Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas

Ernesto García y Pedro García

Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) Madrid

e.garcia@cib.csic.es pgarcia@cib.csic.es

Foto de grupo. De izquierda a derecha: Esther García, Pedro García, Roberto Díez, Mirian Domenech, Eloísa Cano, Susana Ruiz y Ernesto García.

Un primer resumen de las actividades de nuestro grupo apareció el pasado año en estas mismas páginas (http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/55/21_BMP_55_Garcia.pdf), puesto que también pertenecemos al grupo de «Biología de los microorganismos patógenos». En él se hacía referencia a la historia del grupo, ligado siempre al estudio de *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), uno de los principales patógenos y causa principal de morbilidad y mortalidad en niños y adultos de todo el mundo. La enfermedad neumocócica invasiva (ENI) viene precedida por el establecimiento del llamado «estado de portador», es decir, la colonización de la nasofaringe. Este proceso tiene lugar a través de una relación compleja huésped-parásito en la que también se dan interacciones con otros microorganismos que ocupan el mismo hábitat. La mayoría de estas interacciones implican, por un lado, a proteínas de la superficie bacteriana y, por otro, a los mecanismos de defensa del huésped.

Uno de los temas tradicionales de trabajo en nuestro laboratorio ha sido (y sigue siendo), el estudio de las mureín-hidrolasas que hidrolizan enlaces específicos de la pared celular. Estas enzimas pertenecen a una familia de proteínas de superficie denominada *«Choline-binding proteins»* o CBPs, que se caracterizan por la unión específica y no covalente al aminoalcohol colina que forma parte de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la envuelta celular. Las CBPs más estudiadas han sido: a) LytA, la principal autolisina de neumococo; b) LytB, una glucosaminidasa responsable de la separación de las células hijas; c) LytC, una lisozima implicada, entre otras funciones, en la autolisis a 30°C; d) Pce, una fosforilcolinesterasa que degrada los residuos de fosforilcolina de la superficie celular. Estas proteínas se investigaron, inicialmente, desde el punto de vista del papel fisiológico que desempeñan en la célula. Al disponer de suficientes cantidades de estas proteínas se ha podido profundizar en la relación estructura-función de varias de ellas, tanto bacterianas como fágicas (véase más adelante), a través del estudio de sus propiedades físico-químicas y de sus estructuras tridimensionales. Estos trabajos se vienen llevando a cabo en estrecha colaboración con los grupos de Margarita Menéndez y Juan Hermoso del Instituto Rocasolano del CSIC.

Actualmente, determinadas cepas de neumococo han alcanzado la categoría de *«supergérmenes»*, bacterias cada vez más difíciles de erradicar con antibióticos. Además, las vacunas actuales no cubren todas las necesidades de prevención y se está comprobando un incremento en la incidencia de ENI causada por neumococos de serotipos no vacunales. Es evidente, por tanto, que se necesitan urgen-

temente nuevos fármacos efectivos basados en nuevas dianas terapéuticas. En nuestro laboratorio se está estudiando la implicación de estas CBPs en la colonización, el establecimiento de la ENI y la respuesta inmune del huésped. Para ello, se han puesto a punto diversas técnicas *in vitro* —como los biofilmes o los cultivos celulares— y modelos animales de infección. Hace unos años desarrollamos un modelo experimental de formación de biofilm por neumococo usando placas multipocillo. Se observó que dichos biofilmes eran estructural y funcionalmente complejos ya que en su formación están implicados múltiples genes, algunos de ellos de función desconocida. Asimismo, se demostró que el DNA y determinadas proteínas y polisacáridos son componentes de la matriz extracelular de estos biofilmes.

En cuanto a los compuestos con actividad antibacteriana, se están estudiando diferentes grupos de moléculas que se pueden resumir así:

