

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Proceso de adsorción y liberación fágica en *Streptococcus pneumoniae* : caracterización de los receptores e identificación de una nueva lisina asociada al bacteriófago Dp-1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pedro Aurelio García González

Madrid, 2015

TP
1984
071

Pedro Aurelio García González



* 5 3 0 9 8 6 3 3 2 8 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-044227-1

PROCESO DE ADSORCION Y LIBERACION FAGICA EN STREPTOCOCCUS
PNEUMONIAE: CARACTERIZACION DE LOS RECEPTORES E IDENTIFICACION
DE UNA NUEVA LISINA ASOCIADA AL BACTERIOFAGO Dp-1

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1984



Colección Tesis Doctorales. Nº 71/84

© Pedro Aurelio García González
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-12017-1984

Autor: PEDRO AURELIO GARCIA GONZALEZ

PROCESO DE ADSORCION Y LIBERACION FAGICA EN
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: CARACTERIZACION DE
LOS RECEPTORES E IDENTIFICACION DE UNA NUEVA
LISINA ASOCIADA AL BACTERIOFAGO DP-1.

Director: Dr. Rubens López García
Investigador Científico del Instituto de
Inmunología y Biología Microbiana del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

1982

A Marisa

A mis Padres

El trabajo experimental que presento para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas ha sido realizado en el Instituto de Inmunología y Biología Microbiana del C.S.I.C., bajo la dirección del Dr. D. Rubens López García a quien deseo agradecer profundamente su inquietud y ayuda en la realización de este trabajo, así como por compartir su amistad y su entusiasmo por la Ciencia.

Por otra parte quiero expresar mi gratitud al Prof. Dr. Antonio Portolés, Director del citado Instituto, por las facilidades que me ha brindado para la realización de este proyecto, así como por sus valiosas aportaciones a la discusión de los experimentos realizados.

Asimismo quiero agradecer especialmente el apoyo y estímulo prestado por la Dra. Concepción Ronda y el Dr. Ernesto García, excelentes compañeros a los cuales debo parte de mi formación científica y el excelente espíritu de trabajo y compañerismo que acompañó la realización de la Tesis.

Al Dr. Enrique Méndez por sus útiles consejos durante la purificación del enzima.

Agradezco a D. Eloy Blanco su ayuda en las técnicas de microscopía electrónica y a D. Aurelio Hurtado por la preparación de los dibujos de este trabajo.

Mi agradecimiento al Dr. D. Angel Martín Municio por haber aceptado ser ponente del presente trabajo, así como por sus valiosas sugerencias.

-II-

Finalmente deseo agradecer a todos mis compañeros de laboratorio la ayuda que me han brindado.

El presente trabajo ha sido realizado durante el disfrute de una beca de la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid que agradezco públicamente.

ABREVIATURAS

CRP	:proteína C reactiva
EA	:etanolamina.
células EA:	células cultivadas en presencia de etanolamina
DEA	:N,N-dimetiletanolamina
MEA	:N-monetiletanolamina
LTA o Fag	:ácido lipoteicoico o antígeno de Forssman
DOC	:desoxicolato sódico
MIC	:concentración mínima inhibidora
MDI	:multiplicidad de infección
EDTA	:ácido etilen diamino tetracético
FUdR	:fluorodeoxiuridina
DNA	:ácido desoxirribonucleico
D	:dalton
ρ	:densidad
SDS	:dodecilsulfato sódico
PAL	: "Phage Associated Lysin"
DTT	:ditiotreitól
g	:aceleración de la gravedad
rpm	:revoluciones por minuto:
cpm	:cuentas por minuto
V_o	:volumen de exclusión cromatográfico
V_t	:volumen total de una columna
K	:kilobase
PEG	: polietilenglicol
2-ME	:2-mercaptoetanol
TEMED	:N,N,N',N' tetrametil etilén diamino

NOTAS ACLARATORIAS

Adsorción reversible e irreversible: aunque los términos Interacción Reversible e Irreversible sean conceptualmente más apropiados, desde el punto de vista químico, para designar los procesos de unión entre los bacteriófagos y las estructuras periféricas de la célula huésped, hemos preferido mantener los términos Adsorción Reversible e Irreversible, con los que se designa habitualmente a tales procesos en la literatura especializada.

PAL: en la literatura científica anglosajona es la abreviatura de las palabras "Phage Associated Lysin". Con este término se designa genéricamente a diversos enzimas líticos producidos durante el proceso de infección fágica, sin que ello implique necesariamente que el enzima esté físicamente asociado a la partícula fágica.

INDICE

INDICE

	<u>Pag.</u>
1. <u>INTRODUCCION</u>	
1.1. Generalidades	
1.2. Características generales de <u>Streptococcus pneumoniae</u>	
1.2.1. Clasificación	
1.2.2. Morfología	
1.2.3. Crecimiento	
1.2.4. Identificación de laboratorio	
1.2.5. Estructura y fisiología del neumococo	
1.2.5.1. Polisacáridos capsulares	
1.2.5.2. Pared celular	
1.2.5.2.1. El peptidoglicano	
1.2.5.2.2. Acido teicoico	
1.2.5.3. La membrana citoplásmica	
1.2.5.3.1. El antígeno de Forssman (ácido teicoico de membrana)	
1.2.5.3.2. El enzima autolítico de neumococo	
1.3. Bacteriófagos de <u>Streptococcus pneumoniae</u>	
1.3.1. Dp-1	
1.3.2. Dp-4	
1.3.3. Cp-1	
1.4. Receptores fágicos en bacterias Gram-positivas ...	
1.4.1. Introducción	
1.4.2. Acceso de los fagos al material receptor	

Pag.

1.4.3. Receptores asociados con flagelos	
1.4.4. Receptores asociados con la pared celular y la membrana plasmática	
1.4.4.1. Receptores en las capas proteicas super- ficiales	
1.4.4.2. Receptores asociados con el peptidoglicano y el ácido teicoico	
1.4.4.2.1. Estafilococos	
1.4.4.2.2. Bacilos	
1.4.4.3. Receptores asociados con el peptidoglicano y el polisacárido u otros componentes	
1.4.4.3.1. Lactobacilos	
1.4.4.3.2. Estreptococos	
1.4.5. Modelos de adsorción fágica	
1.5. Lisinas asociadas a fagos	
1.6. Objetivos	
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	
2.1. Bacterias	
2.2. Bacteriófagos	
2.3. Medios de cultivo	
2.4. Multiplicación bacteriana	
2.5. Purificación del bacteriófago Dp-1	
2.6. Cálculo de células viables y titulación de fago .	
2.7. Obtención de paredes y sus fracciones	
2.8. Obtención de protoplastos y membranas	

2.9. Obtención de ácido lipoteicoico	
2.10. Marcaje de paredes de <u>S. pneumoniae</u>	
2.11. Marcaje de proteínas	
2.12. Obtención de extractos crudos de células	
2.13. Conversión de la amidasa, de su forma E a la forma C, biológicamente activa	
2.14. Determinación de la actividad enzimática	
2.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida	
2.16. Valoración de proteínas	
2.17. Microscopía electrónica	
2.18. Preparación de antígenos	
2.19. Animales de experimentación	
2.20. Pauta de inmunización	
2.21. Otros anticuerpos empleados	
2.22. Inmunoprecipitación en gel de agar	
2.23. Inmunoelectroforesis en gel de agar	
2.24. Materiales y reactivos	
3. <u>RESULTADOS</u>	
3.1. Aislamiento y purificación de una lisina inducida por el bacteriófago Dp-1 en un mutante de <u>S.pneumo-</u> <u>niae</u> deficiente en autolisina	
3.1.1. Lisis de la estirpe salvaje de neumococo y de un mutante deficiente en autolisina por el bacterió- fago Dp-1	
3.1.2. Detección de actividad lítica en los lisados de cw-1	

Pag.

3.1.3. Síntesis de actividad lítica durante la infección fágica	
3.1.4. Estimulación de la actividad lítica por agentes reductores	
3.1.5. Purificación de la actividad lítica asociada al fago	
3.1.5.1. Preparación del lisado	
3.1.5.2. Precipitación con polietilenglicol	
3.1.5.3. Centrifugación en gradientes de cloruro de cesio	
3.1.5.4. Centrifugación a equilibrio en ClCs	
3.1.5.5. Cromatografía de filtración	
3.1.6. Papel de las partículas fágicas vacías en la actividad lítica	
3.1.7. Caracterización parcial de la actividad lítica purificada	
3.1.7.1. Peso molecular	
3.1.7.2. Efectos del pH y de la molaridad del tampón ..	
3.1.7.3. Efecto de las sales y de varios enzimas	
3.1.7.4. Cinética	
3.1.7.5. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la PAL	
3.1.8. Productos de degradación enzimática	
3.1.9. Requerimiento de colina para la actividad de la PAL	
3.2. Obtención de un antisuero frente a la PAL	

3.3. Influencia de la colina en la adsorción del bacteriófago Dp-1 a <u>S. pneumoniae</u>	
3.3.1. Efecto del aminoalcohol de la pared en la adsorción fágica	
3.3.2. Localización topográfica de los sitios de adsorción fágica por microscopía electrónica	
3.4. Caracterización de los receptores de <u>S. pneumoniae</u> implicados en la adsorción del bacteriófago Dp-1	
3.4.1. Capacidad de adsorción fágica de distintas fracciones subcelulares de <u>S. pneumoniae</u>	
3.4.2. Adsorción fágica a paredes aisladas	
3.4.3. Adsorción fágica a membranas aisladas	
3.4.4. Ensayos de competición entre paredes intactas y diferentes fracciones subcelulares de <u>S. pneumoniae</u> para la adsorción de Dp-1	
3.4.5. Ensayos de competición para la adsorción de Dp-1 entre paredes intactas de <u>S. pneumoniae</u> y diferentes moléculas que pueden formar parte de los receptores fágicos	
3.5. Estudios fisiológicos sobre la liberación de la progenie fágica en <u>S. pneumoniae</u> infectado por el bacteriófago Dp-1	
3.5.1. Papel de la PAL en la liberación del Dp-1.....	
3.5.2. Papel de la pared conteniendo colina en la liberación del Dp-1	
4. <u>DISCUSION</u>	
4.1. Adsorción del bacteriófago Dp-1 a <u>S. pneumoniae</u>	

Pag.

4.2. Purificación y caracterización de una PAL asociada al bacteriófago Dp-1 y su papel en la liberación de la progenie fágica	
5. <u>CONCLUSIONES</u>	
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades

Desde que Twort (1) y D'Hérelle (2) descubrieron los primeros bacteriófagos hasta la actualidad, son considerables los conocimientos acumulados sobre los virus bacterianos. No es preciso señalar la enorme contribución que han prestado estas partículas submicroscópicas en el espectacular desarrollo experimentado por la Biología Molecular. A pesar de lo mucho que esto significa por sí mismo como contribución a la Ciencia Básica, los fagos, una vez más, son en gran medida los "responsables" del impresionante esfuerzo científico que se está realizando en la actualidad para desarrollar esa rama de la Ciencia que se conoce como Biotecnología. No deja de resultar paradójico que la también denominada "Ingeniería Genética", que tantas implicaciones prácticas parece entrañar, tenga como punto de partida las observaciones ya históricas de Arber (3) sobre los fenómenos de restricción y modificación que se presentan durante el proceso de infección fágica, que parecían revestir un interés puramente básico.

A pesar de cuanto hemos señalado, aún en 1975 existían sistemas bacterianos de indudable importancia desde el punto de vista práctico e incluso histórico, dentro de la Genética Bacteriana, como son los casos de Streptococcus pneumoniae y Neisseria gonorrhoeae donde no se había aislado ningún bacteriófago. Limitándonos al caso de S. pneumoniae, en bacterias Gram-positivas los conocimientos sobre algunas etapas del proceso infectivo, como son la adsorción y la liberación de la progenie fágica se encuentran mucho menos desarrollados que en el caso de las bacterias

Gram-negativas. Asimismo, el estudio de la adsorción fágica podría aportar además de nuevos conocimientos sobre la naturaleza de los receptores situados en las envolturas bacterianas, datos sobre el mecanismo de incorporación de los componentes de la pared celular. Por otra parte, una mejor identificación del enzima o enzimas implicados en el proceso de liberación fágica podría, a su vez, contribuir a ampliar nuestros conocimientos sobre procesos donde, como se ha señalado anteriormente (4,5), se da un claro paralelismo biológico. Entre éstos se pueden citar el efecto bacteriolítico inducido por antibióticos beta-lactámicos en S.pneumoniae y la liberación fágica en la estirpe salvaje R36A de esta especie; en ambos procesos parece desempeñar un papel básico la autolisina (N-acetilmuramil-L-alanil amidasa) de la célula huésped.

El trabajo que desarrollamos en esta investigación, después de un amplio examen de los antecedentes bibliográficos relacionados con nuestro tema, se centra en tratar de aportar algunas respuestas a los interrogantes planteados en el párrafo anterior.

1.2. Características generales de Streptococcus pneumoniae

1.2.1. Clasificación

El neumococo, una bacteria Gram-positiva originariamente designada como Diplococcus pneumoniae, ha sido recientemente clasificado como Streptococcus pneumoniae (6) dentro de la familia de las Streptococcáceas.

La estrecha relación entre los neumococos y otros estreptococos se ilustra por las siguientes propiedades que comparten:

- a) Morfología: la división celular tiene lugar en un plano, dando lugar a cortas cadenas de cocos Gram-positivos (7).
- b) Metabolismo: la fermentación de la glucosa se verifica a través de la ruta de la glicolisis, produciendo ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético (heterofermentativa), esto es, son bacterias lácticas (6).
- c) Estructura antigénica: i) el carbohidrato-C especie-específico de los neumococos parece ser análogo (aunque antigénicamente diferente) al antígeno-C grupo-específico de los estreptococos (6, 7). ii) los antígenos-M de neumococo son proteínas tipo-específicas, que son similares a los antígenos tipo-específicos de los estreptococos del grupo A (8). Sin embargo, en contraste con los estreptococos que comparten mayor número de propiedades con los neumococos, los antígenos-M de neumococo no tienen propiedades antifagocíticas y los anticuerpos contra ellos no confieren protección frente a la neumonía (6, 7). iii) la subunidad peptídica del peptidoglicano de la pared celular es similar en los neumococos y en los estreptococos del grupo A (6, 9).

d) Transformación genética: la resistencia a drogas, el polisacárido capsular y otros marcadores genéticos han sido transferidos de unas especies a otras por medio de la transformación genética (10, 11, 12, 13).

e) Homología de ácidos nucleicos: el contenido en guanina-citosina (G + C) del DNA varía entre 33 y 44 moles por ciento tanto para los neumococos como para los restantes estreptococos (6). Además, usando técnicas de homología DNA-RNA se ha demostrado una relación genética entre los neumococos y los estreptococos de los grupos A y H (14).

1.2.2. Morfología

Los neumococos aislados de sus hábitats naturales son cocos pequeños, bacterias algo ovaladas con diámetros de 1,2-1,8 μm y una longitud de 0,5-1,0 μm (estas medidas varían algo con las condiciones de crecimiento), capsuladas, Gram-positivas, que se desarrollan aisladamente, por parejas o en cadenas cortas. No son móviles ni forman esporas. Todos los neumococos aislados del hombre son capsulados. Las estirpes no capsuladas se han aislado en el laboratorio durante el cultivo de estirpes capsuladas en presencia de anticuerpos anticapsulares específicos (15).

1.2.3. Crecimiento

Los neumococos tienen requerimientos nutricionales complejos y se han desarrollado medios químicamente definidos para su multiplicación (16). Crecen en una variedad de medios complejos derivados de extractos de carne o digeridos trópicos de semilla de soja (p. ejem. caldo infusión de corazón de vaca, tiogli

colato, caldo tripticasa de soja). Estos medios se caracterizan por: a) el medio no contiene glucosa, porque la glucosa se metaboliza a ácido láctico y el pH bajo es perjudicial para el micro organismo. Sin embargo, la adición de glucosa a una concentración final del 1% permite un incremento de 10 veces en la población bacteriana. Para conseguir esto, el ácido láctico formado tiene que ser neutralizado usando agentes alcalinos como sosa, bicarbonato ó carbonato. El crecimiento óptimo se alcanza a pH 7,6.

b) el medio contiene una fuente de catalasa, como sangre desfi-
brinada (conejo, carnero o humana). Los neumococos son anaerobios facultativos con una marcada tendencia a acumular peróxido de hidrógeno en cultivo: aerobio. Utilizan el oxígeno principalmente a través de un sistema enzimático con flavoproteína, y el producto final del metabolismo del oxígeno es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son incapaces de degradar (17, 18). Como el H_2O_2 es tóxico para los neumococos, el organismo no puede sobrevivir mucho tiempo en cultivos donde falte la catalasa.

Del 5 al 10% de las estirpes de neumococo requieren una concentración de CO_2 más alta que la atmosférica para desarrollarse sobre la superficie de medios sólidos, de aquí la con veniencia de incubar las placas de cultivo en un incubador con atmósfera de CO_2 .

El neumococo crece difusamente en medios líquidos sin formar películas en la superficie; en cultivos viejos los organismos pueden sedimentarse en el fondo del recipiente. En la superficie de medios sólidos, como agar sangre, las estirpes capsula-

das producen colonias redondeadas con bordes enteros, de aproximadamente 1 mm de diámetro, lisas (tipo S) y rodeado por una zona de alfa-hemolisis. En medios similares incubados en anaerobiosis, las colonias de neumococo están rodeadas por una zona de beta-hemolisis; esto es debido a la presencia de una hemolisina (oxígeno-lábil), análoga a las O-hemolisinas de estreptococos hemolíticos. Las colonias jóvenes tienen forma de cúpula o hemisféricas, pero según va envejeciendo el cultivo, la autólisis provoca el hundimiento de la porción central de la colonia, dando lugar a una depresión central rodeada de un borde elevado. Los neumococos no capsulados forman colonias más pequeñas, rugosas (tipo R), moderadamente granulares sobre la superficie de medios sólidos (19).

La temperatura óptima para el crecimiento es 37°C, y no crecen por debajo de 10°C o por encima de 45°C. El pH óptimo es 7,6 y la supervivencia es pobre fuera del rango de 7,0 a 7,8.

