

Bases moleculares de la acción de antimicrobianos en estreptococos

Adela González de la Campa



Unidad de Genética Bacteriana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Crtra Majadahonda-Pozuelo Km 2, 28220 Madrid



De izquierda a derecha. Detrás: María José Ferrándiz, Mónica Amblar, Adela González de la Campa, María Teresa García. Delante: Miriam García López, Patricia Rabanal. En foto adicional, Antonio Alexandre de Vasconcelos.

El grupo está formado por un Investigador Científico del CSIC (Adela González de la Campa), dos Científicas Titulares del ISCIII (María José Ferrándiz y Mónica Amblar), una profesora titular de la UCM (María Teresa García), dos estudiantes de doctorado (Miriam García López, Antonio Alexandre de Vasconcelos) y una estudiante de TFG (Patricia Rabanal).

Los objetivos del grupo son conocer las bases moleculares de la acción de antimicrobianos así como caracterizar nuevos compuestos y nuevas dianas terapéuticas. El grupo estudia estos aspectos en bacterias patógenas Gram-positivas, especialmente *Streptococcus pneumoniae* (SPN), mediante una combinación de estudios básicos y otros más aplicados (epidemiología molecular, emergencia *in vivo* de resistencia). Hemos estudiado tanto antimicrobianos utilizados para el diagnóstico (optoquina) como otros

utilizados en el tratamiento de infecciones (principalmente las fluoroquinolonas levofloxacina y moxifloxacina). También nuevos compuestos, como la seconeolitsina, dirigidos a una nueva diana, la DNA topoisomerasa I (Topol).

Hemos estudiado la organización topológica del cromosoma de SPN. El cromosoma presenta una compactación (de hasta 1000-veces) óptima para armonizar su replicación, segregación cromosómica y expresión génica. Dicha compactación está mediada tanto por el nivel de superenrollamiento del DNA (SC) como por la asociación de proteínas de unión al nucleóide (NAPs). El nivel de SC en SPN depende principalmente de las actividades enzimáticas de sus DNA topoisomerasas: topoisomerasas que disminuyen es SC (Topol y TopoIV), y girasa que aumenta el SC negativo. Las fluoroquinolonas

(FQs) inhiben la girasa y la Topo IV formado un complejo ternario enzima-DNA-FQ que produce roturas de cadena doble en el DNA. La resistencia a FQs se origina principalmente por la alteración de sus dianas moleculares, bien por mutación puntual o por transferencia horizontal intraespecífica o interespecífica con estreptococos comensales. La expulsión de FQs fuera de la célula juega también un papel en la resistencia en SPN. Hemos demostrado que alteraciones en una estructura de tipo tallo-lazo localizada en posición 3' de *patAB*, que codifica un transportador de tipo ABC, confieren expresión aumentada de dichos genes e incremento de la resistencia a FQs.

El genoma de SPN es relativamente pequeño (~2 Mb), rico en AT (60%), y codifica muy pocas NAPs. Nosotros hemos caracterizado la proteína HU, la única NAP descrita en SPN, que contribuye a la compactación cromosó-

mica. El cromosoma se organiza en varios niveles de compactación según el tamaño de las unidades que los constituyen: macrodominios (rango de megabase) y dominios de SC (rango de Kb, bucles aislados). La disponibilidad de fármacos que inhiben cada una de las topoisomerasas de SPN, nos ha permitido analizar el transcriptoma de SPN en condiciones de cambio local o global del nivel de SC.

Los cambios locales en SC inducidos por las FQs inducen alteraciones en el transcriptoma que afectan al 5.2% (levofloxacina) y 6.5% (moxifloxacina) del genoma. Ambas FQs, regulando la transcripción de genes de rutas metabólicas diferentes, producen un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que contribuyen a su letalidad, de acuerdo con el modelo general de acción de antibióticos bactericidas. Estas ROS son fundamentales en el efecto post-antibiótico de las FQs.

La inducción de cambios globales en SC por novobiocina (inhibidor de la subunidad GyrB de la girasa), o por seconeolitsina (inhibidor de TopoI), nos ha permitido definir dominios de SC. En estos dominios, todos los genes tienen transcripción coordinada y funciones similares, independientemente de su dirección de transcripción. La disminución del SC mediada por novobiocina afecta al 37% del genoma. La mayoría de estos genes (>68%) se agrupan en 15 dominios de SC. El incremento del SC mediado por seconeolitsina afecta al 10% del genoma, con 25% de los genes agrupados en 12 dominios. Los dominios definidos en estas situaciones opuestas solapan en su mayoría, lo que indica que el cromosoma está organizado en dominios de SC con localización fija.

