

Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas

Pedro García y Ernesto García

Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones,
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), c/Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid



Miembros del grupo de investigación (de izquierda a derecha): Pedro García, Miriam Moscoso, Eloísa Cano, Mirian Domenech, Lidia Araújo, Ernesto García, Susana Ruiz, Leire Aguinagalde, Roberto Díez, Alma Sotillo, Héctor de Paz, Elisa Ramos, Mar Reinés.

El origen de nuestro grupo se remonta a 1975 cuando Rubén López y Concepción Ronda regresaron al viejo Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid después de una estancia en el laboratorio de Alexander Tomasz de la Rockefeller University (Nueva York). Desde entonces y durante casi 40 años, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) ha constituido el *leitmotiv* de nuestro quehacer. Neumococo es un patógeno humano muy importante y causa frecuente de meningitis, sepsis, neumonía, otitis media, etc., en niños menores de 5 años y adultos de edad avanzada. Se calcula que, globalmente, esta bacteria es responsable directa de la muerte de entre 700 000 y un millón de niños al año. Además de la ya clásica vacuna 23-valente, en 2001 y 2010, respectivamente, se licenciaron en nuestro país vacunas compuestas por 7 y 13 polisacáridos capsulares conjugados a una proteína portadora. La vacuna 13-valente se recomienda para niños y jóvenes a partir de 6–8 semanas de vida y hasta los 17 años, además de estar indicada para

adultos mayores de 50. A pesar de estas medidas preventivas, la realidad es que se ha producido un reemplazamiento de los tipos capsulares (se han descrito, al menos, 94 serotipos) y no está demostrado que la vacunación de la población infantil sea coste-efectiva.

A lo largo de casi 40 años, el interés científico del grupo se ha centrado en diferentes aspectos de la biología de neumococo entre los que se pueden mencionar: 1) enzimas líticas de pared o peptidoglicán hidrolasas (PgH), 2) fagos, 3) bases moleculares de la biosíntesis capsular, 4) formación de biofilmes y 4) desarrollo de nuevas terapias. Como veremos a continuación, las estrechas relaciones genéticas existentes entre las PgH del huésped y sus fagos han conducido a una *co-evolución* de los apartados 1 y 2.

Según Maclin McCarty, neumococo posee «tendencias suicidas». Con esta afirmación, McCarty (uno de los tres descubridores de que el DNA constituye la base de la herencia genética) quería significar que *S. pneumoniae* posee una

enzima autolítica sumamente potente (una *N*-acetilmuramyl-L-alanina amidasa; NAM-amidasa) que produce la lisis y muerte celular poco después de que el cultivo entre en la fase estacionaria. En 1985 fuimos capaces de clonar, secuenciar y expresar, en *Escherichia coli*, el gen *lytA* que codifica la principal autolisina neumocócica lo que, en aquel momento, supuso la primera clonación y expresión funcional de una autolisina bacteriana. El aislamiento y caracterización molecular de diversos mutantes y la clonación de este gen en neumococo usando un mutante deleciónado en *lytA* permitieron la definición precisa de algunas de las funciones de la NAM-amidasa LytA. Además, la obtención de estos mutantes permitió la identificación de otras PgH de neumococo entre las que cabe mencionar Pce (una fosforilcolinesterasa), LytC (una lisozima autolítica a la temperatura del tracto respiratorio superior) y la glucosaminidasa LytB responsable de la separación de las células hijas al final de la división. El desarrollo de un método de purificación de estas proteínas en un solo paso cromatográfico ha facilitado la obtención de numerosos datos fisicoquímicos, así como el estudio de la relación estructura-función de varias proteínas de unión a colina o *choline-binding proteins* (CBPs) que se han conseguido cristalizar. Estos trabajos se realizan en colaboración con los grupos de Margarita Menéndez y Juan Hermoso del Instituto Rocasolano (CSIC). Asimismo, hay que resaltar la colaboración con el grupo de José Manuel Pingarrón, de la Universidad Complutense y de Jesús Mingorance del Hospital La Paz de Madrid, que ha dado como resultado el desarrollo de un genosensor basado en la amplificación por PCR de una región específica del gen *lytA* que permite la identificación precisa de neumococo de manera rápida y con mucha sensibilidad.

El aislamiento y caracterización de diversos fagos que infectan a neumococo ha constituido uno de nuestros mayores intereses. Además de estudios sobre los mecanismos de replicación de diversos fagos, incluyendo los fagos Cp's que contienen una proteína unida covalentemente a su genoma, a lo largo de los años hemos estudiado las enzimas líticas (endolisinas) responsables de la liberación de la progenie al final del ciclo lítico del fago. En 1988, caracterizamos molecularmente la lisozima Cpl-1, la primera enzima lítica codificada por un fago de neumococo. De la comparación de las secuencias de LytA y Cpl-1, propusimos que las enzimas líticas de neumococo y sus fagos son proteínas modulares construidas según un patrón en que la mitad de la proteína (normalmente la N-terminal) es la responsable de la actividad catalítica mientras que la C-terminal reconoce al sustrato insoluble, la pared celular. Con el tiempo, se han clonado, secuenciado y expresado un buen número de endolisinas codificadas tanto por fagos líticos como atemperados de neumococo y especies próximas.

