales mejor formados aparentemente. Habiendo recolectado datos de difracción por rayos X suaves de **más de 300 cristales** en múltiples condiciones de medio diferentes (pH, sales, temperatura, seeding, reducción de residuos, aditivos, etc) así como de diferentes constructos y estados conformacionales de la proteína, **solamente se pudo obtener un espectro a 8-9Å** (Figura 3.3).

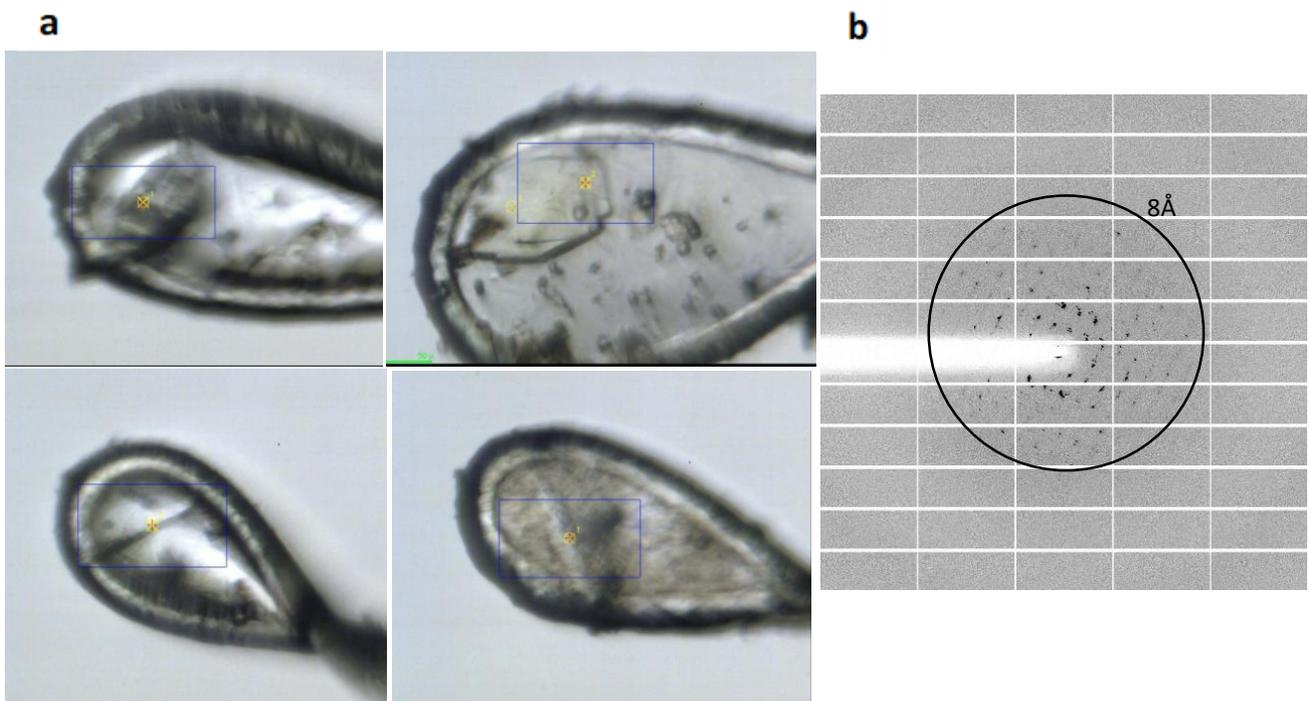


Figura 3.3. a) Muestra de algunos cristales congelados en su loop del ectodominio de P116 que fueron difractados. Se observan formas características como aguja, barra y prisma piramidal. b) Diagrama que muestra el patrón de difracción de uno de los cristales de P116 que presentó un mejor ordenamiento interno. En la circunferencia se indica aproximadamente la resolución alcanzada en angstroms por los puntos del espectro.

Para mejorar la calidad de los cristales se probaron técnicas como la deshidratación, añadido de aceite, entrecruzamiento con glutaraldehído, metilación de lisinas, Floppy-Choppy y añadido de aditivos (Hampton), pero la técnica que nos dio un resultado claramente de optimización en la resolución obtenida al difractar fue el **microseeding** (ver mats y metds). En mi caso este método dio buenos resultados, obteniendo mediante este proceso una clara mejora a la hora de difractar estos cristales con respecto a su condición original previa al microseeding. Mediante esta técnica se logró mejorar los espectros de difracción llegando incluso a 8Å desde cristales que difractaban a 15Å.

También cabe destacar que, durante el proceso de intentar mejorar la resolución obtenida, se pensó en realizar un **constructo del dominio central** (246-818) cuando teníamos una predicción de la estructura secundaria de la P116 gracias al programa Psipred (Buchan, 2019). También gracias a las técnicas de proteólisis limitada y Floppy Choppy, que se utilizaron para tratar de obtener fragmentos de la P116 más estables para su cristalización in situ, añadiendo a la mezcla de proteína y precipitantes pequeñas cantidades de proteasas, en las que previamente se ha comprobado que proteolizan la proteína en fragmentos relativamente grandes y estables, para tratar de mejorar la ordenación de las moléculas mientras se forman los cristales. En mi caso añadí varias concentraciones de **quimotripsina**, la proteasa que comprobé que generaba cortes más prometedores que fueran estables, los cuales fueron analizados por secuenciación N-terminal coincidiendo en el corte con la eliminación del dominio N-ter (ver figuras 3.1 y 3.4). Así, se diseñó un constructo que excluía el N-terminal (unos 200aa), pensando que esta zona - al poseer mayor flexibilidad - podría dificultar el ordenamiento homogéneo y adecuado de las moléculas a la hora de cristalizar. Comprobamos que este constructo central se expresaba y purificaba de forma muy similar al ectodominio completo, manteniéndose su fracción libre siempre en estado dimerico. También verificamos que cristalizaba rápida y fácilmente en muchas condiciones, aunque ligeramente diferentes a las condiciones donde cristalizaba el constructo de mayor tamaño. Además, observamos que en general estos cristales difractaban a una resolución más alta que los del ectodominio. Pasando de una resolución media de 20-25Å en cristales del ectodominio completo a 12-15Å en muchos casos. Aun consiguiendo un mayor número de cristales que difractaban mejor, no se consiguió aumentar la resolución por encima de los 8Å que ya habíamos alcanzado con el ectodominio en algún caso.

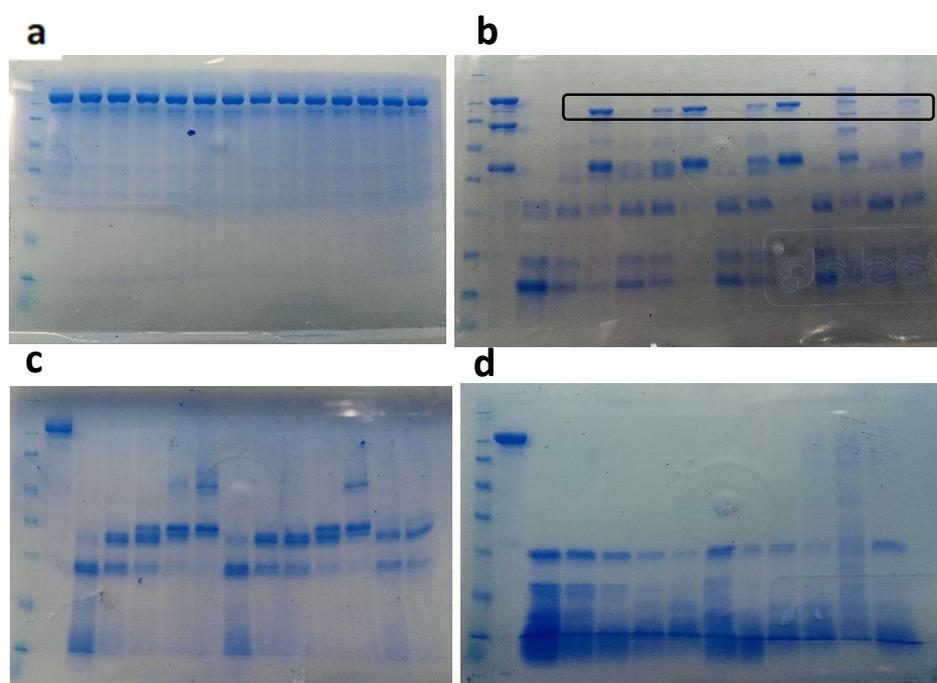


Figura 3.4. Geles de proteólisis limitada con 4 de las proteasas que se experimentó. Se utilizaron mezclas de la proteína P116 a 0.2mg/mL en presencia de las siguientes diluciones de las proteasas (originalmente a 1mg/mL): 1/3, 1/9, 1/25, 1/83 y 1/250 y a 22°C y 37°C. a) Trombina b) Quimotripsina c) Tripsina d) Papaína. El rectángulo en b) indica el fragmento de interés.

1.3.- Determinación de la estructura de P116.

En un inicio se pudo reconstruir un mapa a 6Å analizando determinadas partículas. En este mapa se podía observar burdamente ciertas zonas de estructura secundaria, pero era imposible analizar la secuencia de las cadenas. Mediante la recolección y procesamiento de nuevas imágenes en Crio-EM se pudo ir mejorando el mapa hasta obtener uno a 3.3Å, a partir del mapa básico a 6Å del ectodominio de P116 (Figura 3.5) donde se pudo construir un modelo completo de más del 80% de la proteína. De este mapa de 3.3Å se procesó una de las subunidades que tenía un poco más de resolución y se consiguió bajar a 3.2Å. En las regiones de los extremos, los dominios N y C, se encontró un mayor problema de resolución (Figura 3.6). Probablemente debido a una mayor flexibilidad en esta zona, que es justamente la más cercana a la membrana plasmática donde se ancla la proteína. De hecho, no aparece la densidad del C-ter en el mapa de microscopía y se ha comprobado que en varias ocasiones se fragmentan los últimos 80aá (ver figura 3.15).

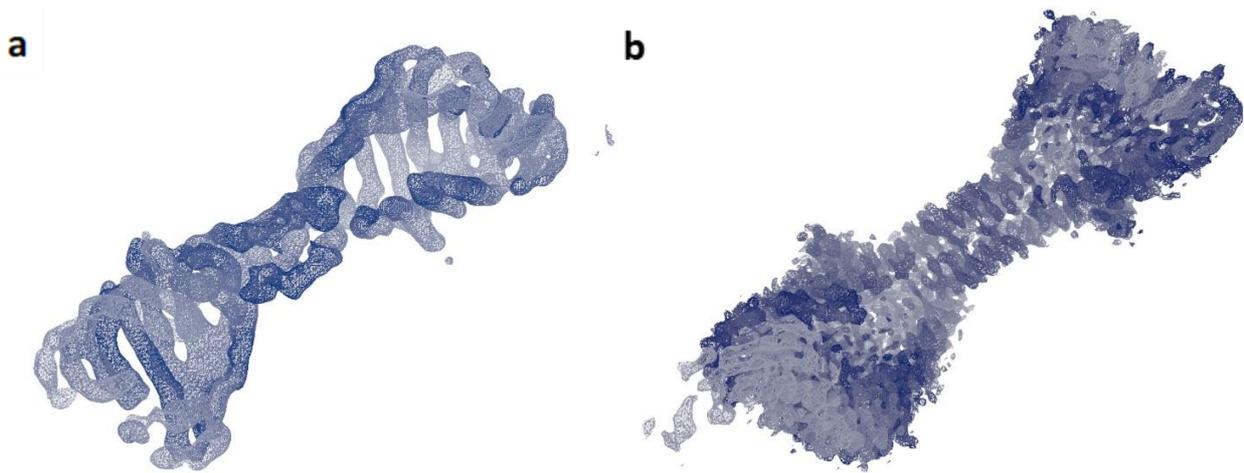


Figura 3.5. Comparación del primer y último mapa de densidad de P116. a) El mapa original de Crio-EM a 6Å podía aproximar la estructura de la P116 y su disposición en dímero, pero la falta de detalle impedía construir los aminoácidos específicos sobre la densidad. La cavidad hidrofóbica ya era ampliamente visible. b) El mapa actualizado a 3.3Å donde la alta resolución permite identificar las hélices y láminas con facilidad, así como determinar el espacio ocupado por cada aminoácido de la cadena polipeptídica.

Cuando el servidor de modelaje estructural **Alphafold** (Jumper, J et al. 2021) estuvo disponible, se obtuvieron predicciones de la estructura del dominio N que presentaban cierta variabilidad al usar diferentes tramos de la secuencia. Las mejores predicciones seleccionadas utilizando el modelo parcial ya disponible, permitieron completar la interpretación del mapa, aunque algunos residuos en el extremo N del dominio permanecieron difíciles de identificar y quedaron como alaninas. Así, se cogió el modelo del dominio N-ter que más se ajustaba a la densidad parcial que teníamos en el mapa para ese dominio y se utilizó como modelo en nuestra estructura final. Luego, todo el modelo P116 se refinó con Phenix y la estructura refinada final se depositó en el PDB con el código XXXX, presentando los datos estadísticos mostrado en la tabla 3.1.

a

P116 (EMDB-xxxx)	
Data collection and processing	
Magnification	105,000
Voltage (kV)	300
Electron exposure (e ⁻ /Å ²)	50
Defocus range (μm)	-1 to -3.5
Pixel size (Å)	1.05
Symmetry imposed	/
Initial particle images (no.)	3463490
Final particle images (no.)	1315362
Map resolution (Å)	3.2
FSC threshold	0.143
Map resolution range (Å)	2.5-5
Refinement	
Initial model used (PDB code)	/
Model resolution (Å)	3.2
FSC threshold	0.143
Model resolution range (Å)	2.5-5.0
Map sharpening <i>B</i> factor (Å ²)	-94

b

Refinement Statistics	P116
Model Composition	
Chains	2
Atoms	12772
Protein residues	1618
Ligands	0
<i>B</i> factor (Å²)	51.22
R.m.s deviations	
Bond lengths (Å²)	0.003
Bond angles (°)	0.651
Validation	
MoltProbit score	2.18
Clashcore	12
CaBLAM outliers (%)	6.21
Ramachandran plot	
Favored (%)	89.34
Allowed (%)	10.53
Disallowed (%)	0.13

Tabla 3.1. a) Conjunto de datos extraídos del procesamiento con Crio-EM y de estadísticas de refinamiento del modelo de P116. b) Datos estadísticos principales del refinamiento y validación del modelo construido de P116.

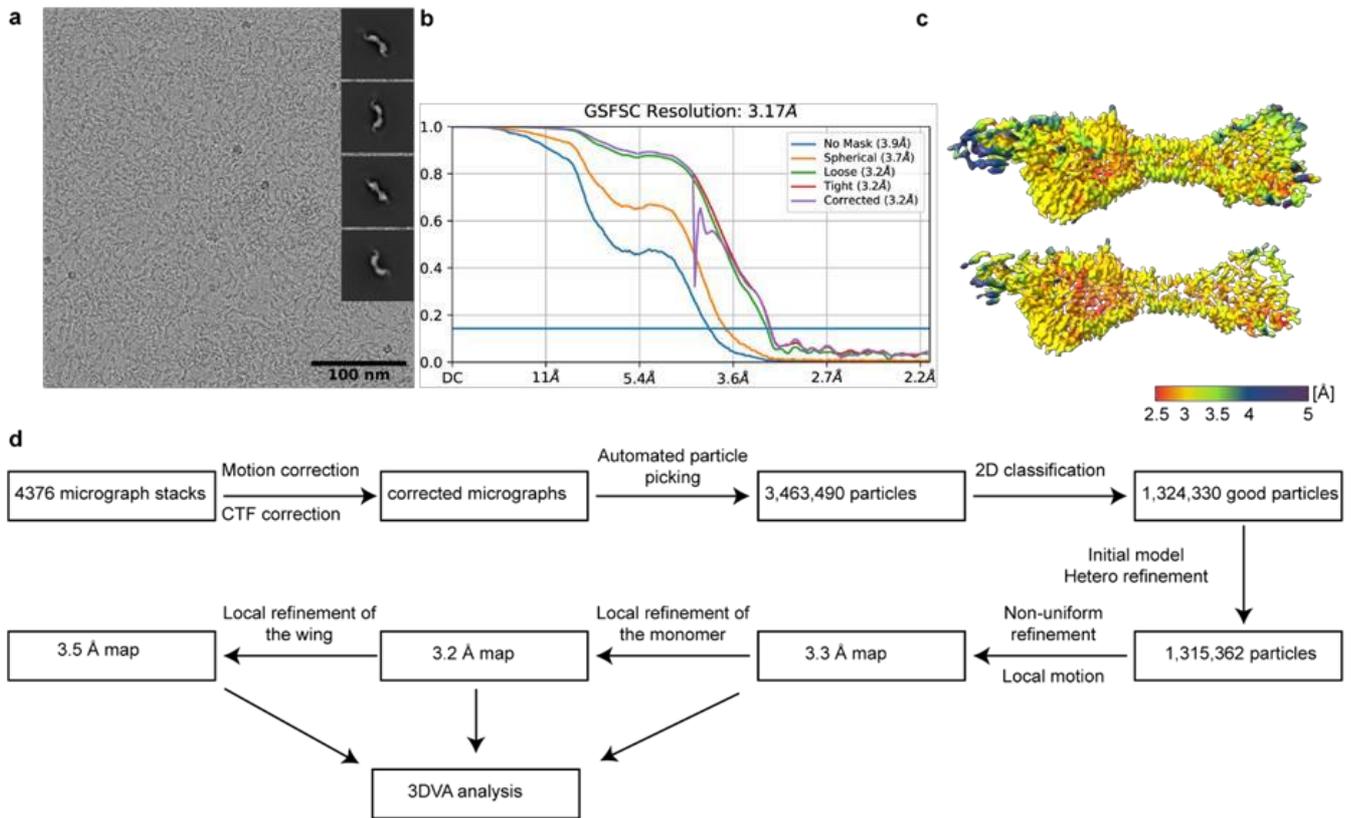


Figura 3.6. Procesamiento de datos de Crio-EM del ectodominio de P116. a) Micrografía de partículas de P116 con un subconjunto de clases 2D como recuadros. b) Correlación de capa de Fourier que muestra una resolución final de 3.2Å. c) Volumen de P116 donde se muestra la distribución desigual de la resolución alcanzada por zonas. Se observa como la zona central fue determinada a una mayor resolución que los extremos. d) Diagrama de flujo que muestra la tubería de procesamiento desde las pilas de micrografías hasta el volumen 3D final.

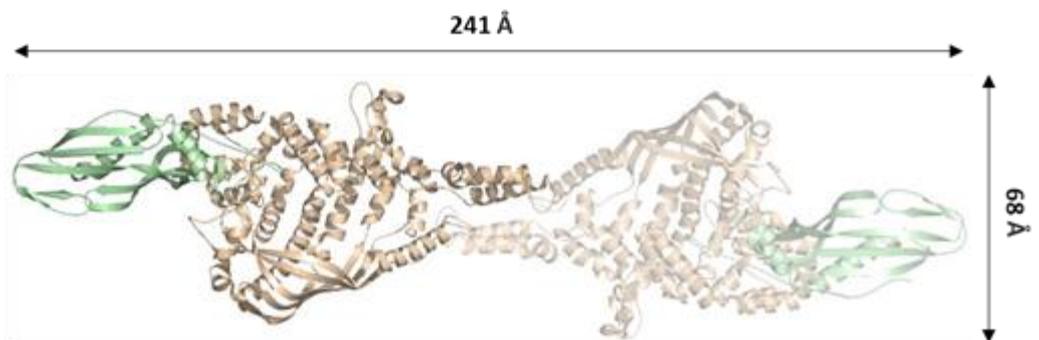
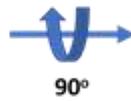
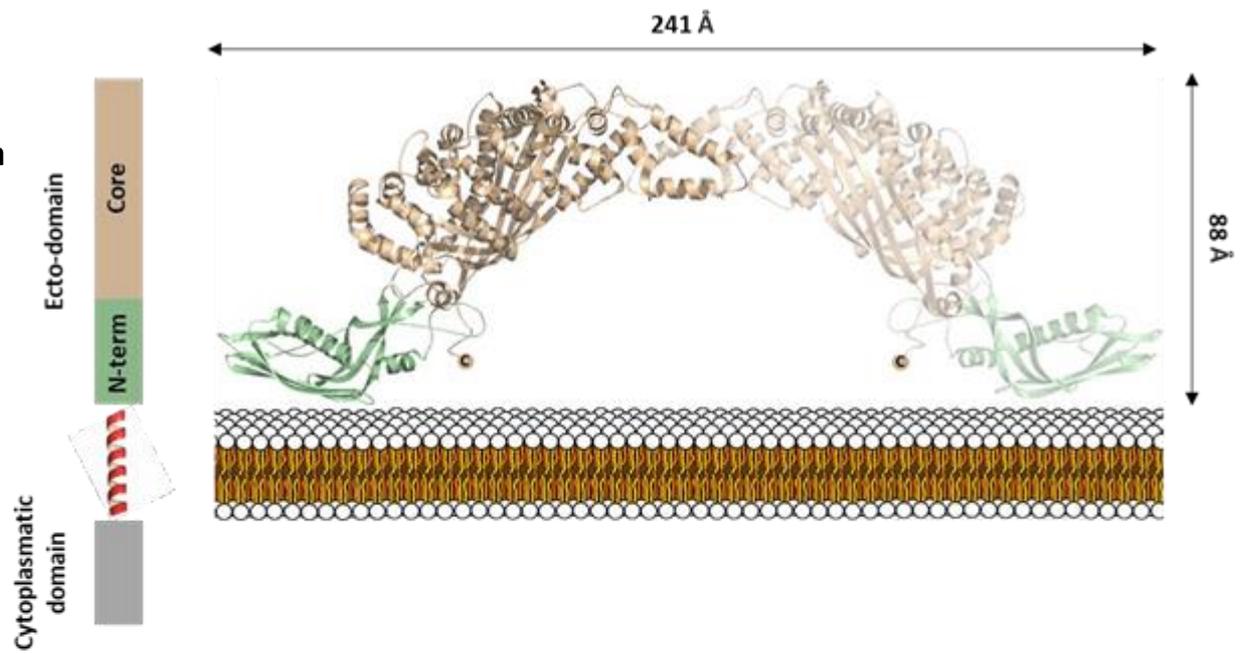
1.4.- Descripción de la estructura de P116.

La estructura de P116 se organiza claramente en **dos dominios diferenciados: el núcleo central y el N-ter, poseyendo además ambos un esquema similar en parte superponible.**

P116 es una proteína de membrana de gran tamaño, con un peso molecular de 116kDa (como su propio nombre indica) y unas dimensiones de 24nm de largo X 8.8nm de alto X 5.8nm de ancho en base a los datos de la Crio-EM. Con una forma alargada dispuesta en paralelo a la superficie de la bacteria con una ligera curvatura en forma de arco en su disposición de dímero. La estructura del constructo de P116, determinada por crio-EM de una sola partícula a una resolución de 3.2Å (de acuerdo con el criterio estándar de oro de FSC 0,143 y utilizando la clasificación de partículas a partir de 1 315 362 partículas individuales (Figura 3.6) es un homodímero arqueado extendido de ~240Å en su longitud más larga (Figura 3.7). Cada subunidad consta de un dominio N (residuos 60-245), situado lejos del eje del dímero, y un gran dominio central (246-867) que contiene todos los residuos involucrados en la interfaz entre subunidades (Figuras 3.7 y 3.8). Algunos residuos, en los extremos

N y C del constructo (30-59 y 868-957, respectivamente), no eran visibles en los mapas de crio-EM. El dominio N presenta cierta movilidad de bisagra con respecto al dominio central, lo que redujo la resolución local del mapa crio-EM, (Figura 3.6) complicando la construcción del modelo para las partes más distales del dominio (ver en Material y Métodos y Figura 3.10).

a



b

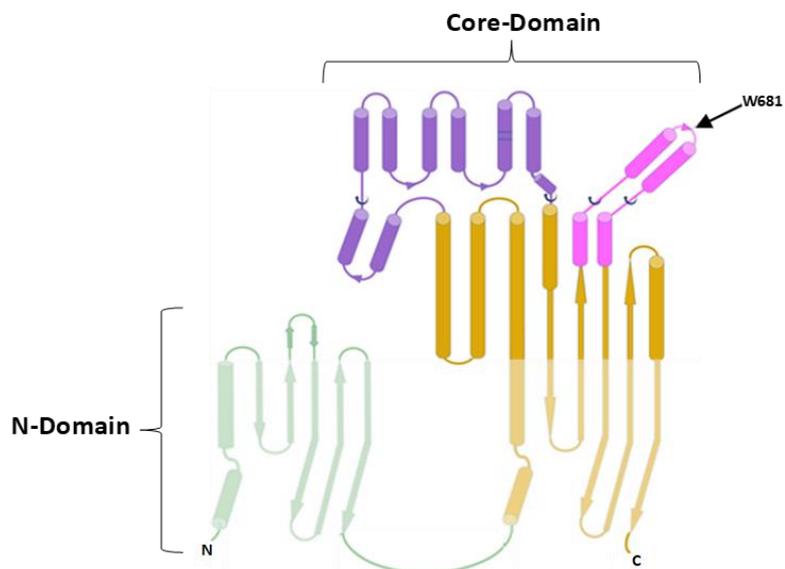


Figura 3.7. a) Estructura del ectodominio de P116 dispuesta en relación a la membrana plasmática de *M. pneumoniae*. En verde se observan los dominios N-ter y en ocre los dominios centrales. b) Esquema tipo origami de la estructura de P116 donde se muestra el paralelismo en la base de los dos dominios principales que conforman la estructura. Se muestra en rosa las hélices de dimerización que interaccionan con el otro monómero para enlazarse. En morado los dominios formados por hélices que pueden equipararse con los dedos de una mano derecha.

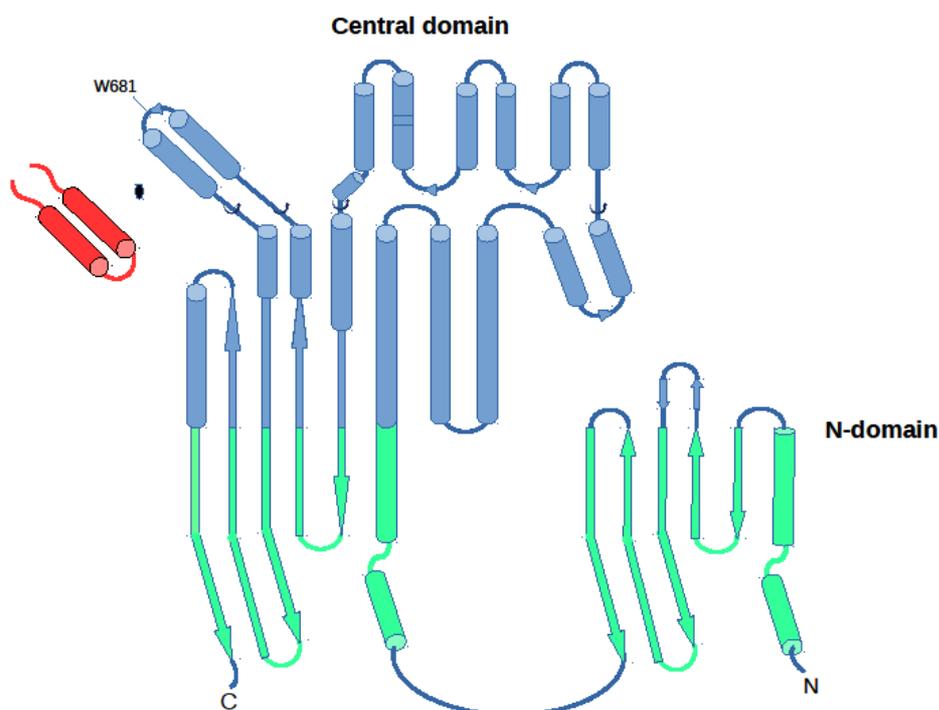


Figura 3.8. Diagrama de Origami que muestra el esquema de la estructura de P116 y sus dos dominios principales semejantes. En turquesa se muestran las zonas coincidentes y en azul la parte extra del dominio central incluyendo las hélices flexibles como dedos. En rojo las hélices de dimerización del otro monómero, señalando el aminoácido clave en esta interacción del homodímero: Trp 681.

Al exponer la estructura frente a todas las estructuras depositadas en el PDB a través del Servidor DALI, solo se encontraron relaciones estructurales muy débiles entre P116 y cualquiera de las estructuras de proteínas determinadas experimentalmente disponibles en el PDB, lo que indica que P116 tiene un novedoso plegamiento que no ha sido detectado con anterioridad. Curiosamente, los dominios N y central de P116 se pueden superponer entre sí para 126 residuos equivalentes (68 % del dominio N), lo que sugiere que P116 puede haberse generado por duplicación de un dominio ancestral (Figura 3.7 y 3.8). Los elementos secundarios comunes en los dominios N y Central consisten en una lámina β con cinco hebras antiparalelas y dos hélices que preceden a la lámina (Figura 3.7). El mayor tamaño del dominio central con respecto al dominio N se debe principalmente a dos inserciones en el dominio central que contienen doce y cuatro hélices adicionales, respectivamente.