1.2.4. Identificación de laboratorio

Hay varias pruebas para la identificación de neumococos en el laboratorio:

a) Fermentación de inulina: la mayoría de las estirpes de neumococo fermentan la inulina. Sin embargo, la prueba no es específica, pues este hidrato de carbono es también fermentado por algunas especies de estreptococos, tales como S. salivarius y S. sanguis (19).

b) Prueba de la solubilidad biliar: los agentes tensoactivos tales como la bilis, sales biliares y dodecilsulfato sódico causan la lisis de los neumococos, como resultado de la activación

del enzima autolítico (20, 9). Este test debe llevarse a cabo con células vivas, a pH neutro, y en ausencia de concentraciones elevadas de proteína. El pH de esta reacción deberá ser neutro porque tanto el dodecilsulfato sódico como el desoxicolato sódico a pH ácido pueden dar un precipitado y por consiguiente un resultado falsamente positivo. Las proteínas en el medio pueden inhibir la reacción, probablemente por unirse al desoxicolato; por esta razón la prueba se lleva a cabo normalmente con una suspensión de células bacterianas en solución salina.

La mayoría de los neumococos se lisan rápidamente mientras la mayoría de los estreptococos alfa-hemolíticos no lo hacen. Sin embargo, algunas estirpes de estreptococos pueden mostrar una tendencia a la disolución en presencia de sales biliares. Por esta razón, la solubilidad biliar puede ser considerada como una prueba muy útil pero no rigurosa para la identificación de los neumococos.

c) Susceptibilidad a la optoquina: la diferencia de sensibilidad a la optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína) entre los neumococos y los estreptococos alfa-hemolíticos, es la base de esta prueba, que es muy utilizada para diferenciar estos dos grupos de organismos (21). La técnica se lleva a cabo empleando discos de papel de filtro a la manera utilizada para probar la susceptibilidad bacteriana a las drogas antimicrobianas. La optoquina tiene una actividad específica frente a los neumococos (21, 22), actuando como bacteriostática a una concentración de 1:100.000 (23). Los otros α -estreptococos requieren una concentración de 1:5000

(o mayor) para ser inhibidos (23). Por consiguiente, la prueba se lleva a cabo con un disco de papel de 6 mm impregnado con 0,02 ml de una disolución acuosa 1:4000 del reactivo. El disco se coloca en una placa de agar sangre inoculada con un cultivo puro del organismo. La incubación debería llevarse a cabo en ausencia de CO₂, porque la zona de inhibición se reduce en estas condiciones.

d) Identificación serológica: el método más simple, más rápido y más exacto para identificar los neumococos presentes en muestras biológicas o en cultivos es la prueba serológica conocida como "reacción de hinchamiento capsular". La prueba se lleva a cabo mezclando sobre el asa de platino la suspensión bacteriana con anticuerpo anticapsular específico; para que las bacterias se hagan más fácilmente visibles el antisuero se mezcla normalmente con una solución al 1% de azul de metileno. El examen microscópico muestra a los neumococos rodeados por una gran cápsula. La apariencia capsular es debida a una combinación entre la cápsula hinchada y la mayor refracción del precipitado formado cuando el anticuerpo reacciona con el polisacárido capsular sobre la superficie de la célula. Los antisueros reaccionantes con todos los 84 polisacáridos capsulares de neumococo pueden obtenerse del Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca. A causa del gran número de tipos individuales de neumococo, el tipado se lleva a cabo mejor en tres etapas: en primer lugar, usando un antisuero polivalente altamente concentrado denominado "omnisuero" (24), que reacciona con todos los tipos capsulares de neumococo y es el reactivo más útil para el pronto reconocimiento de los neumococos con inde-

pendencia del tipo capsular. En segundo lugar, la "reacción de hinchamiento capsular" se repite con diferentes mezclas de anticuerpos, cada una conteniendo anticuerpos frente a 7 a 11 tipos, hasta que se encuentra una reacción positiva. Finalmente se prueban individualmente los anticuerpos de la mezcla que resulte positiva en el segundo test, hasta que se pueda identificar una reacción tipo-específica.

e) Inoculación en animales: el ratón albino es extraordinariamente sensible a la infección con muchos tipos de neumococo cuando se inoculan por vía intraperitoneal. En algunos casos, una única unidad formadora de colonia es suficiente para causar una infección letal. Como el ratón eliminará normalmente otras bacterias presentes en el cuerpo antes de morir a causa de la infección neumocócica, es posible aislar los mismos en cultivo puro a partir de la sangre de un animal infectado por vía intraperitoneal. El animal muere normalmente al cabo de 96 horas de ser inoculado.

Tan pronto como el animal muere se hacen cultivos de la sangre extraída del corazón y del líquido peritoneal, así como tinciones de Gram y "reacciones de hinchamiento capsular" para la identificación de los aislamientos.

1.2.5. Estructura y fisiología del neumococo

Una sección transversal esquemática (Figura 1) de la célula de neumococo muestra:

- a) El polisacárido capsular
- b) La pared celular
- c) La membrana citoplásmica

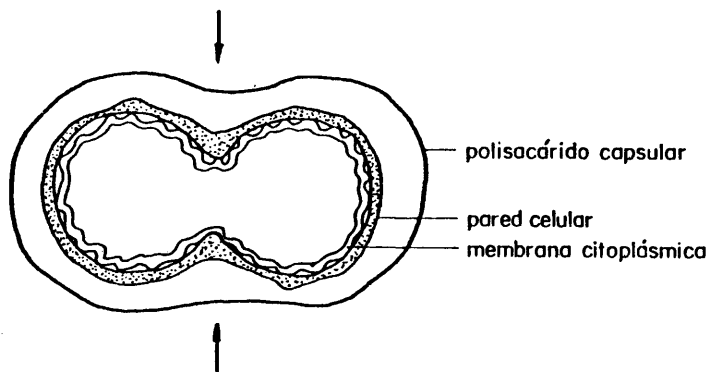


Figura 1.- Sección transversal esquemática de *S. pneumoniae* durante la división. Las flechas indican el plano de división.

Vamos a examinar con cierto detalle algunas propiedades estructurales y fisiológicas de cada uno de estos componentes.

1.2.5.1. Polisacáridos capsulares

Las cápsulas de los neumococos se componen de grandes polímeros de monosacáridos que forman geles hidrofílicos sobre la superficie de los organismos. Aunque la composición de muchos de estos carbohidratos capsulares es conocida, solo han sido definitivamente determinadas las estructuras de unos pocos (p. ejem. los tipos 3, 6 y 8). El tipo 3 por ejemplo, consiste en unidades repetitivas de ácido celobiurónico, es decir D-glucuronil- β (1 \rightarrow 4) D-glucosa β 1 \rightarrow 3 (25). Los polisacáridos de neumococo exhiben un extraordinario grado de especificidad.

Sin embargo, se han descrito reacciones cruzadas con :

a) antígenos capsulares de otros tipos de neumococo (p. ejem. tipos 3 y 8; tipos 2 y 5; tipos 7 y 18; y tipos 15 y 30); b) polisacáridos de otras especies bacterianas, como Escherichia coli, Salmonella sp, Klebsiella pneumoniae y Haemophilus influenzae tipo b; y c) isoantígenos humanos del grupo sanguíneo ABO. La reacción cruzada con sustancias A, B, H y Le está relacionada probablemente con la N-acetil-D-glucosamina que es el grupo terminal común compartido por estos polisacáridos (26). La hemólisis que se ha observado en pacientes con infecciones del tipo 14 puede estar relacionada con esta antigenicidad compartida.

Las cápsulas tienden a hacerse más grandes durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la síntesis del polisa-

cárido es máxima. En fases más tardías, llegan a ser más pequeñas debido a la difusión del polisacárido en el medio circundante. Los polisacáridos capsulares tipo-específicos liberados al medio por los neumococos en crecimiento poseen una toxicidad relativamente escasa pero son sin embargo importantes en la patogénesis pues neutralizan los anticuerpos antes de que éstos tengan oportunidad de unirse a los neumococos que invaden los tejidos. La glucosa estimula la producción capsular y los polisacáridos capsulares pueden detectarse por aglutinación, por precipitación y por la "reacción de hinchamiento capsular". Asimismo, pueden también detectarse en sangre, líquido cefalorraquídeo y orina por "contrainmunolectroforesis" (27).

Mediante el empleo de estos polisacáridos capsulares inmunológicamente distintos, se han identificado 84 tipos de neumococos. Austrian ha demostrado que solo 14 de ellos son responsables de más del 80% de todas las infecciones neumocócicas en Estados Unidos y Europa (28). Los serotipos más comunes asociados con enfermedades neumocócicas infantiles son el 1, 3, 6A, 14, 19F y 23F según la nomenclatura danesa. Ciertos tipos de neumococo son más virulentos que otros; entre los primeros se encuentran los pertenecientes a los tipos 1, 2, 3, 4 7A, 8, 12F y 14.

El polisacárido capsular es considerado como el responsable de la patogenicidad de los neumococos. Aunque el polisacárido en sí mismo no es tóxico para el hombre, la capsula protege a las bacterias de la fagocitosis, por un mecanismo desconocido, y es esencial para su virulencia. Solo las cepas lisas, capsuladas son patógenas pa

ra el hombre; y la virulencia, para un serotipo dado está relacionada con el tamaño de la cápsula. Los neumococos de diferentes tipos, con el mismo tamaño de cápsula, varían grandemente en su virulencia. Los neumococos rugosos (tipo R), no capsulados, incluso a dosis relativamente altas de inóculo, no son patógenos y son fagocitados rápidamente.

La inmunización mediante el empleo de polisacáridos capsulares protege contra la infección subsecuente por el tipo homólogo, y esta es la base para la preparación de la vacuna de neumococo recientemente comercializada (Neumovac) (29).

Los cultivos de neumococos capsulados generan variantes no capsuladas a una tasa baja pero definida. Cuando tales cultivos se multiplican en presencia de antisuero homólogo tipo-específico, las células S capsuladas se aglutinan y los mutantes espontáneos R adquieren así una ventaja selectiva. Después de varios pases en dicho medio la mayoría de las células recuperadas estarán desprovistas de cápsulas y habrán perdido por consiguiente tanto su especificidad tipo como su virulencia. Usando esta técnica, Colin MacLeod obtuvo la estirpe rugosa R36A (30) que es el neumococo tipo salvaje usado en nuestro laboratorio. Los mutantes R también tienden a seleccionarse cuando las células S se subcultivan repetidamente en agar sangre.

Por el contrario, en cultivos de neumococos R algunas células revierten a tipo S. Si el suero anti-R está presente en el medio las células S se ven selectivamente favorecidas, y en subcultivos subsiguientes reemplazarán a las células R. Cuando los

neumococos R se inyectan a un ratón blanco, los mutantes S adquieren mayor ventaja selectiva, pues los fagocitos del huésped destruyen rápidamente las células no capsuladas pero no las capsuladas, que continúan multiplicándose y eventualmente matan al huésped. Los tejidos del ratón vivo proporcionan un medio de cultivo altamente selectivo. Este principio sirve de base al método convencional de mantenimiento de la máxima virulencia de cultivos de neumococo inyectándolos en ratones a intervalos frecuentes.

1.2.5.2. Pared celular

Las paredes celulares de neumococo pueden aislarse por métodos convencionales siempre que se tomen las precauciones necesarias para bloquear la actividad de la poderosa mureína-hidrolasa (autolisina) presente en S. pneumoniae. Esta pared contiene dos componentes macromoleculares mayoritarios:

- i) peptidoglicanos
- ii) ácido teicoicos

1.2.5.2.1. El peptidoglicano: la base estructural de la pared de S. pneumoniae la constituye el peptidoglicano, que consta de residuos alternantes, unidos por enlaces β 1,4, de N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos) y ácido N-acetil-murámico (2-acetamido-3-O-(D-1-carboxietil)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos) (9, 31). Cada residuo de murámico se une covalentemente, a través de su grupo carboxilo, a subunidades de tetrapéptidos, que a su vez parecen entrecruzarse al menos hasta formar dímeros y trímeros (9). Los aminoácidos presentes, en la pared de neumococo son: L-alanina, D-isoglutámico, L-lisina y D-alanina. La

razón molar de lisina y ácido glutámico a glucosamina o ácido murámico se ha comprobado que era siempre mayor que 1 (y la razón molar de alanina a glucosamina o ácido murámico era siempre mayor que 2). Sobre la base de esta observación, se ha sugerido que la murefina de neumococo puede pertenecer al tipo III (32). Sin embargo, no hay evidencia directa para esto, y las cadenas peptídicas laterales pueden estar entrecruzadas por péptidos que contengan aminoácidos adicionales; así cantidades pequeñas pero significativas de serina y glicina están presentes continuamente en preparaciones purificadas en paredes.

La figura 2 representa esquemáticamente la estructura química de la pared celular de neumococo. Debemos señalar que muchos aspectos de este esquema son hipotéticos; así se carece de información no solo sobre la naturaleza de los puentes interpeptídicos, sino también sobre la secuencia, estereoquímica, y posible amidación de los residuos aminoácidos dicarboxílicos. También se desconoce el grado de entrecruzamiento, la longitud media de las cadenas glicánicas y el ácido teicoico, la frecuencia de los residuos libres de ácido murámico, y los sitios y la naturaleza química de la unión de las unidades de ácido teicoico a la cadena glicánica.

Además de los componentes clásicos de la pared celular, no se puede excluir la presencia ocasional o invariable de componentes adicionales funcionalmente importantes. Por ejemplo las pequeñas cantidades de fenilalanina, leucina y otros aminoácidos que habitualmente no se encuentran en la pared parecen indicar la

16.618

Figura 2.-Modelo esquemático de la estructura de la pared celular de Streptococcus pneumoniae. Las cadenas glicánicas se representan por las letras G-M-GM, que indican los residuos de N-acetilglucosamina (G) y ácido N-acetilmurámico (M). Las cadenas laterales peptídicas se representan en el diagrama por trazos verticales (|) interconectadas por uniones transpeptídicas. La secuencia propuesta de aminoácidos de los péptidos se indica en símbolos (ala-glu-lys-ala) en el lado izquierdo del diagrama. El ácido teicoico de pared que contiene colina se simboliza por el rectángulo grande, y la posible estructura química (45) se indica dentro del rectángulo (arriba a la izquierda). Los números se refieren a los distintos procedimientos, más o menos selectivos, que pueden usarse para separar la pared celular en sus componentes macromoleculares: 1= ácido nitroso; 2= ácido tricloroacético frío; 3= metaperyodato sódico; 4= hidróxido sódico o ácido clorhídrico y 5= formamida caliente. La flecha número 6 (arriba a la izquierda) señala el residuo de fosforilcolina que está unido por un enlace éster al carbono 6 de N-acetilgalactosamina. Los triángulos negros señalan el enlace que rompe la amidasa de neumococo entre los residuos N-terminal de L-alanina y el ácido N-acetilmurámico. Los triángulos blancos señalan el enlace glicosídico sensible a la acción de la muramidasa de Charalopsis (33). El número I en círculo (arriba a la derecha) indica los complejos glicano-ácido teicoico de alto peso molecular; II en círculo (en el centro a la derecha) representa los productos peptídicos de bajo peso molecular de la hidrólisis por la amidasa de neumococo. El número 1 en círculo (abajo a la izquierda) indica la posible estructura de los productos de alto peso molecular de la hidrólisis por la muramidasa; el número 2 en círculo simboliza el monómero y oligómero del disacárido-péptido. [Tomado de (219)].

presencia de alguna proteína unida a la mureína. Quizás la figura 2 ofrece un mayor interés experimental si tenemos en cuenta que resume los procedimientos experimentales mediante los cuales se puede fraccionar -de una manera más o menos selectiva- la pared celular de neumococo en sus componentes macromoleculares. El mecanismo preciso de cada uno de estos métodos no se conoce con exactitud, y la extracción selectiva de los ácidos teicoicos por peryodato, álcali suave o ácido y formamida caliente conducen a varios grados de degradación del ácido teicoico. La extracción de los componentes del ácido teicoico por estos métodos no es siempre cuantitativa. Durante la lisis de neumococos inducida por desoxicolato y durante la disolución de paredes celulares purificadas de S. pneumoniae por autolisina aislada de neumococos, las paredes celulares se degradan vía hidrólisis de los enlaces amídicos entre los grupos carboxilo del ácido murámico y el grupo amino de la alanina N-terminal de las cadenas peptídicas laterales (9). Tales hidrolizados pueden fraccionarse pudiendo detectarse complejos de glicano-ácido teicoico de alto peso molecular y monómeros y oligómeros entrecruzados por la malla peptídica de la mureína (Figura 2). Por otra parte, la hidrólisis de paredes celulares de neumococo por la muramidasa de Charalopsis (33) da lugar a dos fracciones mayoritarias que contienen péptidos: un material de alto peso molecular conteniendo más del 90% del ácido teicoico de la pared y aproximadamente un 30% del material peptídico total y una fracción de menor peso molecular conteniendo un 70% del material peptídico y solo un 10% del ácido teicoico (figura 2). Esta última fracción puede ser separada posteriormente en otras tres de distinto tamaño

que representan, presumiblemente, monómeros disacáridos-tetrapéptidos, bis-disacárido-tetrapéptido, y oligómeros mayores de unidades entrecruzadas de disacáridopéptido (figura 2) (33).

1.2.5.2.2. Acido teicoico: Los ácidos teicoicos son polímeros que contienen aldol fosfatos, que son componentes mayoritarios de la envuelta celular de las bacterias Gram-positivas. Se ha demostrado su participación en una variedad de fenómenos fisiológicos en varias especies bacterianas: a) como receptores fágicos (34, 35, 36); b) como determinantes antigénicos (37); c) como modificadores de la sensibilidad celular a los agentes líticos de membrana (38); d) en el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de ión magnesio en la superficie celular, pues son los polímeros poliariónicos más fuertemente cargados en la superficie de las bacterias Gram-positivas, y proporcionan carga superficial a estas células (39); e) como activadores de la ruta alternativa del complemento (40).

