

# Temas de actualidad

## Fagos de neumococo: una perspectiva histórica

Rubens López<sup>1</sup>, Pedro García y Ernesto García

Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Velázquez 144, 28006 Madrid.

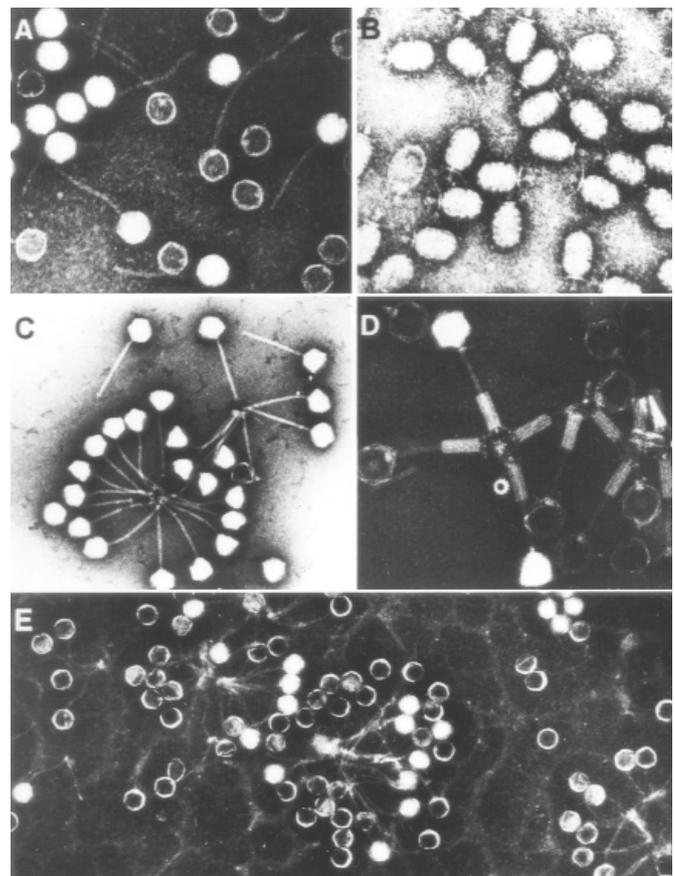
<sup>1</sup>E-mail: ruben@cib.csic.es

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es un patógeno humano que en los años 40 se encontraba entre las principales causas de muerte. En la actualidad, casi sesenta años después de que se generalizara el uso de la penicilina, los trabajos sobre neumococo suelen comenzar con la socorrida frase que señala que se trata de "un importante patógeno humano y un agente etiológico común de las neumonías y meningitis adquiridas en la comunidad en adultos y de las otitis agudas en niños", observaciones que se resumen en que esta bacteria infecta a unos 100 millones de personas al año con una tasa de mortalidad de un 10%. Son muchas las razones que ayudan a explicar por qué neumococo continúa siendo considerado como una bacteria patógena de marcado interés clínico, entre las que se cuenta la gran variabilidad del *locus* capsular responsable de la formación de hasta 90 tipos diferentes de polisacáridos que rodean a la pared celular, y su destacada plasticidad genómica facilitada, en gran medida, por su excepcional capacidad para adquirir DNA libre de su entorno natural. Es sobradamente conocido que neumococo fue históricamente el auténtico conejillo de indias de la biología molecular en los años 40, probablemente debido, como ya se ha señalado, a esa capacidad para captar DNA del medio en que vive (transformación bacteriana) lo que facilitó que fuera en este sistema donde se demostrara que el ADN era la molécula portadora de los caracteres hereditarios, usando como marcador fenotípico la cápsula que le confiere virulencia [1].

