

# COEVOLUCIÓ DE BACTERIS I ELS SEUS VIRUS

Conferència de:

**Rubens López**

Centro de Investigaciones Biológicas

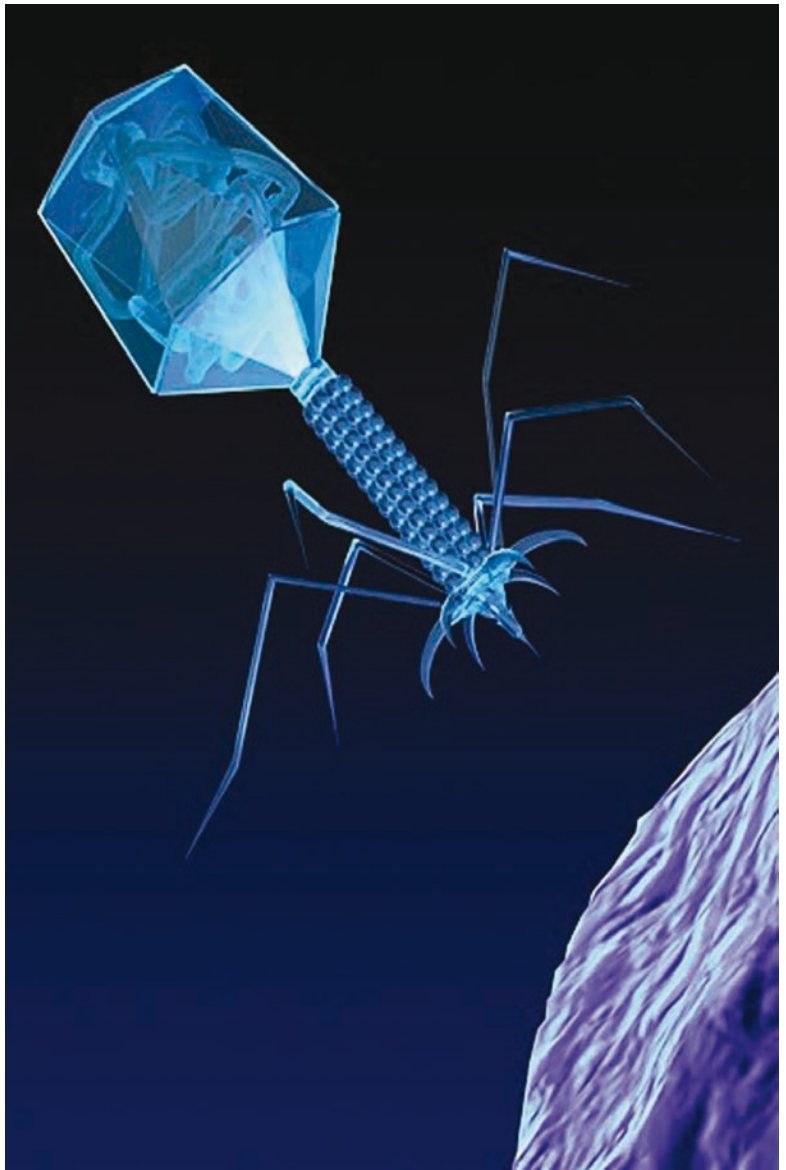
CSIC, Madrid

Des de fa més de 30 anys, treballo amb *Streptococcus pneumoniae*, també conegut com a “pneumococ”. Fins l’any 1943, aquest bacteri matava més éssers humans que el càncer i les malalties cardiaques junts; l’arribada dels antibiòtics va suposar un gran alleujament per a la humanitat en aquest sentit, de la mateixa manera que per a tantes d’altres malalties bacterianes. El pneumococ té un pedigrí extraordinari: existeixen més de 90 serotips capsulars rodejats d’una gruixuda capa de polisacàrids, i aquest fou el caràcter fenotípic que va servir per a evidenciar que el DNA era el suport de la informació genètica. El que es va fer, va ser transformar en capsulada una soca que no tenia càpsula, senzillament donant-li DNA. Avery i McCarthy van ser els genis que elaboraren aquest descobriment.

En el meu laboratori, hem treballat amb 3 caràcters del pneumococ: la càpsula, els enzims lítics i els bacteriòfags.

Va suposar molt de temps descobrir què passava en la càpsula, com també es va trigar molt en identificar els diferents tipus capsulars. Els bioquímics van fer una feina brillantíssima en aquesta identificació. Avui dia la gent gran es vacuna amb vacunes 23 valents per evitar que *Streptococcus pneumoniae* “els mati”, tot i l’existència dels antibiòtics. Una de les soques més letals és la 23F, a la qual se li atribueix un origen català. L’estudi de les càpsules va mobilitzar un gran coneixement de bioquímica i genètica clàssica, però hi faltava l’impuls de la biologia molecular.