El dominio N-ter muestra un empaquetamiento compacto organizado alrededor de un grupo de residuos aromáticos con Trp121, el único residuo de triptófano del dominio, en el centro del grupo (Figura 3.10). A su vez, el gran dominio central se puede describir **como una mano derecha parcialmente abierta**, con hélices antiparalelas contiguas que representan los dedos de la mano y un pulgar extendido de cuatro hélices que domina la dimerización (Figura 3.7). En la punta del pulgar hay un residuo de triptófano (Trp681) que interactúa ampliamente con la subunidad vecina. La palma incluye una hélice α central larga y bien definida, la hélice puente (residuos 268-304) y todos los demás elementos secundarios del dominio central que son comunes con el dominio N (Figuras 3.7 y 3.8). La cavidad de la palma corresponde a una hendidura profunda o ranura que reveló una peculiaridad única notable: una **gran superficie interna** que, aunque es completamente accesible al solvente, es **completamente hidrófoba** (Figura 3.11). Al menos en algunas situaciones, la cavidad de la palma podría estar sellada por la región del extremo C faltante que parece corresponder a una densidad que se extiende sobre la entrada de la cavidad en clases obtenidas durante la clasificación 3D. Se confirmó que los residuos de esta región del extremo C-ter, mediante espectrometría de masas, se aproximaban a los residuos que revisten el borde de la cavidad. Dentro de esta gran cavidad, la zona hidrofóbica corresponde a la zona alta-media de esta cavidad y en la zona baja se encuentran una serie de **aminoácidos cargados**, los cuales, una vez ocluida esta cavidad, pueden seguir expuestos al solvente (Figura 3.9).

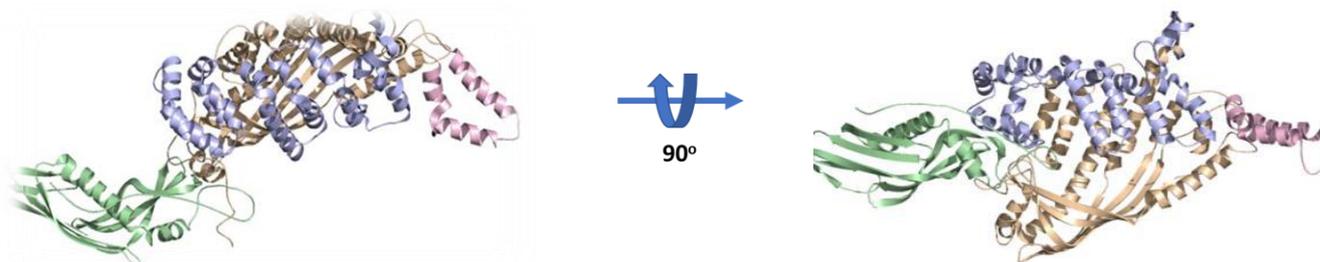


Figura 3.9. Imagen del modelo del monómero en perspectivas lateral y cenital. En verde se muestra el dominio N-ter, en ocre la región del dominio central correspondiente a la superficie interna de la cavidad hidrófoba, en morado la región del dominio central correspondiente a los dedos flexibles donde se encuentran aminoácidos cargados y en rosa las hélices de dimerización que interaccionan con el otro monómero para enlazarse.

Una de las particularidades que también nos llamó la atención desde el principio, es que los mapas obtenidos por crio-EM de P116 muestran fuertes densidades alargadas no contabilizadas (la más larga de $\sim 19\text{\AA}$) que llenan la mayor parte de la cavidad hidrofóbica de la palma (Figura 3.17a). Esta **densidad adicional**, que no se explica por los residuos de proteínas que faltan en el modelo, apunta a la presencia de cantidades significativas de **moléculas en forma de cadena unidas a P116**. La presencia de estos ligandos estaría de acuerdo con el exceso de masa (de aproximadamente 13 kDa de media) medido consistentemente para P116 en diferentes preparaciones (Tabla 3.4). Entre los nueve ortólogos de P116 encontrados en una búsqueda de BlastP, todos de especies del grupo de micoplasmas de Pneumoniae, los aminoácidos que recubren la cavidad hidrofóbica de la palma están

especialmente bien conservados, en particular aquellos en la proximidad de la densidad adicional (Figuras 3.10 y 3.29), lo que respalda un papel funcional clave de estos residuos hidrófobos en la unión a ligandos.

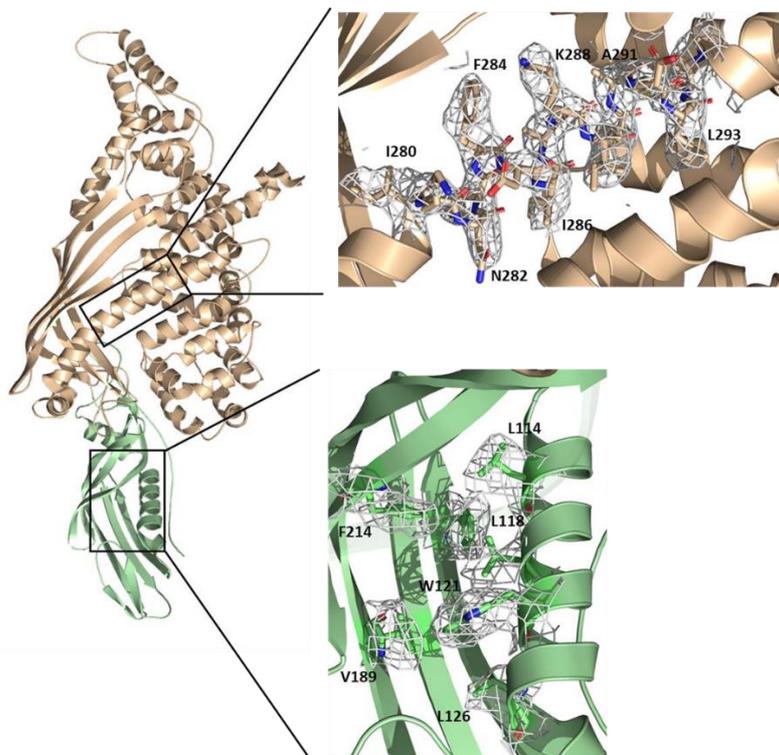


Figura 3.10. Detalle del modelo del monómero del ectodominio de P116 donde se observa la resolución alcanzada por la Crio-EM en determinados residuos del N-ter y del dominio central.

En la estructura de P116, los factores de temperatura aumentan hacia las puntas de los dedos del dominio central, lo que sugiere los movimientos rígidos del cuerpo de los dedos. Esto dará como resultado el ensanchamiento, o alternativamente el estrechamiento, de la cavidad de la palma permitiendo ajustar el volumen de la cavidad al contenido de carga de ligandos (Figura 3.11). Por lo tanto, en las subunidades de P116 vacías se espera que la cavidad de la palma se ocluya sin dejar superficies hidrófobas de proteína accesibles al disolvente. El cierre de la cavidad de la palma también fue sugerido por las sorprendentes predicciones estructurales del dominio central de P116 usando AlphaFold (ver en Materiales y Métodos). En los modelos monoméricos predichos del dominio central, la cavidad de la palma de la mano estaba mayormente ocluida por los dedos, incluido el pulgar, evitando así la exposición de la superficie hidrofóbica como se esperaba (Figura 3.28).

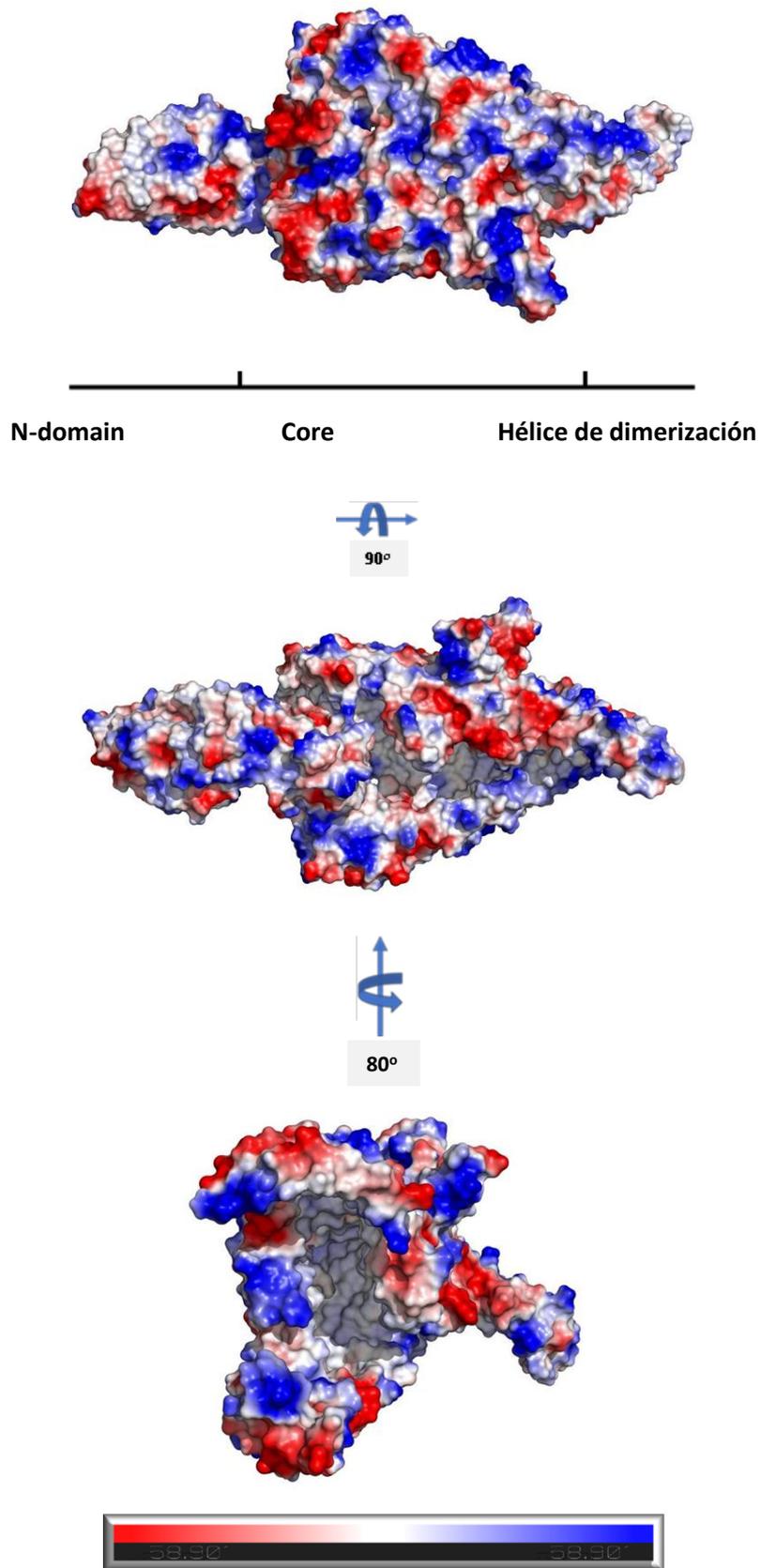


Figura 3.11. Representación de modelo de P16 en superficie donde se muestran las diferentes cargas de los aminoácidos que la componen: en azul cargas positivas, en rojo las negativas y en blanco los aminoácidos sin carga neta.

Los aminoácidos que recubren la cavidad están altamente conservados entre las proteínas ortólogas en el clúster taxonómico de *M. pneumoniae*, lo que indica la importancia de la conservación de esta estructura en especies muy emparentadas. El ortólogo más cercano de P116 se encontró en el pariente más cercano de *M. pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* (51% de identidad) (ver Figura 3.12). Las estructuras de P116 de las otras especies de *Mycoplasma* mostraron una apariencia similar usando AlphaFold2. Estas estructuras exhiben la misma estructura terciaria con un dominio de núcleo central flanqueado por un dominio de pulgar N-terminal (Figura 3.9), con el dominio central formando un surco con las mismas propiedades hidrofóbicas que para la P116 de *M. pneumoniae*.

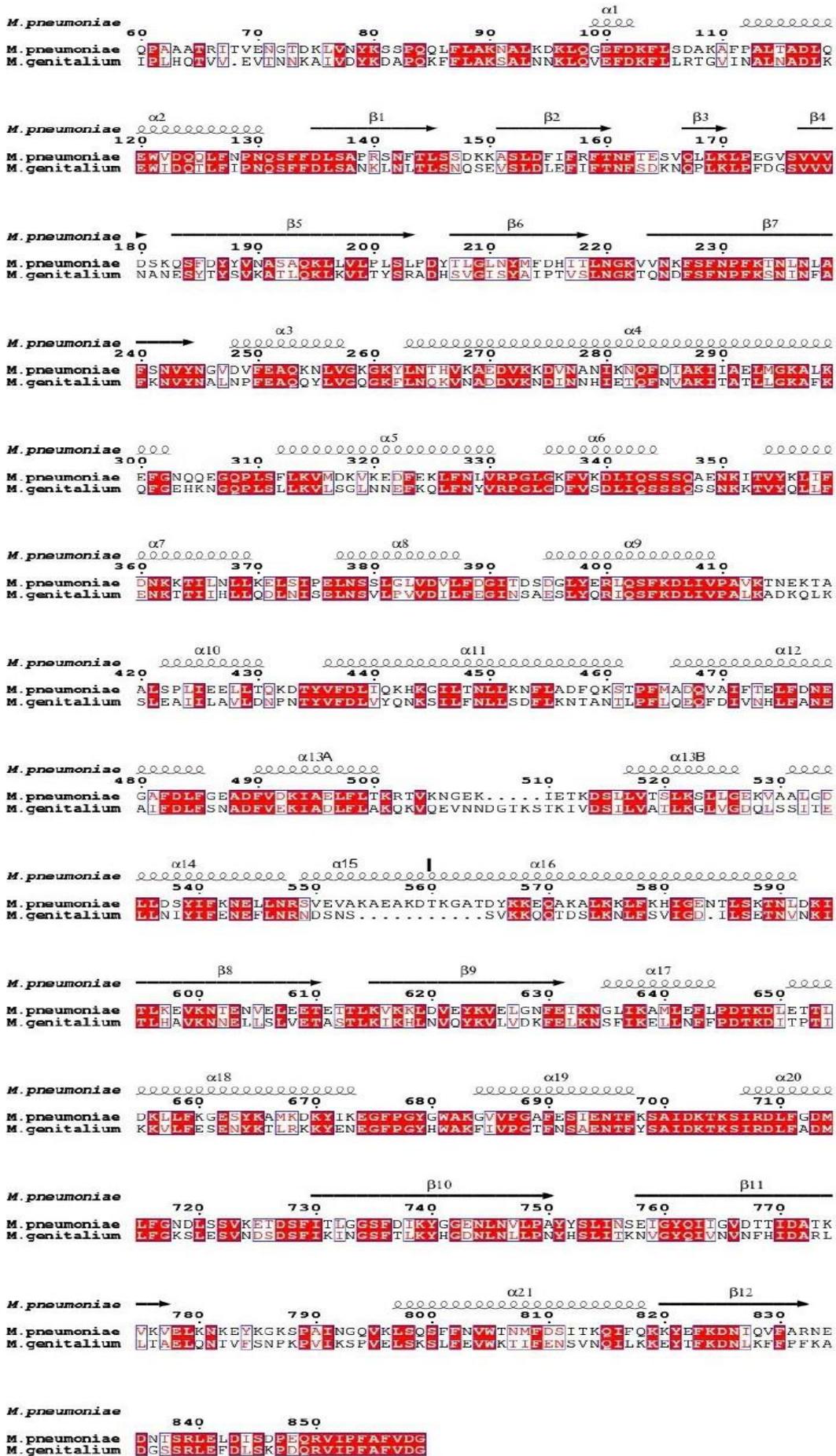


Figura 3.12. Alineamiento de estructuras secundarias de P116 y su ortóloga en *M.genitalium* (MG075). Se puede comprobar que comparten una gran similitud, derivada de un 52% de homología en sus secuencias primarias. Los dominios de alfa hélices y láminas beta que conforman la estructura se comparten en ambas proteínas.

1.5. Otros constructos de P116 y mutantes

Para intentar conseguir un mapa de la zona del N-ter, tan difícil de observar a través de la crio-EM, se fabricó un constructo de esta región de la proteína (13-246) con la intención de expresarlo, purificarlo y tratar de cristalizarlo o analizarlo por crio-EM (a pesar de que por su pequeño tamaño sería muy complicado). Finalmente, tras intentar expresarlo con proteínas de fusión como MBP y SUMOprotein, se concluyó que este constructo no se sobreexpresaba y su producción fue prácticamente imposible, por lo que se desechó la idea.

Otros constructos fueron creados y expresados, como el 30-845 y 246-818, teniendo siempre en cuenta la estructura secundaria de P116 y su gran homología con su ortóloga en *M. genitalium* (ver figura 3.12). El constructo 30-845, careciendo del C-ter, se expresaba de forma similar al del ectodominio completo, con una producción algo inferior, pero manteniéndose bastante estable. Se intentó cristalizar con muy poco éxito, ya que éste apenas cristalizaba y los pocos cristales que se obtuvieron difractaban a muy baja resolución. A través de estudios por MALS se comprobó como este constructo mantenía ese exceso de peso debido a los ligandos introducidos en la cavidad, por lo que ésta debía permanecer en condiciones muy similares a las del constructo del ectodominio completo.

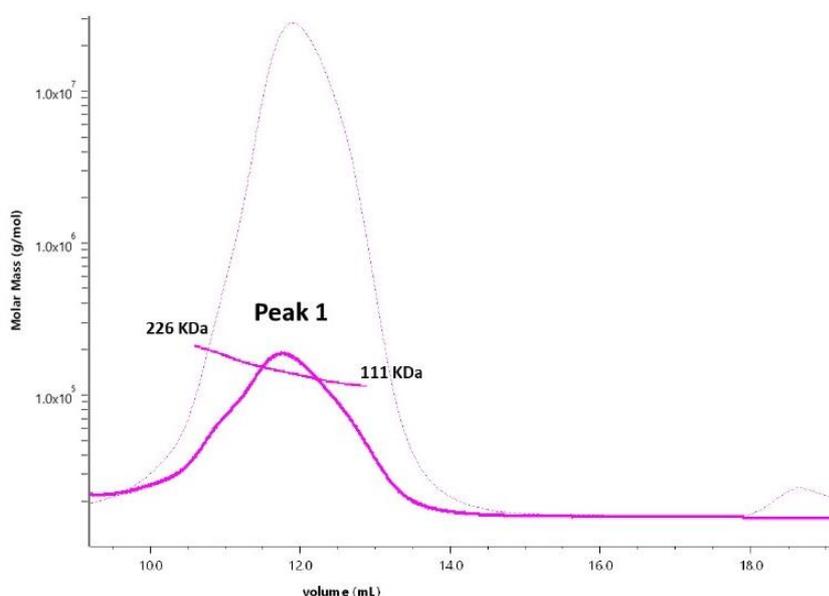
El constructo 246-818, perteneciente al dominio central, ya mencionado en el anterior apartado, se comportaba muy similar al ectodominio completo. Se presentaba también en forma dimérica y con el exceso de peso debido a los ligandos hidrófobos unidos en la cavidad (ver Tabla 3.3 y 3.4).

Otros constructos como el 82-845, 53-957 y el 82-957 también se expresaron, pero presentaban abundantes contaminantes y agregados con DNA, además de una baja estabilidad, lo que dificultaba obtener cantidades adecuadas de la proteína para someterla a ensayos. Sin embargo, se pudo realizar un MALS del constructo 82-845, donde aparecía un 11% aprox.de fracción agregada y el resto proteína libre en estado también dimérico (ver Tabla 3.4).

- **Mutante W681A**

Para comprobar si este aminoácido estaba involucrado directamente en la dimerización, se creó un mutante de sustitución en este aminoácido que parece interactuar más directamente con la otra hélice de dimerización de la subunidad vecina: el Trp 681. Con el objetivo de que, si es un aminoácido crucial para formar el dímero, si se mutaba probablemente afectaría en la estructura, por lo que se sustituyó por una Ala. Este mutante se expresó y purificó adecuadamente en condiciones idénticas a la P116 WT y, en principio, sin variaciones en su estabilidad y comportamiento. Cuando estudiamos

el mutante a través de cromatografía por gel filtración y SEC-MALS comprobamos como ahora la proteína eluía en un único pico de V_e mayor y de gran amplitud, con una polidispersidad mayor al del WT (ver Figura 3.13). Esto suponía que existía una mezcla de diversas especies donde el PM promedio era de 139 KDa, lo que correspondería a una relación 1:3 entre un dímero y un monómero, dado que la proteína no habría sufrido ningún tipo de degradación o proteólisis con picos desplazados hacia un tamaño inferior. En concreto se analizó como el ~75% de la proteína ahora se encontraba en estado monomérico y el restante en forma de homodímero. Ésto verificó el éxito del mutante y apuntó a ser una manera de poder obtener la estructura del monómero (ver figura 3.14 y tabla 3.4)



Sample	Mw (KDa)	Polydispersity (Mw/Mn)	Mass fraction (%)
Peak 1	143,4 +/- 0,27	1,02 +/- 0,00	98,8

Figura 3.13. SEC-MALS de P116 W681A. Se observa la mayor polidispersidad de esta muestra, que oscila entre un rango de PM muy grande, y la clara disminución de tamaño con respecto al WT debido a la predominancia ahora del estado monomérico.

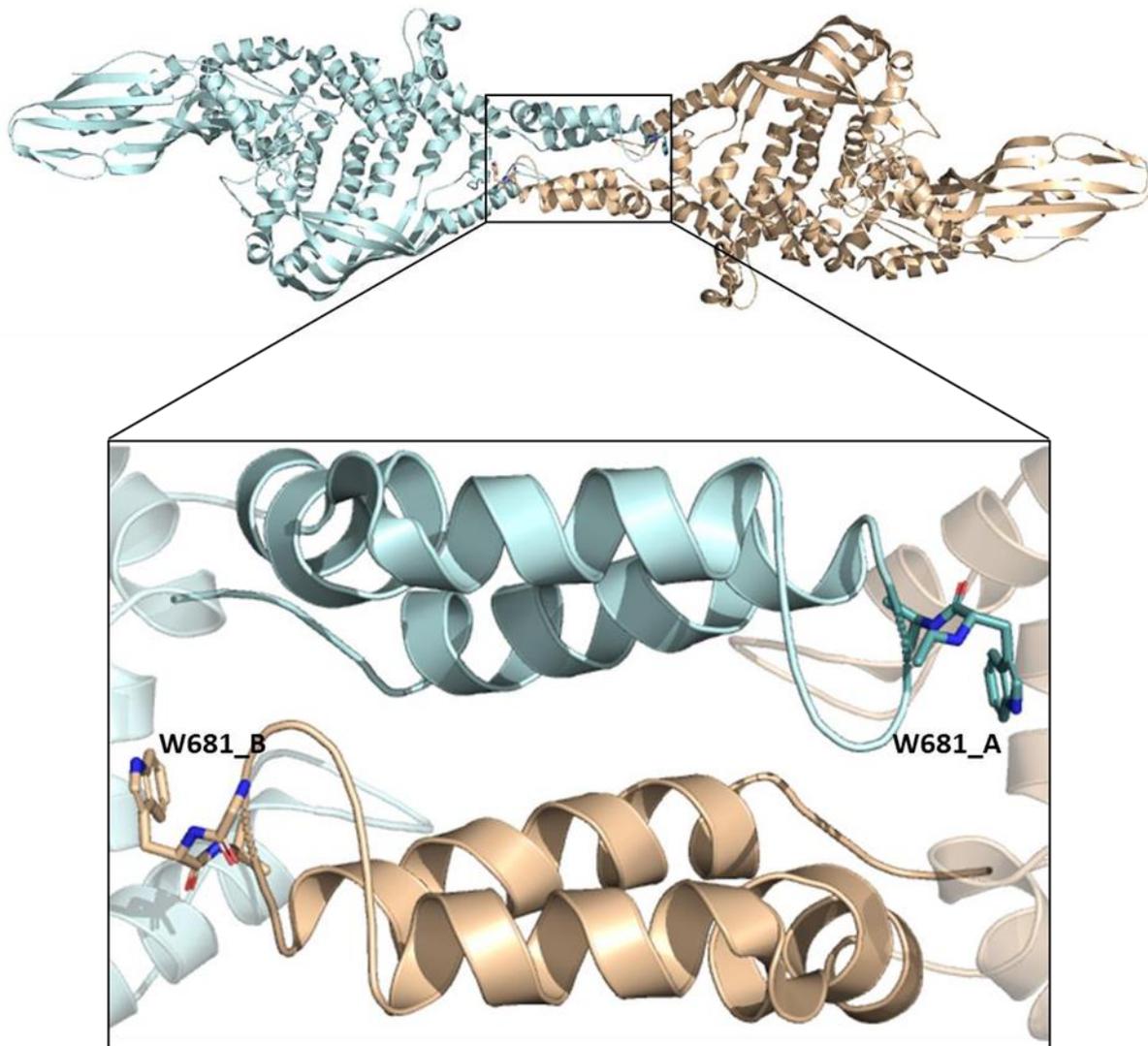


Figura 3.14. Detalle de la zona de dimerización con los dos monómeros y el residuo TRP-681 de ambas cadenas contactando con la opuesta.

Tratando de localizar los residuos clave en la estabilización de la hidrofobicidad en la parte interna de la cavidad de P116, se mutaron **3 Phe** por Asp para cambiar radicalmente su polaridad en posiciones clave dentro de la cavidad (Figura 3.16):

- **Mutante F490D**

Este mutante nos dio un PM de 204 KDa por SEC-MALS, menor que el WT lo que nos hizo pensar que afectaba directamente al vaciado de la cavidad. Una vez analizado este mismo mutante por técnicas cualitativas como el MALDI-TOF, esta reducción del PM era debida a la proteólisis de la proteína en dos fragmentos de ~80KDa y de 20KDa, aunque con el tiempo podían escindirse fragmentos aún

mayores de hasta 400KDa. Por último, por microscopía pudimos observar que la cavidad estaba completamente llena al igual que ocurre en la WT. Este mutante, de alguna manera, desestabiliza toda la estructura provocando la proteólisis de la proteína en regiones del C-ter de unos 100aa. Lo observamos tanto a través de electroforesis en SDS-PAGE donde se visualizaban dos pequeños cortes principales, en una disminución del tamaño en SEC-MALS y en el análisis de masas MALDI-TOF, donde aparecía un péptido de este tamaño. (ver figura 3.15 y tabla 3.4)

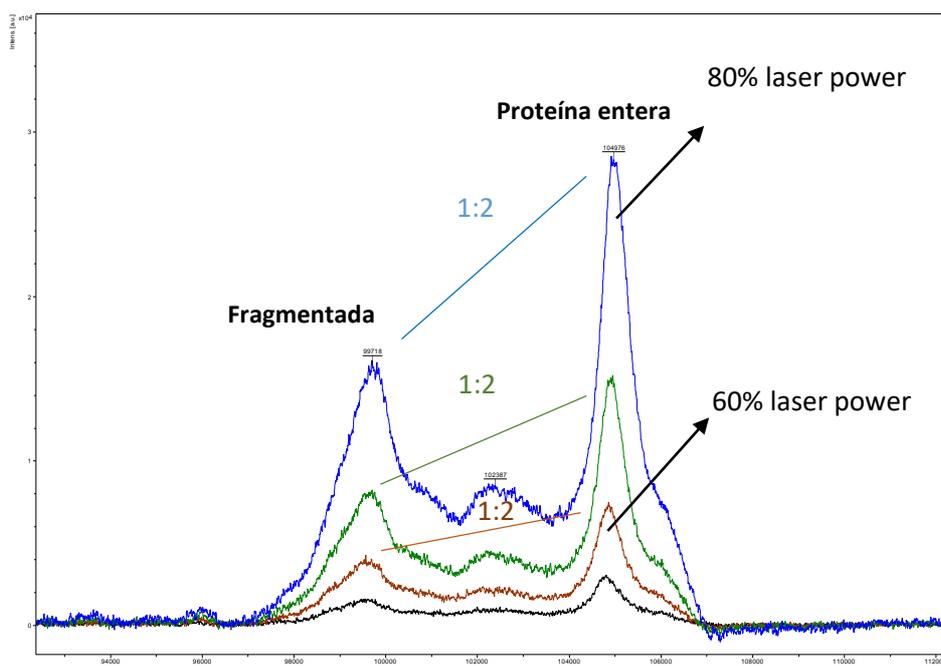


Figura 3.15. Experimento de masas con P116 F490D donde se observa que más del 30% de la proteína se encuentra fragmentada por uno o más pequeños péptidos. También se observa que a medida que aumenta la intensidad del láser ionizante, la relación entre P116 entera y P116 fragmentada se mantiene, lo que explica que la fragmentación observada no es debida a la potencia del láser y que la muestra ya se encontraba en ese estado previo al ensayo.

- **Mutante F711D**

Este mutante presentó una tendencia a rellenarse más por lo que comprobamos en sucesivos análisis por SEC-MALS que se realizaron (ver tabla 3.4 para comprobar algunas de las muestras). En los cromatogramas en gel filtración se observaba un ligero desplazamiento del pico hacia la izquierda (volumen de elución un poco menor) respecto a los cromatogramas para la WT.