Con estos acrisolados antecedentes resultaba llamativo que a mediados de los años 70 el único mecanismo de intercambio genético descrito en este sistema fuese la transformación genética que, por aquellos años, ya había sido muy bien estudiada a nivel fisiológico. No obstante, hasta entonces no se habían podido desarrollar en este patógeno mecanismos de intercambio tales como la conjugación o la transducción a través de la utilización de fagos, en este último caso porque no se había conseguido aislar bacteriófagos en *S. pneumoniae*. En 1975 se publicaron los dos primeros trabajos en los que se describía el aislamiento de tales fagos. El denominado fago Dp-1 (*Diplococcus*

*phage*) fue identificado, a partir de frotis obtenidos en un hospital del Bronx, por McDonnell y Ronda trabajando en el laboratorio de A. Tomasz en la Universidad Rockefeller en Nueva York [8]. Un segundo fago,  $\omega$ -1, así denominado por la morfología que presentaban las células bacterianas después de la lisis, fue descrito, al mismo tiempo que Dp-1, por el matrimonio Tiraby en el laboratorio de M. Fox en el MIT de Boston [15].

Hasta el momento se han caracterizado en gran detalle cinco fagos capaces de infectar a *S. pneumoniae*. Como se puede apreciar en la figura 1, estos fagos exhiben una gran variabilidad morfo-



**Figura 1.** Micrografías electrónicas de bacteriófagos de *Streptococcus pneumoniae*. Fagos líticos Dp-1 (A) y DCp-1 (B). Fagos atemperados HB-3 (C), EJ-1 (D) y MM-1 (E). Los fagos Dp-1, HB-3 y MM1 pertenecen a la familia *Siphoviridae*, Cp-1 es un *Podoviridae* y EJ-1 es un miembro de la familia *Myoviridae*.

lógica ya que tres de ellos pertenecen a la familia *Siphoviridae* (Dp-1, HB-746, MM1), y los otros dos han sido identificados como *Podoviridae* (Cp-1 y fagos relacionados como Cp-5 y Cp-7) y *Myoviridae* (EJ-1). Asimismo, dos de estos fagos son líticos (Dp-1 y Cp-1) mientras que los otros tres son fagos atemperados. Excepto en el caso de HB-746, un fago aislado en Nueva York por H. Bernheimer [2], una investigadora muy relacionada con la escuela de Avery, los otros fagos han sido identificados por miembros de nuestro laboratorio. Asimismo, conviene destacar, al tratarse en este trabajo de resaltar el aspecto histórico de estos fagos, que la caracterización detallada de estos cinco fagos ha sido realizada en su mayor parte en el laboratorio de Genética Bacteriana del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

La identificación del fago Dp-1 iniciada durante las estancias realizadas por los Drs. C. Ronda y R. López en el laboratorio del Prof. A. Tomasz en la Universidad Rockefeller de Nueva York en los años 1974 y 1977, encontró su continuación en España con la incorporación a nuestro laboratorio, en 1978, de los Drs. Ernesto García y Pedro García. En estas primeras etapas de nuestro trabajo, el aislamiento del DNA de Dp-1 permitió poner a punto un sistema de transfección en neumococo, lo que significó la primera alternativa a la transformación genética como procedimiento de transmisión de información en esta bacteria [13]. Además, se realizó la caracterización físico-química de este grupo de fagos, así como un análisis de su replicación y un detallado estudio del DNA [5].

Los primeros aislamientos de fagos de neumococo realizados en España se remontan a finales de los años 70 y, poco después, en 1981, se publicó la caracterización del fago Cp-1 [12]. El nombre de este fago se debe a que los miembros de esta familia se aislaron a partir de frotis faríngeos tomados de niños sanos por el Dr. Domínguez, del Hospital de la Cruz Roja (entonces ubicado en Cuatro Caminos), en Alcalá de Henares; de ahí su denominación de *Complutense Phage*. Conviene recordar que la razón que nos llevó a estimular esta línea de investigación, por encima de cualquier consideración científica sobre el interés que tenía el estudio de los fagos de neumococo, se fundamentó en la precariedad de los fondos destinados por entonces a la investigación científica durante aquellos años de la transición democrática. En esos momentos, se destinaba a la mayor parte de los grupos de trabajo unas pocas pesetas por investigador y mes. En estas condiciones disponíamos de poco más que placas de agar, y por supuesto, contábamos con la generosidad del Dr. Domínguez. Esta situación era sólo, una vez más, la escenificación sangrante de esas dos caras de Jano con que se ve periódicamente agravada la

Investigación Científica en países como el nuestro, donde se carece de una cultura científica acorde con el nivel avanzado de nuestra sociedad (es decir: ahora considero la Investigación Científica fundamental y, poco después, digo aquello de "que investiguen ellos"). Todo ello encuentra su reflejo en unos políticos para los cuales aparecemos, esperemos que no para siempre, como poco más que un lujo que se debe mantener por simple prestigio.