a) Ésteres de aminas bicíclicas que se comportan como análogos de colina ya que interaccionan fuertemente con el módulo de unión a colina de las CBPs ocupando sitios de unión del aminoalcohol. A concentraciones bajas (mM), algunos de estos compuestos no sólo inhiben la actividad enzimática de LytA y otras mureín-hidrolasas, deteniendo el crecimiento, sino que también son capaces de reducir la viabilidad del cultivo. Este comportamiento puede ser imitado si estos compuestos se cargan en un tipo de nanopartículas denominadas dendrímeros. Este trabajo se está realizando en colaboración con el grupo de Jesús M. Sanz de la Universidad Miguel Hernández de Elche.
b) A partir de una quimioteca de más de un millar de fármacos aprobados por la FDA, se han seleccionado algunos compuestos con elevada capacidad bactericida sobre neumococo y otras bacterias patógenas, a concentraciones submilimolares. Los compuestos que muestran mejor efecto bactericida se están probando también en su forma encapsulada como nanopartículas.
c) Las cerageninas (derivados del ácido cólico) son compuestos cuya diana es la membrana bacteriana y que recuerdan a los péptidos antimicrobianos endógenos. En concreto, la ceragenina CSA-13 es muy activa lisando *in vitro* a neumococos (incluso aislados multirresistentes) al disparar la acción autolítica de LytA.
d) Las lisinas fágicas (endolisinas) son enzimas que se sintetizan en el citoplasma bacteriano durante la fase tardía del ciclo lítico con la finalidad de degradar la pared celular facilitando así la liberación de la progenie. Estas enzimas, también denominadas enzibióticos, muestran un potente efecto bactericida y suelen ser muy específicas ya que, normalmente, sólo matan a las bacterias de las que procede el fago que codifica dicha enzima. En nuestro laboratorio se probaron inicialmente la lisozima Cpl-1 y la amidasa Pal (codificadas por los fagos Cp-1 y Dp-1, respectivamente) que son también CBPs. Los resultados obtenidos *in vitro* se validaron en un modelo murino de sepsis. También se ha demostrado que la lisozima Cpl-7 —con un dominio catalítico similar al de Cpl-1 pero con el de unión al sustrato totalmente distinto— es activa no sólo contra neumococo (incluidas las cepas multirresistentes) sino contra otros patógenos Gram-positivos como *Streptococcus pyogenes* o *Enterococcus faecalis*. En esta ocasión, la validación de los resultados se hizo en un modelo de embriones de pez cebra. Asimismo, todos los enzibióticos ensayados consiguieron disgregar eficazmente los biofilmes de neumococo con un importante efecto bactericida asociado. Más recientemente se ha construido una enzima quimérica combinando el dominio catalítico de Cpl-7 y el de unión al sustrato de Cpl-7 con el resultado de que la nueva enzima, Cpl-711, es la que demuestra mayor letalidad contra neumococo. Como todas estas endolisinas son modulares, se puede pensar en la posibilidad de diseñar enzimas «a la carta» frente a diferentes patógenos, especialmente los que se muestran más refractarios al actual arsenal de antibióticos.

Éstas y otras líneas de investigación se llevan a cabo, además, en colaboración con los grupos de J. Yuste, A. Fenoll y A. G. de la Campa del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII) y el de C. Ardanuy y J. Liñares del Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL.

PUBLICACIONES

Ardanuy C, de la Campa AG, García E, Fenoll A, Calatayud L, Cercenado E, Pérez-Trallero E, Bouza E, Liñares J. (2014). Serotype 8 *Streptococcus pneumoniae* multidrug-resistant recombinant clone Swede-n^{15A}-ST63: dissemination in Spain. Emerg Infect Dis doi:10.3201/eid2011.131215.

Moscoso M, Esteban-Torres M, Menéndez M, García E. (2014). *In vitro* bactericidal and bacteriolytic activity of ceragenin CSA-13 against planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. PLoS One 9: e101037.

Sotillo A, Pedrero M, de Pablos M, García JL, García E, García P, Pingarrón JM, Mingorance J, Campuzano S. (2014). Clinical evaluation of a disposable amperometric magneto-genosensor for the detection and identification of *Streptococcus pneumoniae*. J Microbiol Methods 103:25-28.

Domenech M, Araújo-Bazán L, García E, Moscoso M. (2014). *In vitro* biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* as a predictor of post-vaccination emerging serotypes colonizing the human nasopharynx. Environ Microbiol 16:1193-1201.

Silva-Martín N, Retamosa MG, Maestro B, Bartual SG, Rodes MJ, García P, Sanz JM, Hermoso JA. (2014). Crystal structures of CbpF complexed with atropine and ipratropium reveal clues for the design of novel antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*. Biochim Biophys Acta 1840:129-135.

Díez-Martínez R, de Paz H, Bustamante N, García E, Menéndez M, García P. (2013). Improving the lethal effect of Cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. Antimicrob Agents Chemother. 57:5355-5365.

Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. (2013). Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 81:2606-2615.

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.

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.

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.

Pérez-Dorado I, González A, Morales M, Sanles R, Striker W, Vollmer W, Mobashery S, García JL, Martínez-Ripoll M, García P, Hermoso JA. (2010). Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. Nat Struct Mol Biol 17:576-581.

Estudio del Microbioma Humano en Salud y Enfermedad

Pedro Belda, Raúl Cabrera, Anny Camelo, Mariam Ferrer, Arantxa López, Áurea Simón y Alex Mira

Fundación FISABIO, Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Avda Cataluña 21, 46020 Valencia

mira_ale@gva.es

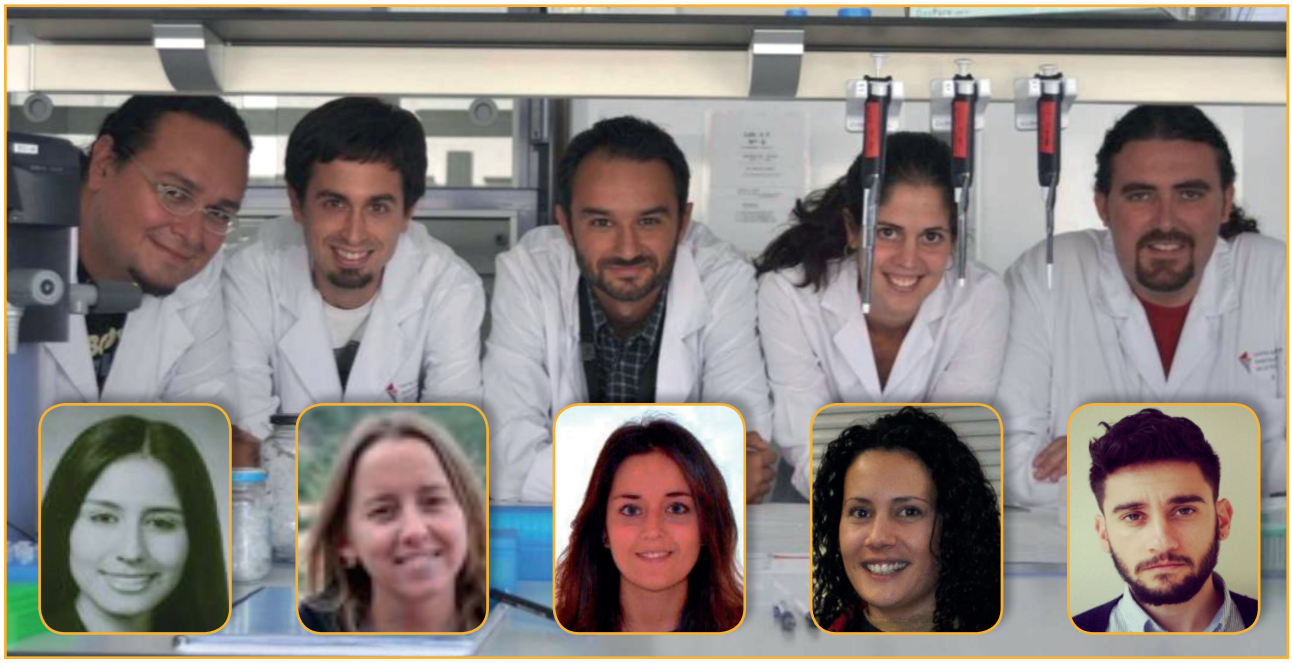

Foto de grupo. Laboratorio para el Estudio del Microbioma Humano, integrado por Luis Alcaraz (actualmente en la UNAM, México), Pedro Belda, Álex Mira, Áurea Simón, Raúl Cabrera (actualmente en el IATA-CSIC) (de izquierda a derecha en la foto principal), Anny Camelo, Arantxa López, Alba Boix, Mariam Ferrer y César Bernabé (fotos inferiores, de izquierda a derecha).

El Laboratorio para el Estudio del Microbioma Humano está dirigido por el Dr. Alex Mira Obrador, y se creó en el año 2009, al integrarse en el Área de Genómica y Salud de la Fundación FISABIO. La investigación del grupo se centra en caracterizar la microbiota humana comensal y patógena desde una aproximación mixta de bioinformática y trabajo experimental en genómica y metagenómica. Se trata de un equipo multidisciplinar que incluye microbiólogos,