- **Mutante F337D**

Este mutante presentaba un comportamiento idéntico al WT (ver tabla 3.4 para comprobar algunas de las muestras)

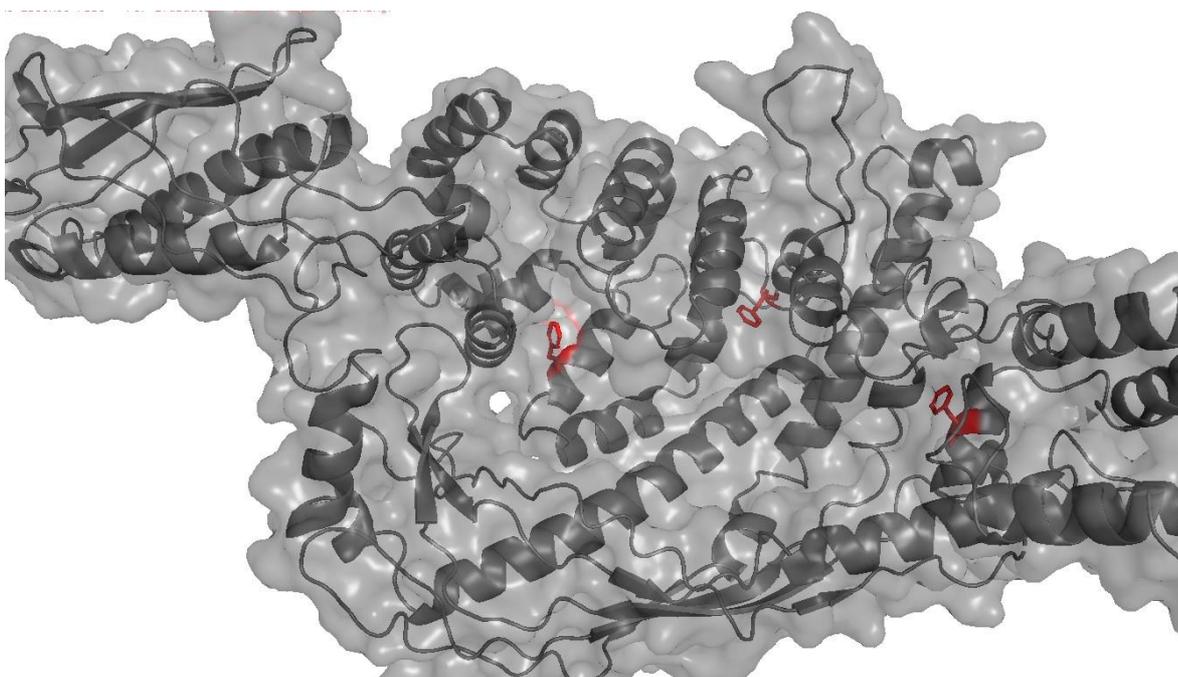


Figura 3.16. Situación de los tres mutantes de Phe en la superficie interna de la cavidad de P116. Se muestran de color rojo y de izquierda a derecha son F337D, F490D y F711D.

Constructo	PMteórico Monómero	PMteórico Dímero
P116 30-957	105.5	211
P116 13-957	107.1	214.2
P116 246-818	65.2	130.4
P116 30-845	92.9	185.8
P116 82-845	87	174

Tabla 3.3. Los pesos moleculares teóricos de cada constructo estudiado en el proyecto, tanto del monómero como el dímero.

Fecha MALS	Muestra	Peso (KDa)	Δ MW/Teórico (KDa)
17/04/19	P116 30-957 10mg/ml	236 / 234.3 / 236	+ 23.3-25
	P116 30-957 18mg/ml	234.4	+ 23.4
15/05/19	P116 30-957 0mM NaCl	215.5 / 214.4 / 217.5	+ 3.5-6.5
	P116 30-957 150mM NaCl	235.7 / 234.4 / 232.6	+ 22-25
23/05/19	P116 13-957	236.6 / 235.2 / 234.4	+ 20-22
02/09/20	P116 30-845	202	+ 16.3
29/07/21	P116 30-957 0mM NaCl	218	+ 7
	P116 246-818 0mM NaCl	144	+ 14
	P116 246-818 150Mm NaCl	144	+ 14
	P116 30-957 PBS	224	+ 13
	P116 30-957 $W_{681}A$	110.5 (75%)	+ 5.5 (+11 dímero)
		226.05 (25%)	+ 15
P116 30-957 + FBS	224.7	+ 13.5	
13/08/21	P116 246-818 Renaturalizada	68.3 (78%) monómero	+ 3.1(+6.2 dímero)
		137.4 (12%)dímero	+ 7
01/09/21	P116 30-957 0mM NaCl	221	+ 10
02/09/21	P116 30-957 150mM NaCl	220	+ 8
	P116 30-957 Congelada 150mMNaCl	220	+ 8
	P116 30-957 Sonicada 150mM NaCl	220	+ 8
	P116 30-957 Sonicada Congelada 150mM NaCl	220	+ 8
	P116 30-957 FBS Tª ambiente	220	+ 8
	P116 FBS 30-957 37º 20min	220	+ 8
	P116 FBS 30-957 37º 1hora	220	+ 8
	P116 13-957 F₄₉₀D	209.8	- 4.4
	P116 13-957 F₇₁₁D	230.3	+ 16.2
05/10/21	P116 30-957 Renaturalizada	210.1	- 0.9
06/10/21	P116 13-957 F ₃₃₇ D	221.9	+ 7.7
	P116 13-957 F ₄₉₀ D	204.4	- 9.8
	P116 13-957 F ₇₁₁ D	225.89	+ 11.7
07/10/21	P116 30-957 Renaturalizada + FactorH	179.8	/

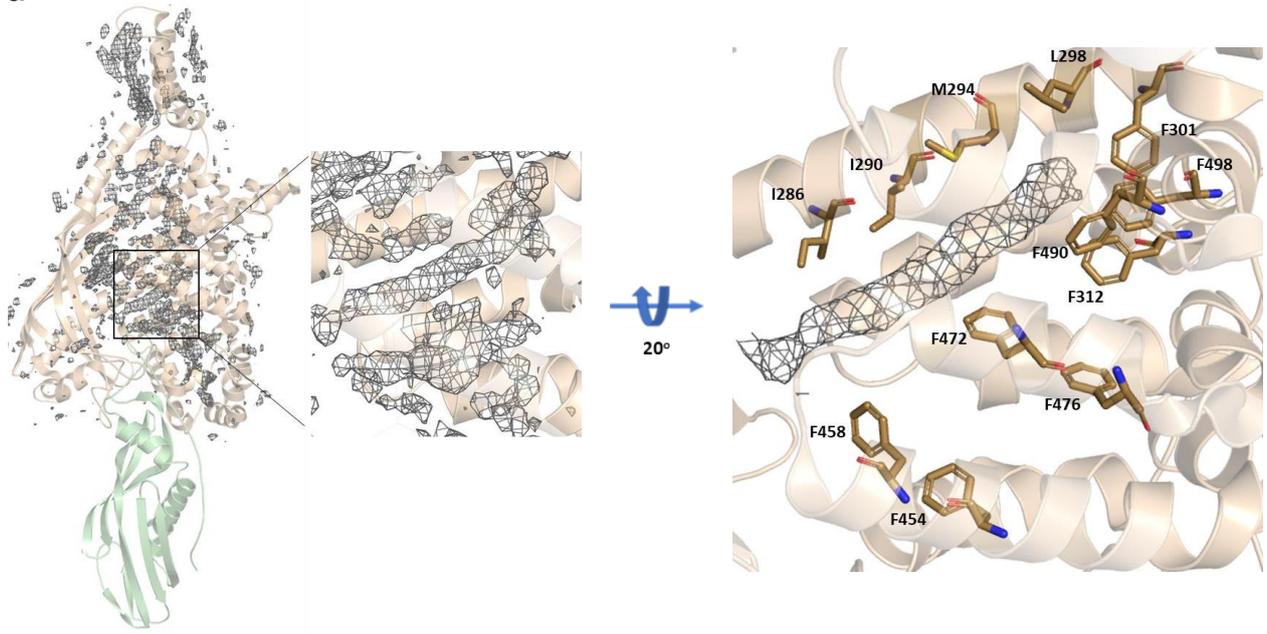
Tabla 3.4. Recopilación de resultados de MALS de diferentes muestras de P116, mostrando la variación en el peso extra de la proteína (lípidos de la cavidad) según constructos, mutantes y otras condiciones (buffer, sal, t^a , tipo de lisis celular, etc). Se comprobó que factores como el tampón o la concentración de NaCl no afectaban directamente a la cavidad. Algunas muestras desnaturalizadas por urea sí se vaciaban (05/10/21). Todos los constructos mantenían un exceso de peso, indicando que la cavidad estaba llena. El mutante W681A provoca que el 75% de la muestra se encuentre como monómero, pero la cavidad se mantiene llena. El mutante F337D se comporta como la WT. El mutante F711D parece que tiene cierta predisposición a llenarse más que la WT y el mutante F490D, señalado en negro, parecía que se vaciaba, pero posteriormente se comprobó que su pérdida de peso se debía a la escisión de péptidos del C-ter.

2.- Caracterización de los ligandos de P116

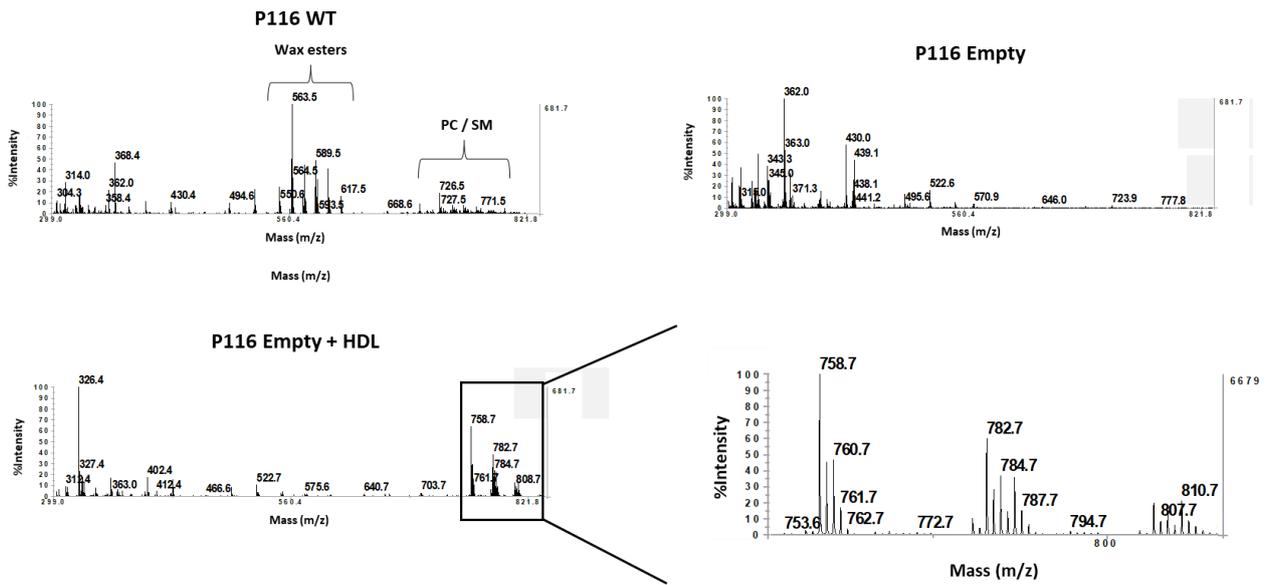
2.1.-Lípidos esenciales fosfatidilcolina y esfingomiolina

Tras comprobar en las decenas de análisis por SEC-MALS de diferentes muestras de P116 el exceso de peso teórico de la molécula, y la densidad extra en el mapa de la Crio-EM donde aparecen ligandos en forma de cadena, se propuso caracterizar la naturaleza de estas moléculas que con gran afinidad se unen a P116. El análisis de espectrometría de masas (MS) (ver en Materiales y Métodos) mostró la presencia, en las muestras purificadas de P116, de los lípidos **fosfatidilcolina y esfingomiolina**, que son esenciales para *M. pneumoniae* (Gaspari et al., 2020), y también de ésteres de cera (Figuras 3.17 y 3.18). Todos estos compuestos podrían haberse incorporado durante la sobreexpresión de P116 en *E. coli*. Como control, ninguno de estos compuestos se detectó en muestras de la adhesina P40/P90 de *M. pneumoniae*, de tamaño similar a P116 y producida de manera similar (Figura 3.20). El carácter hidrofóbico de estos compuestos sugiere una alta afinidad por unirse a sitios de unión hidrofóbicos como es la cavidad de la palma del dominio central, además de que su tamaño y estructuras alargadas se corresponden bien con la densidad adicional que se encuentra en la cavidad de la palma (Figura 3.17).

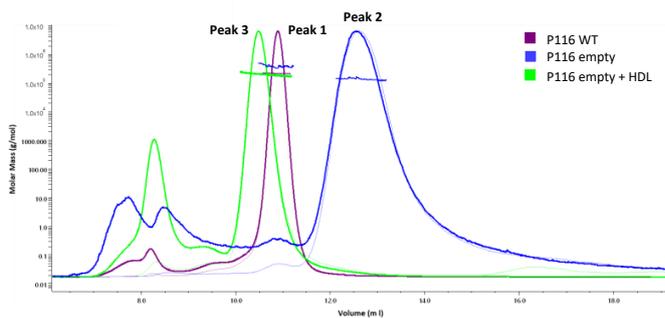
a



b



c



	Mw (kDa)	Polydispersity (Mw/Mn)	Mass fraction (%)
Peak 1	220,82 +/- 0,30	1,01 +/- 0,00	96,05
Peak 2	140,10 +/- 9,94	1,01 +/- 0,10	94,70
Peak 3	204,84 +/- 0,42	1,01 +/- 0,00	90,15

Figura 3.17. a) Detalle de la densidad extra de los ligandos hidrofóbicos en forma de cadenas alargadas localizados en el mapa de densidad electrónica de P116, en la región de la cavidad. b) Resultados de análisis de masas MALDI-TOF para la P116 nativa, vaciada y rellena mediante interacción con HDLs. Se observan picos correspondientes a moléculas de ésteres de ceras de cadenas de diferentes longitudes, así como esfingomielinas y fosfatidilcolinas en la P116 nativa; su práctica desaparición en la muestra de P116 tratada con triton X-100; y la reaparición de nuevo de picos correspondientes a esfingomielinas y fosfatidilcolinas en la muestra de P116 vaciada e incubada posteriormente con HDLs. c) Resultado de SEC-MALS de P116 nativa, vacía y rellena con lípidos procedentes de HDL. Se observa el paso de dímero a monómero al vaciar la cavidad, y el regreso a la forma dimérica tras rellenar la cavidad previamente vaciada.

Fosfolípidos mayoritarios en las membranas eucariotas

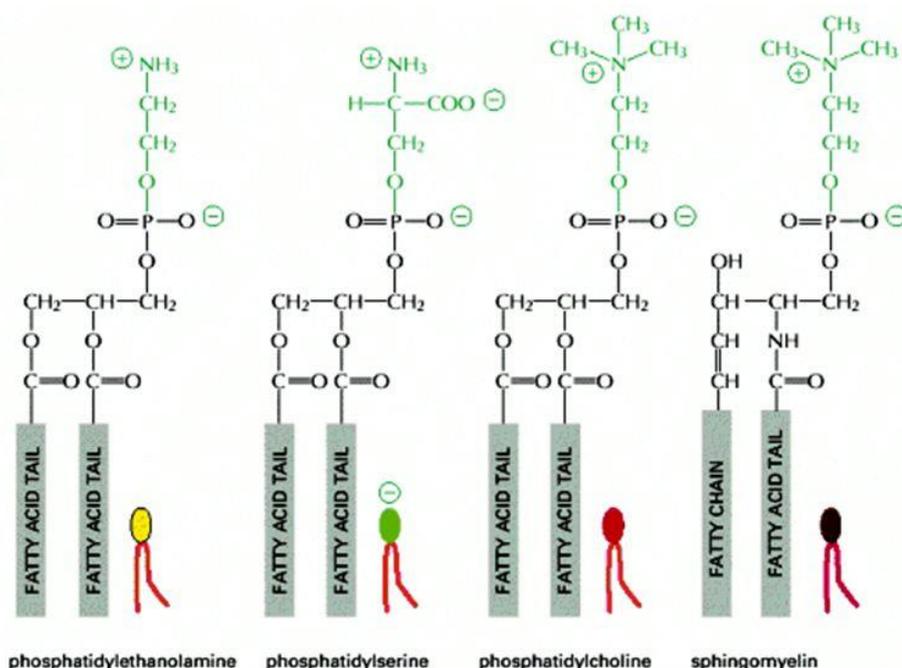


Figura 3.18. Fosfolípidos principales en membranas de eucariotas, que coinciden siendo una de las moléculas básicas que constituyen la membrana de micoplasmas también.

Para obtener muestras de P116 libres de ligandos unidos, se agregaron pasos de desnaturalización y reconstitución al proceso de purificación (ver en Materiales y Métodos). La desnaturalización con urea y cloruro de guanidinio permitió obtener dímeros reconstituidos de P116, pero con lípidos de fosfatidilcolina y esfingomielina todavía presentes. Estos lípidos podrían eliminarse solo cuando la desnaturalización se llevó a cabo utilizando altas concentraciones de detergente **Triton-X** (Figura 3.17). Las muestras de P116 reconstituidas y libres de ligando presentan cierta tendencia a la agregación dependiente de los cambios de temperatura y concentración, y corresponden

principalmente (más del 70%) a moléculas monoméricas según mediciones realizadas en SEC-MALS (Figura 3.17). **Curiosamente un equilibrio muy similar al obtenido por el mutante W681A.**

Primero se intentó rellenar las muestras vacías de P116 con ligandos específicos de forma controlada en presencia de suero bovino fetal (FBS) y segundo en presencia de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los medios que contienen FBS son un caldo de crecimiento común para cultivos de *M. pneumoniae*, aunque se ha demostrado que las lipoproteínas son sustitutos eficientes del suero en medios de cultivo de micoplasma, probablemente porque las lipoproteínas pueden proporcionar los lípidos clave esenciales para las células de micoplasma (Washburn & Somerson, 1979).

Las muestras vacías de P116 incubadas con FBS durante 2 horas a temperatura ambiente, se volvieron a purificar mediante cromatografía de afinidad y luego se analizaron mediante espectrometría de masas, mostrando la clara presencia de los lípidos fosfatidilcolina y esfingomiélin (Figura 3.20). En estas muestras, las moléculas de P116 estaban presentes principalmente como dímeros según la cromatografía de gel filtración y las mediciones de MALS, lo que evidencia el **cambio de monómero a dímero** cuando las moléculas de P116 pasan de tener una cavidad vacía a llena de lípidos (Figura 3.17 y 3.19). Cuando la incubación se realizó con una solución que contenía HDL, el resultado del análisis de las fracciones de P116 purificadas fue muy similar: i) las moléculas de P116 se volvieron en su mayoría dimericas y ii) los lípidos de fosfatidilcolina y esfingomiélin estaban claramente presentes (Figura 3.17). Por lo tanto, la P116 vacía es capaz de capturar al menos varios de los lípidos esenciales requeridos por *M. pneumoniae* tanto del medio FBS como de las HDL.

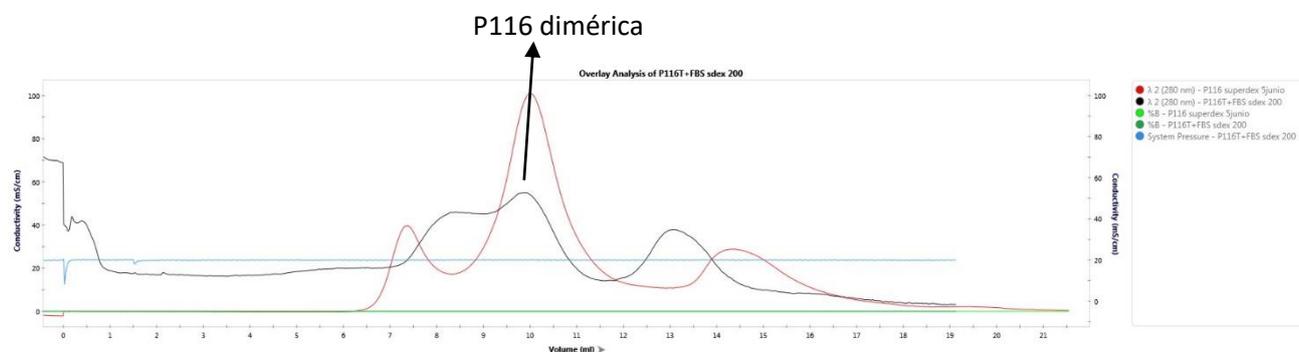


Figura 3.19. Cromatogramas de gel filtración de P116 nativa (rojo) y P116 vaciada e incubada con FBS (negro). Se observa como P116 vaciada tras ser incubada con FBS vuelve a recuperar su estado dimerico inicial también tras la incubación con FB además de captar lípi

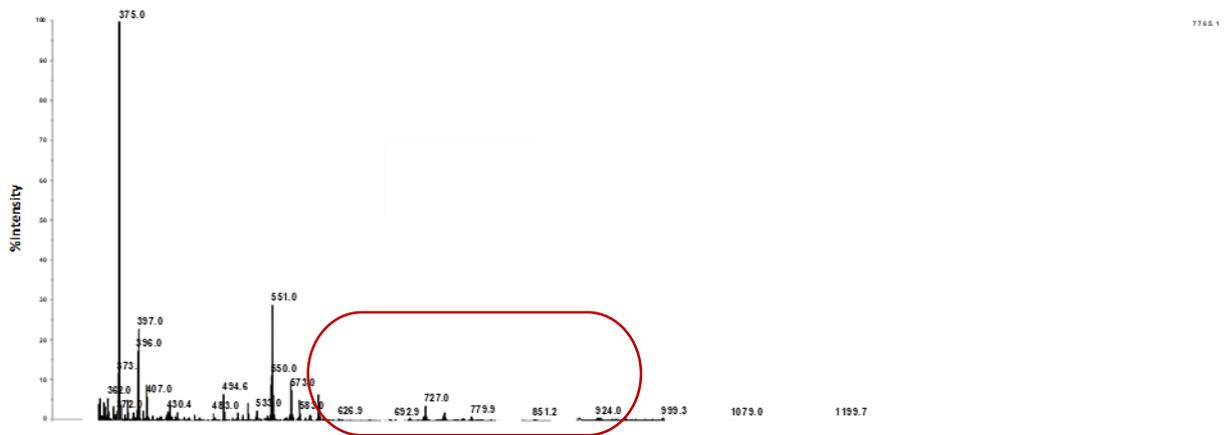
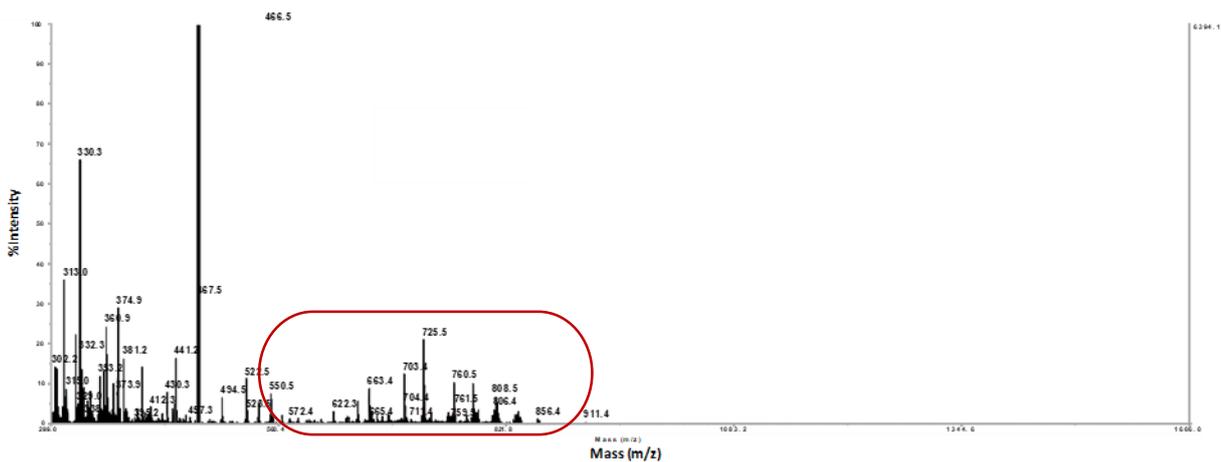
a**P40/P90****b****P116 Empty + FBS**

Figura 3.20. Resultados de análisis de masas MALDI-TOF para la P40/P90, que se utilizó como control, y para P116 vaciada e incubada con FBS. a) Para la proteína P40/P90 no se observan picos correspondientes a estas moléculas lipídicas, como se aprecia en el resaltado rojo. b) En la P116 vaciada e incubada con FBS se observan picos correspondientes a esfingomielinas y fosfatidilcolinas.

2.2.-Interacción de P116 con lipoproteínas

Una vez identificados algunos de los ligandos potenciales de P116, quisimos corroborar dos cuestiones importantes aún no clarificadas:

- 1) Si realmente P116 podía captar y almacenar lípidos a partir de lipoproteínas humanas, como ya se había descrito en bibliografía que *M. pneumoniae* es capaz de extraer de estas proteínas transportadoras los lípidos necesarios para su desarrollo.
- 2) Si P116 era capaz de captar y almacenar el colesterol, ya que esta molécula no era posible detectarla en pequeñas cantidades en ensayos de MALDI-TOF.

El primer objetivo fue comprobar si la P116 interaccionaba formando complejos con alguna de las lipoproteínas humanas. Para ello se realizaron una serie de incubaciones preliminares y equimoleculares de P116 con HDL, LDL y VLDL durante 30 minutos a 37°C, realizando posteriormente una electroforesis en gel en condiciones nativas (sin desnaturalizar las proteínas) para visualizar los posibles complejos formados. Tras teñir el gel con Sudan Black (teñidor de lípidos) y con Azul de Coomassie observamos que a priori no se habían formado complejos estables de P116-lipoproteína, ya que la P116 aparecía aislada y corría de forma similar al control sin incubarse. La VLDL quedaba retenida en el origen del gel, probablemente siendo demasiado grande para poder penetrar en él y correr. Otro aspecto interesante es que la P116 parecía alterar su movilidad cuando se incubó con las LDL o HDL (30' a 37°C), aunque sin la certeza de que fuera a consecuencia de la interacción. También el hecho de que la P116 diera positivo para lípidos (señal débil) con la tinción de Sudan Black cuando había estado expuesta a la HDL podría ser relevante ya que podría indicar cierto grado de interacción/unión (Figura 3.21).

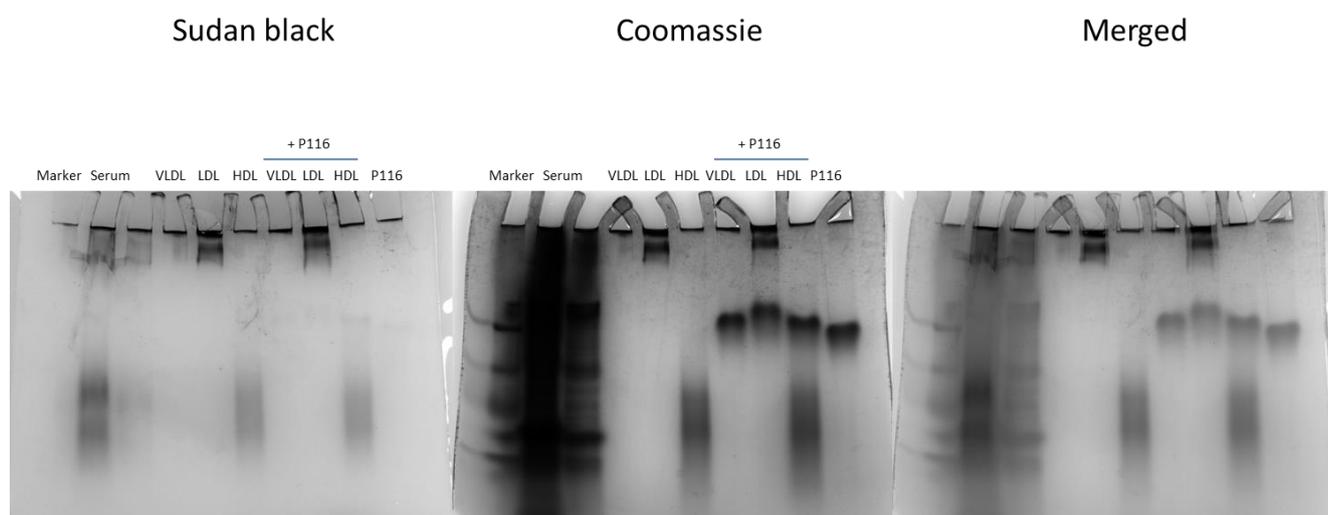


Figura 3.21. Geles de las incubaciones (30min a 37°C) de P116 con las diferentes lipoproteínas humanas en condiciones nativas. La tinción con Sudan black detecta lípidos, por lo que se observa claramente la posición de las HDL y LDL. Las VLDL, debido a su gran tamaño, no fueron capaces de penetrar y correr a lo largo del gel, por eso no se aprecian. En esta tinción también se muestra levemente la presencia de la P116 control y de la P116 incubada con lipoproteínas. La P116 incubada con HDL es la que se muestra más intensa en la tinción con Sudan black. Ésto parece demostrar que la P116 control ya posee algunos lípidos, y que al incubarla con lipoproteínas interactúa con ellas y se recarga aún más, sobre todo con HDL. En la tinción con Coomassie observamos las proteínas, viendo como P116 no forma ningún complejo estable con las lipoproteínas tras estas incubaciones, pero sí muestra una alteración en la manera de correr por el gel de las P116 incubadas con lipoproteínas respecto a la P116 control.