Evidentemente, de las muestras que se nos proporcionaron se aislaron otros fagos tales como el Cp-5 y el Cp-7; este último resultó de gran importancia para la caracterización estructural de las enzimas líticas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos, otro de los temas de investigación que ha marcado el rumbo de nuestro grupo.

Antes de que se publicara el aislamiento de Cp-1, en 1980 se celebraron, a la sazón, las primeras jornadas de puertas abiertas organizadas por el CSIC y, dentro del apartado dedicado a biología molecular en una sesión presidida por M. Salas, R. López presentó datos preliminares de nuestro laboratorio en los que se sugería que el DNA de este grupo de fagos poseía una proteína unida al DNA, una situación similar a la descrita en el fago  $\phi 29$ . Es bien sabido que del detallado estudio de este fago ha derivado una contribución seminal, en aportaciones científicas y humanas, al desarrollo de la biología molecular en España, impulsada por M. Salas y E. Viñuela. Asimismo, existía una gran similitud morfológica entre Cp-1 y  $\phi 29$  lo que llevó a algún ilustre colaborador de M. Salas a señalar, creemos que sin ironía, que en nuestro laboratorio habíamos reaislado el fago  $\phi 29$ . De la afortunada similitud entre estos fagos surgió una fructífera colaboración con M. Salas, buscando las coincidencias y divergencias entre dos fagos que infectaban huéspedes aparentemente muy diversos al tratarse de un parásito humano (*S. pneumoniae*) y de una bacteria del suelo (*Bacillus subtilis*). De nuestro trabajo en común se pudo concluir, como se documentó a través de una serie de publicaciones (para una revisión reciente, ver [5]) que, en efecto, Cp-1 poseía una proteína de 26,8 kDa unida covalentemente por una treonina a la primera deoxiadenoquina de los extremos 5' del DNA de Cp-1 [5] y que este fago replicaba su DNA siguiendo una pauta muy similar a la que se había documentado ampliamente en el caso del fago  $\phi 29$ . Asimismo, se determinaron los mapas físicos de varios fagos de la familia Cp y cabe destacar que el fago Cp-7 que era el que presentaba una mayor divergencia con el resto de los componentes de esa familia, poseía un genoma 1 kb más largo.

El aminoalcohol colina es un componente estructural de los ácidos teicoicos de neumococo y

durante muchos años se pensó que se trataba de una peculiaridad exclusiva de este microorganismo. Hoy se sabe que existe un limitado número de bacterias que comparten esta característica [4]. La colina juega un papel muy importante en la fisiología de neumococo; así, la sustitución de colina por el análogo estructural etanolamina determina cambios bioquímicos muy drásticos en la actividad específica de la principal enzima autolítica de esta bacteria (LytA) así como grandes alteraciones morfológicas como son la formación de largas cadenas de células que no se autolisan al final de la fase estacionaria de multiplicación. Entre 1982 y 1986 se puso de manifiesto que, para que el fago lítico Dp-1 se adsorbiera a la célula huésped y tuviera lugar un ciclo infectivo, era fundamental la presencia de ácidos teicoicos conteniendo colina en la pared de *S. pneumoniae* [5]. Asimismo, se caracterizó como una amidasa la enzima codificada por este fago, una amidasa (Pal) similar a la codificada por la bacteria huésped. En ambos casos se requería la presencia de colina en las paredes usadas en ensayos *in vitro* para ser enzimas activas.