Los neumococos tienen un requerimiento nutricional absoluto por la colina, y la eliminación de esta sustancia del medio de cultivo provoca la detención de la multiplicación celular (41, 42). Esta dependencia de la colina, condujo al descubrimiento de que los ácidos teicoicos presentes en la pared celular de los neumococos, contienen colina. El 85% de la colina de la célula está como constituyente del ácido teicoico (carbohidrato C, antígeno C) (9, 43); el 15% restante está en el antígeno de Forssman (antígeno F, ácido teicoico de membrana) localizado en la membrana plasmática (44).

Si se observa la figura 2 queda claro que las preparaciones de polisacárido C pueden diferir significativamente en composición química dependiendo del procedimiento que se haya usado para producir el material. La extracción con ácido tricloroacético frío (45) o formamida caliente producirían ácido teicoico más o menos degradado, virtualmente libre de péptidos o material mureínico. En contraste, los procedimientos basados en hidrólisis enzimática (p. ejem. lisis celular inducida por desoxicolato) dan lugar a ácido teicoico de alto peso molecular unido a cadenas glicánicas de la mureína (I en la figura 2). Además, tales preparaciones pueden contener también cantidades variables de material peptídico, originados por una acción incompleta de la autolisina. Los antisueros producidos contra tales antígenos de polisacárido C pueden contener más de una clase de anticuerpos, algunos dirigidos contra el ácido teicoico y otros contra porciones del material peptídico (46). Esta aparente confusión puede subsanarse recordando que "polisacárido C" es un término inmunológico, mientras que "ácido teicoico de pared de neumococo" se refiere a una entidad bioquímica definida.

El componente colina-fosfato del ácido teicoico de pared de neumococo es responsable también de otras dos reacciones inmunológicas interesantes: la interacción de los neumococos con la proteína C-reactiva (47) y la aglutinación de los neumococos por ciertas proteínas de mieloma (48).

La sustancia C de neumococo es un ácido teicoico complejo de pared celular, cuyas subunidades repetitivas contienen coli

na, fosfato, glucosa, N-acetil-galactosamina, y una diaminotri-de-soxihexosa, unida por residuos ribitol fosfato (26, 44). Se han propuesto varias estructuras para este ácido teicoico. En uno de los modelos, como se muestra en la figura 2, las unidades de N-acetil-galactosamil se unen glicosídicamente a la posición 2 del D-ribitol, y se sustituyen en sus grupos 3-hidroxilo con colina fosfato. No todos los residuos de N-acetil-galactosamil están sustituidos por colina fosfato; esto está de acuerdo con la observación de que antisueros preparados contra la sustancia C producen reacción cruzada con el polisacárido capsular del tipo 4 de neumococo del que se han eliminado los sustituyentes piruvilo (49); la reacción cruzada se ha atribuido a múltiples residuos de N-acetil-galactosamira con el carbohidrato del tipo 4 lo que sugiere la presencia de tales residuos carentes de sustituyentes en el ácido teicoico C. Resultados recientes parecen confirmar que la colina fosfato está unida a los residuos N-acetil-galactosamina a través de la posición 6 (45).

Se ha sugerido que todos los ácidos teicoicos que contienen ribitol se unen a las cadenas glicánicas del peptidoglicano, vía un trímero de 1,3-glicerol-fosfato unido a la posición 6 del residuo del ácido N-acetil-murámico (50), como se ve en la figura 2. Este tipo de unión se ha demostrado para Staphylococcus aureus H (51) y otras bacterias Gram-positivas. Sin embargo, no se conocen los sitios y la naturaleza química de la unión de las unidades de ácidos teicoicos a la cadena glicánica en neumococo.

La sustancia C da un precipitado con una proteína (proteína C reactiva) que aparece en el suero humano y en el de cone-

jo durante infecciones agudas y procesos inflamatorios de varios orígenes (52, 53). La proteína C reactiva (CRP) no es un anticuerpo, sino una β -globulina que aparece rápidamente en el suero de los animales infectados, aumenta durante la reacción inflamatoria, persiste solo durante la actividad de la lesión y desaparece durante la convalecencia. Las concentraciones en suero de CRP aumentan marcadamente en las primeras 24 horas después de la infección neumocócica (54). La interacción de CRP con el carbohidrato de neumococo puede iniciar la fijación del factor C1 y la activación de la vía clásica del complemento (55), lo que conduce a la fagocitosis del complejo (56). En experimentos llevados a cabo usando CRP humana altamente purificada, la activación de la vía clásica del complemento recuerda mucho lo que producen los complejos inmunes compuestos de polisacáridos C y anticuerpo contra la sustancia C (57). Es posible, entonces, que la CRP pudiera iniciar la opsonización a través de la vía clásica del complemento; sin embargo, no está demostrado el papel protector "in vivo" de esta interacción.

El requerimiento nutricional de los neumococos por la colina, puede satisfacerse mediante el empleo de análogos estructurales como la etanolamina, N-metilamino etanolamina, o N,N dimetilamino-etanolamina y otra serie de aminoalcoholes (58) algunas de cuyas estructuras se muestran en la figura 3. Sin embargo, los neumococos son incapaces de llevar a cabo la metilación de la etanolamina en los ácidos teicoicos, cultivando los neumococos en un medio conteniendo etanolamina en lugar de colina (58). Esta sustitución de la colina por la etanolamina (EA) en la pared celular trae consigo varias alteraciones fisiológicas (58):

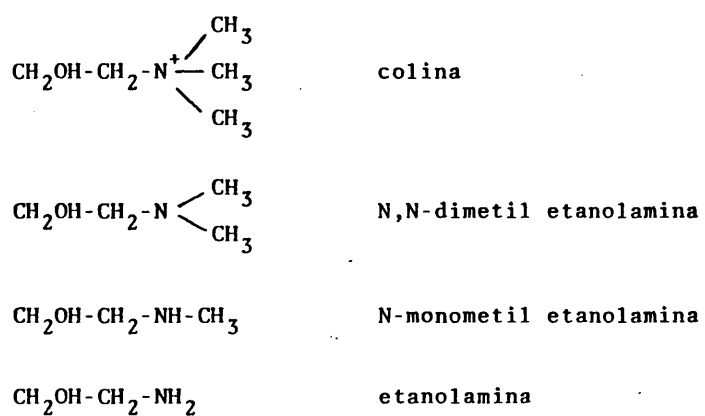


Figura 3.- Estructura química de algunos aminoalcoholes que pueden formar parte de los ácidos teicoicos de S. pneumoniae.

- a) La no separación de las células hijas después de la división celular, de manera que las células EA forman largas cadenas, cuyo tamaño va paralelo con la multiplicación alcanzando el tamaño de varios cientos de cocos por cadena en la fase estacionaria.
- b) Resistencia a la lisis, incluyendo: lisis en la fase estacionaria, lisis por adición exógena de la autolisina extraída del tipo salvaje, lisis inducida por detergentes, y lisis por antibióticos bacteriolíticos no relacionados químicamente.
- c) Incapacidad de adquirir el estado de "competencia" para la transformación genética, debido probablemente a la incapacidad de las bacterias de reaccionar con la sustancia activadora de la competencia (una proteína que puede inducir el estado de competencia en este organismo).
- d) Inhibición de la adsorción de ciertos bacteriófagos.

Todas estas propiedades son consecuencia de dos defectos primarios de los neumococos multiplicados en presencia de etanolamina:

- a) Las paredes celulares de las células EA son totalmente resistentes a la actividad degradativa de la amidasa autolítica de neumococo (9). Esta resistencia no es debida a alteraciones en la composición química (si se exceptúa la presencia de etanolamina en lugar de colina) o en la estructura de la pared celular, pues se ha demostrado que las paredes celulares que contienen etanolamina o colina dan origen a los mismos tipos de productos de digestión cuando se tratan con la muramidasa de Charalopsis (9). Además, la conversión de los residuos de etanolamina en colina, por metila-

ción con yoduro de metilo, sensibiliza de nuevo a la pared celular frente a la amidasa; esto indica que, por lo que se refiere a la susceptibilidad a la amidasa, la única diferencia relevante entre las paredes celulares con etanolamina y con colina es el componente amino-alcohólico (33).

b) Las células EA contienen un enzima autolítico de bajo peso molecular ($3,5 \times 10^4 D$) enzimáticamente inactivo (forma E), que puede convertirse en el enzima normal, de alto peso molecular ($1,3 \times 10^6$), catalíticamente activo (forma C) incubando a baja temperatura la forma E con paredes que contienen colina, en una reacción "in vitro" (59).

Todas las propiedades anómalas mostradas por las células EA desaparecen mediante la adición de colina a los cultivos de neumococo que contienen etanolamina, para lo cual basta que el cultivo esté en multiplicación activa para permitir que tenga lugar la incorporación celular de la colina (58). Después de la adición de colina al medio de crecimiento, los neumococos comienzan la biosíntesis de compuestos fosforilados que parecen ser los precursores metabólicos de la colina que se integra en los complejos macromoleculares que forman parte del ácido teicoico (60). El mecanismo de este cambio a la utilización de la colina no es conocido en la actualidad. A continuación, las unidades nacientes de ácido teicoico que contienen colina se unen a unidades de peptidoglicano sintetizadas al mismo tiempo (61) y estos complejos se incorporan a la pared celular exclusivamente en la región ecuatorial de la misma (62).

La aparición de unidades de pared que contienen colina tiene dos consecuencias bioquímicas importantes:

a) La región ecuatorial de la pared celular de neumococo se vuelve sensible a la autolisina, y

b) la autolisina tipo C, catalíticamente activa, reaparece en la célula (ya sea a través de síntesis "de novo" o por conversión "in vivo" de la autolisina tipo E inactiva de las células EA a la forma C activa).

A los 10 minutos de la adición de colina al medio, reaparece la sensibilidad a la lisis inducida por detergentes. Si se añade la autolisina tipo C a tales bacterias, bajo ciertas condiciones, se digiere, selectivamente, la región ecuatorial provocando la "rotura" de la pared celular en dos hemisferios que contienen etanolamina (63). La capacidad de adquirir el estado de "competencia" para la transformación genética por exposición a la proteína activadora se desarrolla pocos minutos después de la adición de colina; sin embargo, la desaparición de las largas cadenas que forman las células EA a otras más cortas característico de las bacterias incubadas en presencia de colina, solo se completa después de un período de tiempo comprendido entre 5 y 6 horas. La formación de cadenas por los neumococos que se multiplican en etanolamina sugiere que un paso tardío o terminal en la separación de las células hijas durante la división celular puede implicar la acción de la autolisina sobre el sustrato endógeno de la pared celular. El hecho de que la rotura de las cadenas ocurra gradualmente y de forma más lenta que la rápida reaparición de la sensibilidad a la lisis, indica posiblemente que la separación física de las células hijas puede ocurrir solo en septos que fueron iniciados después de la adición de colina, esto es que contengan exclusivamente áci

dos teicoicos con colina (58).

Una de las principales conclusiones que se deduce de cuanto acabamos de exponer es que los ácidos teicoicos ejercen sus efectos fisiológicos a través de la modulación de la actividad autolítica. La amidasa de neumococo requiere una interacción con los residuos de colina del ácido teicoico para su actividad catalítica, esto es, la autolisina reconoce específicamente los residuos de colina en el ácido teicoico además del enlace amídico muramil-alanina en el peptidoglicano. El hecho de que las paredes de las células EA sean inactivas en la conversión "in vitro" del enzima tipo E al enzima tipo C indica que la interacción entre la amidasa y el ácido teicoico que contiene colina es importante, no solo para la actividad hidrolítica del enzima, sino también para la conversión de la forma inactiva de la amidasa (forma E, presente en las células obtenidas con etanolamina) a la forma activa (forma C, presente en los neumococos obtenidos en presencia de colina). Se ha sugerido que las moléculas de forma E se agregan para dar origen a la forma C, activa sobre la superficie de la pared celular, mientras interacciona de alguna manera, con ácidos teicoicos que contienen colina. Durante esta conversión un polisacárido, que contiene ácido teicoico y glicano, pero no la cadena lateral de la mureína, llega a asociarse con el enzima y se ha sugerido que esta asociación contribuye a la estabilidad de la forma C (59). Como en los neumococos obtenidos en presencia de colina hay pequeñas cantidades de enzima E, se ha propuesto que la autolisina en su forma E puede representar un precursor biosintético normal pero inactivo de enzima autolítico. La activación de este

pre-enzima puede ocurrir en una etapa post-ribosomal en la superficie celular vía interacción con los ácidos teicoicos que contienen colina.

1.2.5.3. La membrana citoplásmica

Las membranas plasmáticas de neumococos se preparan normalmente por digestión de las células con autolisina purificada de neumococo en presencia de tampón que contiene sacarosa al 20% seguido de la rotura en medios hipotónicos, lavados, y sedimentación en una ultracentrífuga. La sedimentación de tales preparaciones de membranas a través de gradientes de sacarosa del 10 al 60% según el método de Popkin y colaboradores (64) da lugar a dos fracciones. La fracción de menor densidad contiene vesículas membranosas de apariencia similar a las vesículas mesosomales de las membranas fraccionadas de estafilococos descritas por Popkin y colaboradores.

Vamos ahora a analizar con cierto detalle dos compuestos importantes de la membrana citoplásmica de neumococo como son:

- i) el antígeno de Forssman (ácido lipoteicoico o LTA).
- ii) el enzima autolítico (N-acetilmuramil-L-alanil amidasa), que también está presente en el citoplasma.

1.2.5.3.1. El antígeno de Forssman (ácido teicoico de membrana).

En general, los ácidos teicoicos de membrana (ácidos lipoteicoicos o LTAs) contienen una cadena lineal de 25 a 30 residuos de glicerol fosfato unidos covalentemente a un glicolípido, (figura 4), y están ampliamente extendidos como componentes asociados a membrana en bacterias Gram-positivas (65,66). La parte lipídica de estos ácidos lipoteicoicos se sitúa, posiblemente, en

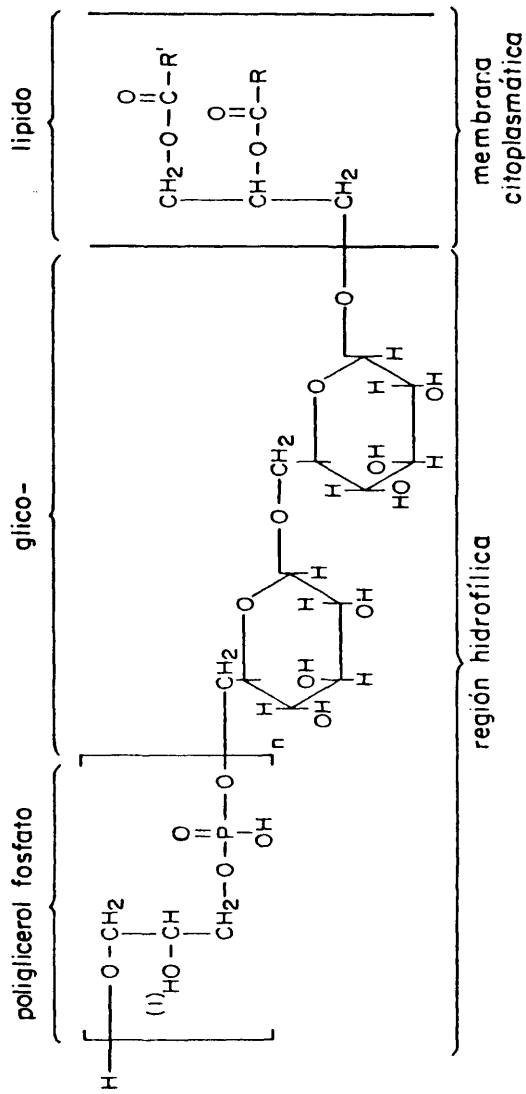


Figura 4.- Estructura general de los ácidos teicoicos de membrana.

(1) Los grupos -OH pueden ser:

- (a) todos glicosilados como en los estreptococos del grupo D donde la D-alanina se une también al residuo de azúcar.
- (b) poco glicosilados como en lactobacilos.
- (c) no glicosilados.

la capa más externa de la membrana citoplásmica, mientras la porción hidrofílica se proyecta hacia afuera. Una característica general de estos ácidos lipoteicoicos es que se intercalan dentro de la matriz de la pared, jugando un papel básico en el control de la actividad autolítica en varios sistemas bacterianos (67, 68), y que, cuando llevan determinantes antigénicos, son accesibles desde fuera. Los ácidos lipoteicoicos se han identificado como cofactores esenciales en la biosíntesis de la pared celular (69) y como agentes responsables de la adherencia bacteriana (70).

El antígeno de Forssman de neumococo (antígeno F, ácido lipoteicoico, LTA) es único en el sentido de que no contiene glicerol y su estructura es similar a la del antígeno C (un ácido teicoico de pared que contiene ribitol) (44), con el que tiene reacción cruzada (71). Sin embargo, los dos polisacáridos son diferentes en varios aspectos: 1) el ácido teicoico de pared (antígeno C) no contiene residuos lipídicos, mientras el antígeno F contiene lípidos unidos covalentemente (el 6,5% en peso son ácidos grasos); 2) el ácido teicoico de pared es el portador del determinante antigénico específico C de la bacteria, mientras el antígeno F, incluso aunque tenga reacción cruzada con el antígeno C, es el único responsable del determinante de Forssman en el neumococo. El antígeno de Forssman representa un grupo general de antígenos con reacción cruzada entre sí que tienen la propiedad común de inducir, en conejos, la formación de anticuerpos reactivos con hemáties de carnero. Está ampliamente distribuido en tejidos de mamíferos (72, 73) y en neumococo el ácido lipoteicoico lleva este determinante antigénico; 3) el carbohidrato C se localiza en la pa-

red celular, comprendiendo entre el 40 y el 50% de su peso seco, y está unido covalentemente al peptidoglicano; el antígeno F se asocia con la membrana plasmática, pero es accesible desde el exterior pues se intercala con la matriz de la pared celular; 4) el antígeno F está presente en la célula en mucha menor cantidad que el ácido teicoico (aproximadamente una décima parte) (44).