Tratando de profundizar en el estudio de estas posibles interacciones, se volvió a realizar una serie de incubaciones de P116, esta vez vaciada, con LDL y HDL a diferentes tiempos, analizando posteriormente en un gel nativo de nuevo las muestras. Las incubaciones de las LDL y HDL con la P116 (30'/2h) a 37°C hicieron desaparecer la banda de proteína correspondiente a P116 de forma sorprendente.

Para localizar la P116 en este gel se realizó un Western Blott con anticuerpos policlonales contra P116, encontrando que en su mayoría había quedado retenida en los pocillos. Desafortunadamente, no pensamos en incubar la P116 sola a estos tiempos porque no preveíamos esta situación y solo teníamos la situación basal sin incubar a 37°C, por lo que no podíamos asegurar si esta desaparición se debía a la formación de un agregado de P116 o de un complejo de P116 con lipoproteínas, en cualquiera de los casos lo demasiado grande como para penetrar en el gel, como indicaba la señal del anticuerpo en la base de los pocillos del gel de las muestras incubadas. A priori se contempló la posibilidad de que P116 vaciada estuviera formando agregados masivos con HDL y LDL con el tiempo, ya que a un tiempo igual (5min) y a la misma temperatura (37°C) la cantidad de P116 libre observada en el Western es diferente en el carril de las LDL con respecto a las HDL. Este hecho invitaba a pensar que la desaparición de P116 se debía a un complejo con las lipoproteínas y que con la LDL debía tener más afinidad, ya que a 5 minutos casi no quedaba proteína libre comparándola con la misma condición pero en HDL (ver Figura 3.22).

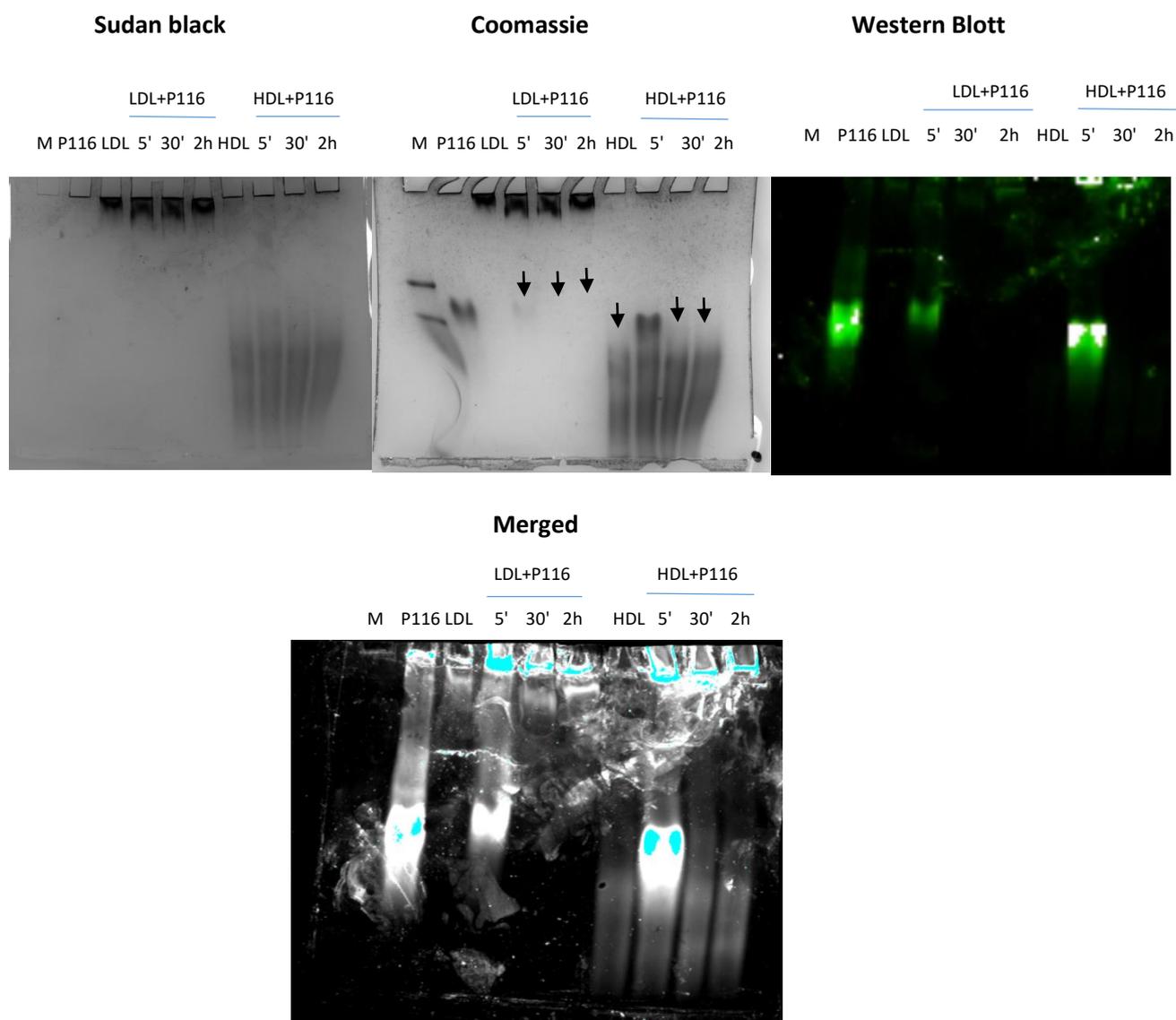


Figura 3.22. Western Blott y gel teñido con azul Coomassie y Sudan black de las incubaciones de P116 vaciada con lipoproteínas humanas. Flechas indican la posición donde debería situarse la P116. En Merged, las bandas en azul señalan la identificación de P116 por el anticuerpo. Se comprueba así como casi desaparece por completo del gel en los carriles correspondientes a las incubaciones con LDL y HDL a 30' y 2h de incubación, quedando un remanente en las incubaciones a 5', sobre todo apreciable con HDL. Se confirma que no forman complejo, pero se abre la posibilidad de agregación conjunta entre P116 y las lipoproteínas que formen conglomerados de gran tamaño que no penetren en el gel, como sucedía con la VLDL. Más tarde se comprobó la inestabilidad térmica de P116 vaciada y reconstituída, que agregaba fácilmente al congelarse y descongelarse o aumentar la temperatura a altas concentraciones de la proteína

Para detectar finalmente si la P116 vaciada estaba agregando con las lipoproteínas o la agregación era causa de la baja estabilidad de la P116 a 37°C, se volvieron a realizar incubaciones, esta vez con controles de P116 nativa y vaciada solas a 37°C. Se realizaron esta vez una serie de cromatografías de gel filtración analíticas para comprobar posibles complejos, agregados y variaciones.

La P116 nativa no agregaba por sí sola ni tampoco formaba complejos cuando era incubada con las lipoproteínas HDL (ambas muestras a 37°C); pero la P116 vaciada, que se encontraba en un estado monomérico mayoritario, al incubarla con las HDLs sí aumentaba el pico de la fracción correspondiente al agregado, además de quedar prácticamente igual cantidad de HDL libre que antes de incubar, y una fracción de P116 libre (Figura 3.23). Estos resultados indicaban que la agregación estaba ocurriendo solo con P116 vaciada, lo cual además evidenciamos observando agregados macroscópicos posteriormente en repetidas muestras de P116 vaciada a determinadas concentraciones tras calentar o congelar y descongelar la muestra. Al concentrar la proteína vaciada y monomérica hasta altas concentraciones, la P116 agregaba en mayor proporción que a bajas concentraciones para unas mismas condiciones de exposición a 37°C durante 2h. Curiosamente, en ciertas ocasiones estos agregados podían disolverse de forma espontánea transcurridos unos minutos, sobre todo cuando la agregación era debida a una congelación y descongelación de la muestra. Tras calentar a 37°C o más, si la concentración o cantidad total era suficientemente alta (>2mg/mL o >40µg), la muestra de P116 vaciada permanecía agregada y terminaba precipitando en un pellet blanco indisoluble.

La fracción soluble de estas incubaciones fue cargada en gel filtración, obteniendo picos de agregados que fueron analizados en geles SDS-PAGE. Finalmente se concluyó que el pico de precipitado únicamente se debe a la P116 y que las HDLs aparecen en un V_e igual que cuando las cargas por sí solas, además también queda parte de P116 no agregada que aparece en un V_e similar al de las HDLs (Figura 3.23).

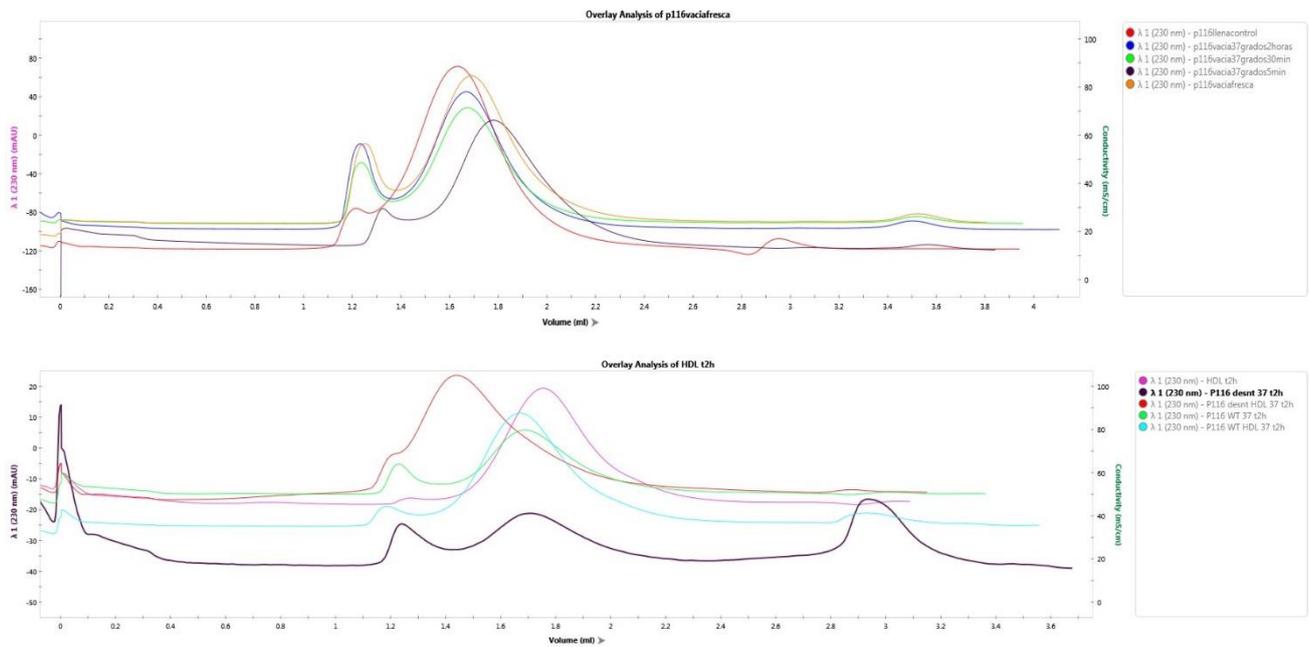
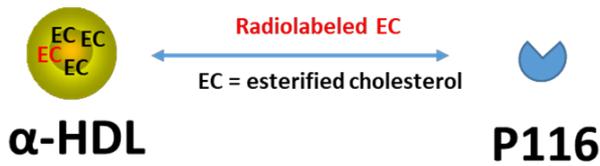


Figura 3.23. Cromatogramas de gel filtración analítica superpuestos de las diferentes muestras de P116 llena y vaciada, controles e incubadas con HDL a 37°C durante diferentes tiempos. Mediante estos ensayos se comprobó que la HDL no agregaba ni formaba complejos estables con P116 y que la P116 vacía tenía tendencia a agregar al ser calentada.

2.3.-Detección del traspaso de colesterol libre y esterificado

Las metodologías de espectrometría de masas utilizadas en estos experimentos no fueron óptimas para la detección de colesterol (consultar material y métodos) y se ideó un análisis alternativo con partículas de HDL que contenían **colesterol marcado con tritio o éster de colesterol marcado con tritio**, para luego medir la tasa de transferencia de radiactividad a P116 después de ser incubados juntos (Tabla 3.5). Se realizaron incubaciones de P116 vacía y llena con las HDLs cargadas de colesterol marcado con tritio. Sorprendentemente, se pudo detectar una fracción significativa de HDL-[3H]-radiotrazador en las muestras de P116 post-incubadas y purificadas, lo que indica una **transferencia neta tanto de colesterol libre como de éster de colesterol entre HDL y P116** (Figura 3.24).

Specific Activity= 185 cpm/nmol cholesterol



Specific Activity= 1221 cpm/nmol cholesterol

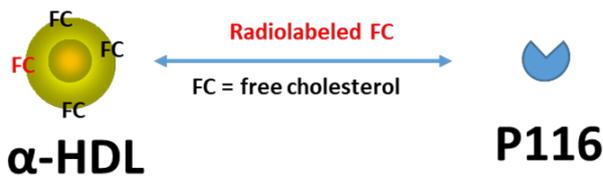


Figura 3.24. Transferencia de colesterol entre HDL y P116 y situación del colesterol libre y esterificado en una HDL.

Para confirmar que ningún remanente de HDL podría estar todavía contaminando las **fracciones de P116 purificadas**, la **ausencia total de APOA1**, la proteína de HDL más abundante, se cotejó mediante detección inmune. La tasa más alta de transferencia de radiosonda se logró cuando las HDL que contenían colesterol [3H] se mezclaron con P116 vacía, aunque la transferencia de colesterol [3H] también fue bastante significativa con P116 llena (Tabla 3.5). Es importante destacar que los ésteres de colesterol [3H] también se transfirieron a pesar de que estos ésteres están enterrados en el núcleo de las partículas de HDL (Figura 3.23). Por lo tanto, la transferencia de lípidos probablemente implica la interacción directa entre P116 y partículas HDL, pero los intentos de atrapar con geles nativos estos supuestos complejos HDL-P116 no tuvieron éxito (Figuras 3.21 y 3.22), lo que sugiere que estos complejos son transitorios en el mejor de los casos, tal vez de manera similar a lo que se ha informado que ocurre con proteínas de unión a HDL como CETP y PLTP (Raposo, 2021). Aunque el experimento se realizó con HDL por su mejor accesibilidad, estos resultados también valdrían para lipoproteínas LDL.

HDL a P116 vacía	K [*H]cholesterol transferred/mL	nmol cholesterol transferred/mL/h	nmol cholesterol transferred/mg P116	n° cholesterol/subunit P116
Colesterol libre	13.1	13.5	59.5	6.3
Colesterol este	6.98	7.2	31.7	3.3
HDL a P116 llena				
Colesterol libre	7.9	7.4	32.6	3.4
Colesterol ester	6.3	6	26.4	2.8

Tabla 3.5. Transferencia relativa de colesterol libre y colesterol esterificado de HDL a P116 vacía y llena. Cálculo aproximado de número de moléculas de colesterol transferidas por subunidad de P116. Se observa una mayor eficiencia de transferencia en las muestras de P116 vacía con colesterol libre, mientras que una menor eficiencia se obtiene en muestras de P116 llena con colesterol esterificado.

3.- Localización celular de P116

El inmunomarcaje con anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, se utilizó contra el constructo 30-957 de P116, mostrando una **distribución intensa y uniforme del marcaje en toda la superficie de las células** de *M. pneumoniae*, lo que contrasta con lo encontrado para la adhesina P1, donde el marcaje con los anticuerpos policlonales correspondientes se concentra en la OT (Figura 3.25). Así, parece que la P116 se encuentra distribuida de manera uniforme por toda la membrana plasmática de la bacteria.

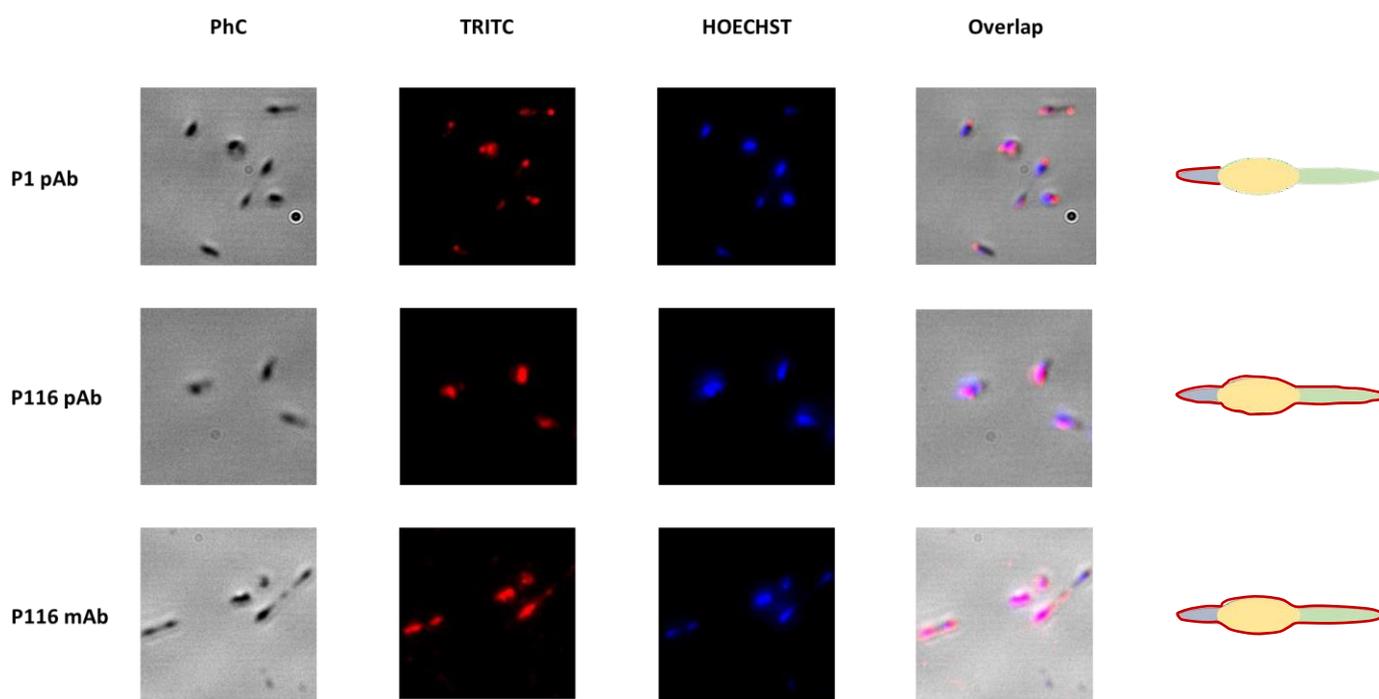


Figura 3.25. Micrografías de microscopía con fluorescencia de *Mycoplasma pneumoniae* con diferentes anticuerpos de P116 y P1 unidos a fluoróforos. Se observa como la fluorescencia emitida con el AC de P1 se localiza polarmente en torno a la OT de *M. pneumoniae*, mientras que con el AC de P116 (MC y PC) se localiza alrededor de toda la célula, indicando su ubicación dispersa por toda la membrana plasmática. pAb: Anticuerpo policlonal; mAb: Anticuerpo monoclonal; PhC: Microscopio de contraste de fase; TRITC: (5/6-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate) Etiqueta anticuerpos, proteínas y otras moléculas para la obtención de imágenes por fluorescencia utilizando estos derivados activados del colorante de rodamina rojo fluorescente; HOECHST: colorante fluorescente de ADN empleado en microscopía de fluorescencia.

4.- Implicación en adhesión y motilidad de P116

La interacción de P116 con anticuerpos resultó solo en alteraciones menores de la adhesión y motilidad de las células de *M. pneumoniae*, también en marcado contraste con la gran implicación en adhesión y motilidad de P1 (Tabla 3.6).

	Antes AC (nº Cells)				Aprox 10' después AC (nº Cells)				Nº células despegadas	%células despegadas
	Cinematografía	Total	No Motiles	Motiles	Total	No Motiles	Motiles			
P1	1	46	5	41	15	11	4	37	90.2	
	2	20	1	19	4	4	0	19	100.0	
	3	131	3	128	31	24	7	121	94.5	
	4	15	0	15	9	9	0	15	100.0	
	5	397	9	388	122	89	33	355	91.5	
								Media	95.1	
								SD	4.6	
P116	1	170	5	165	112	7	105	60	36.4	
	2	79	7	72	45	8	37	35	48.6	
	3	51	5	46	35	5	30	16	34.8	
	4	42	5	37	30	6	24	13	35.1	
	5	61	4	57	31	4	27	30	52.6	
								Media	40.2	
								SD	6.6	
P40P90	1	54	3	51	35	19	16	35	68.6	
	2	159	14	145	108	44	64	81	55.9	
	3	146	8	138	85	28	57	81	58.7	
								Media	60.6	
								SD	6.7	
ContPBS	1	29	4	25	12	4	8	17	68.0	
	2	49	2	47	31	5	26	21	44.7	
	3	32	4	28	17	4	13	15	53.6	
								Media	53.8	
								SD	11.8	

Tabla 3.6. Se observa la gran implicación de P1 en la adhesión de las células de *M. pneumoniae*, con una media de 95% de células despegadas tras 10 minutos de incubación con el anticuerpo de P1. Con el anticuerpo de P116, solo se despegan una media del 40% de células, lo cual es menos de la mitad, pero observando el control con suero PBS sin añadir ningún anticuerpo, ya observamos como hasta la mitad de las células de media se despegan de forma natural, por lo que se puede suponer que la implicación de P116 en adhesión y motilidad debe ser entre escasa y nula. ContPBS: ensayo control con suero de PBS sin añadir anticuerpos; SD: desviación estándar.

Comparando con los datos del control, se puede deducir que **P116 no interviene en la adhesión y el deslizamiento de *M. pneumoniae***. La adhesina P1 muestra una implicación máxima en estos procesos, con una media de células despegadas cercana al 100% de las muestras. La otra adhesina P40/P90, formando el complejo del Nap in vivo junto con P1, muestra una leve implicación en la adhesión, aunque se conoce su esencialidad en este proceso al unirse a los ácidos siálicos del hospedador (Vizarraga, 2020 & Aparicio, 2020). Este resultado para P40/P90 probablemente se deba a la naturaleza de la unión con el AC utilizado para este ensayo, que no obstaculiza demasiado para que la proteína siga llevando a cabo su función.

5.- Proteínas MPN_212 y MPN_161

Una pequeña proteína de 16kDa y 135 aa que se encuentra en el mismo operón que la P116 justo antes de su secuencia, también presente en igual disposición en el organismo más próximo filogenéticamente, *M.genitalium* (MG_074, con un 40% de identidad de secuencia entre ambas). Para tratar de identificar su estructura y función, así como su muy posible formación de complejo con P116, se crearon varios constructos para expresar esta pequeña proteína de membrana, según predicciones en el programa de PSIPRED. Cabe destacar que MPN_212 no es un gen indispensable, a diferencia de la P116.

Se utilizaron los constructos **30-135**, **34-135** y **56-135** clonándose tanto en pOPINE, como en pOPINM (MBP) y pOPINS (SUMO protein).

Lamentablemente, tras intentar expresar varios constructos de MPN_212, con y sin su teórica área transmembrana, incluso en proteínas de fusión, se aparcó el proyecto al no conseguir sobreexpresión en ningún caso (Figura 3.26).

La MPN_161 es una proteína desconocida de *M.pneumoniae* donde en algunos estudios sin publicar se ha comprobado que interactúa con P116. Formada por 445aa, también comparte un 40% de homología con la ortóloga de *M. genitalium*. Al igual que MPN_212, se probó su expresión tanto en constructo completo como conteniendo solo la región extracelular según PSIPRED, vehiculizándola en varios plásmidos, incluidos en proteínas de fusión, pero no hubo éxito obteniendo una sobreexpresión de esta proteína, por lo que se descartó también (Figura 3.26).

Para MPN_161 se utilizaron los constructos 26-**232** y 26-**328** clonándose tanto en pOPINE, como en pOPINM (MBP) y pOPINS (SUMO protein).

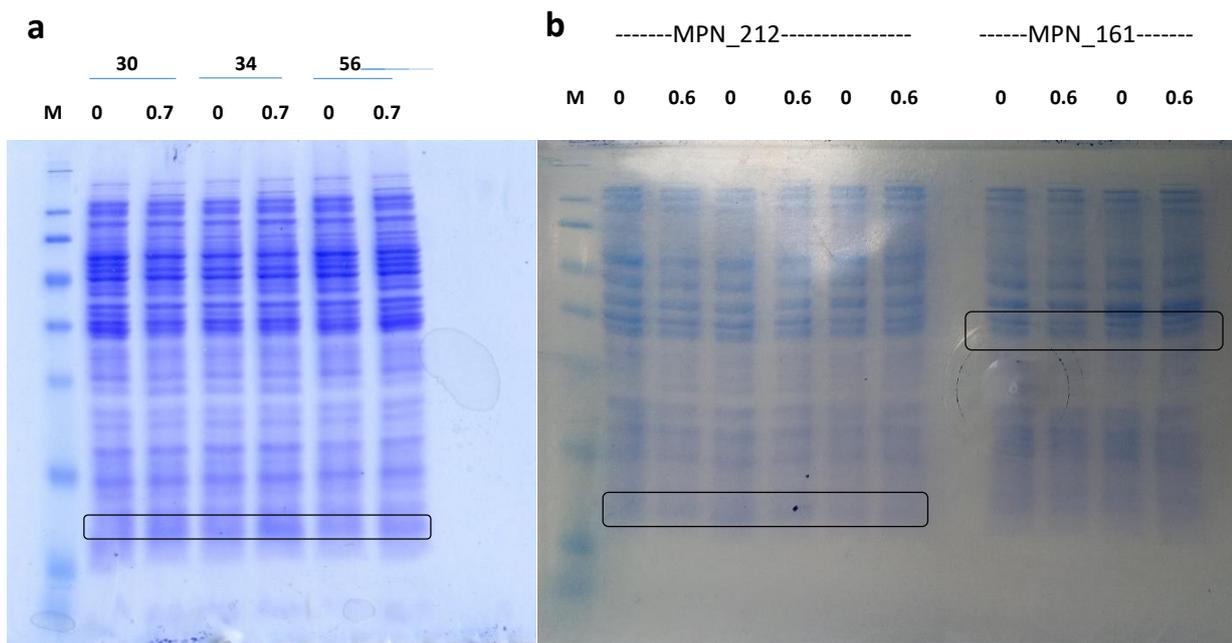


Figura 3.26. a) Pruebas de expresión de MPN_212, donde se observa solo una sobreexpresión muy leve en condiciones con 0.7mM de IPTG en la zona señalada con el rectángulo negro. No se consiguió expresar la proteína en ningún caso finalmente. b) Pruebas de expresión de MPN_212 y MPN_161. No se observa expresión para ningún constructo de MPN_212, mientras que en MPN_161 aparece solo expresión basal, pero no sobreexpresión. Ambas zonas indicadas por los recuadros negros. A pesar de ello se intentaron expresar y purificar obteniendo una cantidad ínfima solo de MPN_161, insuficiente para poder realizar cualquier estudio.

6.- Inmunoensayo ELISA (Reconocimiento de constructos de P116 por sueros de pacientes con infección de *M. pneumoniae*)

Para diseccionar la actividad inmunogénica de P116, se utilizaron tres constructos diferentes de la proteína: P116 30-957 (residuos 30 a 957), el derivado que carece de la región C-terminal (P116 30-845) y un derivado que carece tanto de la región C-ter y N-ter (P116 246-818). Los tres constructos se probaron con sueros totales de veinticinco pacientes con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae* basado en pruebas serológicas (consultar Materiales y Métodos). Todos los pacientes dieron positivo para el constructo P116 30-957 (Figura 3.27, Tabla 3.7). Obtuvimos resultados idénticos cuando usamos el constructo P116 30-845. Sin embargo, **el constructo P116 246-818 resultó en una marcada disminución de sueros positivos (72 %)**; esta pérdida de sensibilidad fue estadísticamente significativa en comparación con los constructos P116 30-957 y P116 30-845, $p = 0,01$ (ver Figura 3.22 y Tabla 3.7). Además, la señal general de los constructos P116 30-957 y P116 30-845 fue mayor que la obtenida con P116 246-818, $p < 0.001$ (ver Figura 3.27 y Tabla 3.7). Por el contrario, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad y la intensidad de la señal entre los constructos P116 30-957 y P116 30-845 ($p = 1.000$ y $p = 0.778$, respectivamente). Todos los sueros de control fueron negativos para los tres constructos de P116.

El constructo 30-845 además nos proporcionó información clave en relación a la inmunogenicidad regional de P116, ya que presentaba un reconocimiento por parte de sueros de pacientes infectados prácticamente idéntico al del ectodominio completo, lo que sugiere que **en el C-ter no se encuentran epítomos importantes**. Al contrario, el constructo que carece también del N-ter (246-818) sí mostró una reducción del 50% aprox. en el reconocimiento por parte de sueros de pacientes infectados como se observa en la tabla 3.7 del inmunoensayo ELISA. Ésto demuestra que **aproximadamente la mitad de los epítomos de P116 se encuentran en la región del N-ter**.