La clonación del primer gen de un fago de neumococo tuvo lugar apenas dos años después de la clonación del gen *lytA*. Esto último supuso el primer caso de manipulación genética de una autolisina en organismos procarióticos. Cpl1 fue identificada como una muramidasa que compartía con la amidasa de neumococo y con la Pal de Dp-1 el ser dependiente de la presencia de colina para desarrollar su actividad [5]. Estas observaciones nos llevaron a sospechar que este requerimiento de colina en los sustratos que degradaba podría

llevar implícito una similitud a nivel molecular entre las enzimas que compartían esta peculiaridad. Aprovechando la disponibilidad del gen *lytA* se usó el mismo como sonda de reconocimiento de regiones similares en el genoma de varios fagos de la familia Cp, todo lo cual nos condujo a la identificación de los genes correspondientes que se comprobó, posteriormente, que codificaban, asimismo, enzimas líticas. Poco después se pondría a punto en nuestro laboratorio un método simple de purificación de estas enzimas, dependientes de colina para su actividad, en columnas de DEAE-celulosa aprovechando el hecho de que la dietil-etanolamina es un análogo estructural de la colina. Las comparaciones de las secuencias de *lytA* y *cpl1* permitieron poner de manifiesto que casi la mitad de dichos genes era prácticamente idéntica lo que permitió postular que esa región de la proteína era responsable del reconocimiento de los sustratos con colina [3].

Estas observaciones se ampliaron posteriormente a las enzimas líticas de otros fagos de la familia Cp-1 así como a otros grupos de fagos, y conviene destacar que, en el caso del fago Cp-7, se encontró una muramidasa que no tenía similitud en las regiones de reconocimiento de colina con las descritas anteriormente lo que se reflejaba en su comportamiento bioquímico por la pérdida de la dependencia de la presencia de colina en los ácidos teicoicos para ejercer su actividad; de ahí que la lisozima Cpl17 fuera capaz de degradar indistintamente paredes conteniendo colina o etanolamina [5]. Con los instrumentos moleculares desarrollados en estos años nos fue posible formular la hipótesis de que las regiones C-termina-

### Rubén López

es licenciado en Ciencias Biológicas y doctor en Ciencias por la Universidad Complutense de Madrid. Inició su trabajo de investigación



en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC donde en la actualidad es Profesor de Investigación. Ha trabajado en la Universidad Rockefeller de Nueva York, en el Instituto Superior de Sanidad de Roma y en la Universidad Agrícola de Wageningen en Holanda. Su trabajo de tesis se centró en el estudio de polisacáridos de *Azotobacteriaceae*. Desde 1973 trabaja en neumococo, en particular

en la enzimas líticas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos, y más recientemente, en los polisacáridos de este microorganismo.

### Ernesto García

obtuvo su Doctorado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid e inició su labor de investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) donde es actualmente Profesor de Investigación. Ha trabajado en el *Centre d'Etudes de l'Energie Nucleaire* en Mol (Bélgica) sobre el destino del DNA inyectado en animales. Desde 1978 trabaja en diversos aspectos de la biología molecular de neumococo



y sus fagos. En 1989 le fue concedido el Premio Lorenzo Vilas de la SEM.

### Pedro García

es doctor en Ciencias Químicas y licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.



En 1978 inició su labor investigadora en el Centro de Investigaciones Biológicas donde es actualmente Científico Titular. Ha trabajado en el CNRS de Toulouse sobre la hiperrecombinación y la ruta corta de reparación de errores en el DNA de neumococo. Su trabajo en el CIB se ha centrado fundamentalmente en las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos.

les de la amidasa del huésped y de las enzimas líticas codificadas por fagos de neumococo y estudiadas hasta entonces, eran responsables del reconocimiento de la colina en el sustrato mientras que las regiones N-terminales contenían el centro activo de tales proteínas. Entre las aproximaciones experimentales que se emplearon para convertir la hipótesis en hecho científico cabe destacar la preparación de enzimas quiméricas activas entre las enzimas líticas de fagos y la amidasa del huésped que, paralelamente, traerían como resultado el intercambio de sus características bioquímicas [5].

Fue en 1990 cuando se publicó el primer análisis molecular de un fago atemperado de neumococo utilizando para ello una cepa lisogenizada con el fago HB-746. De estos estudios cabe destacar que el DNA aislado de las partículas maduras de estos fagos posee una proteína unida al DNA de forma covalente, lo cual representa la existencia de mecanismos moleculares que implican el desprenderse de esa proteína en su versión integrativa y recuperarla durante su ciclo lítico. La caracterización de este mecanismo constituye una línea de investigación que continúa abierta en nuestro laboratorio.