En el meu laboratori, l’any 1992, es va publicar l’aïllament del primer gen que intervenia en un tipus capsular, per ser més exactes, el *tipus III*. Parlaré breument d’aquest tema abans d’endinsar-me en el dels enzims lítics i els bacteriòfags. Tot i que el primer virus descobert fou un virus de plantes, poc després es va descobrir el primer virus de bacteris. El que passa és que, igual com amb les plantes, els bacteriòfags són freqüentment ignorats. El primer



en observar aquests virus va ser un metge anglès que treballava a l'Índia a finals del segle XIX. Ell observà que les enteropaties en aquelles aigües eren inferiors a les que s'esperarien d'acord amb les condicions higièniques del lloc. Va decidir agafar aigua i filtrar-la amb els sistemes dels quals disposaven aleshores, i observà que aquell filtrat disminuïa les infeccions bacterianes. Els primers en observar fags van ser Twore i Derrell. Aquest últim va observar, després de filtrar amb un filtre que retenia els bacteris, que el filtrat era capaç de matar-los. De fet, va visualitzar les calbes que unes partícules causaven sobre una gessa de bacteris. Derrell va estudiar els fags amb l'esperança que ells fossin la "bala màgica" que curés totes les infeccions, que avui dia encara són la segona causa de mortalitat al món. Derrell va fundar a Georgia, juntament amb l'IABA, un centre de producció de fags. Durant la Segona Guerra Mundial, les barreges de fags es duïen com una part del cinturó de salvament de les tropes de la URSS, i varen salvar moltes vides, tot i ser barreges imperfectes, degut a l'absència de millors mètodes de purificació. Allò que es feia eren extractes que amb freqüència contenien productes tòxics bacterians. Aquests tòxics van ser els que limitaren l'estudi, i van suposar el rebuig dels sistemes de control sanitari dels EUA. Derrell, com deia, va fer un centre magnífic que produïa i sequeix produïnt fags.

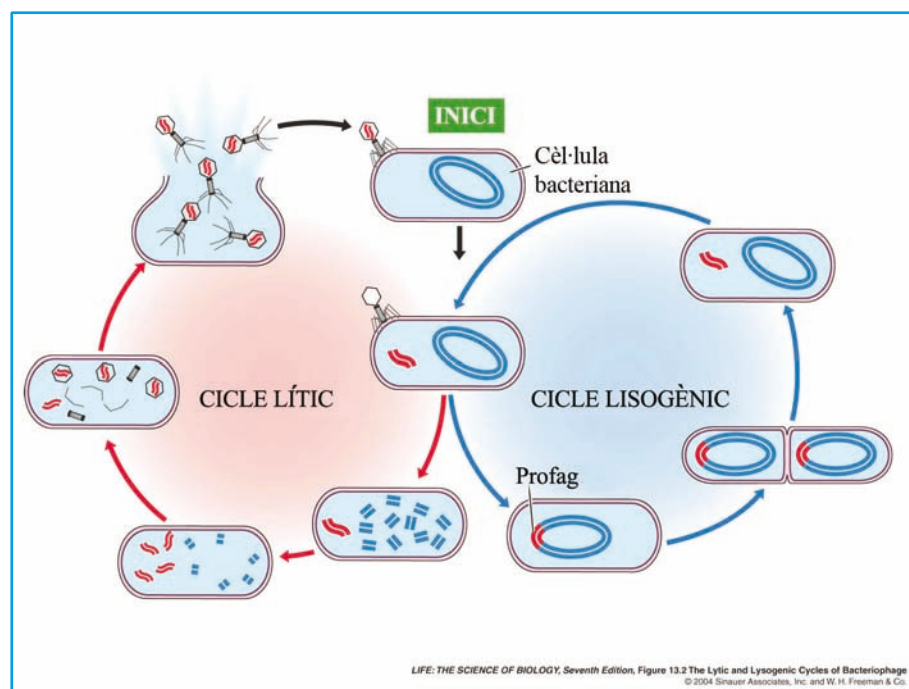
Entre aquests estudis inicials i el que exposaré a continuació, hi ha tota una història dels fags on hi va haver una mena d'oblit d'aquests en quant a l'estudi de la teràpia fàgica. Aquest oblit es deu en gran part a què en els anys quaranta, quan s'iniciava l'estudi d'aquesta teràpia, va aparèixer una primera "bala màgica", que van ser els antibiòtics. Però Looney, Dellbrook i Anderson, l'any 1943, van obtenir les primeres fotografies de fags, amb diferents morfologies, i les van publicar en el *Journal of Bacteriology* aquell mateix any. Amb això va començar la biologia molecular, perquè amb ells es va demostrar que el material que transportaven era DNA –amb els famosos experiments de Hersey i Chase- i que allò que els recobria eren proteïnes. Després, es va desenvolupar el coneixement de tot el que se sabia en microbiolo-