Antígeno	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
P116 30-957	0.6	0.5	1.1	0.5	0.4	0.4	0.5	0.7	0.3	0.3	0.6	0.8	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.5	0.1	0.5	0.2	0.8	0.6	0.6
P116 246-818	0.2	0.4	0.2	0	0.4	0.4	0.1	0.4	0	0	0.3	0.4	0.1	0.3	0.1	0.5	0.2	0.3	0.2	0	0.2	0	0.4	0.1	0.1
P116 30-845	0.3	0.5	1.2	0.4	0.5	0.5	0.5	0.8	0.3	0.4	0.7	0.9	0.5	0.4	0.2	0.6	0.5	1.1	0.6	0.2	0.6	0.3	0.9	0.6	0.5
P1 30-1527	0.2	0.6	0	1.2	0	0	1.1	0.4	0	0.5	0.3	0.3	0.4	0	0	0	0.8	0.3	0.6	0	0.2	0.3	0.9	0.8	0.6
Antígeno	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
P116 30-957	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++
P116 246-818	+	++	+	-	++	++	-	++	-	-	+	++	-	+	+	++	+	++	+	-	+	-	++	+	+
P116 30-845	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++
P1 30-1527	+	++	-	++	-	-	++	++	-	++	++	++	++	-	-	-	++	++	++	-	+	++	++	++	++

Antígeno	$x < 0,1$	$0,1 \leq x < 0,3$	$x \geq 0,3$
	-	+	++
P116 30-957	0 (0%)	25 (100%)	20 (80%)
P116 246-818	7 (28%)	18 (72%)	8 (32%)
P116 30-845	0 (0%)	25 (100%)	21 (84%)
P1 30-1527	8 (32%)	17 (68%)	15 (60%)

Tabla 3.7. Tabla con los resultados de la intensidad de reacción del suero de cada uno de los 25 pacientes por cada uno de los 3 constructos de P116 estudiados y por la adhesina inmunogénica P1, mostrando valores un poco más intensos para P116 con el N-ter y una pérdida de inmunogenicidad para el constructo central 246-818. También se observa como P116 genera una reacción más intensa y unánime en los sueros que P1.

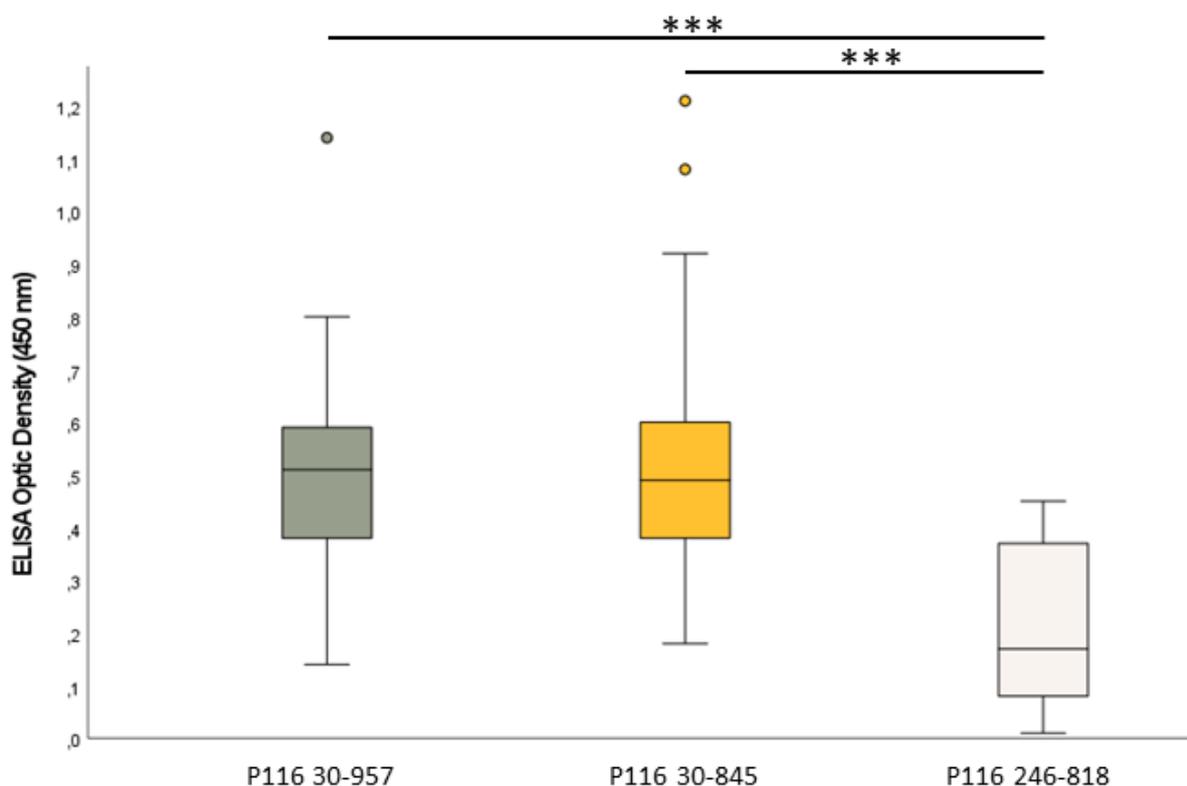


Figura 3.27. Reactividad de sueros de pacientes infectados por *M. pneumoniae* contra constructos de P116. Diagrama de caja que representa la distribución de la reactividad del anticuerpo en el ELISA con diferentes constructos de P116. *** $p < 0.001$. Cada casilla representa los percentiles 75.50º (mediana) y 25º de los valores de ELISA obtenidos para cada constructo. También se indican los valores máximo, mínimo y los atípicos.

7.- Estructura de P116 vacía

Mediante el programa de predicción de estructura AlphaFold se detectaron los modelos de P116 que se asemejaban con lo que conformaría la estructura con la cavidad vacía. Según predicciones y por la gran flexibilidad de las hélices equivalentes a los dedos de la mano, la P116 sería capaz de colapsar casi por completo su cavidad hidrofóbica, impidiendo en gran medida el contacto con el solvente para poder estabilizar el monómero. Para ello el pulgar de dimerización se pliega hacia dentro para cerrar aún más la abertura (Figura 3.28).



Figura 3.28. Conformación cerrada del monómero de P116 (dominio central) obtenido mediante Alphafold. Se aprecia como las hélices de los dedos se pliegan sobre la cavidad. Desviación rms de 3.86Å para 395 residuos equivalentes (sobre 588).

Finalmente se consigue determinar experimentalmente la estructura del dímero vacío mediante Crio-EM a partir de muestras de P116 tratadas con triton X-100 y posteriormente reconstituidas, mostrando un plegamiento diferente al de Alphafold, quizás debido a que aún queda cierta densidad extra y no todos los dedos están cerrados hacia el interior de la cavidad (Figura 3.29). Esta conformación es completamente reversible como ya se ha comprobado, pudiendo abrirse de nuevo para recibir lípidos cuando se pone en contacto la molécula con sustancias hidrofóbicas (Figura 3.30). La estructura de la P116 vacía y después rellenada con FBS también se obtuvo, aunque con un mapa de baja resolución, pero que en esencia se ajustaba a la conformación abierta inicial de la proteína.

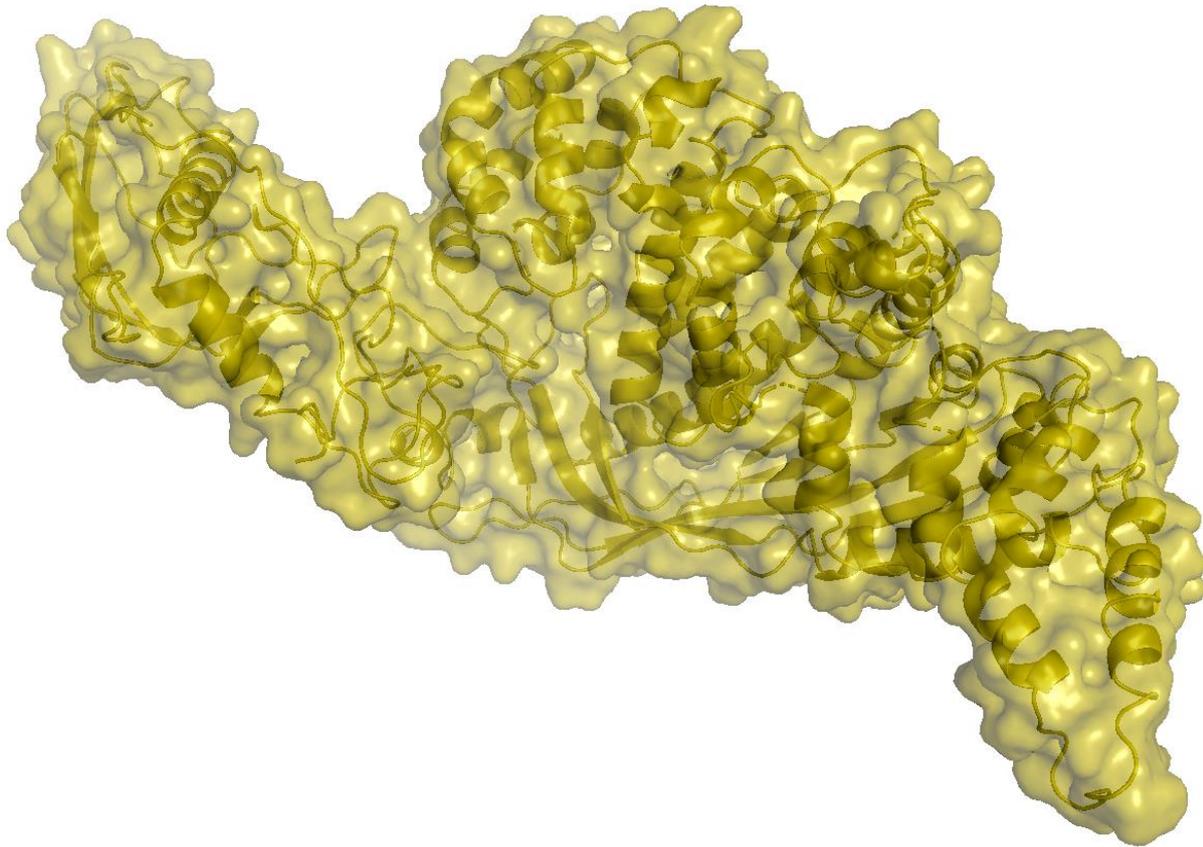


Figura 3.29. Conformación cerrada de P116 obtenida mediante Crio-EM tras un tratamiento con Triton X-100 y posterior reconstitución. Se observa una gran disminución de la cavidad debido a un cambio de posición en las hélices flexibles, plegándose hacia el interior y sufriendo una ligera torsión lateral respecto a la conformación abierta. Los dos dedos más próximos a la hélice de dimerización no se ocluyen mucho, probablemente debido a que aún queda cierta densidad extra en esta zona, correspondiente a lípidos o incluso moléculas de Triton X-100.

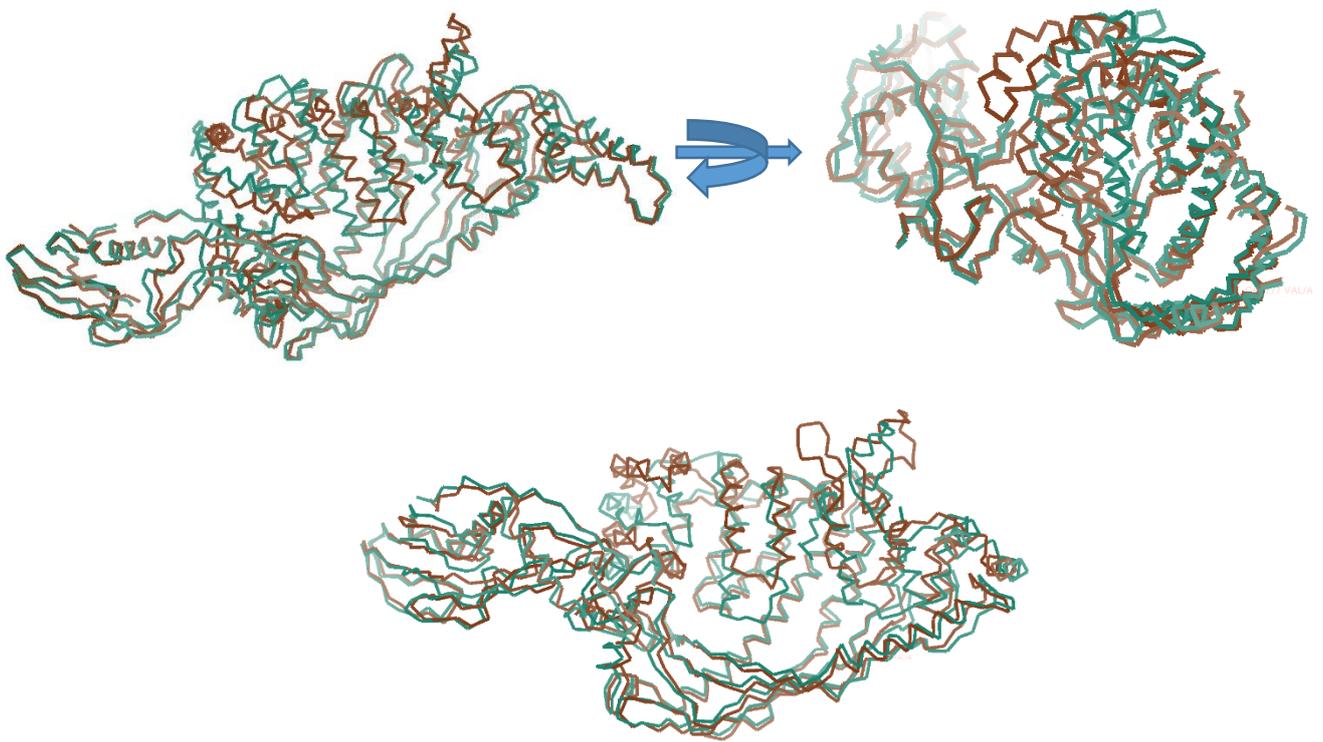


Figura 3.30. Modelos superpuestos del monómero de P116 en conformación abierta (marrón) y en conformación cerrada de Crio-EM (turquesa). Se aprecia como el modelo cerrado ocluye las hélices análogas a dedos hacia la palma, cerrando la cavidad en gran medida.

8.- Conservación de secuencia P116 en el cluster Pneumoniae

Mediante una caracterización en el servidor Blast (Boratyn, 2019) de búsqueda de secuencias similares en una base de datos a partir de P116, se encontró que es una proteína relativamente conservada dentro del Cluster Pneumoniae (Figura 3.31), apuntando a una función similar en las especies más emparentadas con *Mycoplasma pneumoniae* (Tabla 3.8).



Figura 3.31. Rama filogenética perteneciente a las 9 especies de *Mycoplasma* del clúster Pneumoniae, clasificados respecto a la secuenciación del ARN ribosómico de la subunidad 16S. Los números en los nodos representan valores de confianza de arranque (1000 repeticiones). Solo se muestran valores > 80%. Barra, número de sustituciones por posición de nucleótido (Volokhov, 2012).

Proteínas ortólogas de P116 - Especie del cluster Pneumoniae	%homología respecto a la secuencia de P116 (MPN_213)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	52
<i>Mycoplasma testudinis</i>	25
<i>Mycoplasma amphoriforme</i>	24.4
<i>Mycoplasma pirum</i>	24
<i>Mycoplasma</i> sp. E35C	23

Tabla 3.8. Tabla con los resultados de mayor homología de secuencia de P116, realizado con el servidor Blast. Se muestran las proteínas con secuencias que producen alineamientos significativos con P116 y se pueden considerar ortólogas, destacando la ortóloga de *Mycoplasma genitalium* (MG_075) como ya se pudo comprobar en la Figura 3.12.

DISCUSIÓN

Las dos proteínas inmunodominantes más importantes expuestas en la superficie para el diagnóstico serológico de infecciones por *M. pneumoniae* son P1 y P116 (Drasbek, 2004). Curiosamente, el genoma de *M. pneumoniae* contiene una sola copia del gen P116 (MPN213), mientras que contiene muchas copias de varias regiones de P1 que permiten generar, por recombinación homóloga, una enorme variabilidad antigénica para P1. La estructura y los roles biológicos en la adhesión y la motilidad se han estudiado intensamente para P1, que junto con la proteína P40/P90 forman los complejos de adhesión Nap que se encuentran principalmente en la OT (Seto, 2005). Por el contrario, aunque **P116 es una proteína esencial para la viabilidad de las células de *M. pneumoniae***, su estructura, localización y posibles funciones biológicas esenciales siguen siendo mayoritariamente desconocidas. Durante años ha sido categorizada como adhesina por la pérdida de adherencia ante presencia de AC específicos y por su posición en membrana. Se propuso un posible papel en la adhesión de P116 solo porque los anticuerpos contra fragmentos recombinantes de esta proteína interfieren con la unión de *M. pneumoniae* a las células de la línea celular humana HEp-2 (Svenstrup, 2002).

P116, una proteína de membrana esencial para la viabilidad del patógeno humano *M. pneumoniae* (Lluch-Senar et al., 2015), **es la diana de una fuerte respuesta inmunogénica** que está presente de manera más constante en pacientes infectados por *M. pneumoniae* que la respuesta inmune hacia la adhesina P1 inmunodominante, pero antigénicamente variable, como se ha demostrado en este proyecto. La **ausencia de variabilidad antigénica** junto con la fuerte inmunogenicidad de P116 indican que los constructos de esta proteína que abarcan los dominios central y N-terminal podrían ser objetivos excelentes para el desarrollo de vacunas y la inmunoterapia de infecciones por *M. pneumoniae*.

En este trabajo se muestra que, cuando se tratan células de micoplasma con anticuerpos anti-P116, las células móviles no se ven afectadas y no se separan de la superficie sólida a la que están adheridas, lo que contrasta agudamente con lo que se encuentra cuando se tratan estas células con anticuerpos anti-P1 (Tabla 3.6). Aunque no se puede descartar un papel menor o residual de P116 en la adhesión sobre células hospedadoras, está claro que en ausencia de P1 (Baseman, 1982; Krause et al., 1982) o cuando P1 está bloqueada por anticuerpos (Morrison-Plummer et al. 1986 y este trabajo), P116 es incapaz de sostener la adhesión (y por tanto la virulencia) de micoplasma, **excluyendo a P116 como un determinante principal para la citoadhesión**, como se propuso previamente (Svenstrup et al, 2004). Estos resultados respaldan la opinión de que el complejo de adhesión Nap, formado por las adhesinas P1 y P40/P90, es el principal determinante de la adhesión del micoplasma a las células humanas a través de los receptores sialilados (Williams et al. 2018, Vizarraga et al., 2020). No obstante, los resultados que obtuvimos revelaron que los anticuerpos contra P1 afectan única y exclusivamente a las células en movimiento, despegándolas en un 95% de media. Lo que sugiere que,

como ya relataban otros autores, el Nap debe de transitar entre dos conformaciones, y una de ellas sea la que se enganche al AC e impida la adhesión. En cuanto a la P40/P90, no se vio ningun efecto significativo en la adhesión y/o motilidad. En la bibliografía se detallan experimentos donde los anticuerpos específicos para P116 inhiben la adhesión, lo cual podría haberse debido a una reacción cruzada o a que los AC bloquearan la función vital para *M. pneumoniae* y provocara la muerte de la célula (con el correspondiente desprendimiento de la superficie a la que estaba adherida).

Por microscopía confocal con fluorescencia y el inmunomarcaje con anticuerpos anti-P116 hemos visto que la localización de esta proteína **se encuentra alrededor de la mayor parte de superficie** de la membrana de *M. pneumoniae*, ocupando con seguridad todo el cuerpo de la célula, incluida la zona de la OT. Esto indica que P116 exhibe una distribución ubicua en la membrana de las células de *M. pneumoniae* (este trabajo). El número de copias de la proteína se mueve en torno a 245, distribuidas a lo largo de la superficie de la membrana plasmática, según datos de un estudio no publicado por Luis Serrano. Un número importante en comparación a las copias de otras proteínas en cada célula. En conjunto, estos resultados indican que el papel principal de P116 no está relacionado con los procesos de adhesión celular no esenciales, principalmente ubicados en la OT, pero sí está **involucrado en vías metabólicas clave que ocurren en toda la superficie de *M. pneumoniae***. Esta localización homogénea a lo largo de toda la membrana plasmática sugiere que la función de P116 debe ser llevada a cabo en toda la superficie de la célula, lo cual se adecúa bien al descubrimiento de su relación con la organización de lípidos de membrana. Los resultados obtenidos indican un papel clave de P116 en el metabolismo de compuestos hidrofóbicos que son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de las células de *M. pneumoniae*.

P116 es una proteína de membrana, con una hélice transmembrana que abarca los residuos 957-977 según predicciones de estructura secundaria en PSIPRED. Los aminoácidos más abundantes en su secuencia son K y L (11% cada uno), predominando las regiones básicas. El dominio C-ter de la proteína es el que debe estar situado más próximo a la región transmembrana según el modelo construido que tenemos, además de estas predicciones, aunque es cierto que el modelo construido del ectodominio va de los residuos 60-867, por lo que no se conoce con exactitud la posición de los primeros 60 aa, ni la de los 100 últimos aa del C-ter del ectodominio. La **región citoplasmática** correspondería a un pequeño fragmento desde los residuos 977-1030. Por Crio-EM parece que el dominio N-ter interactúa con el final del C-ter justo antes de comenzar la región transmembrana.

La estructura de la gran región extracelular de P116 se corresponde a un **nuevo pliegue**, ya que no se encontró en el servidor DALI ninguna otra estructura resuelta experimentalmente con gran semejanza. La proteína *In vitro* forma dímeros estables en solución a través de una unión tipo pinza entre dos hélices alfa de la parte central de la proteína. Contiene **dos dominios globulares, el N-terminal y el central, que a pesar de sus diferencias de tamaño tienen la misma topología (Figura 3.8), evidenciando que quizás uno de ellos puede provenir de una duplicación**. El dominio central, compuesto esencialmente por hélices alfa, mostró una característica única: **una gran cavidad hidrofóbica** y estructuralmente versátil que, sin embargo, era completamente accesible al solvente

(Figura 3.5, 3.7, 3.11). La relevancia de esta cavidad está respaldada por la alta conservación, entre todos los ortólogos de P116, de los residuos hidrofóbicos que recubren la cavidad. Esta ausencia de variabilidad puede ser debido a que la estructura de la proteína en su totalidad no le permite introducir variaciones para no alterar la función que pueda desempeñar en *M. pneumoniae*. La estructura no debe admitir apenas variaciones ya que la hidrofobicidad interna es crucial en el desarrollo adecuado de la función de la proteína. Mediante el análisis del mapa obtenido por crio-EM, se observaba que la cavidad se llenaba con densidades correspondientes a ligandos unidos desconocidos que podrían corresponder al exceso de masa medido de 6-7 KD por subunidad en SEC-MALS (Figura 3.17a). La caracterización por espectrometría de masas de los compuestos presentes en las muestras de P116 purificadas mostró la presencia de ligandos hidrofóbicos como los lípidos **fosfatidilcolina y esfingomielina**, esenciales para *M. pneumoniae*. Estos análisis también encontraron ceras, que no se sabe que *M. pneumoniae* requiera, aunque algunas bacterias patógenas las utilizan como fuente de carbono (Koronelli, 1979). Estos ligandos pudieron eliminarse de las muestras de P116 solo después de un tratamiento riguroso con detergentes, lo que confirma que **P116 tiene una alta afinidad por una diversidad de compuestos lipídicos e hidrofóbicos**. Las subunidades de P116 reconstituídas y vacías forman principalmente moléculas monoméricas, a diferencia de la total presencia de dímeros cuando la P116 se encuentra con la cavidad llena. Lo interesante es que estos monómeros vacíos pueden volver al estado dimérico cuando se incubaba la P116 vaciada con una fuente que le proporcione lípidos, como el FBS o las lipoproteínas, rellenando de nuevo su cavidad. Así, el estado monomérico de P116 es probablemente la forma en la que la molécula es capaz de internalizar lípidos desde el exterior. **El estado dimérico con ambas cavidades rellenas es muy estable, pero cuando están vacías, parece que la proteína es menos estable a altas y bajas temperaturas y tiende a agregarse** y formar conglomerados sólidos insoluble. Cuando está completamente vaciada parece estar disponible a unirse a otras proteínas o membranas como monómero. El hecho de que incluso desnaturizar la proteína con urea y HCl-Guanidinio no fuera suficiente para eliminar completamente el contenido lipídico de la cavidad, muestra cuán fuertemente unidos se encuentran estos ligandos hidrofóbicos a la cavidad, los cuales solo pudieron ser eliminados con altas cantidades de detergente.

Aunque solo disponemos de imágenes de Crio-EM donde visualizamos la posición del dímero respecto a la membrana, podemos suponer que el monómero se encontraría anclado en membrana dispuesto hacia arriba dejando expuesta la región de las hélices donde se encuentra el Trp-681. En estado monomérico esta región podría estar ligeramente abierta y susceptible de que sea la vía de entrada de los lípidos al interior de la cavidad, que una vez llena sufriría un cambio de conformación que facilitara la dimerización. Es un proceso que in vivo no tenemos la certeza de cómo ocurre, pero los resultados indican que **el monómero debe ser la forma activa que capta lípidos del exterior**, mientras que **el dímero debe ser la forma pasiva que almacena estos lípidos** hasta que puedan ser transferidos hacia la membrana del micoplasma, ya sea para ayudar con la organización estructural de la membrana o como nutrientes (Figura 4.1).

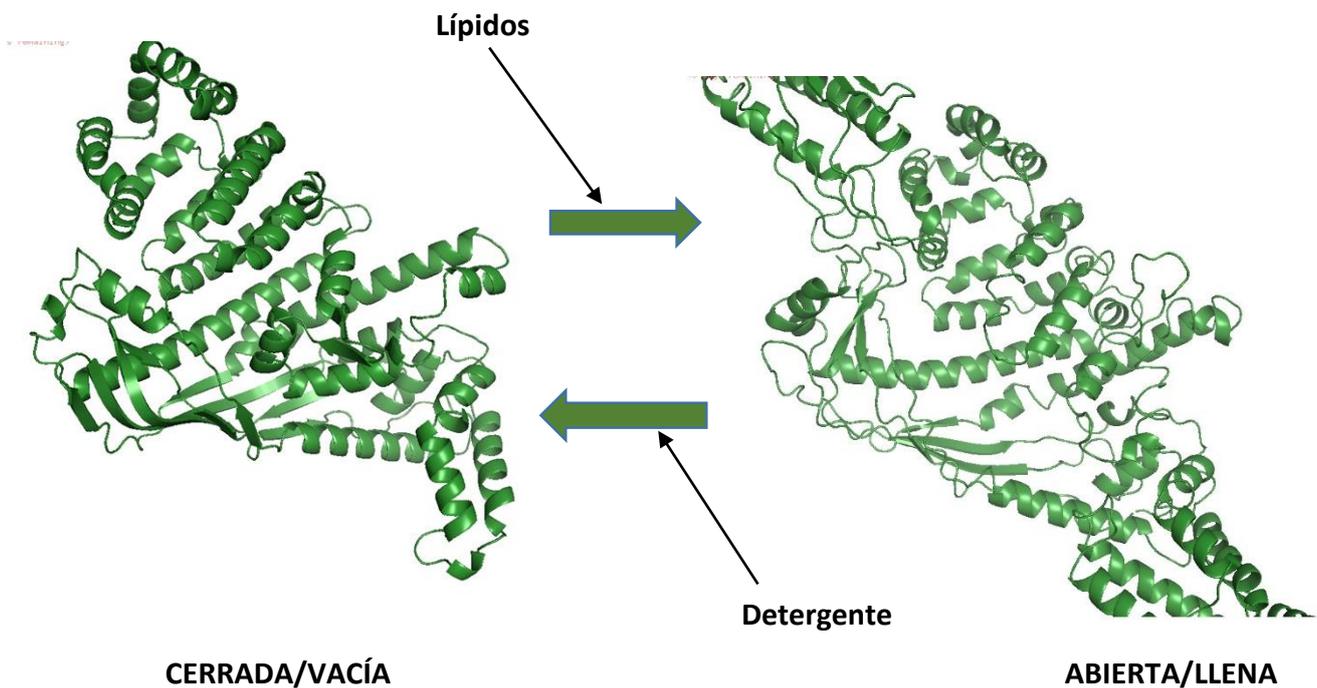


Figura 4.1. Ciclo de transición entre P116abierta y P116cerrada. P116 en conformación cerrada del monómero según AlphaFold (dominio central) y conformación abierta y dímero. Se aprecia como las hélices de los dedos se pliegan sobre la cavidad en estado cerrado.

La forma en detalle indica un posible canal de entrada/salida de los lípidos hacia la membrana de *M. pneumoniae*, situado en la zona próxima al N y C-ter, con **motivos semejantes a los observados por otras proteínas transportadoras de lípidos, como la CETP y PLTP** humanas, con las que comparte cierta similitud estructural y de función. Incluso estas proteínas presentes en animales pueden haber derivado evolutivamente de proteínas como la P116. De hecho, el N-ter podría funcionar como una CETP, incorporando estos lípidos y transfiriéndolos al dominio central de P116 donde se acumularían hasta ser necesitados. Ambas CETP y PLTP presentan una analogía estructural y funcional con la P116 de *M.pneumoniae*, como la presencia de una cavidad hidrofóbica y su papel en la captación de lípidos. Hace pensar acerca de un acoplamiento sobre membranas similar. Las similitudes estructurales de P116 con CETP y PLTP son varias, por ejemplo, los Trp en CETP sirven para anclar a membrana, lo cual indica que los 3 Trp de P116 podrían efectuar un papel parecido.