A lo largo de la pasada década se ha producido un decidido impulso en el estudio de los fagos en general y, así, ha cobrado actualidad, por un lado, la propuesta de que los fagos pueden ser usados con éxito como agentes terapéuticos, retomando como punto de partida el empleo que de los mismos se hizo durante décadas en la extinta URSS, pero, una vez que se introduzcan controles más estrictos en su uso clínico. La emergencia de bacterias patógenas cada vez más resistentes al arsenal antibiótico del que hoy se dispone convierte a este planteamiento en una propuesta alentadora según se ilustra en una reciente revisión [14]. Por otra parte, la original observación de Freeman en 1951 de que los fagos colaboraban a la virulencia de *Corynebacterium diphtheriae* [14], se ha visto documentada ampliamente por la constatación de que los fagos integrativos de numerosas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas debían su virulencia al concurso de los genomas fágicos. Además, en el caso de neumococo, Mario Ramírez trabajando en el laboratorio de A. Tomasz ha llegado a la conclusión de que más del 70% de los aislados clínicos de esta bacteria poseen fagos atemperados [10] y aunque, en nuestra opinión, se trata de una sobrevaloración de la presencia real de genomas completos de fagos en el DNA del huésped, también hemos podido constatar la presencia de un gran número de fagos en el genoma de diferentes aislados clínicos de neumococo. En este prometedor panorama parece lógico que durante los años 90 hayamos centrado nuestro

trabajo en el estudio de los fagos atemperados. Así, y aprovechando la experiencia proporcionada por el análisis del fago HB-746 en el que se estableció, al igual que en el caso de Cp-1, la presencia de una proteína covalentemente unida al DNA y la alta similitud de la amidasa presente en este fago con la principal autolisina de neumococo [11], hemos sido capaces de aislar y caracterizar molecularmente un fago denominado MM1 aislado de la cepa multirresistente de serotipo 23F, cepa que se ha propagado a numerosos países del mundo [6]. MM1 (Figura de la portada, E) contiene un DNA bicatenario que ha sido completamente secuenciado y teniendo en cuenta que en 1997 ya se había secuenciado totalmente el fago lítico Cp-1 [7] se puede afirmar que ha sido en nuestro laboratorio donde se han determinado las primeras secuencias completas de los DNAs de fagos líticos y atemperados de neumococo.

La contribución de los fagos atemperados a la virulencia de neumococo es un tema prioritario de estudio en nuestro trabajo actual. Hasta ahora podemos afirmar que aún no ha podido establecerse de forma incontrovertible que los fagos caracterizados hasta el momento se comporten como fagos transductores. Como se ha puesto de manifiesto anteriormente, los genes líticos han merecido una especial atención en nuestro laboratorio. Así, además de su interés para establecer modelos de evolución modular de las proteínas, han permitido, después de largos años de investigación, delimitar con precisión, a través de la cristalización, la región de reconocimiento del sustrato (región C-terminal). Este planteamiento ha llevado a establecer el mecanismo molecular de unión de estas proteínas a la pared a través de la colina, mecanismo considerado como "único" para unir proteínas a las estructuras de la envuelta bacteriana.

Cada vez se acumulan más datos que demuestran que varias proteínas unidas a la pared de neumococo, y en particular aquellas que se anclan vía colina, se consideran como factores de virulencia. En efecto, LytA ha sido considerada desde hace años como uno de los principales factores de virulencia de *S. pneumoniae*. En este sentido la enorme flexibilidad que proporciona a la autolisina LytA y a las enzimas fágicas su estructura modular que facilita el intercambio entre los genes líticos presentes en el fago integrado y los de la célula huésped, invitan a pensar que, de esta forma tan elaborada, los fagos atemperados contribuirían a incrementar la virulencia de neumococo. Además, en estos momentos se estudian una serie de genes de MM1 que podrían, asimismo, contribuir de forma más directa al enriquecimiento del genoma de neumococo para sobrevivir en su hábitat natural en condiciones adversas.