El ácido teicoico de membrana de neumococo es un fuerte inhibidor del enzima autolítico, inhibiendo no solamente la activación "in vitro" de este enzima (conversión de la forma E en C) sino también la actividad catalítica de la amidasa activada (forma C). Asimismo, se ha sugerido que la inhibición del enzima por el antígeno de Forssman ocurre también "in vivo"; así en experimentos en los que el antígeno de Forssman se añade a cultivos de neumococos (48, 67) se ha observado:

- 1) formación de cadenas por inhibición de la separación de las células hijas después de la división celular.
- 2) resistencia a la lisis inducida por penicilina.
- 3) resistencia a la lisis en la fase estacionaria.
- 4) protección frente a la lisis inducida por fagos.

Todas estas propiedades son típicas de neumococos en los que se ha inhibido la actividad endógena de la amidasa autolítica.

Parece, por tanto, que las moléculas del antígeno de Forssman o Fag pueden penetrar a través de la superficie bacteriana de alguna manera e inhibir el sistema autolítico. Alternativamente, se ha sugerido recientemente la posibilidad de que las autolisinas que intervienen en todos estos procesos se localicen en la super-

ficie externa de los neumococos (74).

Dos hechos adicionales hacen al ácido lipoteicoico un buen candidato al papel de inhibidor endógeno de la autolisina: a) su localización en la superficie más externa de la membrana plasmática (44), en un área en la que es muy probable que estén situadas las moléculas de autolisina; y b) la similitud estructural con el ácido teicoico de la pared celular, pues el enzima autolítico se sabe que reconoce específicamente los ácidos teicoicos homólogos que contienen colina de la pared celular (33).

Del 85 al 90% de la colina celular forma parte del ácido teicoico de pared, y el resto, del 10 al 15%, está presente en el antígeno F (9, 44). La capacidad de los neumococos para obtener una respuesta heterófila es independiente del amino-alcohol constituyente de las células, lo que sugiere que los residuos amino-alcohólicos no son críticos para el determinante del antígeno de Forssman (75). Sin embargo, el ácido teicoico de membrana que contiene etanolamina en vez de colina, no es un inhibidor de la hidrolasa de la mureína.

1.2.5.3.2. El enzima autolítico de neumococo

Se ha postulado que los enzimas autolíticos bacterianos participan en una variedad de fenómenos fisiológicos importantes en diferentes especies bacterianas (76, 77, 78, 79). Específicamente, la autolisina de neumococo, una N-acetilmuramil-L-alanil amidasa, juega un papel clave en los siguientes procesos:

a) separación de las células hijas al final de la división celular de tal manera que los neumococos con un sistema autolítico in

hibido se multiplican formando largas cadenas de varios cientos de cocos (58).

b) desarrollo de la competencia para producir transformación genética. Se ha propuesto un modelo por el cual el factor de competencia (activador) dispara una actividad murein-hidrolásica "controlada" en la zona de crecimiento de la pared celular, que pone al descubierto los receptores del DNA localizados en las zonas profundas de la envuelta celular.

c) liberación de las partículas fágicas al término del ciclo lítico, de tal forma que cualquier inhibición de la hidrolasa de neumococo evitaría la salida de la progenie fágica de la célula infectada (80).

d) lisis inducida por detergentes (9), lisis en la fase estacionaria y lisis inducida por penicilina (82).

Una actividad autolítica incontrolada conducirá rápidamente a la muerte de los neumococos. Es, por tanto, obvia la importancia de un enzima que interviene en tantos fenómenos fisiológicos y cuya acción no regulada tiene consecuencias autodestructivas, para la célula, de aquí la importancia de su regulación. Los componentes claves en la regulación de la amidasa de neumococo son los residuos de colina presentes como componentes estructurales covalentemente unidos tanto al ácido teicoico de pared (antígeno-C) como al ácido lipoteicoico (antígeno-F) de esta bacteria. La amidasa reconoce específicamente la colina en los ácidos teicoicos de la pared (33) y su interacción con ellos es importante no solo para la actividad catalítica del enzima sino también para la conversión

de la forma inactiva (E) en activa (C) del enzima (59). Además, el ácido lipoteicoico que contiene colina es un inhibidor poderoso de la amidasa (48) mientras su homónimo conteniendo etanolamina no lo es.

Basado en los hechos experimentales señalados, Tomasz ha sugerido un modelo para el control del enzima autolítico de neumococo, donde la regulación tiene lugar en varias fases: en la activación enzimática, en la actividad enzimática, y a nivel de sustrato (48). Un esquema hipotético de la regulación de la actividad del enzima autolítico, se muestra en la figura 5. Como ya hemos señalado, dado que pequeñas cantidades de la autolisina en forma E están presentes en los neumococos obtenidos en presencia de colina, se ha sugerido que el enzima en su forma E puede representar el precursor de la amidasa activa (forma C). Por analogía con la conversión "in vitro" de la forma E a la forma C de la autolisina, la activación de este proenzima podría ocurrir después del transporte a través de la membrana plasmática por interacción con los residuos de colina del ácido teicoico de pared. La existencia del precursor inactivo de la autolisina y su conversión a enzima catalíticamente activo por proteólisis se ha descrito en el caso de la muramidasa de S. faecalis (83).

Para que el enzima activo hidrolice los enlaces amídicos de la pared celular de neumococo, es absolutamente necesario que tenga lugar una interacción altamente específica entre el enzima y los residuos de colina del ácido teicoico de pared, de tal manera que si la etanolamina reemplaza a la colina en la pared celular, la última se vuelve resistente a la acción de la autolisina (33).

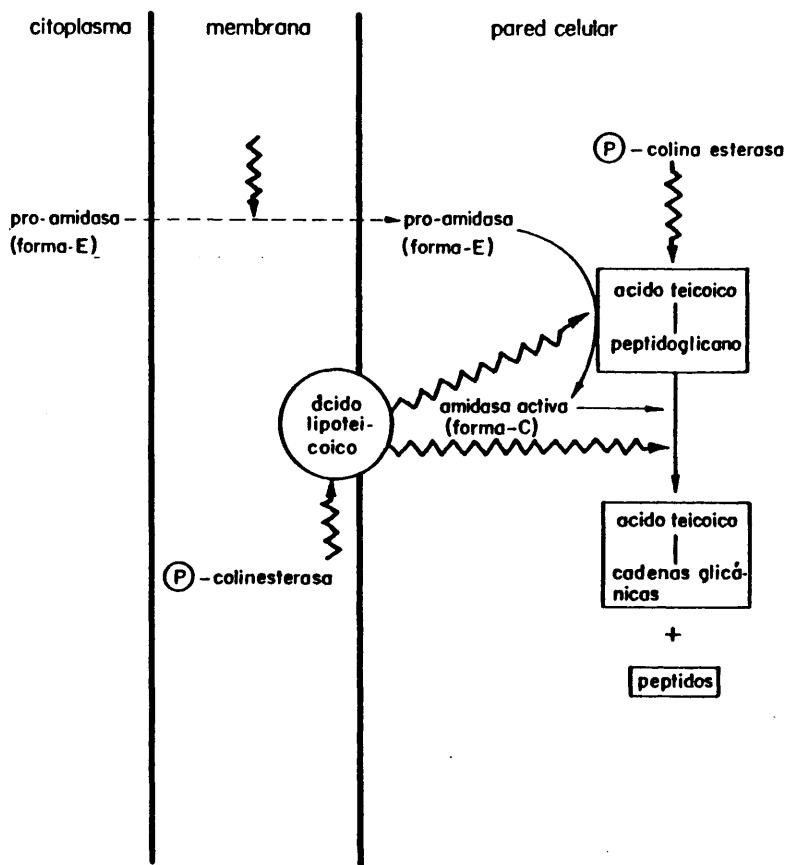


Figura 5.- Modelo hipotético para explicar la regulación de la actividad del enzima autolítico de neumococo.

⚡ indica los sitios posibles de control enzimático.

Por consiguiente, los ácidos teicoicos que contienen colina en la pared se necesitan no solo para la activación del enzima, sino también para su actividad catalítica. Un requerimiento similar para un cierto tipo de ácido teicoico se ha observado en el caso de la amidasa de Bacillus subtilis 168 que, ensayada simultáneamente con dos sustratos de pared que diferían solo en la naturaleza del ácido teicoico, preferencialmente se unía e hidrolizaba la pared celular homóloga (84).

En los neumococos la mayor parte de la actividad hidrolítica parece residir en la membrana plasmática (85). Para que el enzima pueda llevar a cabo sus funciones fisiológicas, tiene que tener acceso, al menos periódico, al sustrato de la pared. Tal translocación del enzima, puede ser un proceso cuidadosamente regulado.

Por otra parte, tanto la activación de la amidasa de neumococo como su actividad catalítica se inhiben por el ácido teicoico de membrana (antígeno F) (48).

Un mecanismo adicional, potencialmente regulador, implica a un enzima, la fosforil-colinesterasa presente en S. pneumoniae que se ha encontrado que elimina un máximo de 15 a 20% de residuos de colina de la pared celular y del antígeno de Forssman, liberando fosforilcolina y dejando el esqueleto de ácido teicoico intacto (86). Como la actividad catalítica de la autolisina parece tener un requerimiento absoluto por los residuos de colina del sustrato (33), la eliminación de una fracción de estos residuos por la esterasa es probable que origine en la pared celular

zonas resistentes a la autolisina. De manera similar, el poder inhibitorio del antígeno de Forssman puede afectarse por la eliminación de los residuos de fosforil colina. Se ha sugerido que mutantes de neumococo que forman cadenas tienen un mayor nivel de actividad esterásica (87).

El tratamiento de los neumococos con bajas concentraciones de penicilina no inhibe la síntesis de ácido teicoico de pared; sin embargo, en presencia de la droga tanto el ácido lipoteicoico como el ácido teicoico de pared recién sintetizado se liberan al medio de cultivo (88,89). En otras palabras, durante el tratamiento con penicilina se libera al medio un inhibidor de la amidasa de la bacteria, dejando al enzima sin ningún control regulador lo que causaría la lisis de las células. La cinética y el alcance de la liberación de complejos que contienen Fag al medio es proporcional a la dosis del antibiótico. La liberación se suprime por inhibidores de síntesis de proteína, y el mecanismo de liberación parece implicar un proceso activo de secreción. La penicilina y otros inhibidores de la síntesis de pared interfieren con el mecanismo de control de las mureín-hidrolasas de neumococo. Es interesante hacer notar que la liberación de la progenie fágica (bacteriófago Dp-1) y la lisis de la célula, también va precedida por la secreción del inhibidor de la autolisina (antígeno de Forssman) al medio (80). No está claro en estos momentos cómo induce la penicilina la liberación del material que contiene Fag; sin embargo, es importante resaltar que todos los inhibidores de pared celular, independientemente de su sitio de acción, provocan liberación del antígeno de Forssman.

Además de la secreción de ácido teicoico y de Fag recién sintetizados, la penicilina induce la secreción masiva de lípidos, tanto de neosíntesis como ya incorporados a la membrana, en varias especies bacterianas, incluyendo Streptococcus sanguis (90), Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus epidermidis y Bacillus subtilis (91, 92). La secreción se induce específicamente por inhibición de la síntesis de la pared celular, y esto se lleva a cabo en ausencia de cualquier lisis celular detectable. Las cantidades de lípidos liberados son proporcionales al grado de inhibición de la síntesis del peptidoglicano, y todos los lípidos secretados están en las mismas proporciones que las encontradas en las bacterias no tratadas.

Esto sugiere que, por algún mecanismo, se mantiene la razón de peptidoglicano (pared celular) a lípidos (membrana plasmática) dentro de un estrecho margen en la célula, eliminándose el exceso de material a través de la secreción. El peptidoglicano recién sintetizado puede proporcionar sitios de unión para nuevos elementos de la membrana plasmática o puede asegurar, de alguna otra manera todavía desconocida, la incorporación y retención de componentes lipídicos en la envuelta celular (91).

Recientes estudios con un mutante resistente a la lisis por desoxicolato(DOC⁻) prestan nuevos apoyos al modelo propuesto para el control de la actividad de la amidasa de neumococo. Este mutante solo posee una actividad amidásica residual (5 al 10% del nivel del tipo salvaje) pero posee una pared celular normal (esto es, conteniendo colina y sensible a la amidasa) (93); es resistente a la lisis en la fase estacionaria, y a la lisis indu

cida por penicilina.

La incubación de este neumococo autolisín-defectivo con autolisina de neumococo tipo salvaje, conduce a la adsorción del enzima a sus sitios de unión en la pared celular. Sin embargo, la actividad de las moléculas enzimáticas debe ser inmediatamente inhibida pues se produce solamente una degradación limitada de la pared celular (94). Esto contrasta con la adsorción de la autolisina a preparaciones de pared "in vitro", donde la adsorción enzimática conduce a la hidrólisis inmediata del material de pared (95). Se ha sugerido que en las células vivas intactas, los sitios de unión enzimática están en estrecha yuxtaposición con un factor inhibidor del enzima, probablemente el antígeno de Forssman (94). Este antígeno de Forssman como se ha dicho atraviesa el espacio entre la pared y la membrana y es accesible desde la parte externa en las bacterias intactas. Estas células cubiertas de enzima "revierten" al fenotipo salvaje pues se vuelven nuevamente sensibles a la lisis en la fase estacionaria, a la lisis por detergentes y a la lisis inducida por la penicilina; todos estos aspectos son fenómenos relacionados con el "disparo" del enzima autolítico. La actividad autolítica puede dispararse también por tratamiento con sacarosa hipertónica, sugiriendo que durante la plasmolisis, el inhibidor de autolisina se retrae de la pared celular junto con la membrana plasmática. Una representación esquemática de lo que puede suceder se muestra en la figura 6, donde el antígeno de Forssman (LTA) aparece proyectándose hacia afuera, a partir de la membrana plasmática y tiene una estrecha relación con la pared celular, de tal manera que el en-

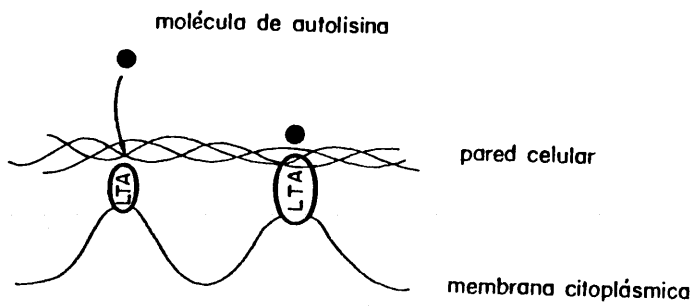


Figura 6.- Esquema hipotético de la interacción entre el ácido lipoteicoico (LTA) y la autolisina añadida exógenamente a un cultivo de células DOC^- .

zima añadido exógenamente se une a la pared celular y es "controlado" inmediatamente por el antígeno de Forssman.

El sistema reconstituido puede obviamente no ser exactamente análogo al de los neumococos tipo salvaje, pues en el último caso la mayoría de la actividad autolítica se localiza en la membrana plasmática y en el citoplasma. Sin embargo, el hecho de que el tipo salvaje y las bacterias fenotípicamente "curadas" exhiban idénticas respuestas a los antibióticos, detergentes y fase estacionaria, sugiere que una fracción fisiológicamente importante de moléculas de autolisina se localiza fuera de la membrana plasmática.

El tratamiento de los neumococos deficientes en autolisina (sin adición de ningún enzima) con penicilina provoca:

a) inhibición de la multiplicación celular (pero no lisis) a la misma concentración de penicilina que la que induce la lisis en el tipo salvaje. b) lisis cuando, previamente se ha adicionado autolisina tipo salvaje al medio de crecimiento ("curación fenotípica"). La sensibilidad de las células a la autolisina exógena requiere el tratamiento con penicilina u otros inhibidores de la síntesis de pared, pues la autolisina exógena por sí sola no tiene efecto sobre la multiplicación bacteriana.

El cloranfenicol y otros inhibidores de la síntesis de proteínas protegen a las células contra la lisis por el enzima exógeno en presencia de penicilina. c) liberación al medio de una macromolécula que contiene colina cuyas propiedades sugieren que contiene Fag de neumococo. Estos resultados llevaron a pos-

tular que la inhibición de la síntesis del peptidoglicano por la penicilina causa, a través de un proceso desconocido, la liberación al medio del antígeno de Forssman (Fag) que, bajo condiciones normales, mantiene reprimida la actividad del enzima. La labilización del complejo Fag-autolisina da lugar a una actividad incontrolada del enzima autolítico y como consecuencia a la lisis posterior de la célula (88).

Los experimentos con mutantes DOC^- han permitido aclarar, al menos parcialmente, el por qué de la necesidad de la síntesis de proteínas para que tenga lugar la lisis inducida por penicilina. El hecho de que los mutantes tratados con amidasa ("curación fenotípica") estén protegidos frente a la lisis inducida por penicilina en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, a pesar de que el enzima se añada al medio de cultivo en exceso contradice la creencia generalizada de que el cloranfenicol protege a las bacterias de la lisis inducida por penicilina al reducir la concentración de autolisina en la superficie celular como consecuencia de un bloqueo en la biosíntesis de nuevas moléculas de amidasa. Lo que parece suceder es que la inhibición de la síntesis de proteínas interfiere con la actividad "i situ" de la autolisina, o con las consecuencias de la actividad "in situ" (o sea la lisis celular). El mecanismo por el cual el cloranfenicol interfiere con la actividad autolítica no está claro. Sin embargo, la marcada reducción en la liberación del antígeno de Forssman inducida por penicilina en presencia de cloranfenicol parece indicar que los inhibidores de la síntesis

de proteínas pueden inhibir la actividad autolítica "in situ" vía modulación del metabolismo del antígeno de Forssman (88).