La entrada principal de los lípidos a las CETPs o PLTPs son los Trp que hay en ambos extremos, los cuales permiten penetrar en las membranas de las lipoproteínas. En la P116 podría ocurrir un suceso parecido al tener dos Trp, uno en cada extremo de la proteína, que pudieran permitir uno unirse a la membrana del donador y el otro a la propia membrana del micoplasma, formando un canal por el cual pudieran pasar los lípidos (Figura 4.2).

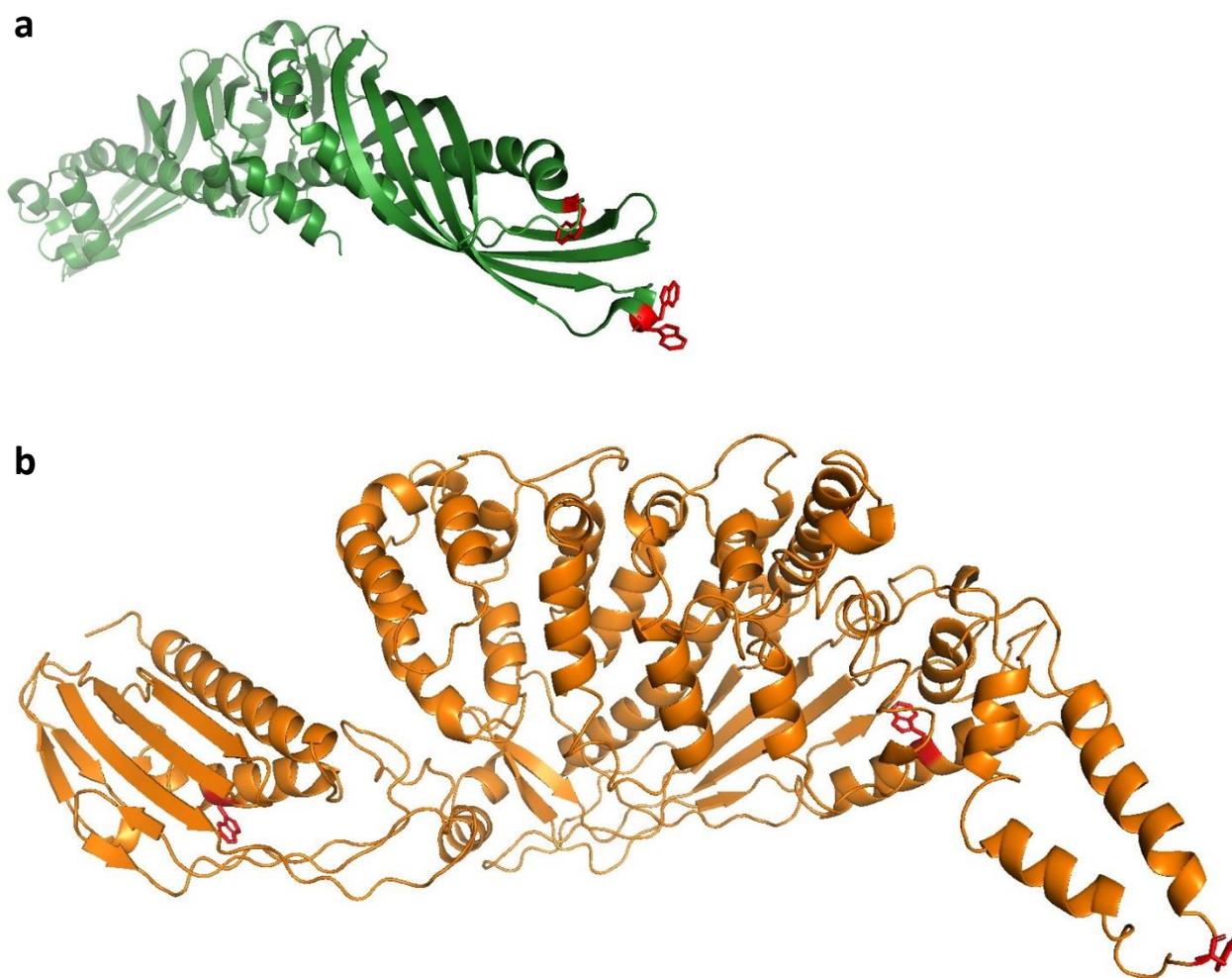


Figura 4.2. Comparación entre estructura de CERP y P116 mostrando los residuos de Trp señalados en rojo en ambos modelos. a) Estructura de CERP donde se muestra su estrecha cavidad tipo túnel que recorre la proteína a lo largo. En rojo se resaltan los residuos de Trp 105, 106 y 162 situados en el extremo que se ha comprobado que son clave en la interacción con las lipoproteínas (Cilpa-Karhu, 2015). b) Estructura del monómero de P116 donde se resaltan los residuos de Trp situados en los extremos en las posiciones 121, 681 y 805 que, en analogía con el caso de la CERP, podrían interactuar con membranas para iniciar el traspaso de lípidos.

Aún así, hay indicios en los resultados de que la P116 llena también puede intercambiar lípidos con el exterior, aunque en menor medida. En el ensayo con HDLs marcadas con tritio, se puede observar que la P116 llena también es capaz de captar algo de colesterol, y en los ensayos con geles nativos y tinción con Black Sudan (teñidor de lípidos) también se comprobó que las P116 incubadas con lipoproteínas aparecían con bandas ligeramente más intensas que las no incubadas, sugiriendo que se cargaban aún más de contenido lipídico. Además, **finalmente mediante la Crio-EM se pudo detectar la conformación cerrada de P116 en estado dimérico** en muestras vacías tratadas con

detergente, lo cual muestra que el vaciado y llenado puede ocurrir también sin cambio de dímero a monómero y viceversa. Aunque **el mapa de la conformación cerrada de P116 obtenido mediante Crio-EM muestra algo de densidad extra** en la zona cercana a la hélice de dimerización, por lo que esta muestra no estaría completamente vacía. Quizás éste es el motivo por el cual la P116 se encontrara en forma dimérica, al estar solo parcialmente vacía, suponiendo que completamente cerrada es solo cuando se encuentra como monómero. Todos estos resultados pueden indicar que la entrada de los lípidos hacia el interior de P116 se encuentra en otra área, por ejemplo, por el N-ter, y la helice de dimerización igual se encuentra dentro de la membrana, en una posición cóncava de la P116 dimérica respecto a la membrana.

El **colesterol**, ausente en *E. coli* y en la mayoría de los organismos procariotas, es esencial y el lípido más abundante en las membranas de *M. pneumoniae* (Pollack, 1970). Se ha demostrado que las lipoproteínas, en particular HDL, pero también LDL, son sustitutos eficaces del suero en los medios de cultivo de *M. pneumoniae*, probablemente porque las lipoproteínas pueden proporcionar los lípidos esenciales, en particular el colesterol (Washburn, 1979). Un resultado importante de este trabajo fue el hallazgo del movimiento neto de colesterol radiactivo de HDL a P116. Cuando comparamos la tasa de colesterol libre o esterificado transferido de HDL a la proteína aislada, esta transferencia fue más rápida en la **forma vacía de P116** que en la forma llena y fue particularmente alta para el **colesterol libre**. Debido a que APOA1, la principal proteína HDL, no se detectó en ninguna condición en las fracciones de P116, podemos descartar que la acumulación de colesterol radiomarcado fuera el resultado de la contaminación por HDL. **No pudimos atrapar ningún complejo HDL-P116**, lo que sugiere que P116 forma solo **interacciones transitorias y rápidas** con HDL. En línea con esto, también se ha informado de un transporte pasivo de colesterol desde las membranas celulares hasta las HDL (Phillips, 2014). Esta vía de difusión no mediada implica la liberación de colesterol del donante, la difusión a través del medio acuático y la incorporación al aceptor (Phillips, 2014). El colesterol libre también puede transferirse de HDL a LDL mediante un mecanismo similar (Cedó, 2020). El flujo neto de colesterol es bidireccional y está gobernado por los grados de colesterol.

En los resultados puede comprobarse como **hasta 6 moléculas de colesterol libre pueden internalizarse en cada cavidad de P116 previamente vaciada**, aún dejando espacio para captar otras moléculas hidrofóbicas. De hecho, en los numerosos análisis de masas que se realizaron de muchas muestras de P116 llena, siempre se encontraban fosfatidilcolina y esfingomiélin. El colesterol no podía encontrarse en P116 recombinante producida en *E.coli*, ya que en esta especie no hay disponible colesterol. Estos análisis son cualitativos y apenas cuantitativos, por lo que no podemos deducir qué cantidades de compuestos son más abundantes dentro de la cavidad de P116, pero sí es cierto que la internalización de lípidos no debe ocurrir de forma azarosa. La P116 debe discriminar de alguna manera qué entra y qué no, ya que los patrones de análisis de masas se repetían exactos en muestras de la proteína tratadas de la misma manera. Las ceras se encontraban presentes siempre en P116 recombinante purificada desde células de *E.coli* en medio de cultivo LB, de donde debían captar estos compuestos; pero la P116 vaciada e incubada tanto con FBS como con HDLs nunca

presentaba en su interior estas ceras, lo que evidencia que debía captarlas mientras se expresaba en las células de *E.coli* en LB.

Además de los sustratos identificados, es muy probable que P116 también sea capaz de captar ácidos grasos, también esenciales para *M.pneumoniae*, dada su inespecificidad a la hora de atraer moléculas hidrofóbicas hacia su cavidad.

En cuanto a la cristalización de P116, es destacable su facilidad para la formación de cristales en diversas condiciones, además con bastante rapidez en la mayor parte los casos, pero siempre con una ordenación escasa. Su rapidez en el origen de estos cristales podría indicar que interacciona bastante rápido y de forma desordenada debido a que los cristales no difractan a alta resolución. Tras haber estudiado la proteína, se puede inferir que la **posible heterogeneidad en los contenidos de las cavidades puede dificultar un adecuado orden para cristalizar adecuadamente** y lograr obtener cristales que difractaran a alta resolución. La flexibilidad que se encontró en los dedos de la estructura también hacía muy heterogénea la muestra, ya que dependiendo de la cantidad de lípidos que había dentro de la cavidad los dedos estarían mas abiertos o cerrados. Es destacable que P116 vaciada se intentó cristalizar sin éxito, apenas formando solo algunos esferulitos, lo cual es probable que sea debido a que en estas muestras había aún mucha más heterogeneidad, ya que aproximadamente el 75% de las moléculas se encontraban en forma de monómero y el resto en dímeros, y habiendo probablemente muchos estados intermedios de cavidades medio llenas que dificultarían una correcta ordenación para formar cristales.

En cuanto a los **mutantes**, se ha obtenido información destacable a partir de ellos. Destaca el resultado de **W681A**, donde sustituyendo un solo aá se provoca que hasta el **75% de la P116 cambie de estado dimérico a monomérico**, dificultando en gran medida el enlace entre ambas cadenas a través de sendas hélices alfa. Cabe destacar que este mutante sí seguía presentando la cavidad llena de lípidos e inalterada. Este drástico cambio a partir de la sola mutación de un aminoácido sigue en consonancia con la rigidez de estructura y la poca variedad en su secuencia que admite P116. Este residuo clave forma parte de una alfa hélice que penetra hacia el otro monómero que forma parte del dímero, en una posición simétrica.

Con **3 mutantes de Phe** ubicados en 3 regiones diferentes de esta cavidad se intentó comprobar la imposibilidad de cambio conformacional de abierta/cerrada, forzando solo a una de estas conformaciones sin permitir un cambio. 2 de estos residuos (F490 y F711) están **altamente conservados** en las proteínas ortólogas de varias especies de Micoplasmas emparentados, lo cual indica la importancia específica de estos residuos. Sería interesante tratar de vaciar alguno de estos mutantes y ver si se comportan como el WT. El mutante **F490D**, con el que a priori parecía que se estaba desestabilizando la cavidad, solo resultó en que provocaba una **autólisis de unos 100 aá del C-ter** que con el tiempo iba en aumento provocando la escisión en más péptidos. Es difícil explicar este resultado a partir de una sustitución en un residuo en medio de la superficie interna de la cavidad, pero tal vez este cambio desajuste toda la rigurosa estructura hidrofóbica y termine colapsando y provocando cortes en varias regiones. Está de acuerdo con la importancia del

mantenimiento de la estructura en P116, donde la variabilidad en los diferentes dominios no parece que sea posible para sostener la estructura y función esencial. En algunos casos el C-terminal apareció fragmentado/escindido de la proteína entera WT también, lo cual cuadra con que en experimentos de Luis Serrano apareciera P116 en la fracción soluble de las bacterias aún siendo una proteína anclada a membrana. **Quizás la región C-ter, la cual no está contenida en el modelo resuelto por Crio-EM, sea altamente flexible y tenga cierta tendencia a ser cortada.** El mutante **F711D** parece que presentó una tendencia a **llenar más su cavidad** respecto al WT, quizás esta sustitución otorga mayor rigidez en la estructura que permanece más abierta y reduce la flexibilidad para cambiar de estado abierto a cerrado.

Una de las mayores particularidades de P116 es que posee la mayor **inmunogenicidad** de entre todo el proteoma de *M. pneumoniae*, siendo la proteína inmunodominante junto con la adhesina P1. Este hecho siempre ha situado a P116 como una proteína candidata al desarrollo de vacunas y un punto clave como señuelo para el sistema inmune para combatir a este diminuto patógeno. Curioso es el hecho de que P1 posea una gran región de aminoácidos variables para evadir y combatir al sistema inmune, mientras que P116 mantiene su secuencia primaria inalterable. Ésto puede indicar la importancia y precisión de su estructura exacta, con una gran cavidad hidrofóbica que puede exponerse más o menos, y rellenarse de lípidos como esteroides o fosfolípidos con parte hidrosoluble, permitiendo su solubilidad en disolventes acuosos. **La flexibilidad de la proteína** en el N-ter, dedos y en la hélice de dimerización es muy notoria en los cambios de conformación abierta y cerrada, y muestra que esta gran flexibilidad puede jugar un papel importante en la captación y almacenamiento del sustrato. Mediante el programa de IA **AlphaFold** hemos podido reproducir una estructura que concuerda en gran medida con la obtenida por experimentación, pero esta vez acercándose más a la **conformación cerrada** (el programa aún no puede tener en cuenta una cavidad rellena de lípidos).

P116 probablemente interactúe fuertemente con otras proteínas de su entorno que facilitan su función a la hora de distribuir los necesarios colesteroles por la membrana (MPN_212, MPN161). Además, tanto P116 como éstas otras están presentes en variantes ortólogas dentro del resto de especies pertenecientes al cluster de *Pneumoniae*, conservándose bastante su estructura. Es muy probable que in vivo la P116 interactúe estrechamente con MPN212 para realizar correctamente su función de captación y contención de lípidos, aunque no pudimos llegar a trabajar con estas posibles proteínas accesorias. P116 no cierra totalmente la cavidad, lo cual puede ser el motivo por el que cuesta tanto que libere todo su contenido. Quizás la unión a otras proteínas con las que forma complejo sea la causa de esta imposibilidad de cierre total. En un futuro el proyecto podría encaminarse a tratar de **purificar todo el operón de P116** (MPN212, MPN213 y MPN 214) para detectar la disposición real de este sistema.

La estrecha relación de los lípidos, en concreto el colesterol, con el género de bacterias *Mycoplasma*, se viene observando y estudiando desde hace décadas. Son **uno de los pocos géneros de procariontes que, al no tener pared celular, requieren de colesterol en sus membranas, el cual no pueden sintetizar endógenamente y deben captar del medio.** Diversos estudios evidencian la interacción de micoplasmas con áreas ricas en lípidos, incluso con cierta **quimiotaxis en placas de aterosclerosis** en

muchas especies de micoplasmas (Yang, 2021 & Nussinovitch, 2010). La interacción entre micoplasmas con lipoproteínas como las HDL y LDL parece clave, actuando ambas como donantes de colesterol para ciertas especies, aún siendo unas más eficientes que otras. En los medios de cultivo para micoplasmas es siempre necesario colocar alguna fuente rica en lípidos, como suele serlo el FBS. Con los resultados presentados en esta tesis se aproxima la vinculación largamente observada de ciertos micoplasmas con las fuentes de lípidos, focalizando la atención en la P116, de la cual se desconocía hasta ahora su función. Nunca se había estudiado con detalle la manera y el proceso por el cual los micoplasmas captan estos lípidos del exterior y los internalizan en sus membranas para su propio uso, o si los modifican previamente. P116 podría tener **implicaciones biotecnológicas por su capacidad de captar lípidos como el colesterol en grandes cantidades**. Podría estudiarse alguna posibilidad en la que P116 pudiera utilizarse como terapia contra la aterosclerosis.

Así, en este proyecto se ha demostrado la esencialidad de esta proteína, ligada con su función clave en la captación y contención de lípidos esenciales para el mantenimiento de la membrana de *M.pneumoniae*, así como su gran inmunogenicidad y la peculiaridad de su estructura con un nuevo plegamiento que alterna dos conformaciones altamente flexibles.

CONCLUSIONES

- 1.- La estructura de P116 consta de 2 dominios principales: un dominio central formado esencialmente por hélices alfa y un dominio N-ter de igual topología, pero menor tamaño.
- 2.- Las hélices alfa de la parte media y superior del dominio central poseen una gran flexibilidad, lo que las equipara con dedos que pueden abrir y cerrarse hacia la gran cavidad de superficie hidrofóbica presente.
- 3.- P116 se presenta en estado dimérico en solución y con un exceso de peso extra de unos 8kDa por subunidad.
- 4.- P116 es una proteína con una secuencia primaria altamente conservada dentro del clúster *Pneumoniae*.
- 5.- La localización de P116 se presenta con uniformidad a lo largo de toda la membrana plasmática de *M. pneumoniae*.
- 6.- P116 no está involucrada de forma relevante en los procesos de adhesión y movimiento de la célula.
- 7.- P116 es igual o más inmunogénica que P1. La región del C-ter es muy poco inmunogénica, probablemente por su proximidad a membrana y su poca exposición al exterior; mientras que el N-ter es muy inmunogénico (ya que al eliminarlo se reduce el 50% de la respuesta inmune)
- 8.- P116 sería el mejor candidato como antígeno para desarrollar una posible vacuna contra infecciones de *M.pneumoniae*, ya que posee la mayor inmunogenicidad y una secuencia sin variaciones.
- 9.- Los resultados obtenidos explican la esencialidad de P116 para el crecimiento de *M. pneumoniae*, indicando un papel clave de P116 en el metabolismo de compuestos hidrofóbicos que son esenciales para la supervivencia de las células de *M. pneumoniae*.
- 10.- P116 funciona como captador del exterior y contenedor de lípidos esenciales para *M. pneumoniae*. La P116 vacía es capaz de capturar al menos varios de los lípidos esenciales requeridos por *M. pneumoniae* tanto del medio FBS como de las HDL, tales como la PC, SM y el colesterol.
- 11.- Los complejos P116-lipoproteínas son de formación rápida y transitoria.
- 12.- El mecanismo de transporte de los lípidos debería involucrar los Trp de los extremos de P116 como puntos de anclaje, con analogía estructural y funcional de las CETP y PLTP, así como la situación del N-ter como punto de entrada de los lípidos a la molécula.
- 13.- La captación de colesterol, otro lípido esencial para el mantenimiento de la membrana de P116, fue demostrada mediante experimentos de radiactividad con colesterol marcado con tritio.

- 14.- Aunque tanto colesterol libre como esterificado es capaz de transferirse desde las lipoproteínas a P116, es el libre el que se transfiere en mayor cantidad.
- 15.- Aunque tanto la P116 vacía y reconstituida como P116 llena pueden captar colesterol, es la vaciada la que puede rellenarse más.
- 16.- P116 se presenta mayormente en estado monomérico tras vaciar la cavidad con tratamiento con detergente y posterior reconstitución.
- 17.- La conformación cerrada y vacía fue detectada por Crio-EM, evidenciando la existencia de las dos conformaciones de la P116 (abierta y cerrada) y la gran flexibilidad de la estructura para pasar de uno al otro estado.
- 18.- La forma monomérica de P116 es inestable termodinámicamente y agrega con facilidad con cambios de t^a y a concentraciones elevadas.
- 19.- El mutante W681A ubicado en la zona de unión de monómeros provoca una gran dificultad para que ocurra la dimerización, demostrando que este residuo es clave para el mantenimiento del dímero.
- 20.- El mutante F490D provoca una desestabilización en la estructura que lleva a la lisis continuada del C-ter de la proteína.

BIBLIOGRAFÍA

Afonine PV, Headd JJ, Terwilliger TC, Adams PD. **Computational Crystallography Newsletter** 2013. Volume 4, Part 2, 43-44.

Altundag K. **Association between nanobacteria and microcalcifications in breast.** J BUON. 2021 Jan-Feb;26(1):280-281.

Aparicio D, Scheffer MP, Marcos-Silva M, Vizarraga D, Sprankel L, Ratera M, Weber MS, Seybert A, Torres-Puig S, Gonzalez-Gonzalez L, Reitz J, Querol E, Piñol J, Pich OQ, Fita I, Frangakis AS. **Structure and mechanism of the Nap adhesion complex from the human pathogen *Mycoplasma genitalium*.** Nat Commun. 2020 Jun 8;11(1):2877.

Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. **Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections.** FEMS Microbiol Rev. 2008 Nov;32(6):956-73.

Baseman, J. B., R. M. Cole, D. C. Krause, and D. K. Leith. **Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*.** J. Bacteriol. 1982. 151:1514-1522

Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, Nettleship J, Assenberg R, Rahman N, Stuart DI, Owens RJ. **A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications.** Nucleic Acids Res. 2007 . 35(6):e45.

Bittman R, S. Clejan, and S. Rottem. **Transbilayer distribution of sterols in mycoplasma membranes: a review.** Yale Journal of Biology and Medicine. 1983 Sep-Dec; 56(5-6): 397–403

Blötz C, Singh N, Dumke R, Stülke J. **Characterization of an Immunoglobulin Binding Protein (IbpM) From *Mycoplasma pneumoniae*.** Front Microbiol. 2020 Apr 16;11:685.

Boratyn GM, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Busby B, Madden T.L. (2019) **Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads.** BMC Bioinformatics. 2019 Jul 25;20(1):405.

Breslow JL. **Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation.** Annu Rev Biochem. 1985; 54:699–727.

Buchan DWA, Jones DT. **The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on.** Nucleic Acids Res. 2019 Jul 2;47(W1):W402-W407.

Cao B, Zhao CJ, Yin YD, et al. **High prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China.** External icon. Clin Infect Dis. 2010; 51:189–94.

Cedó L, Metso J, Santos D, García-León A, Plana N, Sabate-Soler S, Rotllan N, Rivas-Urbina A, Méndez-Lara KA, Tondo M, Girona J, Julve J, Pallarès V, Benitez-Amaro A, Llorente-Cortes V, Pérez A, Gómez-

Coronado D, Ruotsalainen AK, Levonen AL, Sanchez-Quesada JL, Masana L, Kovanen PT, Jauhiainen M, Lee-Rueckert M, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. **LDL Receptor Regulates the Reverse Transport of Macrophage-Derived Unesterified Cholesterol via Concerted Action of the HDL-LDL Axis: Insight From Mouse Models.** *Circ Res.* 2020 Aug 28;127(6):778-792.

Charles MA, Kane JP. **New molecular insights into CETP structure and function: a review.** *J Lipid Res.* 2012;53(8):1451-1458. doi:10.1194/jlr.R027011

Chaudhry R, Varshney AK, Malhotra P. **Adhesion proteins of *Mycoplasma pneumoniae*.** *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:690-9.

Chayen NE. **Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998 Jan 1;54(Pt 1):8-15.

Chen C., Qi Y., Gao J., Pan Y., Li S., Li J., Chen H., Li S., Li Y., Wang M. **Designing, expression and immunological characterization of a chimeric protein of *Mycoplasma pneumonia*.** *Protein Pept. Lett.* 2016; 23:592–596.

Cheung, M. C., Vaisar, T., Han, X., Heinecke, J. W. & Albers, J. J. **Phospholipid transfer protein in human plasma associates with proteins linked to immunity and inflammation.** *Biochemistry* 49, 7314–7322 (2010).

Choubey A , Sagar D, Cawley P , Miller K. **Retrospective review analysis of COVID 19 patients co infected with *Mycoplasma pneumonia*.** Department of Respiratory Medicine, Doncaster Royal Infirmary, UK, 2 Department of Critical Care, Doncaster Royal Infirmary, Sheffield Teaching Hospitals, UK 2021.

Christodoulides A , Gupta N , Yacoubian V , Maithel N, Parker J, Kelesidis T. **The Role of Lipoproteins in Mycoplasma-Mediated Immunomodulation.** *Front Microbiol* 2018 Jul 31;9:1682.

Cilpa-Karhu G, Jauhiainen M, Riekkola ML. **Atomistic MD simulation reveals the mechanism by which CETP penetrates into HDL enabling lipid transfer from HDL to CETP.** *J Lipid Res.* 2015;56(1):98-108.

Civeira F, Mateo-Gallego, R, Burillo E, Cenarro A. **Elevation of high-density lipoprotein cholesterol: future perspective. Cholesteryl ester transfer protein as a therapeutic target.** *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis.* Vol 22, Supplement 1. 2010. 44-48.

Collaborative Computational Project, Number 4. **The CCP4 suite: programs for protein crystallography.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1994 Sep 1;50(Pt 5):760-3.

Dessau MA, Modis Y. **Protein crystallization for X-ray crystallography.** *J Vis Exp.* 2011 Jan 16;(47):2285.

Di Scala C, Baier CJ, Evans LS, Williamson PTF, Fantini J, Barrantes FJ. **Relevance of CARC and CRAC Cholesterol-Recognition Motifs in the Nicotinic Acetylcholine Receptor and Other Membrane-Bound Receptors.** *Current Topics in Membranes, Volume 80* 2017 Elsevier Inc. ISSN 1063-5823

- Drasbek M., P. K. Nielsen, K. Persson, S. Birkelund, G. Christiansen. **Immune response to *Mycoplasma pneumoniae* P1 and P116 in patients with atypical pneumonia analyzed by ELISA.** BMC Microbiol 5, 4-7(2004).
- Duffy M. F., I. D. Walker, G. F. Browning. **The immunoreactive 116 kDa surface protein of *Mycoplasma pneumoniae* is encoded in an operon.** Microbiology 143,3391-3402 (1997).
- Duffy M. F., K. G. Whithear, A. H. Noormohammadi, P. F. Markham, M. Catton, J. Leydon, and G. F. Browning. **Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G reactive with a recombinant protein expressed from the gene encoding the 116-kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae*.** J Clin Microbiol 37,1024-1029 (1999)
- Dumke R., Jacobs E. **Antibody response to *Mycoplasma pneumoniae*: Protection of host and influence on outbreaks?** Front. Microbiol. 2016; 7:39.
- Emsley P, Cowtan K. **Coot: model-building tools for molecular graphics.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126-32.
- Evans, P. **Scaling and assessment of data quality.** 2006 Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 62, 72–82.
- Feingold KR. **Introduction to Lipids and Lipoproteins.** 2021 Jan 19. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000–. PMID: 26247089.
- Feizi T, Taylor-Robinson D. **Cold agglutinin anti-I and *Mycoplasma pneumoniae*.** Immunology. 1967;13(4):405-409.bacteriol.183:1621-1630.
- Fontana A, Fassina G, Vita C, Dalzoppo D, Zamai M, Zambonin M. **Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin.** Biochemistry. 1986 Apr 22;25(8):1847-51.
- Ganter S, Miotello G, Manso-Silvan L, Armengaud J, Tardy F, Gaurivaud P, Thiaucourt F. **Proteases as Secreted Exoproteins in Mycoplasmas from Ruminant Lungs and Their Impact on Surface-Exposed Proteins.** Appl Environ Microbiol. 2019 Nov 14;85(23)
- Garnier M, Foissac X, Gaurivaud P, Laigret F, Renaudin J, Saillard C, Bove JM. **Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle.** 2001 Oct;324(10):923-8. doi: 10.1016/s0764-4469(01)01372-5.
- Gaspari E, Malachowski A, Garcia-Morales L, Burgos R, Serrano L, Martins Dos Santos VAP, Suarez-Diez M. **Model-driven design allows growth of *Mycoplasma pneumoniae* on serum-free media.** NPJ Syst Biol Appl. 2020 Oct 23;6(1):33.
- Gasteiger, E. et al. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.** In: Walker, J.M. (eds) The Proteomics Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press. (2005).

Gharaibeh S, Hailat A. ***Mycoplasma gallisepticum* experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons.** Avian Pathol. 2011 Aug;40(4):349-54.

Green MR, Sambrook J. **The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: High-Efficiency Transformation.** Cold Spring Harb Protoc. 2018 Mar 1;2018(3).

Gregory P, Henderson, Grant J, Jensen. **Three-dimensional structure of *Mycoplasma pneumoniae*'s attachment organelle and a model for its role in gliding motility.** 2006. Volume 60, Issue2 Molecular Microbiology. 376-385

Großhennig S, Schmidl SR, Schmeisky G, Busse J, Stülke J. **Implication of glycerol and phospholipid transporters in *Mycoplasma pneumoniae* growth and virulence.** Infect Immun. 2013;81(3):896-904.

Guasch, A., Montane, J., Moros, A., Pinyol, J., Sitja, M., Gonzalez-Gonzalez, L. & Fita, I. **Structure of P46, an immunodominant surface protein from *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with a monoclonal antibody.** Acta Cryst.2020. D76, 418-427.

