

## 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



Foto del grupo: De izquierda a derecha. Detrás: María José Ferrándiz, Mónica Amblar, Adela González de la Campa, María Teresa García. Delante: Miriam García López, Patricia Rabanal

Nuestro grupo estudia desde hace más de 20 años los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas Gram-positivas, especialmente *Streptococcus pneumoniae* (SPN), mediante una combinación de estudios moleculares básicos y otros más aplicados (epidemiología, emergencia *in vivo* de resistencia durante el tratamiento antibiótico), incluyendo tanto antimicrobianos utilizados para el diagnóstico (optoquina) como otros utilizados en el tratamiento de infecciones (principalmente las fluoroquinolonas levofloxacina y moxifloxacina), o no utilizados todavía como la seconeolitsina. 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), dos Científicas Titulares del ISCIII (María José Ferrándiz y Mónica Amblar), una profesora contratada doctor de la UCM (María Teresa García), una contratada predoctoral (Miriam García López) y una estudiante TFG (Patricia Rabanal).

En los últimos diez años nos hemos centrado en el estudio de la organización topo-

lógica del cromosoma de SPN, un aspecto fundamental para el desarrollo de nuevos antimicrobianos y para la mejora del tratamiento antibiótico. 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, alcanzándose un equilibrio homeostático por

las actividades opuestas de las topoisomerasas que relajan el DNA (topoisomerasas I y IV), y de la girasa, que introduce SC negativo. Las fluoroquinolonas (FQs) inhiben la girasa y la Topo IV formando un complejo ternario enzima-DNA-FQ que produce roturas de cadena doble. 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 para SPN frente a ~4.6 Mb para *Escherichia coli*), rico en AT (60%), y codifica muy pocas NAPs. Nosotros hemos caracterizado la proteína HU, la única NAP clásica descrita en SPN, que contribuye a la compactación cromosómica. 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 y definir dominios de SC, cuyos genes presentan transcripción coordinada y funciones similares. Las FQs producen cambios locales del SC que inducen alteraciones en el transcriptoma que afectan al 5.2% (levofloxacina) y 6.5% (moxifloxacina) del genoma. Ambas FQs, mediante la regulación de la transcripción de rutas metabólicas diferentes, producen un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que contribuyen a la letalidad, de acuerdo con el modelo general de acción de antibióticos bactericidas. Estas ROS son fundamentales en el efecto post-antibiótico de las FQs. Por otra parte, la inducción de cambios globales

en SC por novobiocina (inhibidor de GyrB), o por seconeolitsina (inhibidor de Topo I), nos ha permitido definir dominios de SC. 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 Topo IV (*parEC*) y la Topo I (*topA*); el aumento del SC regula la expresión de *topA*. La disminución del SC afecta al 37% del genoma, con >68% de los genes agrupados en 15 dominios. El incremento del SC 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.

En cuanto a la regulación del SC, la transcripción de *gyrB* y *topA* en SPN 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* 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 ele-

mento 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, Arnanz 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, Arnanz 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, Arnanz 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