En cuanto al uso terapéutico de los fagos en este patógeno humano se precisará, en los años venideros, del empleo de modelos animales de experimentación en los que se provoquen infecciones con neumococo para así analizar los efectos que producen el empleo de fagos *in vivo*. Como un primer paso en este sentido e inscrito en los estudios con enzimas líticas, cabe destacar los recientes resultados apuntados por Nelson y col. [9] sobre la capacidad que posee la amidasa de un fago de *Streptococcus pyogenes*, su principal autolisina, para prevenir y eliminar la colonización por esta bacteria del tracto respiratorio superior en animales de experimentación. Todo ello ha llevado a estos autores a denominar a este tipo de enzimas líticas como "enzibióticos".

Para terminar, deseamos dejar patente que después de 27 años de trabajo con los fagos de neumococo nos encontramos en el comienzo de una nueva y prometedora etapa de cara a futuras investigaciones que abarcan la elucidación del papel de los genes fágicos en la virulencia de *S. pneumoniae* y el empleo de los fagos, bien globalmente o a través del uso restringido de algunas de las proteínas codificadas por estos fagos, con fines terapéuticos. Qué duda cabe que cualquier resultado positivo en este sentido justificaría sobradamente el esfuerzo realizado durante estas casi tres décadas de dedicación al análisis de los fagos de neumococo. Al fin y la postre, como señalara Ovidio, "*quod nunc ratio est impetus ante fuit*".

### Agradecimientos

Son muchas las personas que, por méritos propios, deben figurar en este apartado. La visión siempre brillante de mi maestro el Prof. Alexander Tomasz acompañada de la persistencia de Concha Ronda y Maureen McDonnell permitieron la difícil visualización de placas infectivas y, por tanto, todos ellos merecen una rotunda consideración y agradecimiento en esta pequeña historia. Un apartado muy particular debemos a la tenacidad que mostró Concha en el manejo de los fagos Cp; sin ese empeño, la viabilidad de esa línea de trabajo habría resultado casi imposible. Las aportaciones de José L. García han proporcionado iluminadoras variantes experimentales que resultaron imprescindibles en muchos momentos. Las contribuciones de Alicia Romero, José María Sánchez-Puelles, Eduardo Díaz, Jesús Sanz, Ana C. Martín, Michel Sheehan, "Manu" Gindreau y, recientemente, de Virginia Obregón y Asunción Fenoll han prestado consistencia científica a los resultados conseguidos en los últimos diez años.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Avery OT, McLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79: 137-158.
2. Bernheimer HP (1977) Lysogeny in pneumococci freshly isolated from man. *Science* 195: 66-8.
3. García E, García JL, García P, Arrarás A, Sánchez-Puelles JM, López R (1988) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 914-918.
4. García JL, Sánchez-Beato AR, Medrano FJ, López R (2000) Versatility of choline-binding domain. En: Tomasz, A. (ed) *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, NY, pp. 231-244.
5. García P, Martín AC, López R (1997) Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. *Microb. Drug Resist.* 3: 165-176.
6. Gindreau E, López R, García P (2000) MM1, a temperate bacteriophage of the type 23F Spanish/USA multiresistant epidemic clone of *Streptococcus pneumoniae*: structural analysis of the site-specific integration system. *J. Virol.* 74: 7803-7813.
7. Martín AC, López R, García P (1996) Analysis of the complete nucleotide sequence and functional organization of the genome of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1. *J. Virol.* 70: 3678-3687.
8. McDonnell M, Ronda-Lain C, Tomasz A. (1975) "Diplophage": a bacteriophage of *Diplococcus pneumoniae*. *Virology* 63: 577-582.
9. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98: 4107-4112.
10. Ramírez M, Severina E, Tomasz A (1999) A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 181: 3618-3625.
11. Romero A, López R, Lurz R, García P (1990) Temperate bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae* that contain protein covalently linked to the 5' ends of their DNA. *J. Virol.* 64: 5149-5155.
12. Ronda C, López R, García E (1981) Isolation and characterization of a new bacteriophage, Cp-1, infecting *Streptococcus pneumoniae*. *J. Virol.* 40: 551-559.
13. Ronda C, López R, Tomasz A, Portolés A (1978) Transfection of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage DNA. *J. Virol.* 26: 221-225.
14. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JJ (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 649-659.
15. Tiraby JG, Tiraby E, Fox MS (1975) Pneumococcal bacteriophages. *Virology* 68: 566-569.