Es importante señalar una característica particular de las bacterias que poseen un sistema autolítico alterado en lo que se refiere a su respuesta frente a los antibióticos bacteriolíticos. Tanto las células EA (que contienen una pared celular resistente a la autolisina y una forma inactiva de la amidasa: forma E) como los mutantes DOC⁻ (que contienen solo cantidades residuales de la amidasa) exhiben una respuesta peculiar frente a los antibióticos bacteriolíticos que ha sido designada como "tolerancia antibiótica múltiple" (96) y que muestra las siguientes características:

a) las bacterias tolerantes retienen la alta sensibilidad a la penicilina típica del neumococo, pero en lugar de lisarse en presencia de penicilina añadida a la concentración mínima inhibidora (MIC) las células se limitan a detener su multiplicación. En otras palabras, en las bacterias tolerantes los agentes típicamente bacteriolíticos se vuelven bacteriostáticos, mientras la dosis-respuesta cuantitativa a las drogas permanece inalterable (es decir la MIC para la penicilina es la misma para las bacterias de tipo salvaje y para las tolerantes, pero a la MIC las células tipo salvaje se lisan, mientras las células tolerantes simplemente detienen su multiplicación pero no se lisan), como se muestra en la figura 7. Este es un nuevo tipo de resistencia a las drogas que afecta solo a las consecuencias irreversibles del tratamiento autolítico (lisis y probablemente al efecto bactericida). En estas bacterias tolerantes se pueden observar los fenóme-

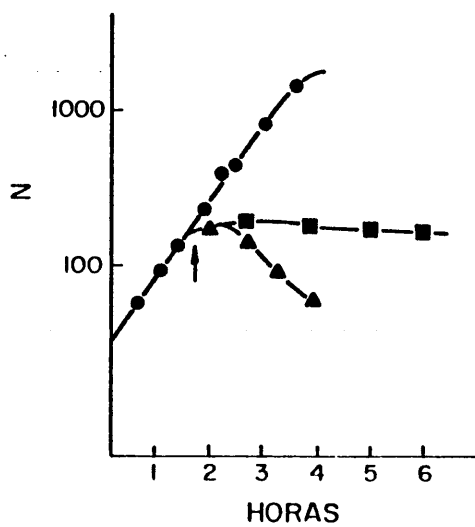


Figura 7.- Respuesta bacteriolítica (en el tipo salvaje, ▲—▲), tolerante (en el tipo deficiente en autolisina ■—■ , de neumococos frente a la penicilina. Los cultivos en fase exponencial de crecimiento se trataron con penicilina (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) al tiempo indicado por la flecha. Un cultivo control (●—●) no se trató con penicilina. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría.

nos de secreción descritos anteriormente, pues en este caso la inhibición de la multiplicación bacteriana por la penicilina no va seguida de lisis.

b) la tolerancia a la droga no es específica ya que el fenómeno se pone de manifiesto empleando cualquier inhibidor de la síntesis de pared celular.

c) la tolerancia a la droga es independiente de la dosis empleada.

d) la tolerancia a la droga es reversible por la reactivación apropiada del sistema autolítico celular, esto es por la reintroducción de la colina en las paredes de las bacterias EA, o por la "curación fenotípica" de los mutantes DOC⁻ con enzima tipo salvaje.

La tolerancia antibiótica en bacterias lisis-defectivas ha sido confirmada en Bacillus licheniformis (97) y Staphylococcus aureus (98). El aislamiento de estafilococos y estreptococos tolerantes a partir de pacientes con infecciones recurrentes es un hecho cada vez más común (99,100).

Las observaciones anteriores sugieren que la respuesta primaria de las células a la penicilina es la inhibición del crecimiento bacteriano; sin embargo, este efecto primario solo puede observarse en bacterias con un sistema autolítico alterado. Los efectos antimicrobianos más importantes de estos antibióticos (es decir, la lisis y el efecto bactericida) constituirían la respuesta secundaria caracterizada por la liberación al medio de un inhibidor de autolisina (antígeno de Forssman) y el consecuente disparo de la actividad amidásica (88, 96).

Esta hipótesis ha sido posteriormente confirmada a través de la modulación del pH del medio de crecimiento. Con este planteamiento experimental se ha conseguido una alteración en la respuesta bacteriana a los antibióticos en neumococos tipo salvaje, de tal manera que estas bacterias se comportan de una manera exactamente análoga a la de los organismos que son defectivos en autolisina (101). Los cultivos de neumococo que se multiplican a pH inferior a 6,0 en el momento del tratamiento con penicilina, reproducen los aspectos típicos de la tolerancia a drogas:

- a) la respuesta celular a los antibióticos líticos cambia la lisis a bacteriostasis, mientras las células retienen su sensibilidad normal (dosis-respuesta) a las drogas.
- b) las células se vuelven tolerantes no solo a la penicilina sino asimismo a todos los inhibidores de la síntesis de pared.
- c) la respuesta tolerante es reversible. Es posible volver a la respuesta lítica por la siguiente secuencia de tratamientos: exposición de células a la penicilina bajo condiciones de tolerancia, seguido de la eliminación de la penicilina por la penicilinasasa y, finalmente, transferencia de las células a medio de cultivo fresco que posea un pH óptimo para la lisis.

Estos resultados indican que hay dos tipos de condiciones de crecimiento para los neumococos: una permisiva (pH =7,0) y otra no permisiva (pH inferior a 6,0 y superior a 8,0) para la lisis. Estas observaciones se han extendido a Bacillus subtilis, donde el pH permisivo para la lisis es 8,0 y a valores inferiores a 6,6 se inhibe la misma. Aunque los valores de pH permisivos para

la lisis son diferentes en estos dos microorganismos, tienen en común el que corresponden en cada caso a los valores óptimos de actividad "in vitro" de las mureín-hidrolasas mayoritarias presentes en tales microorganismos (101, 84). Se ha propuesto que los valores de pH no permisivos para la lisis inducida por antibióticos beta-lactámicos, inhiben la actividad endógena de las mureín-hidrolasas bacterianas que, bajo las condiciones permisivas, son responsables de la destrucción de tales bacterias. Aunque se sabe que las bacterias regulan su pH intracelular, parece probable que la actividad de los enzimas localizados en la superficie más externa de la membrana plasmática o en el espacio periplásmico sería modulable por cambios en la composición iónica del medio de multiplicación. Una evidencia adicional que apoya la interpretación de que la tolerancia en estas bacterias se debe a la supresión de una actividad enzimática localizada en la superficie, viene dada por la observación de que neumococos cultivados a un pH permisivo para la lisis pueden protegerse contra la misma por la simple adición de tripsina al medio de cultivo (101). Se ha propuesto que la tripsina provoca la destrucción proteolítica de las moléculas de amidasa que se liberan al espacio periplásmico o que se encuentran sobre la superficie de la pared celular haciéndose así accesibles al enzima. Estos resultados han sido confirmados por nosotros mediante el empleo de un antisuero anti-amidasa que produce un efecto protector similar al de la tripsina (101) frente a la lisis inducida por antibióticos beta-lactámicos.

Los componentes bacterianos descritos hasta ahora (ácidos teicoicos, ácidos teicoicos de membrana y mureín-hidrolasas) desempeñan probablemente una variedad de funciones en las interac

ciones entre el organismo huésped y la bacteria patógena invasora como son la estimulación de la ruta alternativa del complemento por los ácidos teicoicos (40); la adhesión a las superficies epiteliales vía ácidos teicoicos de membrana (LTAs) (70) y la activación de los efectos antimicrobianos irreversibles de los antibióticos beta-lactámicos (88).

1.3. Bacteriófagos de Streptococcus pneumoniae

Durante los últimos 20 años han sido muchos los investigadores que han intentado encontrar fagos que fueran capaces de infectar a Streptococcus pneumoniae. Todos estos esfuerzos fueron estériles hasta que, a mediados de los años 1970, Tiraby y colaboradores consiguieron aislar, a partir de muestras tomadas de la garganta de pacientes del Hospital General de Boston, los primeros fagos de neumococo a los que llamaron fagos "omega" (102).

Paralelamente, y de manera independiente, un grupo de la Universidad Rockefeller de Nueva York logró aislar bacteriófagos de neumococo a partir de pacientes con ligeros síntomas patológicos en el tracto respiratorio superior (103). Estos bacteriófagos recibieron el nombre de diplofagos (Dp). A partir de entonces varios investigadores han aislado en distintas áreas geográficas fagos capaces de lisar los neumococos.

Se ha comprobado que estos fagos difieren en varios aspectos, entre ellos la serología y morfología (102, 103, 104, 105). Por otra parte, Bernheimer aisló fagos temperados a partir de neumococos encapsulados tomados de pacientes humanos (104, 105). Parece probable, por consiguiente, que los fagos de neumococo estén ampliamente extendidos, y por lo tanto no está claro el motivo por el que se tardara tantos años en su aislamiento. Una razón podría ser la relativa inestabilidad de los fagos en lisados crudos y su sensibilidad a los solventes orgánicos (103).

Los fagos de neumococo han proporcionado ya unas interesantes informaciones en varios aspectos. Las estirpes de neumococo de los tipos capsulares que frecuentemente provocan infeccio-

nes en niños se han asociado con la lisogenia, y Bernheimer (105) ha sugerido una posible conexión entre la lisogenia y la patogenicidad de los neumococos. El fago Dp-1 ha resultado ser el primer bacteriófago aislado en una bacteria Gram-positiva que contiene lípidos (106).

Otro aspecto peculiar de este fago es el papel fundamental que la mureín-hidrolasa del huésped juega en la liberación de la progenie fágica (80). La presencia de polisacáridos en la cápsula parece proteger a los neumococos contra la infección de todos los fagos líticos aislados hasta ahora (104). Por otra parte, en las estirpes rugosas sensibles al fago, la presencia de colina en el ácido teicoico de la pared celular es esencial para la inactivación del fago por la bacteria, aunque los receptores parecen contener no solo polisacáridos sino también material proteico (103). De este punto nos ocuparemos en detalle en el apartado de Resultados.

Asimismo los fagos de neumococo son potencialmente interesantes pues son un excelente material de partida para conseguir un mejor conocimiento sobre la genética de Streptococcus pneumoniae. El aislamiento del fago Dp-4 ha conducido al desarrollo, por vez primera, de un sistema de transfección simple utilizando DNA maduro obtenido de las partículas fágicas purificadas (107, 108). Otros investigadores, utilizando otro fago de neumococo (105), consiguieron transfección utilizando la forma replicativa del DNA viral (109, 110). También se ha descrito en S. pneumoniae la denominada "pseudotransfección", una forma peculiar de transferencia genética sensible a la DNA-asa, que requiere el uso

de células competentes y del bacteriófago (111). Asimismo, el aislamiento de bacteriófagos de neumococo ha permitido desarrollar los estudios sobre el destino del DNA fágico introducido por infección o transfección; los resultados de estas investigaciones servirán de base para una mejor comprensión del mecanismo de incorporación del DNA y así poderlos contrastar con los resultados obtenidos en estudios similares realizados por transformación genética.

Todo lo expuesto justifica la posibilidad de que los fagos de neumococo se puedan usar para abrir nuevas e interesantes líneas de investigación sobre la fisiología, bioquímica y genética del neumococo. Vamos ahora a exponer con más detalle las características más sobresalientes de los tres fagos de neumococo aislados y usados asiduamente en nuestro laboratorio: bacteriófagos Dp-1, Dp-4 y Cp-1.

La morfología de los tres fagos se muestra en la figura 8; la tabla 1 resume algunas características de las partículas viricas y sus componentes macromoleculares. El antisuero contra el Dp-1 muestra un cierto grado de reactividad cruzada con el Dp-4.

1.3.1. Dp-1

Las preparaciones de partículas del fago Dp-1 teñidas con acetato de uranilo muestran una doble capa externa, aparentemente una cubierta lipídica, tanto a bajos como a altos aumentos. El virus purificado por centrifugación a equilibrio en gradientes de cloruro de cesio contiene lípidos (aproximadamente un 8,5% del peso seco), que se pueden extraer con cloroformo. La cromato-

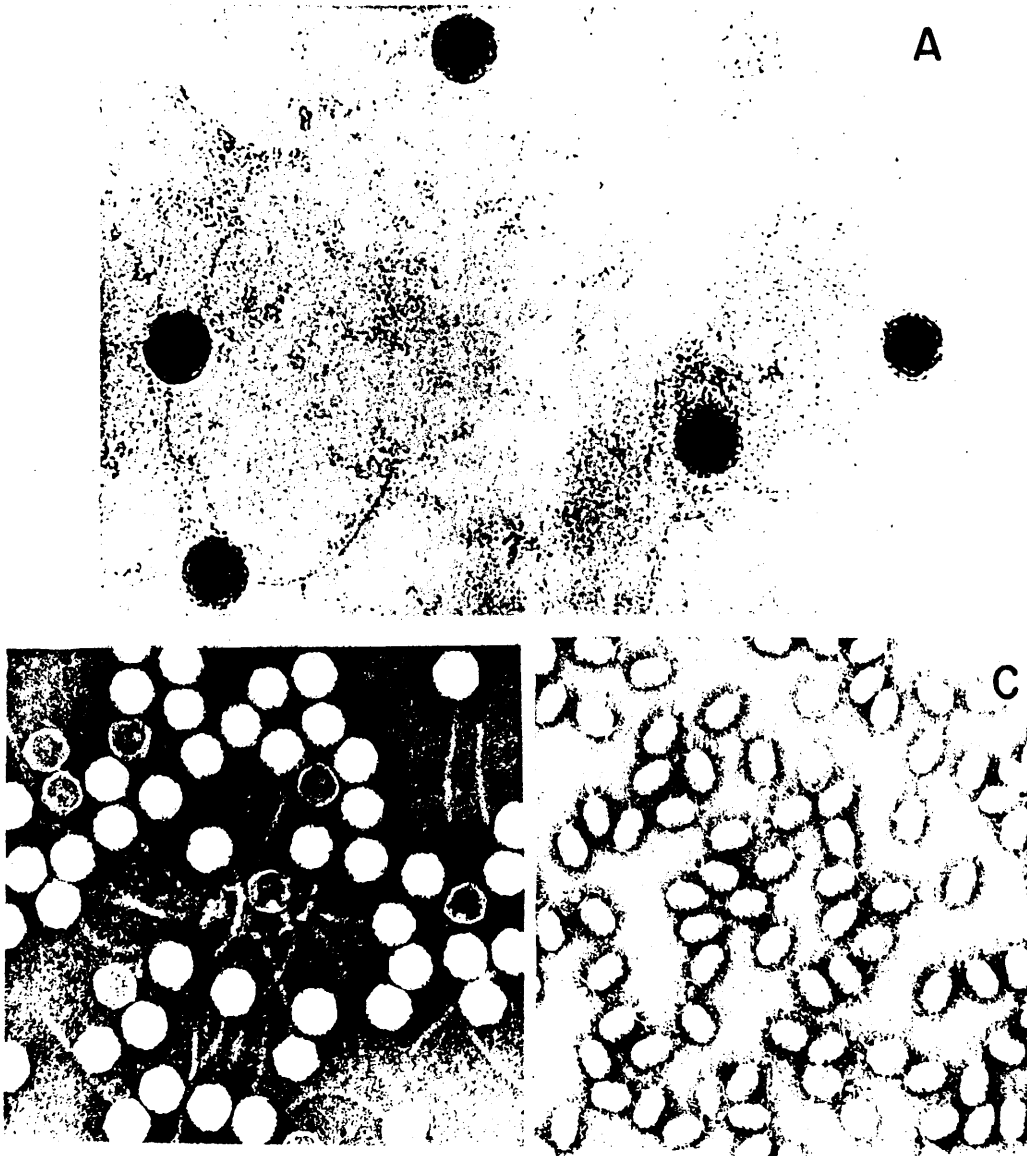


Figura 8.- Micrografías electrónicas de bacteriófagos de *S.pneumoniae* purificados. A, Dp-1 teñido con acetato de uranilo; B, Dp-4; C, Cp-1, éstos 2 últimos teñidos con ácido fosfotúngstico (aumentos: A, x 200.000; B, x 123.000; C, x 131.000).

Tabla 1

Algunas características de los fagos Dp-1, Dp-4 y Cp-1 de Streptococcus pneumoniae

Bacteriófago

Característica	Dp-1	Dp-4	Cp-1
Morfología			
Cabeza (diámetro en nm)	Hexagonal (67±3)	Hexagonal (60±3)	Hexágono irregular (60x45)
Longitud de cola (nm)	150	155	20
Presencia de apéndices y fibras	No	No	Si
Presencia de envuelta lipídica	Si	No	No
Densidad de partículas (g/cm ³)	1,47	1,48	1,46
DNA			
Masa molecular (x10 ⁶ Dalton)	ND (a)	37	12
Temperatura de fusión (°C)	ND	83,5	87
Tamaño (µm)	ND	17,5±0,3	6,3±0,3
Densidad (g/cm ³)	1,681	1,666	1,699
Transfección	Muy baja	Si	Si
Transducción	No	No	No
Proteínas, peso molecular	1(mayoritaria):25.000 2(mayoritaria):38.000 3(intermedia):65.000 4(minoritaria):78.000	1(mayoritaria):25.500 2(mayoritaria):38.000 3(intermedia):72.000 4(minoritaria):80.000 5(minoritaria):100.000	1:67.000 2:53.000 3(mayoritaria):39.00 4:34.000 5:29.500 6:28.000 7:20.500 8:13.000

(a) ND: no determinado

Tomado de (219, 238).

grafía en capa fina de los lípidos extraídos muestra la presencia de lípidos neutros, cardiolipina, y cantidades inferiores de fosfatidiletanolamina. Varios de los fosfolípidos mayoritarios del neumococo (p. eje. fosfatidilglicerol, glicolípidos) están ausentes en la partícula fágica. La presencia de esta cubierta lipídica es probablemente la causa de la sensibilidad del Dp-1 a los solventes orgánicos y a los detergentes (106).