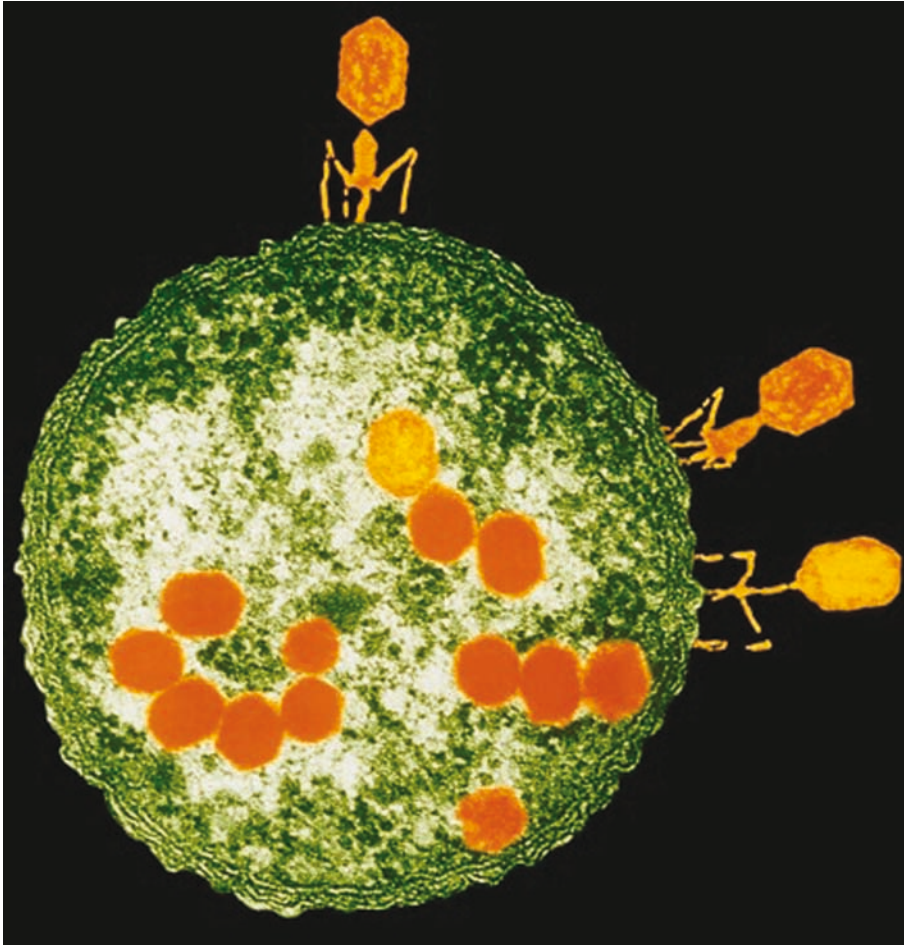
gia, fins que també els va ajudar una mica *Escherichia coli*, que ha estat realment un altre conillet d'índies!

Passen els anys, i, de sobte, l'any 2002, ni més ni menys que la portada de *Nature* torna a estar dedicada als fags. I els està dedicada per la raó que va provocar inicialment el seu interès. Resulta que ara ens trobem, tot i els escèptics –que no ho són sense certes raons, com és el difícil accés als bacteris en casos de tuberculosi, per exemple-, amb una reaparició de l'ús terapèutic dels fags. Però sorgeix a més una altra cosa, que és l'ús dels enzims que ells utilitzen per a alliberar la progènie fàgica, i això fou una novetat que va sorgir a través de la idea genial que va tenir un professor del *Rockefeller Institute*, Vicent Fischetti, qui un any abans havia ocupat unes pàgines a la revista *Science*, perquè utilitzant un enzim del nostre laboratori –anomenat *PAL*-, havent-lo prèviament purificat, amplifecat i produït, va observar que els pneumococs es destruïen amb relativa facilitat. Va utilitzar fins i tot un medi experimental en l'estat de portador (a la gola) per a dur a terme les seves observacions.

Amb això acabo el repàs de la història dels fags i introdueixo els enzims lítics. Per a aquells que no hi estan familiaritzats, en la infecció fàgica poden ocórrer

dues coses: que es produeixi una infecció lítica, o que es produeixi un estat de lisogènia. Quan un fag s'aproxima a un bacteri, el primer obstacle amb què es troba és la paret, o la càpsula en alguns casos (minoritaris). Allà hi ha d'haver més components específics que actuen com a lligands de l'antireceptor del fag, abans que aquest "injecti" el DNA en l'interior del bacteri. Aleshores poden passar dues coses: una és que la maquinària biosintètica del bacteri canviï per a produir noves molècules fàgiques, i es produeix així una lisi; o pot passar que el genoma del fag s'integri en el genoma bacterià i ens trobem davant d'una situació de lisogènia. Als fags que duen a terme aquesta funció se'ls anomena "atemperats", i permeten una de les primeres col·laboracions entre bacteris i fags. D'aquestes situacions biològiques, la primera és una situació que ens interessa per a la teràpia fàgica, ja sigui a través del fag o dels seus enzims lítics, doncs el fag ha de ser capaç de trencar la paret bacteriana per poder alliberar la seva progènie. La segona situació, sobre la qual tracta la meua exposició, resulta d'interès perquè aquests genomes fàgics integrats poden establir una relació quasi permanent amb el bacteri que han envaït, i això no és solament una simple elucubració de laboratori.





