

# Bases moleculares de la acción de antimicrobianos en estreptococos

**María José Ferrándiz y 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. CIBER de Enfermedades Respiratorias



De izquierda a derecha: Cristina Aranz, Luz Balsalobre, María Isabel Cercenado, Adela G. de la Campa, A. Javier Martín-Galiano, María José Ferrándiz.

Nuestro grupo estudia desde hace más de 20 años los mecanismos de resistencia a antibióticos en estreptococos, principalmente en *Streptococcus pneumoniae*, mediante una combinación de estudios moleculares básicos y otros más aplicados (epidemiología, emergencia *in vivo* de resistencia durante el tratamiento antibiótico). Estos estudios han incluido tanto antimicrobianos que se utilizan para el diagnóstico (optoquina) como otros utilizados en el tratamiento de infecciones (principalmente fluoroquinolonas, Fqs). Los objetivos del grupo son conocer las bases moleculares de la acción de antimicrobianos así como buscar nuevos compuestos y nuevas dianas de acción. El grupo está formado actualmente por un Investigador Científico del CSIC (Adela González de la Campa), una Investigadora Titular de OPI (María José Ferrándiz), dos Investigadores Posdoctorales (Luz Balsalobre y Antonio Javier Martín-Galiano) y dos Técnicos de Laboratorio (Cristina Aranz y María Isabel Cercenado). A continuación se exponen las líneas de investigación del laboratorio.

## SUSCEPTIBILIDAD DE *S. PNEUMONIAE* A OPTOQUINA Y DROGAS ANTIMALÁRICAS

Nuestros primeros trabajos permitieron determinar las bases moleculares de la característica susceptibilidad de

*S. pneumoniae* a optoquina, habitualmente la única prueba utilizada en clínica para diferenciar el neumococo de los estreptococos *viridans* (SV). La diana de la optoquina resultó ser la ATPasa de membrana  $F_0F_1$  (subunidades a, b, g, d, e) es el complejo citoplásmico, que dispone del sitio catalítico para la hidrólisis de ATP y  $F_0$  (a, c, b) es transmembranal y forma el canal de protones. Caracterizamos las mutaciones de resistencia, tanto a optoquina como a otras drogas antimaláricas (quinina, mefloquina, etc.) en las  $\alpha$ -hélices transmembranales de las subunidades c y a. Puesto que la quinina y la quinidina son drogas utilizadas para el tratamiento parenteral de malaria causada por *P. falciparum* resistente a cloroquina y el mecanismo de acción de estos compuestos es todavía desconocido, propusimos a neumococo como un sistema modelo para el ensayo de dichos compuestos. Por otra parte, demostramos que la ATPasa  $F_0F_1$  es esencial para la viabilidad celular y constituye por tanto un blanco idóneo para el desarrollo de nuevos antibacterianos. Esta enzima, presente en mitocondrias y cloroplastos, es la enzima fundamental para la síntesis de ATP. Sin embargo, en *S. pneumoniae*, que carece de cadena respiratoria, la enzima genera un gradiente transmembranal de protones por medio de la energía liberada por la hidrólisis del ATP y actúa regulando el pH intracelular. Determi-

namos que la cantidad de ATPasa  $F_0F_1$  se regula a nivel de la iniciación de la transcripción del operón dependiendo del pH intracelular. También estudiamos la respuesta de tolerancia a ácido y la expresión génica global de esta respuesta utilizando microarrays. La respuesta a ácido es fundamental para la adaptación de la *S. pneumoniae* a los diferentes hábitats en que se encuentra (tracto respiratorio, líquido cefalorraquídeo, sangre) y por tanto para su capacidad patogénica.

## SUSCEPTIBILIDAD DE *S. PNEUMONIAE* A FLUOROQUINOLONAS Y CUMARINAS

La resistencia a antibióticos, tanto en neumococo como en otras bacterias Gram-positivas, ha llevado al desarrollo de nuevas fluoroquinolonas (Fqs), que actualmente están indicadas para el tratamiento de infecciones respiratorias en adultos. Aunque la prevalencia actual de cepas resistentes a Fqs es todavía baja (<5%), la emergencia de estas cepas puede llegar a ser un problema clínico importante. Sin embargo, la resistencia a Fqs entre los estreptococos viridans (SV), bacterias comensales que comparten nicho ecológico con neumococo en la nasofaringe y causan endocarditis y bacteriemia en pacientes inmuno-comprometidos, es superior a la de neumococo (13%-20%). Nosotros hemos detectado la existencia de cepas de neumococo recombinantes que han adquirido mutaciones de resistencia a Fqs por transferencia horizontal desde los SV, lo que permite deducir que los SV están actuando como un reservorio de resistencia. Nuestro trabajo ha revelado que las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a Fqs se han seleccionado de entre las pertenecientes a los clones epidémicos multiresistentes y que, entre ellas, se encuentran cepas recombinantes. La diseminación de la resistencia a Fqs a través de estos clones, incluyendo las cepas recombinantes, puede provocar un aumento rápido de la resistencia si se incrementa el consumo de Fqs.