Otra característica notoria del Dp-1 es su dependencia del sistema autolítico de la célula huésped para la liberación de la progenie fágica al medio. Esta dependencia fue sugerida por vez primera en 1975 por McDonnell y colaboradores usando células de S. pneumoniae en las cuales la colina (el componente normal del ácido teicoico en esta bacteria) había sido biosintéticamente reemplazada por la etanolamina (103). Una evidencia posterior de la implicación de la autolisina del huésped en el proceso de liberación fágica se obtuvo a través de experimentos en los que los neumococos, conteniendo colina en su pared, se infectaron con Dp-1 y posteriormente se incubaron bajo condiciones que bloquean la actividad normal de la autolisina de neumococo. La liberación de la progenie fágica quedaba, paralelamente, bloqueada bajo tales condiciones. En este tipo de experimentos quedó claramente demostrado el papel básico que juega en tal bloqueo el inhibidor específico de la autolisina, el antígeno de Forssman, en las bacterias infectadas (80, 67). El microscopio electrónico, por otra parte, mostró la presencia de fagos atrapados dentro de las bacterias incubadas bajo tales condiciones. Además, se puso de manifiesto la presencia de macromoléculas conteniendo colina (iden-

tificadas como antígeno de Forssman) que se liberaban al medio de cultivo de células infectadas con Dp-1 en un proceso que precedía el comienzo de la lisis del cultivo (80). Estos aspectos de la infección con Dp-1 presentan una interesante similitud con los efectos producidos sobre el sistema autolítico de neumococo por el tratamiento con penicilina de S. pneumoniae (67, 112, 101). Otro ejemplo de la implicación del sistema autolítico del huésped en la liberación de la progenie fágica es el siguiente: cuando un mutante de neumococo, defectivo en la mureína-hidrolasa, y como consecuencia carente de la fase de autólisis por envejecimiento del cultivo, se infecta con Dp-1, solo se lisan aquellas bacterias infectadas a una multiplicidad de infección (MDI) igual o superior a uno, y la lisis de estas células nunca es tan drástica como la que ocurre en los neumococos de tipo salvaje. Si, por otro lado, las bacterias mutantes se "recubren" con autolisina tipo salvaje antes de la infección fágica ("curación fenotípica") se produce una lisis total incluso en células infectadas a baja MDI (101). Como veremos más adelante, esta observación ha servido como punto de partida de una serie de experimentos que constituyen una parte importante de esta Memoria de Tesis.

1.3.2. Dp-4

El aspecto más interesante de este fago es la capacidad de su DNA para transfectar a los neumococos. Este proceso de transfección parece depender tanto del DNA fágico como de la bacteria huésped; la transfección con DNA de Dp-1 alcanza niveles muy bajos, mientras que el DNA de Dp-4 es capaz de producir una frecuencia relativamente alta de transfección (0.5% de las células competen-

tes) siempre y cuando se use como célula receptora del DNA un huésped deficiente en nucleasas. Las curvas de cinética de la transfección en neumococo sugieren que varias moléculas o fragmentos de DNA fágico deben interaccionar con una célula competente para producir un centro infectivo. El mismo tipo de fisiología competente se necesita para la incorporación tanto del DNA fágico como del DNA cromosómico de bacterias (108).

Usando DNA del fago Dp-4 marcado radiactivamente, se ha podido comprobar que los máximos niveles de transfección, es decir la máxima unión e incorporación de DNA, se alcanzan con bacterias deficientes en la nucleasa mayoritaria en S. pneumoniae. Se ha sugerido que el DNA se degrada masivamente durante la incubación con células competentes tipo salvaje, mientras que esta degradación era muy limitada en el caso de neumococos competentes deficientes en nucleasas. Un comportamiento similar en lo que se refiere a la degradación del DNA bacteriano, se ha descrito en el caso del DNA transformante (113).

Recientemente se han determinado las características físico-químicas del DNA del bacteriófago Dp-4 (114). Las micrografías electrónicas muestran que el DNA es una molécula de doble banda (longitud media, 14,5 μm), que corresponde a una masa molecular de 36×10^6 Dalton. Este resultado está en concordancia con el obtenido por velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga analítica (38×10^6 Dalton), y en gradientes de sacarosa neutros (38×10^6 Dalton), y alcalinos (21×10^6 Dalton) (114). El DNA de Dp-4 tiene una densidad de flotación marcadamente baja: 1,666

g/cm³ en ClCs neutro y 1,410 g/cm³ en SO₄Cs₂. Asimismo se ha demostrado que las dos bandas de este DNA tienen diferentes densidades y pueden separarse fácilmente una de otra después de la desnaturación. El contenido de guanina más citosina es de alrededor del 33%.

Otra característica importante de este sistema es que el p-hidroxifenilazauracilo, un inhibidor de la DNA polimerasa III, puede inhibir selectivamente la síntesis del DNA de S. pneumoniae sin afectar marcadamente la replicación del DNA del bacteriófago Dp-4 ni la productividad ("burst size") del fago en cada ciclo infeccioso (115). Estos resultados contrastan con los esfuerzos, hasta ahora infructuosos, llevados a cabo por diversos autores en otros sistemas fágicos de estreptococo para inhibir selectivamente la síntesis del DNA del huésped, sin afectar a la del fago infectante (116).

Todas estas propiedades han servido de base para poder analizar con detalle el proceso de replicación del fago Dp-4 en Streptococcus pneumoniae estudiado por infección (117). Este trabajo ha permitido concluir que el modelo de replicación del Dp-4 guarda ciertas similitudes con otro previamente descrito para el fago Ø 29 (118).

1.3.3. Cp-1

Cp-1 es el bacteriófago de neumococo aislado más recientemente. Se obtuvo a partir de muestras de gargantas de niños sanos en Alcalá de Henares. Visto al microscopio electrónico con tinción negativa su morfología resultó ser muy diferente a la de

los otros fagos de neumococo descritos anteriormente (105, 106, 109). Tiene una cabeza hexagonal irregular de aproximadamente 60 por 45 nm; una cola corta de 20 nm. de longitud, apéndices de cuello y fibras en la cabeza (figura 8).

Esta estructura recuerda mucho a la del fago Ø 29 de Ba-cillus subtilis (119). Contiene nueve proteínas estructurales aun que una de ellas (p.m. = 39.000 Dalton) representa más del 90% de las proteínas totales (120). El DNA es de bajo peso molecular (12×10^6 Dalton) y presenta una marcada resistencia frente a la mayoría de nucleasas de restricción ensayadas (PstI, XbaI, BglII, BamHI, EcoRI, SalI, MboI y SmaI). Las nucleasas que lo digieren son: AluI que produce 12 fragmentos, Hind III que produce 2 fragmentos y Hae III que produce otros 2 (120). Otro aspecto interesan te del Cp-1 es que el DNA obtenido por el método de la proteinasa K no tiene actividad biológica en transfección. Sin embargo, si el DNA del fago se prepara en ausencia de proteasas, el material de la interfase del DNA tratado con fenol parece tener actividad transfectante. Esta observación, junto con otros datos físico-químicos observados (p. ejem. el DNA tratado con fenol no pene tra en los geles de agarosa), sugiere la presencia de una proteí na asociada con el DNA del Cp-1. Esta posibilidad, junto con el bajo peso molecular de su DNA, hacen a este sistema un instrumen to interesante para estudios genéticos de los fagos de neumococo.

1.4. Receptores fágicos en bacterias Gram-positivas

1.4.1. Introducción

El primer paso en el proceso de infección de una bacteria por un virus bacteriano es la adsorción del bacteriófago a un receptor de la célula huésped. Casi todas las estructuras de la superficie de una célula bacteriana, incluyen o pueden actuar como receptores fágicos. Los fagos se adsorben a estructuras tan diferentes como flagelos, pili, cápsulas, lipopolisacáridos, complejos teicoico-peptidoglicano, proteínas superficiales, etc (121). Por consiguiente, podemos considerar la superficie externa de la bacteria como un mosaico de receptores para diferentes fagos. Después de la adsorción el ácido nucleico del fago penetra en la célula, se replica y forma nuevos fagos que por último se liberan lisando la bacteria.

49 Los fagos varían mucho en tamaño y estructura; paralelamente sus modos de adsorción varían también. Sin embargo, se puede hacer una generalización importante acerca de la adsorción fágica a su receptor y es la de que se trata de un proceso altamente específico. Un determinado fago se adsorbe generalmente solo a un rango limitado de estirpes bacterianas que llevan un receptor específico. La especificidad de la infección fágica se estableció ya en los primeros años de la investigación sobre fagos, pero la arquitectura molecular de los receptores ha sido desconocida durante muchos años. El trabajo sistemático de investigación, realizado durante las últimas décadas, sobre las cubiertas celulares bacterianas ha permitido un mejor conocimiento de las estructuras de los receptores fágicos tanto en las bacterias Gram-

positivas como en las Gram-negativas.

Los receptores fágicos de las bacterias Gram-negativas han sido objeto de una amplia investigación y sobre ellos se han escrito numerosas revisiones (121, 122, 123). El hecho de que haya una mayor variedad de receptores identificados en las bacterias Gram-negativas no es reflejo de una falta de interés en el campo de las bacterias Gram-positivas, sino consecuencia de un desarrollo más temprano en los conocimientos sobre la estructura de las cubiertas celulares de Gram-negativas, pese a su mayor complejidad, unido a una mayor facilidad en el manejo de los fagos de E. coli y S. typhimurium, principalmente. Por todo ello, y dado que en nuestro trabajo nos hemos ocupado exclusivamente de fagos de S. pneumoniae, en este capítulo nos vamos a centrar en el estudio de los receptores de fagos de bacterias Gram-positivas haciendo especial hincapié en el caso de los fagos de estreptococos y de otras bacterias Gram-positivas con marcada semejanza con los estreptococos.

La mayoría de los estudios sobre la adsorción fágica en bacterias Gram-positivas se han realizado con fagos pertenecientes a los grupos A, B y C de Bradley (124), cuyos receptores están presentes en la pared celular o en el complejo pared-membrana.

Con pocas excepciones, tales fagos no se inactivan por material soluble obtenido a partir de las capas superficiales bacterianas.

Estos resultados han llevado a muchos autores a la conclusión de que estos fagos son capaces de adsorberse a los componentes macromoleculares de sus receptores solo cuando tales componentes se mantienen en una disposición particular, que es la que aparecería en la pared o en la célula intacta. Actualmente se habla de la existencia de una adsorción reversible, otra adsorción irreversible y finalmente de la liberación del DNA. Se ha sugerido que, en ciertos sistemas se trataría de diferentes etapas secuenciales del proceso de adsorción que pueden implicar, en algunos casos, el reconocimiento específico y posiblemente secuencial de sitios distintos en la pared y en la membrana plasmática de la bacteria receptora.

51 1.4.2. Acceso de los fagos al material receptor

Es obvio que los fagos deben tener acceso a sus receptores para poder unirse a ellos. La inhibición de la unión del fago a su bacteria huésped que se observa cuando las bacterias o las paredes se adsorben a lectinas apropiadas o a moléculas de anticuerpo (125, 126, 127, 128, 129) puede deberse simplemente al recubrimiento de la superficie bacteriana por la proteína unida y no indica necesariamente que el componente de pared que une el anticuerpo o la lectina sea en sí mismo un componente del receptor del fago.

La presencia de una cápsula de ácido hialurónico en estreptococos puede bloquear el acceso de los fagos a los receptores de pared aunque las bacterias encapsuladas pueden ser infectadas en medios conteniendo hialuronidasa (130) o bien por

fagos que lleven asociado este enzima (131, 132). La presencia de un polisacárido "microcápsular" en Staphylococcus aureus confiere también resistencia frente al fago bloqueando el acceso al material receptor asociado a la pared (133). De forma similar, una elevada producción de proteína M en estreptococos (134) y de proteína A en estafilococos (135) protege a las bacterias frente a la infección fágica. Dado que la presencia de cápsulas y de proteínas superficiales se asocia con la virulencia en tales bacterias, una consecuencia de la presencia de fagos en ambientes naturales será la selección de estirpes virulentas de estos organismos (134, 136, 135).

Las alteraciones en la pared celular pueden bloquear el acceso de fagos al material receptor subyacente que podría ser considerado como el responsable de la "adsorción irreversible" como se demuestra por la observación (137) de que el acceso del bacteriófago ϕ 29 de B. subtilis al receptor asociado a membrana se bloquea en un mutante gta A de Bacillus subtilis 168 cuya pared celular posee galactosamina en su ácido teicoico en lugar de D-glucosa.

Por otra parte, los elegantes experimentos de Archibald y colaboradores (138, 139) pusieron en evidencia que en B. subtilis W23 cultivado en quimostato en condiciones de limitación de fosfato se alteraba la composición de su pared: aumentaba el contenido de galactosamina y la glucosa del ácido teicoico era sustituida por el glucurónico dando lugar al ácido teicurónico al cual no podía adsorberse el fago SP50. En experimentos de re-

versión, al añadir un exceso de fosfato se sintetizaba e incorporaban nuevas unidades de ácido teicoico exclusivamente en la superficie interna de la pared, lo que impedía, durante varios minutos, la adsorción fágica. No obstante, empleando paredes aisladas inmediatamente después de la adición de fosfato el fago SP50 podía adsorberse a la superficie interna de tales paredes (139).

1.4.3. Receptores asociados con flagelos

Se han aislado dos fagos flagelotrópicos en bacterias Gram-positivas: el PBS1 que infecta a estirpes móviles de Bacillus subtilis (140) y el PBP1 que lo hace a estirpes móviles de B. pumilis (141). Ambos fagos se unen girando sus fibras de cola alrededor del filamento flagelador. Estudios sobre PBS1 han mostrado que esta unión es reversible (143) y no es específica para los flagelos de bacterias sensibles (144). Los fagos se mueven hacia la base del filamento y se unen allí irreversiblemente: esta unión va seguida de la contracción de la cola y la liberación del ácido nucleico. El cese de la movilidad que aparece después de la infección va en paralelo con la observación de bacterias que llevan unidos irreversiblemente fagos vacíos (144) hecho que puede deberse al daño causado por el fago en la base flagelar. Parece que no se requieren los componentes de la pared celular para la adsorción pues el PBS1 se une a protoplastos de B. subtilis (143).

1.4.4. Receptores asociados con la pared celular y la membrana plasmática

1.4.4.1. Receptores en las capas proteicas superficiales

La presencia de proteínas, guardando una disposición re-

gular (145, 146) en la superficie externa de las paredes de la es tirpe P1 de Bacillus brevis se ha encontrado que actúa como receptor para varios fagos. El fago M de cola contráctil se inactiva por la proteína aislada (147). Los mutantes resistentes al fago M tienen subunidades proteicas superficiales alteradas; en algunos casos tales proteínas tenían un peso molecular sustancialmente más bajo que las del tipo salvaje, aunque la composición de aminoácidos apenas había cambiado.

1.4.4.2. Receptores asociados con el peptidoglicano y el ácido teicoico.

Se ha demostrado que los ácidos teicoicos forman parte esencial de los receptores de varios fagos. Algunos fagos se adsorben irreversiblemente a paredes aisladas, mientras que otros se unen solo reversiblemente, aunque, aparentemente, de manera específica a paredes aisladas de bacterias sensibles. Todavía no se posee información suficiente sobre la posible relación entre la reversibilidad de la unión y la naturaleza del receptor o del sistema de unión del fago. A continuación vamos a revisar en detalle la naturaleza de tales interacciones en diferentes estirpes de bacterias Gram-positivas.

1.4.4.2.1. Estafilococos

Los componentes mayoritarios de las paredes de estafilococos son el peptidoglicano y el ácido teicoico altamente entrelazados, aunque pueden estar presentes otros polímeros, especialmente proteínas (148). Los fagos tipo de estafilococos cuyos receptores se han estudiado son morfológicamente del grupo B de

Bradley y tienen colas flexibles terminadas en una estructura en forma de botón o en una base plana (149).

Estudios iniciales demostraron que varios fagos de esta-filococo se adsorbían a cepas de S. aureus independientemente de si lisaban o no tales cepas (150). Aun más, estos fagos se adsorbían a ciertos bacilos y a estreptococos del grupo D (151, 152). Por otro lado, Ralston (153) observó que la extracción del ácido teicoico de las paredes de S. aureus K, eliminaba su capacidad de adsorber el fago K y Morse (154) mostró que los fagos no se unían a las fracciones del peptidoglicano o del ácido teicoico obtenidas por extracción de paredes con ácido tricloroacético caliente. Con una sola excepción (155) todos los estudios posteriores han apoyado la sugerencia de Morse (154) de que el ácido teicoico participa en la estructura del receptor y que la disposición del ácido teicoico, su forma de unión al peptidoglicano, puede jugar un papel importante en el proceso de unión del fago.

55

Una clara evidencia de la implicación del ácido en la adsorción fágica la obtuvieron Coyette y Ghuysen (156) quienes encontraron que la eliminación enzimática de los sustituyentes N-acetilglucosaminil del ácido teicoico de la pared de S. aureus Copenhague reducía su capacidad para unir cualquiera de tres de sus fagos específicos, los tipos 3C, 71 y 77. No obstante, la dependencia de estos fagos por los sustituyentes N-acetilglucosaminil también parece ser sorprendentemente inespecífica pues estos fagos se unen igualmente bien a estirpes en las que el acetamidoazúcar tiene toda su configuración anomérica en α o toda en β (157, 158).

La sugerencia (154) de que tanto el ácido teicoico como el peptidoglicano están implicados en la unión del fago está apoyada por la observación de que el fago 52A no se inactiva por material de pared enzimáticamente solubilizado (157) y no se une a paredes de S. aureus H después de la eliminación selectiva de los grupos O-acetilo que están unidos a algunos residuos de ácido N-acetilmurámico en el peptidoglicano (159). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Muruyama (158) se concluyó que los tres componentes, ácido teicoico, cadena glicánica y cadena peptídica, deben presentar una determinada disposición estereoquímica para inactivar al fago 3C.

Estos resultados sugieren que la incapacidad de los componentes de pared tomados aisladamente o mezclados "in vitro" en distintas proporciones para inactivar ciertos fagos que no obstante se unen a paredes intactas puede explicarse sobre la base de que tales fagos tienen requerimientos específicos por una conformación particular que se pierde cuando las paredes se solubilizan.

1.4.4.2.2. Bacilos

La biología de los fagos que infectan a Bacillus subtilis ha sido revisada en detalle por Hemphill y Whiteley (160). Morfológicamente se incluyen representantes del grupo A de Bradley (como los fagos SP8, SP50, Ø25 y PBSX), grupo B (como SPP1, SPO2 y Ø105) y grupo C (como el fago Ø29). Se ha probado que representantes de los tres grupos requieren la presencia de ácido teicoico en su material receptor (37). También se ha indicado que el peptidoglicano participa junto con el ácido teicoico en el receptor

en la estirpe W23.

La particular conformación del ácido teicoico puede tener una importancia fundamental como parecen sugerir los estudios (161) llevados a cabo sobre la influencia del cloruro sódico en la unión del fago Ø25 a paredes de B. subtilis 168. En presencia de concentraciones elevadas de cloruro sódico, el ácido teicoico aislado sufre un cambio conformacional gradual y adopta una conformación de cadena estadística. Parece probable que una transición similar tenga lugar en paredes intactas, implicando al menos esa parte del ácido teicoico que está expuesta a la superficie. Esto podría explicar el efecto inhibitorio del ClNa sobre la unión del fago Ø25 a las paredes.