Des de fa molts anys, se sabia que algunes malalties infeccioses, com l'escarlatina, estan produïdes per un bacteri, però aquest no és patògen si no duu incorporat un genoma de fag, la qual cosa implica que els gens de virulència estan en el genoma del fag incorporat. Molts bacteris patògens, associats a malalties tan greus com el botulisme o el còlera, estan associats a fags. Aquesta és sens dubte una relació evolutiva entre fags i bacteris en la que els dos tenen sistemes per a contribuir en l'intercanvi de gens i l'adquisició d'avantatges de cara a la supervivència. Dit això, el concepte clàssic de la infecció conegut com a relació de hoste-bacteri podria, a segons el meu parer, ser substituït per la relació hoste-bacteri-fag, degut a la cada vegada més freqüent integració lisogènica.

Com a cosa anecdòtica, entre les relacions que s'estableixen entre virus i bacteris, n'hi ha una de molt llençada que és la de l'origen del nucli de les cèl·lules eucariotes. Això es basa en la suposició de la coexistència entre *LUKA* i els virus en la

sopa primitiva, i que els virus van ser els responsables de l'adquisició del nucli. Evidentment, les raons científiques són molt dèbils per a sostenir aquesta teoria.

Intentaré, a partir d'ara, enmarcar la relació entre virus i bacteris dins del treball que es desenvolupa en el nostre laboratori, i que es basa en pneumococs. El pneumococ té una característica fonamental, arribada l'hora de parlar de la relació entre virus i bacteris, i és el fet de posseir un aminoalcohol, la colina, com a component estructural de la seva paret. La colina forma part dels àcids teicoics, que són particulars dels bacteris Gramm positius. Els Gramm positius tenen una gran paret i no tenen membrana externa, per la qual cosa només disposen de la interna. Fins fa ben poc es pensava que l'únic bacteri que tenia colina a la paret era el pneumococ, però s'ha vist que no és així. Haig d'afegir que la colina, tot i ser fonamental per al pneumococ, ha de provenir del medi extern, doncs el pneumococ no pot sintetitzar-la. Pot, no obstant, créixer amb anàlegs es-

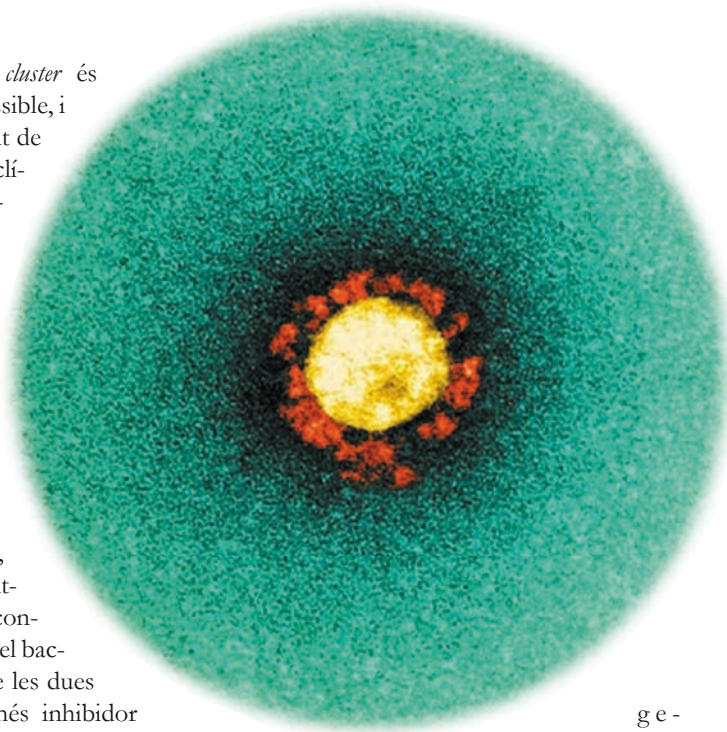
tructurals, com l'etanolamina, però quan això succeeix, l'organisme canvia en un sens fi d'aspectes: morfològicament, bioquímicament, i fins i tot canvia en la seva relació amb els fags, que és el que aquí ens interessa, doncs perd capacitats enormes, com és la de transfecció. Tan és així que la típica estructura diplocòquica dels pneumococs que s'observa en les anàlisis d'hospitals canvia, i es formen estructures de fileres llargues de bacteris. Tots aquests canvis estan condicionats per uns enzims que estan en tots els eubacteris coneguts: els enzims lítics.