La resistencia a Fqs ocurre principalmente por alteración de los blancos celulares: DNA topoisomerasa IV (topo IV: ParC<sub>2</sub>ParE<sub>2</sub>) y DNA girasa (girasa: GyrA<sub>2</sub>GyrB<sub>2</sub>). Estas enzimas esenciales controlan la topología del DNA. Nuestro grupo ha caracterizado los genes que codifican la girasa y la topo IV de *S. pneumoniae*. Hemos localizado las mutaciones responsables de resistencia a Fqs en los dominios N-terminales de *parC* y *gyrA* y en el C-terminal de ParE (el dominio de interacción ParC-ParE). Experimentos de transformación genética nos permitieron demostrar que, en *S. pneumoniae*, la topo IV es el blanco primario para la mayoría de las Fqs, siendo la girasa un blanco secundario. La cuantificación de la inhibición de las actividades enzimáticas de superenrollamiento (girasa) y de decatenación (topo IV) en presencia de Fqs nos permitió demostrar también a nivel bioquímico que la topo IV es blanco primario para las Fqs. Además, hemos estudiado la eficacia biológica de las cepas con topoisomerasas recombinantes. Hemos demostrado que, aunque determinadas mutaciones producen un coste biológico, este coste se compensa en las cepas recombinantes por restauración del nivel global de superenrollamiento debido a la presencia de topoisomerasas subóptimas. Por otra parte, la caracterización genética de

la girasa nos permitió la detección de una mutación en el extremo N-terminal de GyrB de *S. pneumoniae* que fue la primera caracterización de mutación responsable de resistencia a cumarinas en una bacteria Gram-positiva. Aunque las cumarinas tienen propiedades farmacológicas desfavorables, son un grupo de antibacterianos no relacionado químicamente con las Fqs que presentan elevada actividad frente a las bacterias Gram-positivas y constituyen un grupo importante para el futuro desarrollo de fármacos.

## REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR SUPERENROLLAMIENTO

Recientemente hemos demostrado que la relajación del cromosoma de *S. pneumoniae* por tratamiento con novobiocina (inhibidor de GyrB) dispara una respuesta transcripcional global y homeostática en la que están implicadas todas las topoisomerasas: la girasa se activa y las topoisomerasas I y IV se inhiben. Más del 13% del genoma muestra respuesta transcripcional, y la mayoría (>68%) de estos genes están localizados en 15 agrupamientos (14.6-85.6 Kb) con transcripción coordinada. Hemos determinado que existe una organización estructural del genoma que correlaciona el contenido AT con el nivel de expresión y que incluye dominios topológicos cuya transcripción está regulada por superenrollamiento y regiones con función estructural. Hemos demostrado que el nivel de superenrollamiento es un parámetro general que regula la expresión génica, independientemente de otros tipos de regulación más específica. Puesto que este nivel puede variar en los diferentes nichos en los que se encuentra en el hombre *S. pneumoniae*, su regulación sería crucial para la patogenicidad de esta bacteria.

## LA DNA TOPOISOMERASA I COMO NUEVA DIANA ANTIMICROBIANA

Hasta ahora no se había identificado ningún compuesto que actuara eficientemente sobre la DNA topoisomerasa I. Nosotros hemos testado la inhibición de esta enzima por alcaloides semisintéticos derivados de la boldina habiendo detectado dos que la inhiben a concentraciones equivalentes a las que inhiben el crecimiento bacteriano (~10 mM). Estos compuestos son activos frente a cepas multiresistentes, no afectan la viabilidad de células humanas y representan nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones neumocócicas. Hemos patentado recientemente el uso de estos nuevos antimicrobianos (P200931186).

## PUBLICACIONES RECIENTES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO

- Balsalobre L, de la Campa AG.** (2008) Fitness of *Streptococcus pneumoniae* fluoroquinolone resistant strains with topoisomerase IV recombinant genes. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 822-830.
- de la Campa AG, Ardanuy C, Balsalobre L, Pérez-Trallero E, Marimón JM, Fenoll A, Liñares J.** (2009) Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones during 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis* 15: 905-911.

Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, Schwartzman JB, de la Campa AG. (2010) The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters. *Nucleic Acids Res* 38: 3570-3581.

García MT, Blázquez MA, Ferrándiz MJ, Sanz MJ, Silva-Martín N, Hermoso JA, de la Campa AG. (2011) New alkaloid antibiotics that target the DNA topoisomerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 286: 6402-6413.

Balsalobre L, Ferrándiz MJ, de Alba G, de la Campa AG. (2011) Nonoptimal DNA topoisomerases allow maintenance of supercoiling levels and improve fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1097-1105

Ferrándiz MJ, Ardanuy C, Liñares J, Balsalobre L, García MT, de la Campa AG. (2011) New species genetic approach to identify strains of streptococci mitis group that are donors of rifampin resistance to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 368-372

Domenech A, Ardanuy C, Balsalobre L, Martí S, Calatayud L, de la Campa AG, Brueggemann AB, Liñares J. (2012) Pneumococci can persistently colonise adult patients with chronic respiratory disease. *J Clin Microbiol* 50: 4047-4053.

Balsalobre L, Ortega M, de la Campa AG. (2013) Characterization of recombinant fluoroquinolone-resistant pneumococcus-like isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 254-260.

## Microbiología molecular y antimicrobianos

**Miguel Viñas**

Campus de Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona. Hospitalet de Llobregat



El grupo de investigación al completo, en una reciente celebración.

El Grupo de Microbiología Molecular y Agentes Antimicrobianos del Campus de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat, Barcelona) de la UB tiene 21 años de existencia e inició su actividad cuando Miguel Viñas llegó a este Campus en el año olímpico de 1992 procedente de la Facultad de Farmacia. El grupo tiene una considerable actividad docente que abarca los estudios de Medicina, Odontología, Podología y Enfermería, así como la participación en diversos masters oficiales. La actividad investigadora del grupo se centra

en la exploración de algunos de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, particularmente los que hacen referencia a la interacción entre agentes antimicrobianos y membranas bacterianas. Las herramientas utilizadas principalmente para este fin se centran en la utilización de nanotecnologías, y particularmente la utilización de microscopía de fuerza atómica, y el estudio de la capacidad formadora de canales transmembrana por métodos electrofisiológicos y, particularmente, por la técnica de medición de conductancia