Según su respuesta a disminución de SC, el cromosoma de SPN está organizado en 5 tipos de dominios: activados (UP), inhibidos (DOWN), no regulados con posición conservada (pcNR), no regulados con posición variable (pvNR), y ricos en AT (ATr). El contenido en AT en el genoma se correlaciona con los dominios, siendo más alto en los dominios UP que en los DOWN. Los dominios ATr contienen los genes menos transcritos y podrían tener una función estructural. Los genes de los diferentes dominios muestran características funcionales específicas, lo que sugiere que han estado sometidos a una presión selectiva de carácter topológico que ha llevado a definir la localización de genes implicados en metabolismo, virulencia y competencia.

Los cambios globales del SC incluyen la regulación de los genes de sus topoisomerasas: su disminución activa la transcripción de los genes de la girasa (*gyrA*, *gyrB*) e inhibe los de la de TopoIV (*parEC*) y la TopoI (*topA*); el aumento del SC regula la expresión de *topA*. La transcripción de *gyrB* y *topA* está regulada por su localización estratégica en el cromosoma en dominios: *topA* en un dominio DOWN y *gyrB* en un dominio UP. Sin embargo, la transcripción de *parEC* (TopoIV) y de *gyrA* depende de señales específicas en sus regiones promotoras. La región promotora de *gyrA* presenta una curvatura intrínseca que actúa como un activador *per se* y es un sensor del nivel de SC, que regula su transcripción. Además, Topo I se une a la curvatura del promotor de *gyrA*. Por tanto, Topo I, cuya transcripción está regulada por niveles de SC, parece ser el elemento clave en la regulación de la expresión de *gyrA*.

PUBLICACIONES RECIENTES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO

- Ferrándiz MJ, de la Campa AG. (2014).** The fluoroquinolone levofloxacin triggers the transcriptional activation of iron transport genes that contributes to cell death in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:247-257.
- Domenech A, Tirado-Vélez JM, Fenoll A, Ardanuy C, Yuste J, Liñares J, de la Campa AG. (2014).** Fluoroquinolone-resistant pneumococci: dynamics of serotypes and clones in Spain in 2012 compared with those from 2002 and 2006. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:2393-2399.
- Ferrándiz MJ, Aranz C, Martín-Galiano AJ, Rodríguez C, de la Campa AG. (2014).** Role of global and local topology in the regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE.* 9: e101574.
- Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, Aranz C, Zimmerman T, de la Campa AG. (2016).** Reactive oxygen species contribute to the bactericidal effects of the fluoroquinolone moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:409-417.
- Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, Aranz C, Camacho-Soguero I, Tirado-Vélez JM, de la Campa AG. (2016).** An increase in negative supercoiling in bacteria reveals topology-reacting gene clusters and a homeostatic response mediated by the DNA topoisomerase I gene. *Nucl Acids Res.* 44:7292-7303 (2016).
- Brito L, Wilton J, Ferrándiz MJ, Gómez-Sanz A, de la Campa AG, Amblar M. (2017).** Absence of tmRNA has a protective effect against fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol.* 7:2164.
- Martín-Galiano AJ, Ferrándiz MJ, de la Campa AG. (2017).** Bridging chromosomal architecture and pathophysiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Genome Biol Evol.* 9:350-361.
- Alvarado M, Martín-Galiano AJ, Ferrándiz MJ, Zaballos A, de la Campa AG. (2017).** Upregulation of the PatAB transporter confers fluoroquinolone resistance to *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Front Microbiol.* 8:2074.
- Ferrándiz MJ, Carreño D, Ayora S, de la Campa AG. (2018).** HU of *Streptococcus pneumoniae* is essential for the preservation of DNA supercoiling. *Front Microbiol.* 9:493.
- García MT, Valenzuela MV, Ferrándiz MJ, de la Campa AG. (2019).** Reactive oxygen species production is a major factor directing the post-antibiotic effect of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 63:e00737-19.