A més, des de l'any 1975, no s'havia aïllat el primer fag de pneumococ. Posteriorment, durant la transició, aïllarem fags provinents de les torades de frotis de gòles de nens malalts. El fag que vàrem aïllar, estructuralment semblant al 29, era un fag aïllat de nens d'Alcalá de Henares, per la qual cosa va rebre el nom de *Complutense phagus* o *CP1*. Per altra banda, i simultàniament, la Dra. Openheimer, als EUA, va observar que en els frotis de meningitis i otitis infantils, l'agent etiològic principal de les quals és el pneumococ, el 70% dels casos (o fins i tot, més) posseïen fags atemperats. Si bé nosaltres no hem trobat aquesta relació, sí és cert que n'hem trobat d'altres, potser més satisfactòries i més, per així dir-ho, sofisticades. Per exemple, si conreem pneumococs en medis amb etanolamina, podem fer-los créixer de manera que formin llarguíssimes cadenes. Si se'ls aplica un breu pols (microcirurgia) de colina en aquest cultiu, de manera que la colina sigui ràpidament incorporada i es torni a activar el metabolisme de l'etanolamina, veiem que es formen unes bandes a la paret, i aquestes bandes són de colina. Si ara afegim fags en excés podem observar com aquests fags es fixen exclusivament en la regió on està la colina, i en cap cas on hi ha etanolamina. Aquesta és la primera barrera: el fag requereix un antireceptor perquè la diàna del receptor que té està compost de colina. Això es va establir l'any 1982. Ara, amb el genoma del fag totalment seqüenciat, hem trobat una proteïna que li permet reconèixer específicament el receptor, entre d'altres coses, la colina (en el **rec**); si no hi ha colina, el fag no serà capaç de fixar-se i "injectar" el seu DNA.



En els últims 6 anys s'han seqüenciat, en el nostre laboratori, els genomes de 4 fags: 2 fags atemperats i 2 fags temperats. Aquestes seqüències ens permeten, mitjançant comparació amb els bancs de gens, establir la funció de la majoria dels gens. En el fag *P1*, vàrem veure que un dels seus gens és molt semblant als gens dels enzims lítics. Els fags estan formats per una sèrie d'agrupaments, anomenats *mòduls* i *clusters*; en comparar aquesta regió en 3 fags temperats d'espècies pròximes, vàrem veure que els tres tenien un *cluster* que no té l'únic fag lític, és a dir, que els fags no tenen tota una sèrie de gens que són els que determinen, en els cas dels fags atemperats, que aquests tinguin la possibilitat d'integrar-se en el genoma del bacteri. Dit d'altra manera, si el fag no té aquest grup de gens, es comportarà com un fag lític. Com es pot veure, la relació coevolutiva entre aquests fags i el pneumococ no podia ser més perfecte!

Adquirir tot aquest *cluster* és complicat, però és possible, i això és molt important de cara a les aplicacions clíniques, on els fags lítics resulten molt més interessants que els atemperats, perquè una de les proteïnes que codifiquen, la *C1*, és la que fa que, quan el fag "mostra" el DNA, un dels primers gens que codifica per al gen inhibidor de la lisi, *cs1*, sigui el que sintetitza i, depenent de les condicions fisiològiques del bacteri, "prendrà" una de les dues opcions: sintetitzar més inhibidor de lisi i deixar que el fag s'inserti en el