Hakim MS, Annisa L, Jariah ROA, Vink C. **The mechanisms underlying antigenic variation and maintenance of genomic integrity in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.** Arch Microbiol. 2021 Mar;203(2):413-429.

Himmelreich R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B. C. Li, R. Herrmann: **Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*.** Nucleic Acids Resn24, 4420-4449 (1996)

Inamine, J. M., K. C. Ho, S. Loechel, and P. C. Hu. **Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*.** J. Bacteriol.1990. 172:504-506

Jancarik J, Scott WG, Milligan DL, Koshland DE Jr, Kim SH. **Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*.** J Mol Biol. 1991 Sep 5;221(1):31-4.

Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, Couloux A, Lee SW, Yoon SH, Cattolico L, Hur CG, Park HS, Ségurens B, Kim SC, Oh TK, Lenski RE, Studier FW, Daegelen P, Kim JF. **Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3).** J Mol Biol. 2009 Dec 11;394(4):644-52.

Jiang Z, Li S, Zhu C, Zhou R, Leung PHM. ***Mycoplasma pneumoniae* Infections: Pathogenesis and Vaccine Development.** Pathogens. 2021 Jan 25;10(2):119.

Johnson JK, Somerson NL. **Cholesterol as a limiting factor in the growth of *Mycoplasma pneumoniae*.** Appl Environ Microbiol. 1980 Aug;40(2):391-9.

Józsi M. **Factor H Family Proteins in Complement Evasion of Microorganisms.** Front Immunol. 2017 May 18; 8:571.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M,

Berghammer T, Bodenstern S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. **Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.** Nature. 2021 Aug;596(7873):583-589.

Jun He, Liu M, Ye Z, Tan T, Liu X, You X, Zeng Y, Wu Y. **Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* (Review).** Mol Med Rep. 2016 Nov;14(5):4030-4036.

Kabsch, W. **XDS.** 2010 Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66, 125–132.

Kannan TR, Baseman JB. **ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens.** Externalexternal icon. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:6724–9.

Kapatais-Zoumbos K, Chandler DK, Barile MF. **Survey of immunoglobulin A protease activity among selected species of *Ureaplasma* and *Mycoplasma*: specificity for host immunoglobulin A.** Infect Immun. 1985;47(3):704-709.

Köhler, G; Milstein, C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975.** J. Immunol. 2005. 174, 2453–2455

Kornspan JD, Tarshis M, Rottem S. **Adhesion and biofilm formation of *Mycoplasma pneumoniae* on an abiotic surface.** Arch Microbiol. 2011;193(11):833-836.

Koronelli TV, Kaliuzhnaia TV, Rozynov BV. **Lipids of saprophytic bacteria produced during growth on a complex organic substrate.** Mikrobiologija. 1979 Sep-Oct;48(5):932-4.

Koufos E, Hyung Chang E, Rasti ES, Krueger E, Brown AC. **Use of a Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus Peptide To Inhibit Binding of a Bacterial Toxin to Cholesterol.** Biochemistry. 2016 August 30; 55(34): 4787–4797

Krause, D. C., and D. Taylor-Robinson. **Mycoplasmas which infect humans,** 1992 p. 417-444. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.* American Society for Microbiology, Washington, D.C

Krause, D. C., and J. B. Baseman. **Inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption and adherence to respiratory epithelium by antibodies to a membrane protein.** 1983 Infect.Immun.39:1180-1186.

Krause, D. C., Chen, S., Shi, J., Jensen, A. J., Sheppard, E. S., & Jensen, G. J. **Electron cryotomography of *Mycoplasma pneumoniae* mutants correlates terminal organelle architectural features and function.** 2018 Molecular microbiology, 108(3), 306–318.

Krause, D. C., D. K. Leith, R. M. Wilson, and J. B. Baseman. **Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence.** 1982 Infect. Immun. 35:809-817.

Lei D, Rames M, Zhang X, Zhang L, Zhang S, Ren G. **Insights into the Tunnel Mechanism of Cholesteryl Ester Transfer Protein through All-atom Molecular Dynamics Simulations.** JBC Papers, May 3, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.715565

Levisohn S, Kleven SH. **Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*)**. Rev Sci Tech. 2000 Aug;19(2):425-42.

Liebschner D, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczi, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon, M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito, O. V. Sobolev, D. H. Stockwell, T. C. Terwilliger, A. G. Urzhumtsev, L. L. Videau, C. J. Williams, P. D. Adams. **Macromolecular structure determination using x-rays, neutrons and electrons: recent developments in phenix**. 2019 Acta Crystallogr D Struct Biol 75, 861–877.

Lluch-Senar M, Delgado J, Wei-Hua C, Lloréns-Rico V, O'Reilly FJ, Wodke J, Besray U, Yus E, Martínez S, Nichols R, Ferrar T, Vivancos A, Schmeisky A, Stülke J, van Noort V, Gavin AC, Bork P, Serrano L. **Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium**. Molecular Systems Biology (2015) 11:780

Maniloff, J.1992. **Phylogeny of mycoplasmas**, p. 549-559. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (ed.), **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Marston BJ, Plouffe JF, File Jr TM, et al. **Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio**. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch Intern Med. 1997;157:1709–18.

Mayer, F. **Cytoskeletons in prokaryotes**. 2003 Cell Biology International 27: 429–438

Miyata M and Ogaki H, 2006. **Cytoskeleton of Mollicutes**. J Mol Microbiol Biotechnol 11: 256–264.

Miyata M, and Jennifer D. Petersen. **Spike Structure at the Interface between Gliding *Mycoplasma mobile* Cells and Glass Surfaces Visualized by Rapid-Freeze-and-Fracture Electron Microscopy**. 2004. J. Bacteriology 186: 4382–4386.

Miyata M and Nakane D. **Cytoskeletal “jellyfish” structure of *Mycoplasma mobile***. PNAS 2007. 104: 19518–19523.

Morrison-Plummer J, Leith DK, Baseman JB. **Biological effects of anti-lipid and anti-protein monoclonal antibodies on *Mycoplasma pneumoniae***. Infect Immun. 1986; 53:398–403.

Murphy HC, Burns SP, White JJ, Bell JD, Iles RA. **Investigation of human low-density lipoprotein by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy: mobility of phosphatidylcholine and sphingomyelin headgroups characterizes the surface layer**. Biochemistry. 2000 Aug 15;39(32):9763-70.

Nakane D, Kenri T, Matsuo L, Miyata M. **Systematic Structural Analyses of Attachment Organelle in *Mycoplasma pneumoniae***. PLoS Pathog. 2015 Dec 3;11(12):e1005299.

Nussinovitch U. **The association between mycoplasma infections and atherosclerosis: myth or clinical reality?** Isr Med Assoc J. 2010 Jul;12(7):439-40.

- Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK. **A review of mycoplasma diagnostics in cattle.** Epub 2018 Apr 19.
- Pecora, R. **Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids.** Journal of Nanoparticle Research 2, 123–131 (2000).
- Phillips MC. **Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux.** J Biol Chem. 2014 Aug 29;289(35):24020-9.
- Pollack JD, Somerson NL, Senterfit LB. **Isolation, Characterization, and Immunogenicity of *Mycoplasma pneumoniae* Membranes.** Infect Immun. 1970 Sep;2(3):326-39.
- Porath A, Schlaeffer F, Lieberman D. **The epidemiology of community-acquired pneumonia among hospitalized adults.** Externalexternal icon. J Infect. 1997;34:41–8.
- Priscilla M Ueno, Timenetsky J, Centonze VE, Wewer JJ, Cagle M, Stein MA, Krishnan M, Baseman JB. **Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization.** 2008 Oct 154(Pt 10):3033-3041
- Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G, Pownall HJ. **Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein.** Biochemistry. 1997 Mar 25;36(12):3645-53
- Raposo HF, Forsythe P, Chausse B, Castelli JZ, Moraes-Vieira PM, Nunes VS, Oliveira HCF. **Novel role of cholesteryl ester transfer protein (CETP): attenuation of adiposity by enhancing lipolysis and brown adipose tissue activity.** Metabolism. 2021 Jan;114:154429.
- Razin S. **Mycoplasmas.** 1996 Medical Microbiology. 4th edition.
- Razin S, Hayflick L. **Highlights of mycoplasma research--an historical perspective.** Biologicals. 2010 Mar;38(2):183-90.
- Razin S, Kutner S, Efrati H, Rottem S. **Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes Volume 598, Issue 3, 6 June 1980, Pages 628-640
- Razin S, Kutner S, Efrati H, Rottem S. **Cholesterol and Phospholipid Uptake by Mycoplasmas.** Reviews of Infectious Diseases, Volume 4, Issue Supplement_1, May-June 1982, Pages S85–S92
- Razin S, Yogev D, Naot Y. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.** 1998 Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1094–1156. BIBLIOGRAFÍA 162 15.
- Reddy, S. P., W. G. Rasmussen, and J. B. Baseman. **Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.** 1996 FEMS Immunol. Med. Microbiol. 15:199-211
- Relich RF, Balish MF. **Insights into the function of *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 from orthologous gene replacement.** Microbiology (Reading). 2011 Oct;157(Pt 10):2862-2870.
- Rice L, Washburn, Somerson NL. **Lipoproteins as Substitutes for Serum in Mycoplasma Culture Medium.** JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 1979, p. 586-589.

- Roca B. **Infecciones por micoplasmas**. Rev Clin Esp. 2006; 206(5):239-42.
- Rottem, S. 2003. **Interacton of mycoplasmas with host cells**. Physiol. Rev.83:417-432.
- Scheffer MP, Gonzalez-Gonzalez L, Seybert A, Ratera M, Kunz M, Valpuesta JM, Fita I, Querol E, Piñol J, Martín-Benito J, Frangakis AS. **Structural characterization of the NAP; the major adhesion complex of the human pathogen *Mycoplasma genitalium***. Mol Microbiol. 2017 Sep;105(6):869-879.
- Schmidl SR, Gronau K, Pietack N, Hecker M, Becher D, Stülke J. **Phosphoproteome of the Minimal Bacterium *Mycoplasma pneumoniae***. Molecular & Cellular Proteomics 2010 Jun; 9(6): 1228–1242.
- Seto S, G. Layh-Schmitt, T. Kenri, and M. Miyata. **Visualization of the attachment organelle and cytdherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy**. J. Bacteriol. 2001 183:1621-1630
- Seto S, Kenri T, Tomiyama T, Miyata M. **Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions**. J Bacteriol. 2005
- Slutzky G.M, Razin S, and Kahane I. **Serum lipoproteins as cholesterol donors to *Mycoplasma membranes***. 1976 Biochemical and biophysical research communications Vol.68, No. 2,
- Svenstrup H. F., P. K. Nielsen, M. Drasbek, S.Birkelund, and G. Christiansen. **Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy**. J Med Microbiol 51,361-373 (2002)
- Tabassum, I., Chaudhry, R., Chourasia, B. K., & Malhotra, P. (2010). **Identification of an N-terminal 27 kDa fragment of *Mycoplasma pneumoniae* P116 protein as specific immunogen in *M. pneumoniae* infections**. BMC infectious diseases, 10, 350. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-350>
- Trigatti BL. SR. **B1 and PDZK1: partners in HDL regulation**. Curr Opin Lipidol. 2017;28:201–208.
- Vizarraga D ,Torres-Puig S, Aparicio D, Pich OQ. **The Sialoglycan Binding Adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumonia***. Trends Microbiol. 2021 Jun;29(6):477-481.
- Vizarraga D, Kawamoto A , Matsumoto U, Illanes R, Pérez-Luque R, Martín J, Mazzolini R, Bierge P, Pich OQ, Espasa M, Sanfeliu I, Esperalba J, Fernández-Huerta M, Scheffer MP, Pinyol J, Frangakis AS, Lluch-Senar M, Mori S, Shibayama K, Kenri T, Kato T, Namba K, Fita I, Miyata M, Aparicio D. **Immunodominant proteins P1 and P40/P90 from human pathogen *Mycoplasma pneumoniae***. Nat Commun. 2020 Oct 14;11(1):5188.
- Vizarraga D, Pérez-Luque R, Martín J, Fita I, Aparicio D. **Alternative conformation of the C-domain of the P140 protein from *Mycoplasma genitalium***. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 2020 Nov 1;76(Pt 11):508-516.
- Volokhov, D.V., Simonyan, V., Davidson, M.K and V.E. Chizhikov. **RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary**

molecular marker in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmataceae. 2012 Mol. Phylogenet. Evol. 62: 515–528.

Waites, K. B., D. M. Crabb, X. Bing, and L. B. Duffy. **In vitro susceptibilities to and bactericidal activities of garenoxacin (BMS-284756) and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas.** 2003 Antimicrob. Agents Chemother.47:161-165.

Waites K. B, Talkington D. F. ***Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogenexternal icon.** Clin Microbiol Rev. 2004;17:697–728.

Waites KB, Atkinson TP. **The role of mycoplasma in upper respiratory infections.** Externalexternal icon. Curr Infect Dis Rep. 2009; 11:198–206.

Weber K, Osborn M. **The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.** J Biol Chem. 1969 Aug 25;244(16):4406-12.

Werner S, Diekert G, Schuster S. **Revisiting the thermodynamic theory of optimal ATP stoichiometries by analysis of various ATP-producing metabolic pathways.** J Mol Evol. 2010 Dec;71(5-6):346-55.

Williams CR, Chen L, Driver AD, Arnold EA, Sheppard ES, Locklin J, Krause DC. **Sialylated Receptor Setting Influences *Mycoplasma pneumoniae* Attachment and Gliding Motility.** Mol Microbiol. 2018 Sep;109(6):735-744.

Winter, G. **Xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction.** 2010 J. Appl. Crystallogr. 43, 186–190.

Wyatt, P. J. **Light scattering and the absolute characterization of macromolecules.** Analytica Chimica Acta 1993, 272, 1–40.

Yanfei Yua,b, Jia Wanga,c, Rui Hana,d, Li Wanga, Lei Zhanga, Amy Yimin Zhange, Jiuqing Xinf, Shaoli Lig, Yanhua Zengh, Guoqing Shaoa,b, Zhixin Fenga, and Qiyan Xionga. ***Mycoplasma hyopneumoniae* evades complement activation by binding to factor H via elongation factor thermo unstable (EF-Tu)** VIRULENCE 2020, VOL. 11, NO. 1, 1059–1074

Yang J, Zhao H, Yuan H, Zhu F, Zhou W **Prevalence and association of mycoplasma infection in the development of coronary artery disease.** Braz J Biol. 2021 Sep 10;83:e246385

Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. **Detection of Mycoplasma in cell cultures.** Nat Protoc. 2010 May;5(5):929-34.

Zhou Y, Wang J, Chen W, Shen N, Tao Y, Zhao R, Luo L, Li B, Cao Q. **Impact of viral coinfection and macrolide-resistant mycoplasma infection in children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia.** BMC Infect Dis. 2020 Aug 26;20(1):633.

Zhu B, Cai G, Hall EO, Freeman GJ. **In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations.** Biotechniques. 2007 Sep;43(3):354-9.

Zimm, Bruno H. (1948). **The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions.** The Journal of Chemical Physics, 16 (12). 1093-1099

ANEXO 1. Regiones citoplasmáticas de adhesinas de *Mycoplasma genitalium*

Una vez determinada la estructura extracelular del Nap de *M. genitalium* (Aparicio, 2020) (Figura 1), se intentó identificar la estructura de las regiones citoplasmáticas de las dos adhesinas que lo componen, la P110 y la P140.

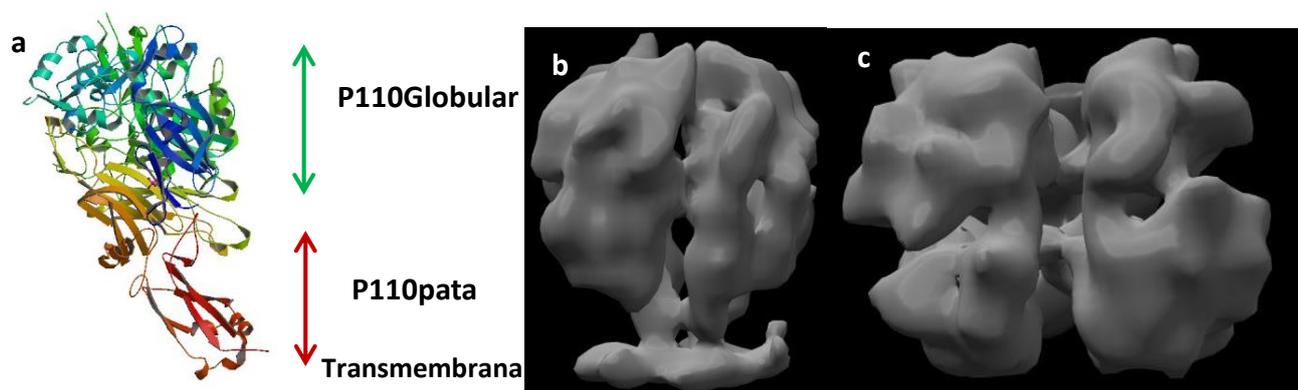


Figura 1. a) Estructura del dominio extracelular de la adhesina P110 de *M. genitalium* obtenida a partir de difracción de rayos X de cristales de la proteína a 2.7Å. Se observan dos dominios principales: el globular y la pata, éste último contactando con la región transmembrana. b) Imagen del Nap obtenida a partir de microscopía electrónica con la ayuda combinada de la estructura por difracción de rayos X. En posición lateral se observa el heterodímero de P110 y P140, con la región transmembrana en la parte basal. c) Imagen del Nap a partir de microscopía electrónica en perspectiva cenital, donde se observa el tetrámero formado por dos heterodímeros de P110 y P140.

La **homología de secuencia entre las partes citoplasmáticas** de P110 y P140 (así como sus ortólogos P40/P90 y P1 en *M. pneumoniae*) es clave. Su secuencia primaria está muy conservada entre diferentes especies emparentadas, mucho más que las partes globulares de estas adhesinas, que son las que interactúan con los receptores de las células hospedadoras. Probablemente sean el punto de anclaje en la formación del Nap (el complejo de adhesinas formado por P110 y P140 en la membrana), junto con la parte transmembrana. No se pueden expresar el Nap completo excepto los últimos 30 aminoácidos del c-terminal (parte citoplásmica). Ésto indica que esta región debe ser muy importante, **ayudando a la formación del Nap, la tetramerización y anclaje a la célula, así como la exportación a la membrana.** Por este motivo se eligió determinar la estructura de esta zona.

Se probó la expresión de la parte citoplasmática de las adhesinas, tanto de *M. genitalium* como de *M. pneumoniae*, con diferentes constructos cubriendo alguna parte de la zona transmembrana, pero en ningún caso se obtuvo proteína. Estos constructos probablemente eran tóxicos y las células de *E. coli* eliminaban estas proteínas o su imposibilidad de plegamiento conllevaba a la lisis.

Luego diseñé nuevos constructos que incluían exclusivamente la zona citoplasmática de P110 (87aá, 9.4kDa) y P140 (66aá, 7.2kDa) en los plásmidos pOPINF y pOPINE. Después de la clonación, hice pruebas de expresión de estos constructos y **no obtuve sobreexpresión de ninguno, ni siquiera incubando juntas ambas proteínas para comprobar si aumentaba su estabilidad**. Cabe señalar que ambos constructos citoplasmáticos no tienen aminoácidos aromáticos, por lo que no absorben a 280nm, lo que dificulta mucho el seguimiento del rastro de estas proteínas.

Entonces comencé a trabajar con un nuevo **constructo con la proteína de fusión MBP** en el plásmido pOPINM. Los constructos de MBP se expresaban bastante bien, y después de la purificación obtenía grandes cantidades de adhesina citoplasmática + MBP, pero después de la digestión para descartar la MBP, me quedaba una cantidad muy pequeña de las citoplasmáticas. Parece que la P110citoplásmica (P110c) se expresaba mejor y en mayor cantidad que la P140c, pero al cortar la MBP sufría degradación antes que la P140c (Figura 2). La digestión conjunta de ambas proteínas no parecía significativamente mejor que por separado, **gran parte de las partes citoplásmicas quedaban aún unidas a la MBP**. además los cromatogramas no muestran que ambas formaran complejos (ni cuando aún están unidas a la MBP ni después de la digestión). Se comprobó también que las citoplasmáticas, al ser escindidas de la MBP, forman **agregados masivos que precipitaban**.

También realicé una coexpresión de ambos fragmentos citoplasmáticos, P110 y P140, en el plásmido pOPINF. Realizando una doble transformación para incluir ambos plásmidos dentro de cada célula de *E.coli* y verificando que ambos se introducen realmente (colonias doblemente positivas). En las pruebas de expresión no se observaba ninguna de las proteínas, pero tras la purificación y electroforesis en gel, visualizaba bandas de ambos constructos citoplasmáticos, aunque en muy pequeña cantidad, mostrando un rendimiento muy bajo (Figura 2).

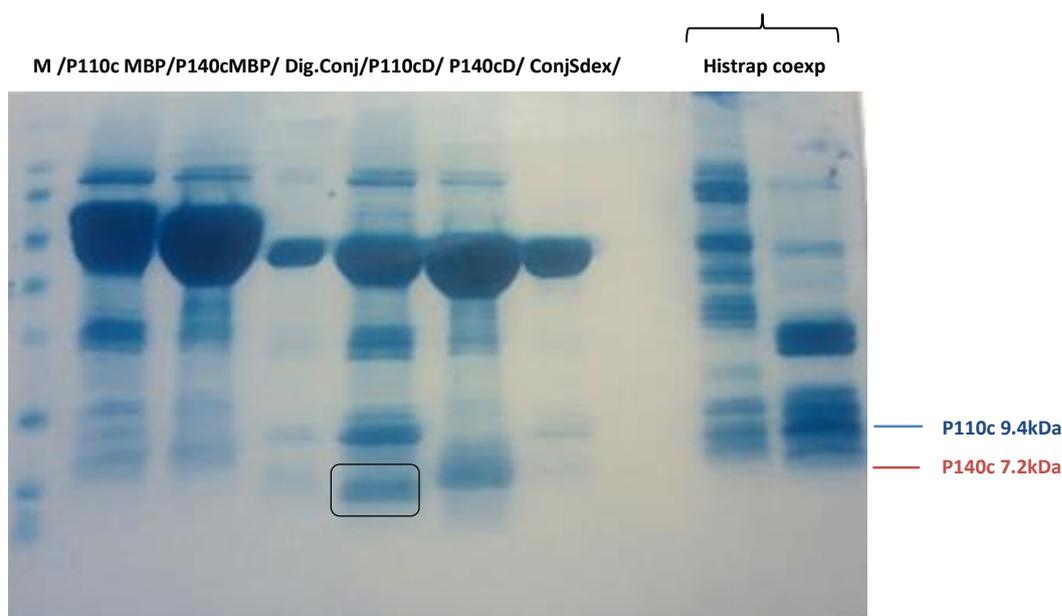


Figura 2. Gel del 15%PA donde se muestra la buena expresión de los constructos citoplasmáticos de las adhesinas en MBP, y la gran pérdida de cantidad tras la digestión que escinde la proteína de fusión, así como degradación de P110c remarcada en rectángulo negro. M:Marcador; Dig.Conj: Digestión conjunta de ambas adhesinas de la MBP; P110cD: Digestión de P110c de la MBP; P140cD: Digestión de P140c de la MBP; ConjSdex: pico superdex de digestión conjunta.

En geles de SDS-PAGE de P110c sola aparecían siempre 2 bandas, que con el tiempo iba aumentando la banda inferior y disminuyendo la superior proporcionalmente, evidenciando que la proteína se va escindiendo con el tiempo (Figura 2).

También intenté expresar con la **proteína de fusión SUMO**, obteniendo resultados ligeramente mejores de expresión que con MBP para ambas proteínas, pero teniendo problemas para mantener estable una concentración de al menos 1mg/ml tras digerir y eliminar el fragmento de la Sumo de las regiones citoplásmicas. En este caso era la P140c la que tras la digestión se degradaba rápidamente.

Se intentó poner **placas de cristalización de P110c y de P140c**, tanto con las proteínas de fusión MBP como con SUMO, así como aisladas. Solo se obtuvo cierto **precipitado cristalino o algún esferolito que no difracta con P140c**, por lo que la vía de cristalización quedó agotada rápidamente, sobre todo porque ambas se expresaban en muy baja cantidad y era todo un logro mantener P110c o P140c a 1mg/mL estables durante más de 3 días, además de que aumentando la concentración ambas agregaban y precipitaban con gran facilidad.

Para tratar de separar completamente la mayor parte posible de P110c y P140c de las proteínas de fusión, utilicé buffer con HCl-Gua tras pasar una columna Histrap, consiguiendo, en efecto, separar una mayor porción de P110c y P140c sin proteína de fusión. Tras reconstituirlas en un buffer sin agentes desnaturizantes, se realizó un **DLS de muestras que habían sufrido desnaturalización y otras que no** para comprobar si había alguna diferencia, comprobando que ambas muestras se mantenían iguales y el HCl-Gua no provocaba cambios en las adhesinas citoplasmáticas (Figura 3).

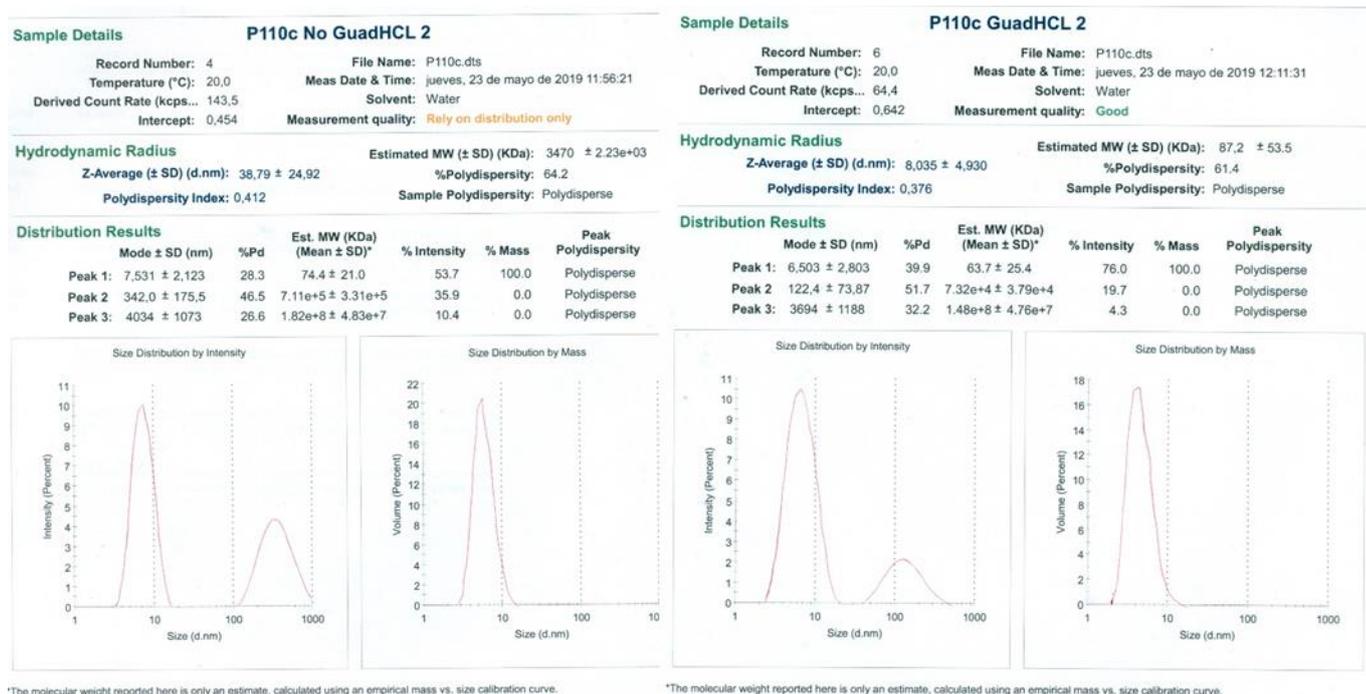


Figura 3. DLS de P110c tras sufrir desnaturalización con HCl-Gua y muestra control, presentando un patrón prácticamente idéntico en tamaño, radio y polidispersión. Parece que la P110c que estuvo en contacto con HCl-Gua se replegó a su conformación inicial, que, tras la digestión de proteína de fusión, se debe encontrar bastante extendida.

Se pudieron realizar varios análisis por **SEC-MALS** de ambas adhesinas citoplásmicas (Figura 4) donde se obtuvieron resultados similares para ambas. P110c aparecía como una proteína de unos 10kDa, que eluía por la columna **muy desplegada y en estado monomérico** a 1mg/ml, con un coeficiente de extinción de $0.224 \text{ g}^{-1}\text{l}^{-1}$ (2.10 en molar), que se correspondía con el teórico. Con P140c se obtuvo el mismo resultado, de una proteína que eluía muy desplegada, de unos 8kDa y con un coeficiente de extinción similar al teórico (Figura 4, 5 y 6).