57 El peptidoglicano también juega algún papel en la adsorción fágica pues Young (35) observó que la capacidad de las paredes de B. subtilis 168 para inactivar el fago Ø25 se perdía cuando estas paredes se autolisaban. De forma similar, la digestión por lisozima de las paredes de B. subtilis W23 destruye su capacidad para inactivar SP50 (139). Se ha sugerido que la autólisis provoca una alteración de la geometría del receptor fágico, provocando un descenso de adsorción, y que el fago Ø25 debe reconocer el peptidoglicano intacto así como el ácido teicoico glucosilado para conseguir su máxima adsorción.

Young y colaboradores han sugerido (162, 163, 35) que en B. subtilis pueden existir receptores, quizás más débiles en su capacidad para adsorber fagos, cuya función se pone de manifiesto en ausencia de ácido teicoico con glicerol glucosilado, que sería

el receptor primario. La posibilidad, sugerida por estudios de microscopía electrónica (164), de que los fagos pudieran ser capaces de unirse a membranas ha sido confirmada por Jacobson y Landman (137) quienes demostraron que varios fagos de bacilos que se adsorben a paredes aisladas son también capaces de adsorberse a protoplastos. Esto no se debe a la presencia de material de pared en la superficie de los protoplastos ya que en el caso del fago Ø29, este se une a protoplastos derivados de una estirpe gta A de B. subtilis 168, a cuya pared es incapaz de unirse. Jacobson y Landman (137, 165) han sugerido que los fagos utilizarían para su adsorción a membrana algunos componentes químicos de la misma que son semejantes aunque no idénticos a otros que están presentes normalmente en la pared.

Así, los fagos que tienen especificidad por el ácido teicoico con glicerol glucosilado de la pared pueden también unirse al ácido teicoico de membrana presente en la superficie de los protoplastos. Los ácidos teicoicos de membrana, aunque relacionados químicamente con el ácido teicoico de pared, se sintetizan siguiendo una ruta metabólica diferente y a partir de intermediarios también diferentes de aquellos implicados en la biosíntesis del ácido teicoico de pared (166). Se sabe (65) que los ácidos teicoicos de membrana se encuentran entremezclados con las estructuras de las paredes celulares sobre la superficie de ciertas bacterias, ya sea porque la membrana se extiende y alarga hacia la pared o porque pasan a través de la pared en el proceso de su excreción al medio. Posiblemente por esto el ácido teicoico de

membrana podría ser el sitio de unión alternativo sugerido por Young y otros investigadores (35).

1.4.4.3. Receptores asociados con el peptidoglicano y el polisacárido u otros componentes

1.4.4.3.1. Lactobacilos

Las paredes de ciertas estirpes de Lactobacillus plantarum contienen además del ácido teicoico con ribitol, un polisacárido fosforilado compuesto de ramnosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fosfato (167, 168). Se ha visto que en la unión del fago 1 la galactosa parece esencial para la adsorción pero la ramnosa, en proporción adecuada, también se requiere para alguna etapa subsecuente del proceso de adsorción o de penetración. Por otra parte, Yokokura ha sugerido (169) que para que tenga lugar la adsorción irreversible y la inactivación del fago J1 que infecta a L. casei S-1 se requiere la presencia tanto de la ramnosa de la pared como de la galactosamina presente en la membrana plasmática.

Asimismo, la adsorción del fago PL1 a L. casei ATCC 27092 (170, 171) es inhibida por la ramnosa. El fago PL1 se adsorbe reversiblemente a paredes aisladas del huésped y esta unión puede ser completamente inhibida por incubación del fago y las paredes en presencia de ramnosa.

Las proporciones de fagos no unidos eran casi idénticas a 0°C y a 37°C demostrando que no se requiere cantidad significativa de energía de activación para la adsorción, y que ésta necesita, como primer paso, una interacción iónica, entre el fago y la superficie de la pared. La adsorción a células intactas es, al

principio reversible pero se vuelve irreversible cuando se incuba a 37°C y los fagos, en ese caso, ya no pueden ser desplazados por la ramnosa. La reacción irreversible se inhibe claramente a 0°C, lo que sugiere la existencia de alguna reacción enzimática para la asociación definitiva de los fagos con la célula huésped. La adsorción irreversible no está condicionada por el estado metabólico de las bacterias, pero la penetración del DNA fágico se inhibe claramente en células metabólicamente inactivas o en presencia de arsenato (172), aunque otros inhibidores metabólicos no tengan efectos selectivos. Aparentemente, por tanto, el proceso de penetración requiere células huésped metabólicamente activas y se puede separar secuencialmente del proceso de adsorción irreversible.

1.4.4.3.2. Estreptococos

En un trabajo reciente realizado en estreptococos de los grupos A y G (173) se ha visto que el fago A25 se adsorbe irreversiblemente a bacterias muertas por calor, aunque la rotura mecánica de tales bacterias destruye completamente su capacidad de unir irreversiblemente el fago. A partir de estos resultados se ha llegado a la conclusión de que la adsorción fágica tiene lugar en un proceso de dos etapas, la unión reversible del fago a la pared de la bacteria seguida de una inactivación irreversible que requiere la presencia de algún componente celular que se pierde, se desplaza o se destruye por la rotura mecánica de las bacterias. La unión reversible a las paredes es específica pues se observa solamente cuando se emplean paredes de bacterias sensibles (grupos A y G). Sin embargo, no requiere la participación de los polisacáridos grupo-específicos pues el peptidoglicano purificado

que no contiene prácticamente polisacárido retiene la capacidad de unir fagos. Esta capacidad se destruye por tratamiento con lisozima o amidasa: también se destruye cuando el peptidoglicano se liofiliza, lo que sugiere que habrán ocurrido cambios irreversibles en su organización estructural. Dado que en estreptococos existen importantes diferencias estructurales entre los distintos carbohidratos grupo-específicos (174) y algunos fagos de estreptococos son mucho menos grupo-específicos de lo que se había pensado anteriormente, puede ser que tales fagos de estreptococos reconozcan solamente el componente peptidoglicánico como su receptor primario. La capacidad del fago A25 para unirse a paredes de estreptococos de los grupos A y G, pero no a los del grupo B (175) puede ser una consecuencia de la presencia, en el último caso, de un puente interpeptídico que difiere en composición (176) del existente en los estreptococos.

En el caso del fago P3, polisacáridos y proteínas pueden ser componentes esenciales del receptor. Cuando se prepararon receptores aislados (177) por rotura ultrasónica a partir de esferoplastos de estreptococos del grupo D, se obtuvo un material particulado que se pensó que contenía pared celular y material de membrana. La capacidad de adsorción fágica de este material se destruía por oxidación con peryodato y también por digestión proteolítica.

En Streptococcus lactis ML3 la capacidad de células intactas para unir irreversiblemente el fago ml3 se destruía por tratamiento con solventes lipídicos. Posteriormente se confirmó

(178) que la membrana plasmática une irreversiblemente dicho fago. El material receptor soluble se aisló por extracción de membranas con desoxicolato sódico y la filtración en gel dio una fracción lipoproteica activa de peso molecular entre 2×10^5 y 8×10^5 . La inactivación del fago m13 por esta fracción siguió una cinética de primer orden y su actividad específica era doce veces mayor que la de la membrana completa. La fracción lipoproteica era químicamente heterogénea y, aunque su actividad no era debida a la pequeña cantidad (2%) del carbohidrato presente, no fue posible establecer qué componente proteico o lipoproteico, era el responsable primario de la adsorción. Sin embargo, su actividad se destruía por incubación con tripsina pero no con lipasas.

1.4.5. Modelos de adsorción fágica

Salvo unas pocas excepciones, en general, los fagos específicos de los sistemas bacterianos descritos anteriormente no se inactivan por materiales solubles derivados de la bacteria huésped. Esto no implica necesariamente que tales fagos sean incapaces de unirse reversiblemente a materiales solubles.

La adsorción reversible, no acompañada de inactivación, se ha puesto de manifiesto en varios estudios con paredes aisladas. Incluso en los casos donde las paredes bacterianas intactas aisladas inactivan fagos, la incapacidad de los materiales enzimáticamente disueltos o químicamente extraídos para inactivar los fagos puede no ser un reflejo de una ausencia de unión del fago, y quizás deba explicarse en otros términos. Una complicación adicional surge del hecho de que el peptidoglicano puede partici-

par solo indirectamente en la unión de ciertos fagos que son específicos para el ácido teicoico o el polisacárido. En estos casos, el peptidoglicano puede servir para mantener el ácido teicoico o el polisacárido en una disposición particular que se requiere para el reconocimiento por parte del fago. Alternativamente, el peptidoglicano junto con el ácido teicoico o el polisacárido puede ser el auténtico receptor reconocido por el fago. Estas posibilidades no son mutuamente excluyentes y su importancia relativa puede variar para distintos fagos.

La unión inicial de los fagos, aunque aparentemente es mucho menos estereoespecífica de lo que cabría esperar, puede servir para mantener al fago en la superficie mientras tienen lugar las interacciones subsiguientes, y quizás mucho más específicas, que conducen a la fijación irreversible. Estas últimas interacciones podrían implicar la reorientación del fago o su interacción con otros componentes bacterianos. Así, Lovett y Shockman propusieron (179, 180) que la primera etapa de la infección de Micrococcus lysodeikticus por el fago N1 es una unión reversible entre componentes de la cola del fago y la pared celular, que va seguida por una etapa que implica algún otro material celular, probablemente la membrana plasmática, que conduce a la adsorción irreversible. Una secuencia de hechos similares puede seguirse en la adsorción de los fagos J1 y PL1 a L. casei, del fago m13 a S. lactis, y posiblemente del fago A25 a estreptococos del grupo A y en varios fagos de B. subtilis.

Jacobson y Landman (137) consideraron muy poco probable que las especies moleculares responsables de la unión de los fagos a los protoplastos fueran distintas de las responsables de la

unión a los receptores de pared. Esto es cierto si los componentes del fago implicados en ambas uniones son las mismas pero, si no es así, distintos componentes del fago podrían ser capaces de reconocer distintos receptores uno en pared y otro en membrana, no relacionados estructuralmente entre sí. Más recientemente, los mismos autores (181) han sugerido que el fago Ø29 se une reversiblemente al ácido teicoico glucosilado de la pared de B. subtilis 168 a través de los apéndices del cuello del fago (182) y que esta unión reversible permite a la cola del fago aproximarse a algún componente de la membrana al cual se une posteriormente primero reversible y más tarde irreversiblemente.

Todo parece indicar que, en bacterias intactas, el fago Ø29 puede establecer contacto con su receptor de membrana, solo si previamente puede unirse a la pared celular. Aunque esto puede reflejar la necesidad de que el fago esté anclado por su cola el tiempo necesario para hacer contacto con los ácidos lipoteicoicos intercalados en la pared o con otros componentes de membrana. En otros casos la unión irreversible, o inactivación, puede asegurarse solo cuando la cola o la espícula de la cola penetra en la pared y hace contacto con la superficie de la membrana. Aunque todavía se poseen pocos datos al respecto, algunos fagos que infectan a bacterias Gram-positivas han demostrado contener lisinas asociadas (183). Estas lisinas, facilitarían la penetración de la pared que sería un pre-requisito para la interacción de fagos como m13 y J1 con sus receptores de membrana. En otros casos, los fagos parecen estar desprovistos de tales lisinas, pero la adsorción de estos fagos puede hacer a la pared particularmente

sensible a la lisina exógena o a la autolisina bacteriana (153).

No se sabe todavía si la unión irreversible a bacterias muertas o a estructuras celulares aisladas va acompañada de la liberación de ácido nucleico. Yokokura (169) ha señalado que, después de la unión irreversible a las preparaciones pared-membranas de L. casei, el fago J1 parece presentar un mayor número de cabezas vacías. Watanabe y Takesue (172) han demostrado que la penetración del ácido nucleico del fago PL1 es dependiente del estado metabólico de la bacteria huésped aunque la adsorción irreversible del fago no está afectada por el estado fisiológico de las células. Se ha observado una unión irreversible que no va acompañada de liberación de ácido nucleico en los fagos Ø25 y SP10 de B. subtilis (35): La microscopía electrónica demostró que los fagos adsorbidos a paredes celulares tenían cabezas llenas y colas contraídas y distorsionadas. Es muy probable que incluso en el caso de estos fagos contráctiles, se requiera la interacción con componentes de membrana para la liberación del ácido nucleico incluso aunque las paredes aisladas adsorban el fago irreversiblemente y ésto provoque su contracción.

En resumen, se puede concluir que ciertos fagos se unen solo reversiblemente a paredes celulares aisladas, pero lo hacen irreversiblemente a bacterias muertas por calor, preparaciones pared-membrana, protoplastos, fragmentos aislados de membrana plasmática o componentes solubles de la membrana. Al menos en el caso del fago J1 de Lactobacillus casei (169) esta inactivación va acompañada de liberación del ácido nucleico. Otros fagos se unen irreversiblemente a paredes aisladas y en algunos casos, (138, 35) es

ta unión irreversible no parece estar acompañada por liberación del ácido nucleico incluso aunque haya contracción y distorsión de la cola (96).

Por tanto, en general, se podría suponer que la adsorción necesita dos interacciones específicas y secuenciales: en primer lugar, con componentes de la pared bacteriana y en segundo lugar con componentes de la membrana intercaladas o no en la pared. La interacción con la membrana sería, por tanto, un pre-requisito para la liberación del DNA con el fin de proteger al DNA frente a procesos degradativos durante su paso a través de la gruesa pared celular.

1.5. Lisinas asociadas a fagos

Muchos bacteriófagos inducen la síntesis de lisinas que degradan la pared celular durante el proceso infectivo. Varias de estas lisinas se han caracterizado tanto genética como bioquímicamente. No obstante, al igual que sucede en el caso de los receptores fágicos, se posee un mejor conocimiento sobre las lisinas asociadas a fagos que infectan a bacterias Gram-negativas que de aquellas otras asociadas a fagos de bacterias Gram-positivas. Lisinas, con distintas actividades hidrolíticas, se han aislado de cultivos infectados con los colifagos T2, T3, T4, T5, T6, T7 y lambda y del fago P22 de Salmonella (184, 185, 186, 187, 188, 189, 190). Por otra parte, también se han estudiado en detalle las lisinas asociadas a fagos que infectan a estreptococos.

67

Las lisinas de los fagos T2 y T4 son N-acetilmuramidasa (189), mientras que la del fago T7 es una N-acetilmuramil-L-alanil amidasa (186) y la del fago lambda es una endopeptidasa (184). Los bacteriófagos T3 y T5 parece que también poseen actividades líticas similares (185). La gran mayoría de estos enzimas se han aislado y purificado, lo que ha permitido estudiar sus propiedades químicas.

Se ha comprobado que diversas mutaciones encontradas en colifagos conducen a la pérdida de su actividad lítica, lo que indica que los genes responsables de la síntesis de estas proteínas líticas se encuentran localizados en el genoma viral (191, 192, 193). Durante el proceso infectivo del fago T4 se ha comprobado la producción de tres proteínas relacionadas con la lisina. El gen e es responsable de la lisozima fágica, y mutantes defec-

tivos en este gen no se lisan; sin embargo, mutaciones en otro gen el rIV o el s permiten la lisis de mutantes e (191). La función normal del gen s se cree que está relacionada con la integridad de la pared celular del huésped. Mutaciones en el gen t también producen resistencia a la lisis a través de un mecanismo desconocido.

En el caso del bacteriófago lambda, existen dos genes, R y S, implicados en la lisis celular (192). El producto del gen R es una endolisina (194) mientras que el producto del gen S parece afectar a la permeabilidad celular (195) pero aún no ha sido caracterizado.

En el caso del fago Ø6, un virus RNA con envuelta lipídica que infecta a Pseudomonas phaseolicola, la infección comienza por la adsorción a los pili del huésped (196). A través del empleo de mutantes se ha podido demostrar que se requiere la actividad de una lisina en un paso temprano de la infección. Esta lisina es una proteína estructural (P5) de la partícula fágica. Se ha sugerido, que la proteína P5 es fundamental para el paso del RNA del virión a través de la pared bacteriana; además, esta lisina colabora en la liberación de la progenie fágica a través de una interacción, cuya naturaleza se desconoce, con otra proteína estructural de la partícula fágica (P10). Sin embargo, la asociación de la lisina (P5) con la partícula fágica es, probablemente, necesaria para la penetración del RNA, pero no lo es para la lisis de la célula, ya que mutantes defectivos en el proceso de morfogénesis fágica pueden lisar la célula huésped.

La mayoría de las lisinas fágicas son solubles y no están asociadas a las partículas del bacteriófago (184, 197, 187,

189); sin embargo, hay excepciones como el caso citado anteriormente (fago Ø 6) o en el del bacteriófago G de Bacillus megaterium que inducen dos agentes líticos, uno libre y otro asociado al virión (198). También se ha descrito una lisina asociada al virión para un fago de estreptococo (199).

Se ha estudiado con gran detalle una lisina asociada al bacteriófago C1 (C-PAL) que infecta a estreptococos del grupo C (199, 200, 201). Empleando preparaciones crudas de este enzima se han llevado a cabo experimentos de "curación fenotípica" en Streptococcus sanguis (202) siguiendo un diseño experimental similar al descrito para S. pneumoniae en el apartado 1.2.5.3.2.; así mismo, esta lisina se ha utilizado para liberar de las paredes de estreptococos varios antígenos (203), carbohidrato C (204) y en la preparación de protoplastos y esferoplastos de varios grupos de estreptococos (201, 205). Sin embargo, solo recientemente se ha conseguido su purificación a homogeneidad (205).

Se ha demostrado que esta C-PAL se encuentra tanto unida a las partículas fágicas como libre en los sobrenadantes, después de la lisis del cultivo (199). También se ha descrito (206) una lisina asociada al fago A25 que infecta a los estreptococos del grupo A (A-PAL). Esta A-PAL comparte con la C-PAL muchas propiedades físico-químicas, pero es mucho menos activa frente a paredes aisladas en ensayos "in vitro"; además, esta A-PAL solo se ha detectado en forma libre y nunca asociada con las partículas fágicas.