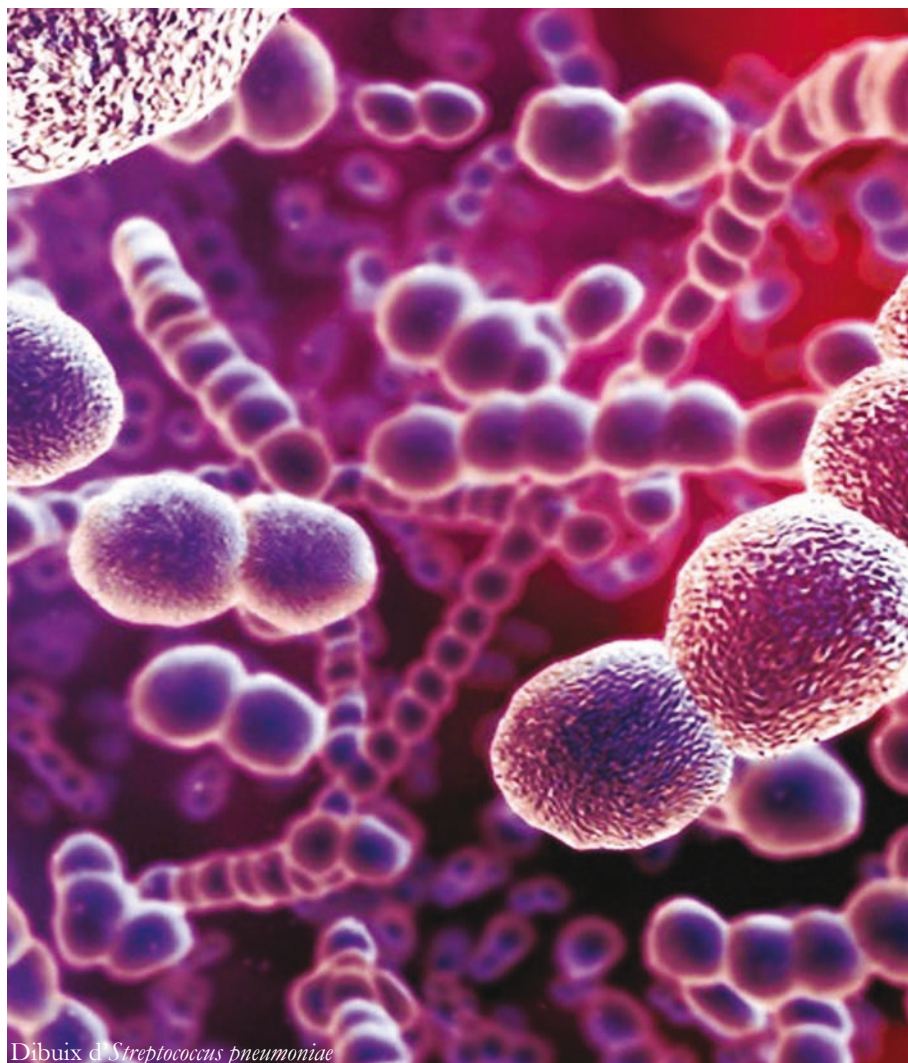


g e -  
n o m a  
bacterià, o bé pa-

rar aquesta síntesi, donant via lliure al fag per a que arrenqui el seu cicle lític. Això està molt condicionat, però és el fruit d'una llarga coevolució. És, a més, una possibilitat que només tenen els fags atemperats.

Els enzims lítics són fonamentals per als bacteris, i per això estan molt repetits, per assegurar que la funció no es perdi. *Escherichia coli* té més de 17 enzims lítics. Sense ells, la paret es converteix en un cinturó que constreny el bacteri, el qual no podrà créixer, ni dividir-se. No obstant, els enzims lítics també són perillosos per al bacteri, doncs la paret constitueix una protecció insubstituïble. Si els enzims lítics es descontrolen, la paret ja no servirà de protecció de cara a les forces osmòtiques del medi extern, i el bacteri s'autolisarà. En el pneumococ s'han descobert, fins el moment, 4 enzims lítics. El més important d'ells és *LytA*, una amidasa totalment dependent de la seva activitat, sense la qual es formen aquestes llargues alineacions de cèl·lules, i per tant conclouem que és un enzim que depèn totalment de la presència de colina en el substrat que trencarà.

Però allò curiós va ser descobrir que, quan s'ha de produir el cicle lític i el fag ha de trencar la paret des de l'interior per a poder alliberar la seva progènie, o troba colina en la paret, o no s'alliberen els fags.



Dibuix d'*Streptococcus pneumoniae*



Com que els fags posseeixen els seus propis enzims lítics, decidírem repetir l'experiment d'abans. Després de permetre que els fags envaïssin bacteris carents d'enzims lítics propis, vàrem aplicar pulsos d'etanolamina. El que buscàvem era que, allà on hi hagués colina, els fags s'alliberessin, i on hi havia etanolamina, quedessin bloquejats en l'interior dels bacteris. Això significaria que fags i bacteris comparteixen biològicament alguna altra cosa a més que un mateix espai: hi hauria alguna cosa allà que faria que als enzims lítics dels fags se'ls acudís el mateix que als dels bacteris.

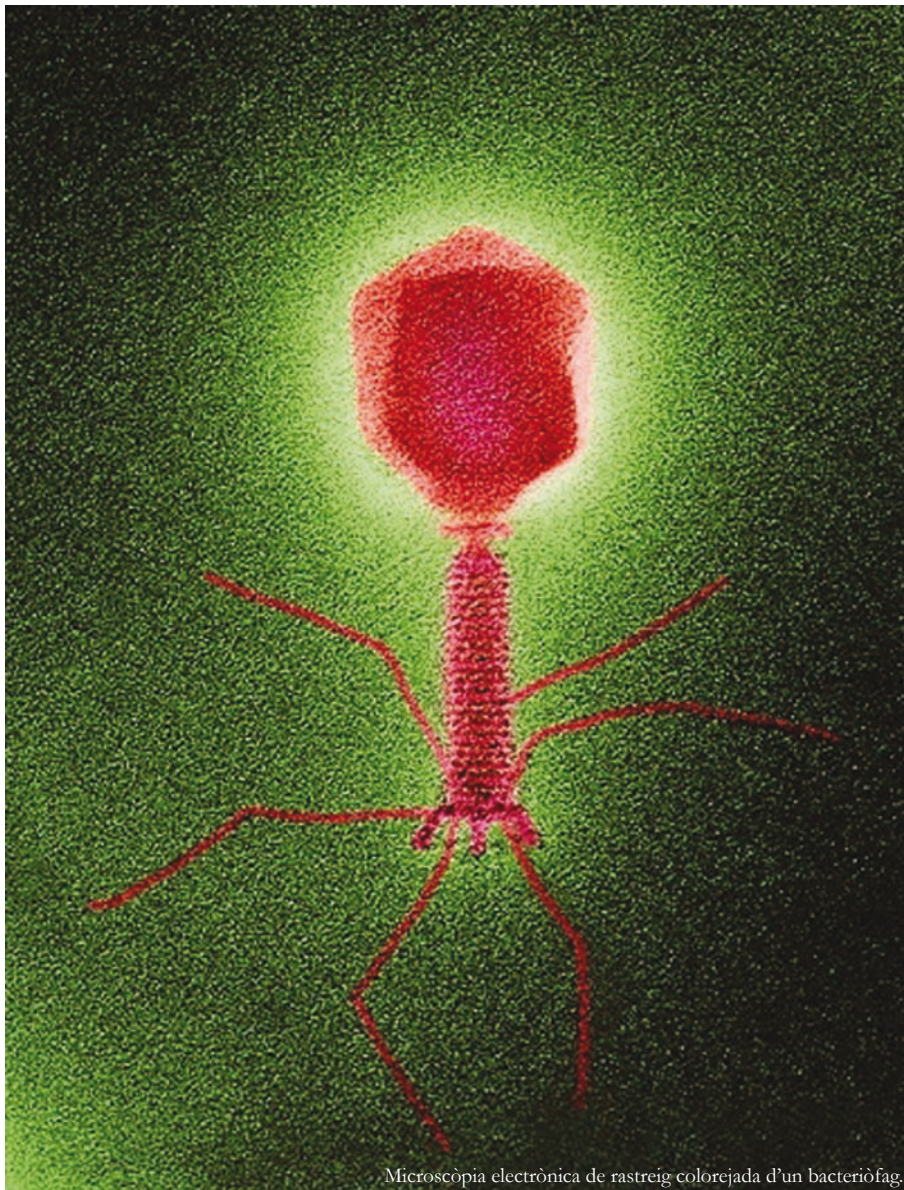
Allò que vàrem fer a continuació, va ser una digestió, amb enzims de restricció, del