El esquema que ha resultado de todos estos estudios es que, a excepción de la lisozima Cpl-7 codificada por un fago de la familia Cp, todas las demás PgH de neumococo y sus fagos son enzimas modulares que pertenecen a la familia de las CBPs. Cpl-7 es un caso especial ya que es capaz de degradar las paredes celulares independientemente de

que contengan o no colina (la colina es un aminoalcohol característico de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de neumococo). En los últimos años y en colaboración con Jose Yuste del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII, se ha demostrado que las PgH de neumococo están implicadas de manera directa en la virulencia de este patógeno desempeñando un papel muy importante en la evasión de los mecanismos de defensa del huésped y siendo fundamentales tanto para la colonización de la nasofaringe como para el desarrollo de la enfermedad neumocócica invasiva.

A pesar de su importancia histórica en los estudios de transformación genética, la secuencia y organización de los genes capsulares no empezó a ser desvelada hasta 1993. Aunque hoy se conoce la estructura del *cluster* responsable de la biosíntesis de los 94 tipos capsulares, fueron datos obtenidos en nuestro laboratorio los que permitieron demostrar que existen dos tipos de organizaciones génicas: los serotipos 3 y 37 se sintetizan mediante una sola glicosiltransferasa (sintasa) mientras que el resto de los polisacáridos requieren una proteína tipo Wzy que actúa catalizando la polimerización de las unidades repetidas que forman parte del polisacárido. Además, demostramos que el gen *galU*, que codifica una UDP-glucosa pirofosforilasa, es esencial para la biosíntesis capsular.

Solo muy recientemente se ha puesto en evidencia la capacidad de neumococo para formar biofilmes y nuestro laboratorio ha contribuido a ello. Además de demostrar que algunas CBPs y otras proteínas son importantes en este proceso, hemos aportado pruebas directas de la existencia de DNA extracelular y, al menos, un polisacárido, entre las sustancias poliméricas extracelulares del biofilm neumocócico. Por otro lado, hemos demostrado el poder de algunas PgH para deshacer los biofilmes de *S. pneumoniae in vitro*.

Las PgH, tanto las de origen fágico como la propia NAM-amidasa LytA, han demostrado ser enzimas promotoras que poseen actividad antibiótica (enzimbióticos) en modelos murinos de infección neumocócica y, dado que son eficaces en aislados clínicos de *S. pneumoniae* multirresistentes, poseen un futuro prometedor por sí solas o en terapias combinadas con antibióticos tradicionales. Actualmente se está investigando el potencial terapéutico antineumocócico tanto de fármacos de uso clínico con otras aplicaciones como nuevos compuestos inhibidores de las PgH y, en un sentido más amplio, de las CBPs.

BIBLIOGRAFÍA

- Bustamante N, Rico-Lastres P, García E, García P, Menéndez M. (2012) Thermal stability of Cpl-7 endolysin from the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-7; cell wall-targeting of its CW_7 motifs. *PLoS One* 7: e46654.
- Campuzano S, Esteban-Fernández de Ávila B, Pedrero M, et al. (2011) Electrochemical magneto-immuno-PCR approach for direct and highly sensitive detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Chemical Sensors* 1: 8.
- Campuzano S, Esteban-Fernández de Ávila B, Yuste J, et al. (2010) Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Biosens Bioelectron* 26: 1225-1230.

Campuzano S, Pedrero M, García JL, García E, García P, Pingarrón JM. (2011) Development of amperometric magnetosensors coupled to asymmetric PCR for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Bioanal Chem* 399: 2413-2420.

Domenech M, García E, Moscoso M. (2011) In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4144-4148.

Domenech M, García E, Moscoso M. (2012) Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Biotechnol* 5: 455-465.

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

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

Ramos-Sevillano E, Rodríguez-Sosa C, Cafini F, et al. (2012) Cefditoren and ceftriaxone enhance complement-mediated immunity in the presence of specific antibodies against antibiotic-resistant pneumococcal strains. *PLoS One* 7: e44135.

Ramos-Sevillano E, Rodríguez-Sosa C, Díez-Martínez R, et al. (2012) Macrolides and β -lactams antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5534-5540.

Biotecnología Microbiana e Industrial

Los enzibióticos como herramienta terapéutica

Tomás González Villa

Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la USC



Integrantes del grupo de investigación (de izquierda a derecha): Trinidad de Miguel Bouzas, Mauricio Roberto Carreño López, Tomás González Villa, José Luis Rodríguez Rama, Lucia Feijoo Siota, Ana Gonzalez Abril, Fernando María Punín y Nistal.

Nuestro grupo de investigación posee una amplia experiencia en la clonación y explotación de genes de potencial industrial. Comenzando su actividad como grupo en el año 1983, encuadrado dentro del grupo de Biotecnología perteneciente al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la USC.

La actividad del grupo se centra fundamentalmente en moléculas con alto potencial biotecnológico en los ámbitos farmacéuticos, de ingeniería de procesos y tecnología de alimentos. Siendo una de nuestras líneas de investigación la expresión de proteínas con actividad enzibiótica.