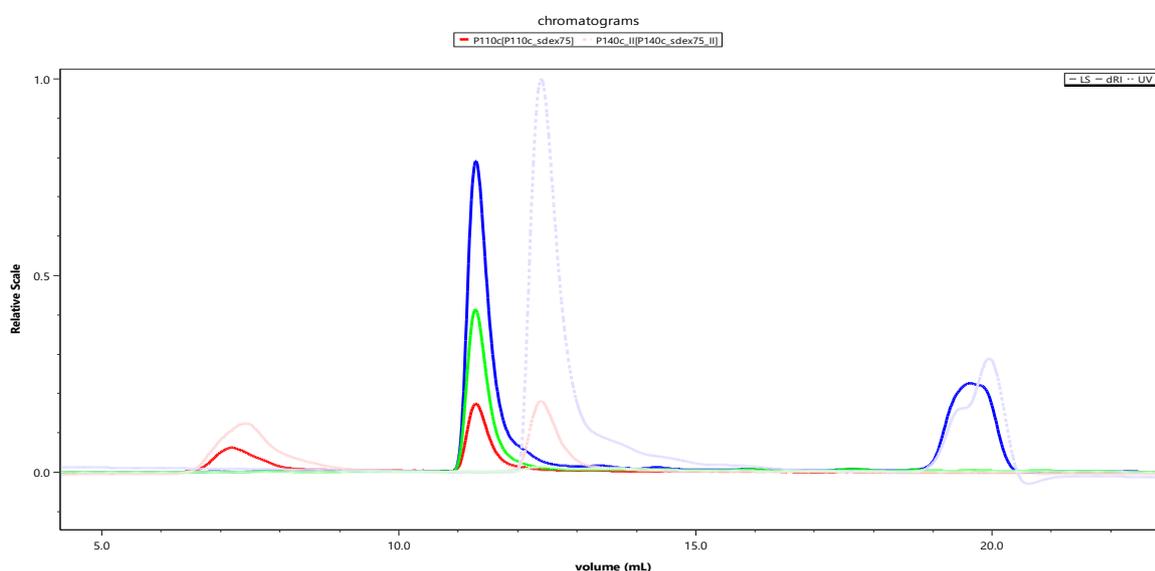


Figura 4. Comparación de Sec-MALS de P110c (cromatograma de colores intensos) y P140c (cromatograma de colores apagados). Se observa la señal equivalente en los 3 detectores del equipo: LS, dRI y UV. P110c da señales bastante buenas en los tres detectores, con un solo pico principal con un poco de cola (menos que el correspondiente de P140c analizado anteriormente en la misma columna). A partir de la señal UV y dRI podemos obtener un valor para el coeficiente de extinción a 280 nm, que es $0,224 \text{ g}^{-1}\text{l}^{-1}$ (2,10 en molar).

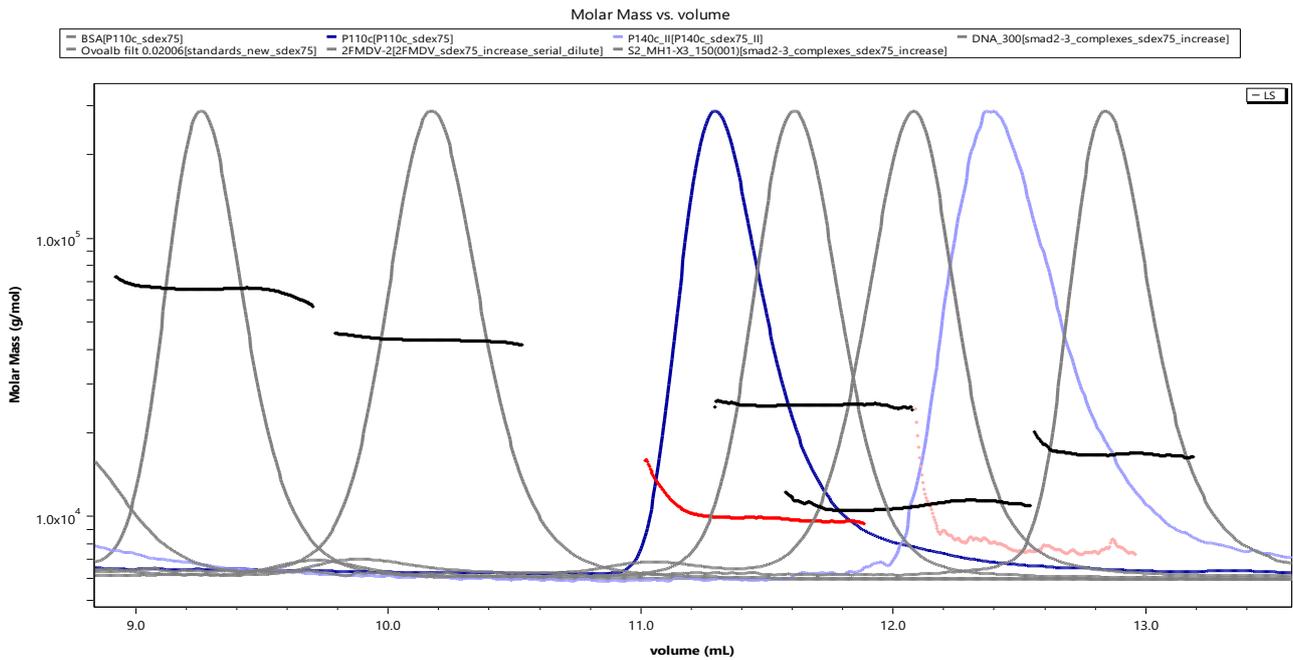
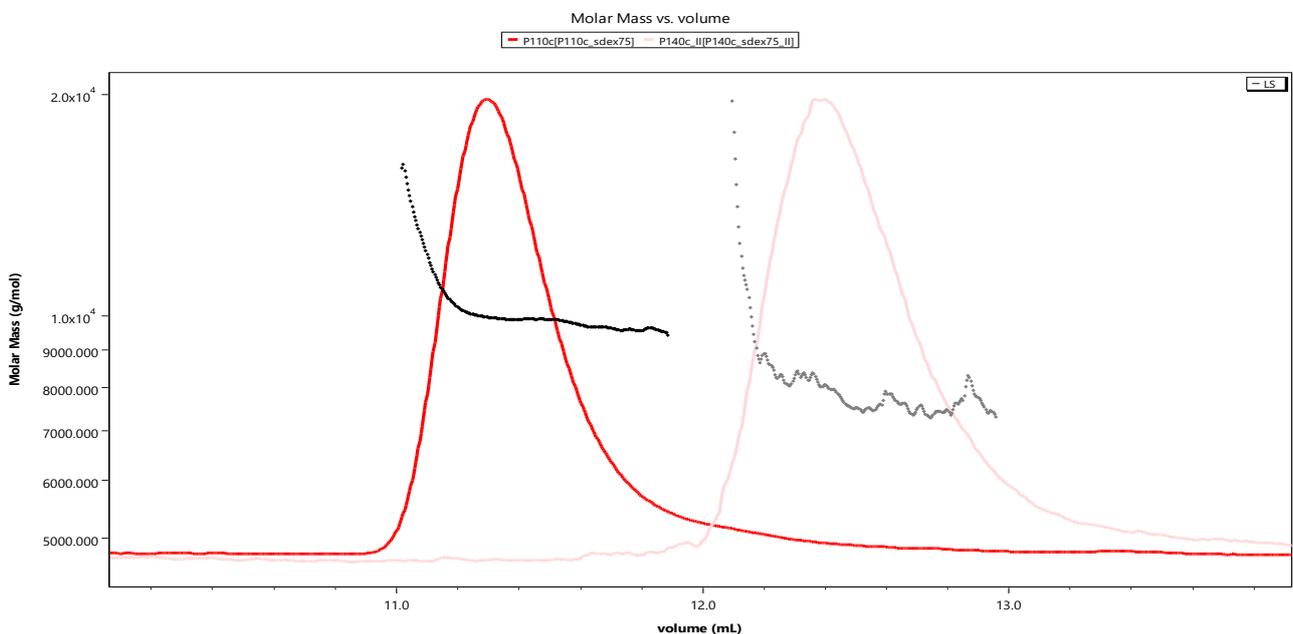


Figura 5. Cromatograma de Sec-MALS de P110c (azul intenso) y P140c (azul débil) comparado con cromatogramas de otras proteínas patrón (gris). Cuando se compara P110c con otras muestras analizadas en la misma columna, vemos que la P110c, proteína de 10 kDa, eluye antes que otras proteínas más grandes (16 y 25 kDa) e incluso antes que una muestra de masa molar similar de ácido nucleico (AANN), que son generalmente flexibles. Ésto indica que la proteína tiene que estar en una conformación en gran medida extendida. P140c también aparece en una conformación extendida, y eluyó bastante más tarde en la columna.



Peak 1				
	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Polydispersity (Mw/Mn)	Calculated mass (µg)
P110c	10.04 ± 0.13	10.08 ± 0.13	1.00 ± 0.02	108.88
P140c	7.96 ± 0.11	8.06 ± 0.12	1.01 ± 0.02	157.70

Figura 6. Comparación de cromatogramas de Sec-MALS de P110c (rojo intenso) y P140c (rojo débil). La estimación de la masa molar de 10 kDa indica que P110c es un monómero, y la traza de Mw parece bastante constante excepto por la primera parte, que tiende a 11-12 kDa. Posiblemente debido a que hay una mezcla de P110c con y sin residuos del tag remanente de la proteína de fusión (que pueden haber sido degradados). En P140c se muestra un aumento del gradiente de masas molares dentro del pico.

Tratando de estudiar más a fondo la posible estructura de la región citoplasmática de estas adhesinas, se pudo realizar una **resonancia magnética nuclear (RMN) de una muestra de P140c**. El resultado indicó que **no tiene prácticamente estructura secundaria, apareciendo muy desordenada** (Figura 7). Ésto concuerda con los resultados del SEC-MALS, donde se observaba un fragmento muy lineal y desenrollado, más alargado incluso que un fragmento de DNA de igual tamaño. No se pudo conseguir RMN de P110c sola ni de ambas juntas, ya que la estabilidad de estos pequeños constructos es muy baja y agregan con gran facilidad, así como tampoco son capaces de interactuar formando complejo tras incubarse solas o con proteínas de fusión.

Se intentó testear interacciones de P110c y P140c con P32, proteína con la que probablemente in vivo interactúen dentro del citoplasma en la zona del Botón terminal de la OT de *M. genitalium*. No se formó complejo tras las incubaciones, probablemente por la carencia de estructura secundaria de los dominios citoplasmáticos de estas adhesinas, que impide que puedan comportarse de forma natural y estable.

Método Resonancia magnética nuclear espectroscópica

Los datos de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance III de 600 MHz equipado con un cabezal de sonda criogénica y un gradiente de campo de pulso z. El tampón de adquisición fue 40 mM TRIS, NaCl 150 mM, D2O al 10%, pH 6.6 a 298K. El experimento 1D 1 H se adquirió usando el tren de pulsos Watergate W5 para supresión de agua, con adquisición directa de 4096 puntos y 16 transitorios. El experimento 1 H- 15 N BEST-TROSY se adquirió con 1024x256 puntos y 8 transitorios. Los experimentos se procesaron utilizando TOPSPIN v3.5 (Bruker BioSpin).

Yao J, Dyson HJ, Wright PE. **Chemical shift dispersion and secondary structure prediction in unfolded and partly folded proteins.** FEBS Lett 419, 285-289 (1997).

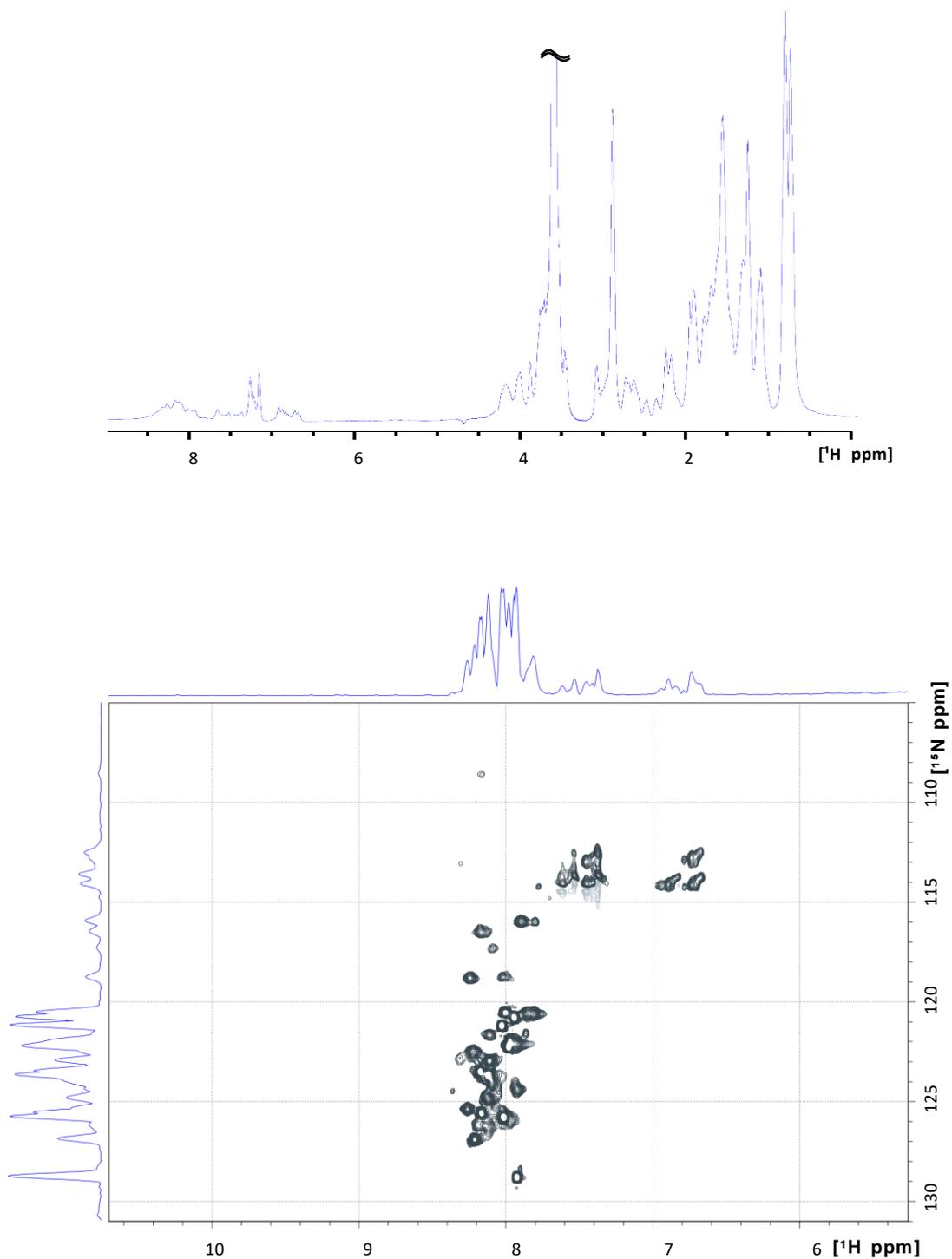


Figura 7. Experimentos 1D y 2D ^1H - ^{15}N TROSY RMN de la proteína P140c de *M. genitalium*. Mediante esta RMN se determinó que la proteína estaba desordenada (Intrinsically disordered protein). Se muestran dos espectros donde se ve que la proteína parece una IDR/IDP. La pobre dispersión de las señales de amida (de 7,6 a 8,4 ppm) indica que la proteína no adopta una estructura terciaria bien definida, lo cual es típico de una región intrínsecamente desordenada. La proteína no forma estructura secundaria, tal y como pensábamos.

ANEXO 2. Microscopía de rayos X sobre células de *Mycoplasma genitalium*

El objetivo era **observar células de *Mycoplasma genitalium* WT y varios tipos de mutantes**, así como **sus diferentes interacciones con las células endometriales** (células hospedadoras naturales). Partimos de la ventaja de la microscopía de rayos x para visualizar células vitrificadas in vivo, sin dañar tanto la muestra como con la microscopía electrónica, que quema con la dispersión de electrones (e⁻). Aunque la resolución de los rayos X por el momento es menor que en la microscopía electrónica, queríamos ver el proceso de infección y penetración en la célula huésped por parte de *Mycoplasma genitalium*.

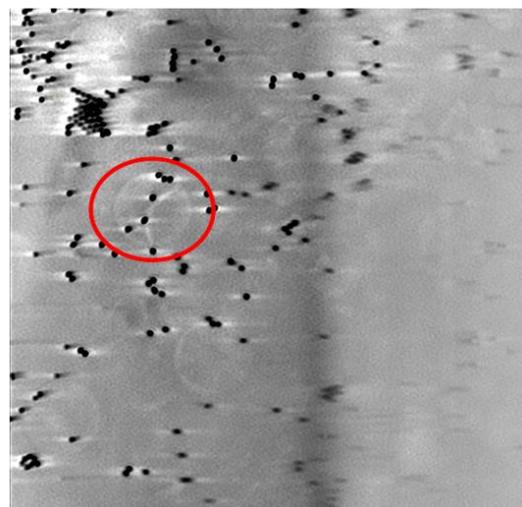
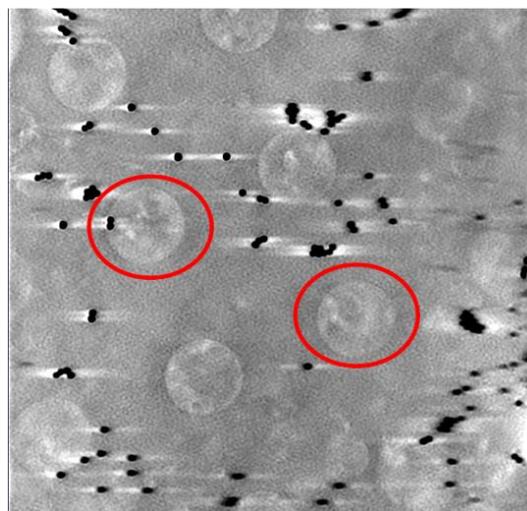
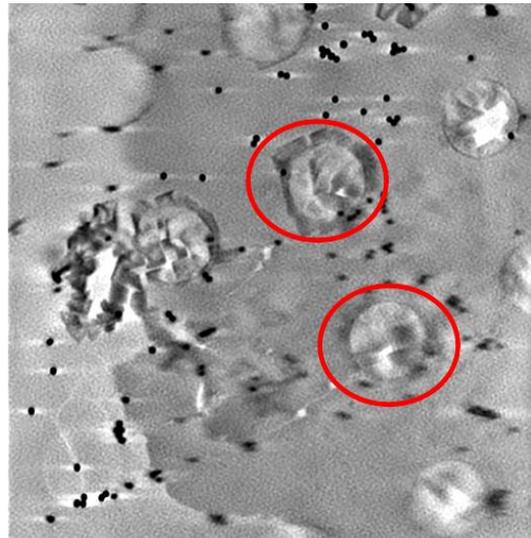
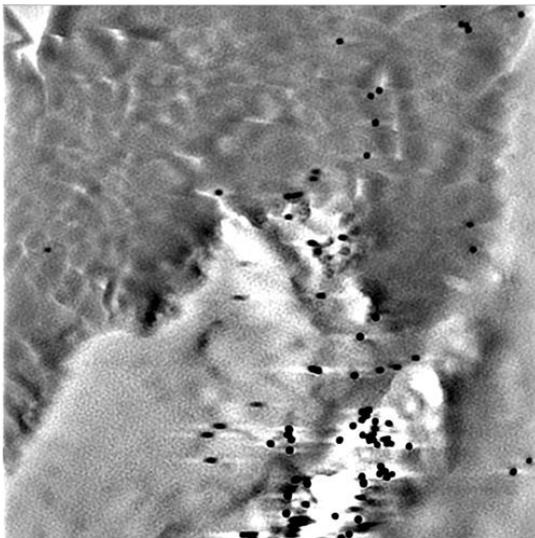
Esta técnica tiene la capacidad de formar imágenes de la más alta resolución espacial de muestras biológicas gruesas e hidratadas sin la preparación de muestras, que consume mucho tiempo, requerida por los microscopios electrónicos. Además, los microscopios de rayos X blandos brindan gran información espectroscópica y entregan imágenes de alto contraste, ya que las muestras biológicas tienen sus bordes de absorción primarios en la ventana de agua, entre el borde de absorción de carbono (284eV) y oxígeno (543eV) (Morrison, 2007).

La primera vez que realizamos esta técnica tuvimos varios problemas, como la mala fijación del micoplasma al sustrato (solucionado añadiendo polilisina), o la extrema afinidad de las partículas de oro (gold fiducials) por los micoplasmas, dificultando su observación (solucionado añadiendo BSA a las partículas). Además, los micoplasmas son muy sensibles a la radiación, lo que dificulta la realización de tomografías de alta calidad, que requieren de más tiempo donde la muestra puede dañarse. Inicialmente también tuvimos demasiada confluencia de células endometriales en las rejillas, lo que dificulta la observación clara, o el uso de un tampón salino no osmótico para las células, que provocaron su lisis y la presencia de células fantasma (solo restos de membrana plasmática). Con la resolución de este microscopio no se determina la ultraestructura de la OT, pero gracias a la autofluorescencia (y la fluorescencia que proporciona la proteína Cherry que contenía esta cepa de *M. genitalium*) y al uso de células humanas (éstas infectadas no podrían ser utilizadas como muestras para microscopía electrónica convencional), se debería poder determinar bien la forma, situación, posición y lugar de la OT en la célula.

Observamos que en la muestra con células endometriales sin infección por micoplasma no hay fluorescencia, por lo que la fluorescencia detectada por el microscopio en el citoplasma de las células endometriales de las muestras infectadas debe proceder de la OT y la proteína Cherry repartida por todo el micoplasma. Además, las morfologías de micoplasma no se veían en la muestra sin infección. Sobre todo, se observaban bien los agregados de micoplasma, ya que muchas de las células individuales de micoplasma apenas son visibles sobre el fondo. Por eso posteriormente se utilizaron células de *M. genitalium* con Se-Met en el medio de cultivo para que la incorporaran durante el crecimiento, con el fin de obtener unas células con mayor contraste sobre el fondo para poder visualizarlas mejor. Se seleccionaron las áreas de las rejillas que, mediante microscopía de

fluorescencia, se observaba intensa emisión de azul (correspondiente a presencia de células endometriales) y de rojo (presencia de micoplasmas) a la vez, indicando la presencia inequívoca de micoplasmas infectando a estas células hospedadoras.

Tras superar estos inconvenientes, fuimos capaces de recolectar una serie de tomografías a lo largo de varias sesiones donde se observaban claramente **grupos de células de *M. genitalium* infectando alrededor de la membrana plasmática de las células endometriales, así como en el interior del citoplasma**, aunque nunca presenciamos células de *M. genitalium* en el interior del núcleo de las células hospedadoras (Figuras 1 y 2).



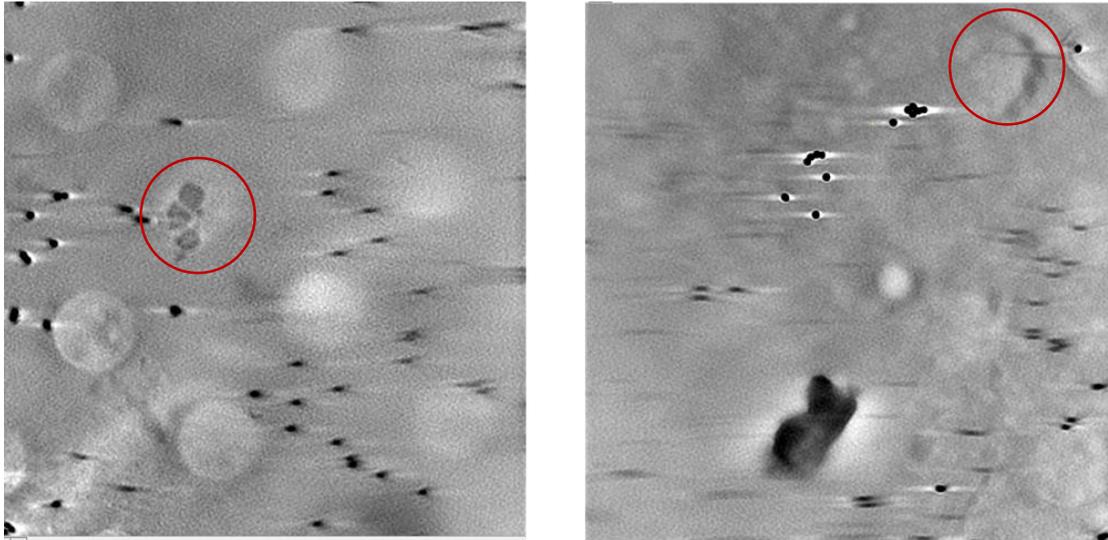


Figura 1. Tomografías de microscopía de rayos X donde se observa la presencia de células de *M. genitalium* alrededor de la membrana de células endometriales o en el interior de su citoplasma. En la primera imagen a la izquierda, se observa uno de los agregados masivos de micoplasmas que eran frecuentes en las primeras rejillas donde no habíamos calculado correctamente el número de células con el que infectar ni los tratamientos adecuados para la correcta visualización. Señalados con círculos rojos se destacan pequeños grupos de células de *M. genitalium* fácilmente identificables por su característica morfología tipo matraz. Las partículas de oro (gold fiducials) se observan como puntos negros muy densos y tienen un diámetro de unos 130nm, aproximadamente una cuarta parte de la longitud que alcanzan de media las células de *M. genitalium* (0.5 μ m).

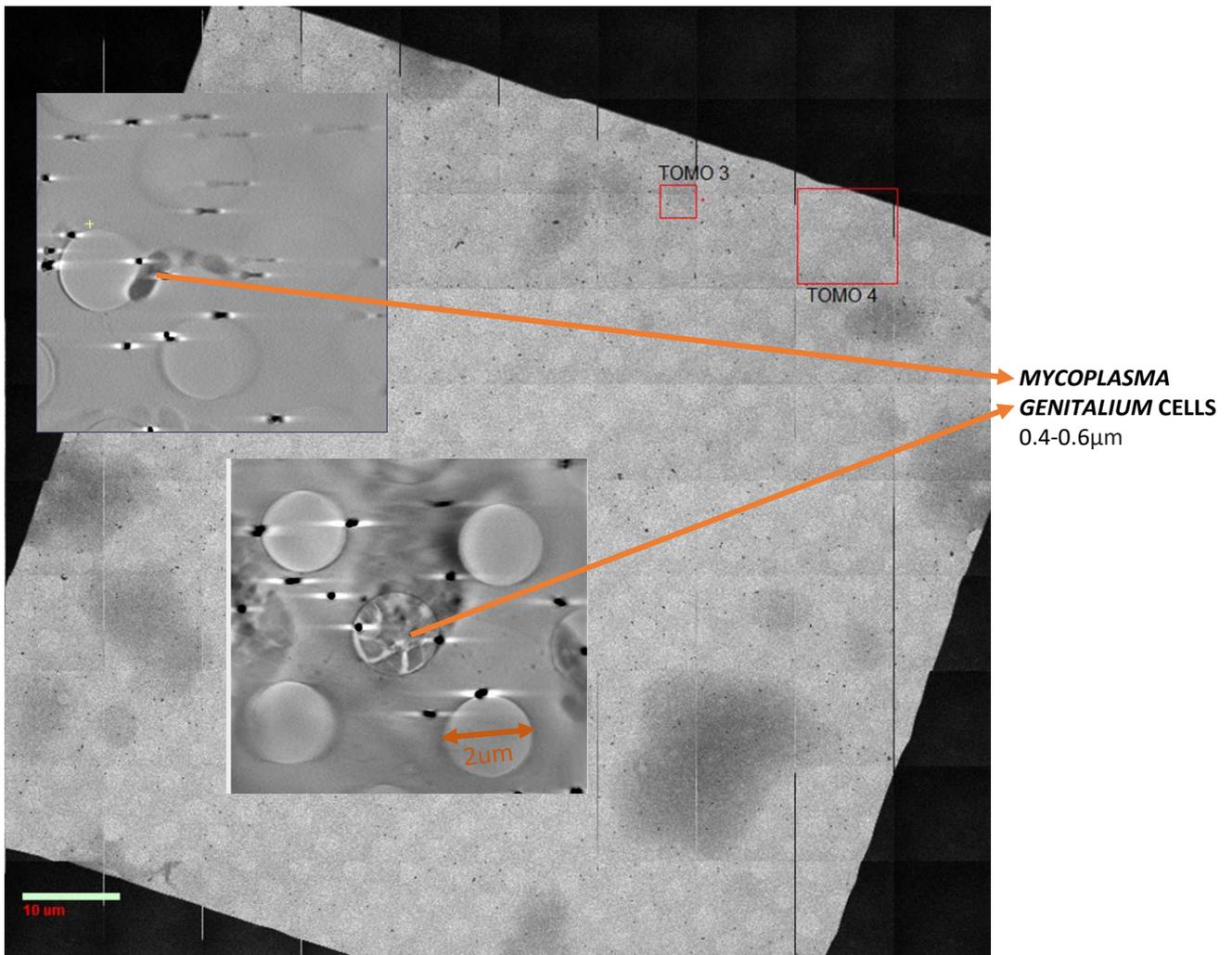


Figura 2. Detalle de 2 tomografías sobre un área de rejilla. Cada tomografía aproximadamente se tomaba con dimensiones de cuadrados de 10µm de lado, para poder visualizar con el máximo detalle las células de *M. genitalium*. Se indica con flechas la presencia de micoplasmas, así como el diámetro de los agujeros del quantifoil (2µm) de las rejillas de carbono usadas, sobre los que los micoplasmas solían adherirse.

Morrison G.R. **X-Ray Microscopy**. 2007. World Scientific Pub Co Inc.