genoma de diversos fags, i vàrem dur a terme una hibridació *Southern* amb el gen de l'enzim bacterià *LytA* com a sonda marcada radioactivament. En alguns fragments hi havia bandes d'hibridació. Això suggeriria l'existència d'una regió comú. Duent a terme digestions i hibridacions successives en aquests fragments, vàrem poder acotar una regió que es podia seqüenciar. Quan comparàrem la seqüència d'aquell gen, un lisozim, amb l'amidasa *LytA*, vàrem observar que la meitat del gen era pràcticament idèntic: un 60-70% dels nucleòtids eren iguals. A més, aquesta regió tenia una organització molt peculiar, doncs es tractava d'un patró de 20-21 aminoàcids que es repetien, com una sèrie de duplicacions que haguessin ocorregut al llarg de l'evolució

tot formant una sèrie de duplicacions les quals al seu torn formessin una sèrie de repeticions dins d'aquest mòdul. Aquesta era la regió que es postulava responsable, i tot i això, ambdós enzims eren completament diferents, com era d'esperar en individus que tenen una regió catalítica diferent. En col·laboració amb cristal·lògrafs, vàrem voler anar més enllà. Però abans, permeteu-me que faci de nou èmfasi en la importància evolutiva d'aquests motius.

Disposem ara de l'aïllament d'un gran nombre d'enzims lítics. Comparant-los, hem comprovat la presència, en tots ells, de motius de repetició de reconeixement de la colina. Aquests motius repetit, organitzats sempre en mòduls, ha de ser evolutivament molt flexible, perquè aquests mòduls poden canviar de posició, i poden així estar en posició N-terminal o C-terminal. Probablement això podria voler dir que, al llarg de l'evolució, no solament és aquest conjunt de gens el que dona característiques fenotípiques i estabilitat als bacteris, sinó que molt possiblement hi ha intercanvis.

Tornant al tema que ens ocupava, els enzims lítics com *LytA* són fonamentals, en el bacteri, per a dur a terme el procés infecciós, doncs es solen ancorar en les partícules perifèriques bacterianes, convertint-se en part important del fenomen d'adhesió. A més, la manera en què s'uneixen a la paret o a la membrana pot canviar molt d'un bacteri a un altre. En el cas dels pneumococs, i amb l'ajuda dels cristal·lògrafs, hem posat de manifest una forma peculiar d'unió a la paret cel·lular, donat que no es tracta d'una unió covalent. Observem que les regions C-terminals de reconeixement de la colina tenen una estructura de solenoide formada exclusivament per làmines  $\beta$ , amb un gir levògiri, format per aquells grups de 20-21 aminoàcids que tenen els motius dels quals he parlat anteriorment. I, enmig de cada dos d'aquests motius, s'estableix una estructura en la qual es formen unes cavitats hidròfobes, constituïdes essencialment per aminoàcids aromàtics com el triptòfan i la treonina, i on s'encaixen les colines. Una cavitat d'aquestes evidència el mo-



Microscòpia electrònica de rastreig colorejada d'un bacteriòfag.

tiu de tanta especificitat, doncs té una estructura tal que només dona cabuda a què entrin molècules de tipus colina, doncs només elles alliberen un catió  $\pi$  que compensa les càrregues hidrofòbiques i encaixa allà fortament per a formar aquestes estructures de reconeixement entre l'enzim i el substrat. Aquesta és l'explicació de per què sense colina no hi ha activitat *LytA*.

Tot això ens va dur a postular que els enzims lítics dels pneumococs i els seus fags tenen una estructura modular on un dels mòduls té una regió de reconeixement i una regió on hi ha un centre catalític. Emperò, en un dels fags que hem estudiat vàrem veure que la seva estructura ja era *per se* modular, és a dir, era una estructura modular interespecífica, per la qual cosa el que vàrem veure és que té en comú amb els enzims lítics de pneumococ el fet que posseeix una regió de reconeixement de colina en la paret. Però la part N-terminal no s'assemblava a la regió terminal d'altres amidases, com la *LytA*, sinó que era quasi idèntica a la regió N-terminal d'un enzim lític d'un fag de *Lactococcus lactii*. És a dir, que allò que havíem vist era en realitat un enzim quimèric, la qual cosa indicava molt probablement que aquests bacteris i aquests fags s'intercanviarien els enzims -i per suposat els seus gens- que, després, la selecció s'encarregaria de dur a bon port. Així, en algunes situacions, com passa en el cas del pneumococ, a l'enzim primigeni li suposa grans avantatges catalítiques adquirir aquesta regió d'unió a la colina, doncs li permetrà una unió més ferma al substrat i el podrà degradar millor.

L'aïllament i intercanvi de motius, probablement és un fenomen relativament freqüent. Allò que nosaltres observem és que els motius que donen el reconeixement existeixen com a restes o remanents (de l'anglès *remnants*). Quan un fag com el que estudiem s'integra en el genoma d'un bacteri, trobem situacions en les quals a part del gen que duu el bacteri per a *LytA*, existeix un gen *LytA* mutat que, quan s'integra el fag, genera una situació en la qual es troba un gen intacte i d'altres gens en els quals, per escissions

anteriors anormals de fags, es creen situacions en les quals aquests motius dels quals he estat parlant es poden mutar, canviar i millorar, i, en determinats moments, intercanviar amb veïns pròxims. En el laboratori, a partir de tots els enzims lítics dels quals disposem, hem pogut crear diversos enzims quimèrics. Modificant la regió limítrof entre la regió de reconeixement del substrat i la regió catalítica, hem introduït mutacions que faciliten recombinacions que donen lloc a gens lítics de sistemes bacterians separats de pneumococ, i obtenim enzims funcionals que fenotípicament són com un híbrid que exhibeix propietats característiques recombinants de les que tenien les cèl·lules parentals els gens que hem recombinat. Un altre grup del nostre laboratori va trobar resultats similars amb el fag CPL1, que posseeix una regió de reconeixement quasi idèntica a la que aquí es comenta.

Abans de concloure, m'agradaria citar telegràficament algunes altre relacions fag-bacteri. Una d'elles, d'evidència experimental indirecta, és un terme aparegut molt recentment, els *morons*, de l'anglès *more on* (*more on DNA* = més DNA). Aquesta teoria, postulada per Heindrich, ve a dir que els genomes dels fags s'han anat formant a través d'un fenomen d'acreció, i que això va passar originalment perquè un fragment de DNA d'un bacteri va mutar i va ser capaç de donar lloc a un cert tipus de proteïnes

que es reconeixen en un fag, com la *proteïna D*, que és la que permet l'ensamblatge del fag. Aquest fragment posteriorment atraparà molècules de DNA que es van anar incorporant per aquest sistema d'addició de morons. Aquesta és, però, una teoria molt recent i no demostrada. Emperò, quan s'analitzen els fags i es comparen amb d'altres, s'observa que hi ha uns gens que són d'adquisició recent, i que posseeixen una sèrie de característiques comunes. Una d'elles és que tenen el seu propi promotor i el seu propi terminador, i no són transposons, sinó que apareixen probablement per recombinació il·legítima, que és més abundant del què semblava –almenys en procariotes. Alguns d'aquests gens són interessantíssims i codifiquen per a proteïnes tan importants com les metilases, que confereixen un gran avantatge selectiu per als fags, doncs els confereixen resistència contra enzims de restricció.

Un altre exemple de relació fag-bacteri són les biopel·lícules. Els bacteris conreats en laboratori creixen en medis i condicions òptimes que possiblement estan molt lluny de ser les que aquests mateixos bacteris troben en l'ambient exterior. En l'ambient hi ha d'haver més limitacions a la proliferació. Possiblement en les pel·lícules existeixin també fags que permetin la difusió de determinats bacteris i en promocionin la formació de colònies, essent doncs un avantatge per a la seva proliferació.



**Rubens López** és llicenciat en Ciències Biològiques (1963) i Doctor en Ciències per la Universitat Complutense de Madrid el 1967.

És Professor d'Investigació des del 1989. Ha estat Visiting Associate Professor a la Universitat Rockefeller de Nova York (EE.UU). Director de cursos de doctorat en les càtedres de Microbiologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona (1975) i a

la Facultat de Farmàcia de la Universitat Complutense de Madrid (del 1980 al 1984). Cap del Departament de Microbiologia Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (CIB) des del 1987 fins l'actualitat. Ha estat Sots-director del CIB i Vicepresident de l'Associació de Personal Investigador del CSIC. És cap del laboratori de Genètica Bacteriana del CIB on treballa en *Streptococcus pneumoniae* (neumococ) i els seus bacteriòfags

Ha publicat més de 185 treballs científics en revistes i llibres internacionals i nacionals i és coautor de més de 150 Comunicacions en Congressos Nacionals i Internacionals, així com coeditor de 3 llibres.