Un caso muy peculiar nos lo ofrece el bacteriófago Dp-1 que infecta a S. pneumoniae. Se ha demostrado (80) que para la li

beración de la progenie fágica de los neumococos infectados se requiere la participación de la autolisina del huésped, siguiendo un mecanismo similar al propuesto para la lisis inducida por antibióticos beta-lactámicos (207). Esto explicaría la incapacidad del fago Dp-1 para lisar neumococos que crecen en medio con etanolamina, ya que la incorporación de este aminoalcohol al ácido teicoico de pared, en lugar de la colina, vuelve a la pared insensible a la autolisina.

Asimismo, un mutante de S. pneumoniae (cw-1) deficiente en amidasa, era resistente a la lisis bajo determinadas condiciones fisiológicas en cultivos infectados por Dp-1 (80). Posteriormente nos ocuparemos con gran detalle de este modelo experimental que nos ha servido como punto de partida para el aislamiento de una nueva actividad lítica inducida por el bacteriófago Dp-1 en S. pneumoniae.

1.6. Objetivos

En 1928 Griffith (208) en S. pneumoniae, fue el primero en emplear el término transformación bacteriana para describir la transferencia de información genética de un microorganismo a otro. Tuvieron que transcurrir más de 15 años para que, de nuevo en S. pneumoniae, Avery y colaboradores (209) dieran a la transformación su auténtica dimensión, que serviría de base para el desarrollo posterior de la Genética Bacteriana, al demostrar que la información para la transmisión de caracteres hereditarios estaba contenida en el DNA.

Como se ha señalado en la primera parte de esta Memoria, no dejaba de resultar paradójico que siendo el neumococo la bacteria donde comenzó a cimentarse el desarrollo de la Genética Bacteriana, fuese la transformación el único mecanismo de transmisión de información genética conocido en esta bacteria hasta hace 3 ó 4 años. Es indudable que una de las razones principales para explicar esta limitación estaba basada en los frustrados intentos para aislar bacteriófagos que infectaran a esta bacteria.

El aislamiento de bacteriófagos de neumococo en 1975 abrió nuevas perspectivas en este sistema como hemos puesto de manifiesto en los capítulos anteriores. Al plantearnos el desarrollo experimental de nuestro trabajo hemos tenido muy en cuenta una serie de consideraciones entre las que vamos a destacar las siguientes:

a) Desde 1975 a 1978 se perfeccionaron y desarrollaron los métodos de aislamiento, purificación y caracterización de varios bacteriófagos de S. pneumoniae (102, 103, 109, 105) en particular de dos

de ellos en nuestro laboratorio (103, 114), lo cual facilitaba grandemente la accesibilidad a uno de los materiales de partida indispensables.

b) Los conocimientos sobre la composición y estructura de las envueltas periféricas de bacterias Gram-positivas en general y de S. pneumoniae en particular habían experimentado un desarrollo muy considerable. Mención especial, aun cuando nos ocupemos de ello en detalle con posterioridad, merecen los trabajos de Tomasz y colaboradores (63, 210). Estos autores, sirviéndose del hecho singular de la presencia de colina en el ácido teicoico de la pared de neumococo, elaboraron un elegante modelo sobre el mecanismo de incorporación y de distribución del ácido teicoico en la pared de S. pneumoniae.

Por otra parte, a pesar de la menor complejidad estructural que presenta la pared de las bacterias Gram-positivas con respecto a las Gram-negativas, los conocimientos sobre receptores fágicos en la pared de las primeras eran muy limitadas y se carecía absolutamente de datos en el caso particular de neumococo..

El análisis de estos dos hechos nos llevó a la conclusión de que los fagos de neumococo podrían servir como una excelente herramienta de trabajo no solo para desarrollar las hipótesis experimentales de Tomasz sobre el modelo de incorporación de los componentes de pared recién sintetizados a las estructuras preexistentes, sino también para tratar de estudiar la naturaleza de los receptores fágicos en estas bacterias Gram-positivas.

c) En nuestro laboratorio, se trabajaba en 1978 en el primer estudio sobre la replicación de un fago en estreptococos (117) y poco antes (101, 112) el empleo de un diseño experimental basado en la modulación del pH del medio de cultivo de S. pneumoniae había llevado a concluir como ya hemos señalado, que el fago Dp-1 utilizaba en la estirpe R36A la amidasa del huésped para la liberación de la progénie fágica (80). Este modelo guardaba estrechas relaciones con el mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos, en particular en lo que se refiere a los efectos irreversibles, y de mayor importancia farmacológica, propiciados en diversos microorganismos por tales drogas; un planteamiento experimental que permitió desarrollar y confirmar el fenómeno de "tolerancia antibiótica" (101, 112).

73 Sin embargo, el comportamiento biológico del bacteriófago Dp-1 y de otros fagos de neumococo en mutantes carentes de amidasa nos llevó a plantearnos la posibilidad de que pudieran existir mecanismos alternativos o complementarios para la liberación de la progénie fágica. De aquí que centráramos parte de nuestros esfuerzos en la posible identificación del factor o factores implicados en este proceso.

En resumen, la Memoria que presentamos se ocupa en su parte experimental de la identificación de un nuevo enzima que aparece durante el proceso infectivo del fago Dp-1 en un mutante de S. pneumoniae defectivo en la amidasa presente en la estirpe salvaje.

A continuación abordamos el estudio sistemático de dos etapas del proceso infectivo donde persisten grandes lagunas de

Conócimiento en bacterias Gram-positivas en general y en neumococo muy en particular, como son la adsorción y la liberación de la progenie fágica al medio de cultivo. Para esta última era imprescindible la purificación de la lisina inducida por el fago en neumococo a la cual nos acabamos de referir. En cuanto a la adsorción del bacteriófago Dp-1 a S. pneumoniae presentamos resultados que esperamos contribuyan a aportar un mejor conocimiento sobre la naturaleza de los receptores fágicos en neumococo y que nos permitan demostrar cómo los fagos pueden servir como auténticos trazadores biológicos para seguir el proceso de incorporación y distribución de los componentes de la pared celular de S. pneumoniae.

85

2. MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Bacterias

A lo largo de los experimentos que se detallan en la presente Memoria se ha utilizado una estirpe de Streptococcus pneumoniae, cepa salvaje R6 derivada de la R36A cedida amablemente por el Dr. A. Tomasz de la Universidad Rockefeller de Nueva York. Cw-1 es un mutante de la cepa salvaje R36A obtenido por Lacks mediante tratamientos sucesivos con nitrosoguanidina, deficiente en su principal autolisina (N-acetilmuramil-L-alanil amidasa) (93).

Las bacterias con ácidos teicoicos conteniendo distintos residuos aminoalcohólicos (tales como colina, etanolamina (EA), N-monometil etanolamina (MEA) o N,N-dimetil etanolamina (DEA)) se obtuvieron cultivando, durante más de 20 generaciones, la estirpe R6 en el medio con el aminoalcohol apropiado, como se ha descrito anteriormente (63).

2.2. Bacteriófagos

El bacteriófago utilizado fue el Dp-1 (106), cuyas características generales se describieron en el apartado 1.3.1.

2.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados en esta Memoria han sido ampliamente descritos en la literatura (16, 210, 211). Dado lo complejo de la preparación de estos medios consideramos oportuno dar una clara idea de sus características.

En primer lugar hubo de prepararse una serie de soluciones de trabajo compuestas por:

- Solución C_{den} - Base

Glicina 380 mg.; L-Alanina 700 mg.; L-Valina 1440 mg.; L-Isoleucina 1520 mg.; L-Prolina 2320 mg.; L-Serina 1180 mg.; L-Treonina 900 mg.; L-Metionina 620 mg.; L-Triptófano 280 mg.; L-Aspártico 1440 mg.; L-Glutámico 4400 mg.; L-Cisteína 300 mg.; agua destilada y desionizada c.s.p. 4000 ml. La solución se ajusta a pH =7.

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

- Solución de Aminoácidos

L-Histidina 640 mg.; L-Tirosina 122 mg.; L-Arginina 800 mg.; agua destilada y desionizada c.s.p. 1000 ml.

Se esteriliza por filtración en Millipore (0,22 μ).

- Solución Vitaminas - Colina

Solución de Adams I (Biotina 0.03 mg.; Acido nicotínico 30 mg.; Pirodoxina. ClH 35 mg.; Pantotenato cálcico 120 mg.; Tiamina. ClH 32 mg.; Riboflavina 14 mg.; agua destilada y desionizada c.s.p. 200 ml) 12,8 ml.; Asparagina (5 mg/ml) 32 ml; agua destilada y desionizada 36 ml.

Se esteriliza por filtración en Millipore (0,22 μ).

- Solución SAC

Acetato sódico. 3H₂O 20 gr.; Cloruro sódico 20 mg.; agua destilada y desionizada c.s.p. 1000 ml.

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

- Solución de Suplemento

Solución de sales ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 gr.; Cl_2Ca anhidro 0,5 gr; $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4,5 mg.; agua c.s.p. 1000 ml.) 60 ml.; Glucosa 20% 120 ml.; Sacarosa 50% 6 ml.; Adenosina (2 mg/ml) 120 ml; Uridina (2 mg/ml) 120 ml.

- Solución Pre - C

Acetato sódico. $3\text{H}_2\text{O}$ 2 gr.; Casamino ácidos 5 gr.; L-Triptófano 5 mg.; L-Cisteína. ClH 50 mg.; agua destilada y desionizada c.s.p. 1000 ml. La solución se ajusta a $\text{pH} = 7,4-7,6$.

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

- Solución Adams III

Solución de Adams I 64 ml.; Solución de Adams II ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg.; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50 mg.; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg.; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mg.; ClH conc. 1 ml.; agua destilada y desionizada c.s.p. 100 ml) 16 ml.; Asparagina 800 mg.; Colina 80 mg.; CaCl_2 1% 0,64 ml.; agua destilada y desionizada 400 ml.

Se esteriliza por filtración en Millipore ($0,22 \mu$).

- Medio C_{den} - EA

A partir de las soluciones de trabajo descritas anteriormente se preparó el medio C_{den} - EA añadiendo por orden los distintos componentes:

C_{den} - Base	2500 ml
Aminoácidos	625 ml
Glutamina (1mg/ml)	125 ml
Vitaminas - Colina	125 ml

Piruvato 2%	62,5 ml.
SAC	500 ml.
Suplemento	162,5 ml.
Tampón fosfato 1M pH 8,0	187,5 ml.
L-Leucina (10 mg/ml)	125 ml.
L-Fenilalanina (10 mg/ml)	62,5 ml.
L-Lisina (10 mg/ml)	112,5 ml.
Etanolamina (2 mg/ml)	100 ml.
Agua destilada y desionizada	325 ml.

En el caso de que se desee preparar medio C_{den} - Colina, se sustituye la etanolamina por 25 ml. de colina (1mg/ml).

De igual manera, para preparar C_{den} - DEA o C_{den} -MEA, medios utilizados para multiplicar las células DEA o células MEA respectivamente, se sustituye la etanolamina por 100 ml de N,N-dimetiletanolamina (DEA) (2mg/ml) o 100 ml de N-monometiletanolamina (MEA) (2mg/ml).

- Medio $C_{pH 8}$

Este medio se utilizó para cultivar la bacteria R6 (a menos que se especifique lo contrario), y su composición se realiza también a partir de las soluciones patrón anteriormente citadas, añadiendo por orden los distintos componentes:

Pre C	400 ml.
Suplemento	13 ml
Glutamina (1mg/ml)	10 ml
Adams III	10 ml

Piruvato 2% 5 ml
Tampón fosfato 1M, pH 8,0 15 ml

Se esteriliza por filtración en Millipore (0,22 μ).

- Medio C + Y

Este medio es el utilizado para la multiplicación de la bacteria cw-1. Consta básicamente de C_{pH8} suplementado con extracto de levadura estéril:

C_{pH8} 1000 ml
Extracto de levadura 4% 20 ml

Además de estos medios de cultivo se usaron distintos tampones y soluciones cuya composición es la siguiente:

- TBT

ClNa 0,1 M
Tris-ClH 0,1, pH 7,8
Cl₂Mg 0,01 M

- Tampón de protoplastos

ClNa 0,15 M
Tampón fosfato potásico 0,05M, pH 8,0
Albúmina bovina 0,4 mg/ml
EDTA 0,01M
Sacarosa 25% (peso/vol)

- PBS

ClNa 0,15 M
Tampón fosfato sódico 0,2M, pH 7,5

- Solución salina

ClNa 0,15M

Las soluciones empleadas para las electroforesis en gel de poliacrilamida fueron las siguientes:

- Solución para geles (10% acrilamida)

SDS 10% 0,3 ml

A + B 15 ml

Tampón de gel 7,5 ml

Agua 7,05ml

TEMED 40 μ l

Persulfato amónico (200 mg/ml)..... 100 μ l

- Gel concentrador (5% acrilamida)

SDS 10% 0,1 ml

A + B 2,5 ml

Tampón de gel 2,5 ml

Agua 4,85 ml

TEMED 12,5 μ l

Persulfato amónico (200mg/ml) 37,5 μ l

- Solución A + B

Acrilamida 18,94 g

N,N-metilénbisacrilamida 1,06 g

Agua c.s.p. 100ml

- Tampón de gel

Tris base 2,5 M
ClH 0,4 M

El pH se ajusta a 8,9

- Tampón de electroforesis

Tris base 3,02 g
Glicina 14,4 g
SDS 1 g

El pH se ajusta a 8,5

- Tampón de ruptura

Tris 0,5 M, pH 6,8 0,125 ml
SDS 10% 0,2 ml
2-Mercaptoetanol 0,05 ml

- Solución para la tinción de geles de poliacrilamida

Azul de Coomassie R-250 0,5 g
Metanol 90 ml
Acido acético 20 ml
Agua 90 ml

- Solución decolorante de geles de polisacrilamida

Metanol 20 ml
Acido acético 7 ml
Agua 73 ml

Las soluciones empleadas para preparar los geles de agarosa fueron las siguientes:

- Tampón Tris-barbiturato

Acido dietilbarbitúrico 22,4 g
Tris base 44,3 g
Azida sódica 0,65 g
Aguac.s.p.1000ml

Este tampón concentrado (pH 8,6) se diluye 1:4 antes de usarlo.

- Solución de agarosa

Agarosa 1 g
Tris-barbiturato 100 ml

La solución se calienta a 90° C en baño de agua con agitación constante. Después de fundirse, la solución se reparte en tubos que se conservan a 4°C durante varios meses.

- Solución para la tinción de geles de agarosa

Azul de Coomassie R-250 1 g
Etanol 90 ml
Acido acético 20 ml
Agua 90 ml

- Solución decolorante de geles de agarosa

Etanol 90 ml
Acido acético 20 ml
Agua 90 ml

2.4. Multiplicación Bacteriana

Las células se mantienen conservadas a -70°C ; una vez descongeladas se multiplican a 37°C , sin agitación, en su medio correspondiente.

70 ml de medio adecuado se inocularon con 7 ml de células para alcanzar una turbidimetría inicial de 50 nefelos (1 nefelo = $2,5 \times 10^5$ ufc/ml), lo cual corresponde aproximadamente a 1 o $1,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colonias por mililitro (Ufc/ml). Las medidas de turbidimetría se hicieron en un nefelómetro Coleman modelo 9.

La curva de multiplicación de las células multiplicadas con colina o etanolamina aparece en la figura 9.

Con el fin de obtener grandes masas de cultivo, cuando la curva de crecimiento llegó a 900 nefelos, se inocularon los 70 ml. de medio en 700 ml de medio fresco. Este cultivo se volvió a llevar hasta casi el final de la fase exponencial de crecimiento, inoculando por último estos 700 ml. en 10 lt. de medio fresco (ver curva de crecimiento).

Las bacterias así multiplicadas, en presencia de etanolamina, poseen tiempos de generación normales pero, como ya hemos señalado, exhiben varias propiedades anómalas, una de las cuales es la incapacidad de las células hijas para separarse completamente al término de la división celular. Esto origina la formación de largas cadenas de cocos en lugar de los diplococos típicos, característicos de esta bacteria (figura 9).

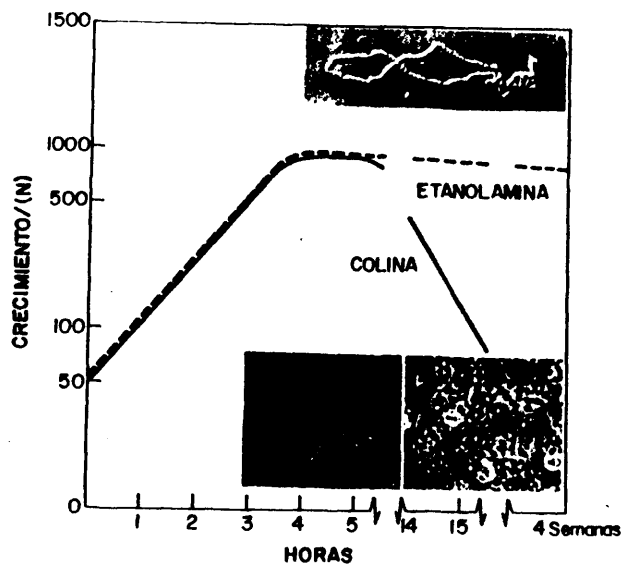


Figura 9.- Células de *S. pneumoniae* multiplicándose en medio que contiene colina (—) o en medio conteniendo etanolamina (- - -). En el recuadro superior derecho se muestra una micrografía de estas últimas en las que se aprecia la formación de largas cadenas que se mantienen durante varias semanas. En el recuadro inferior izquierdo se puede observar el aspecto microscópico de las células multiplicándose en colina en la fase exponencial de multiplicación, y en el recuadro de la derecha las mismas células en la fase estacionaria, donde las células se autolisan (212).

2.5. Purificación del bacteriófago Dp-1

Para la obtención del Dp-1 se sembró la bacteria S. pneumoniae R6 en medio C_{pH}⁸. A una concentración celular de $1,7 \times 10^7$ células/ml se infectó con el fago Dp-1 a una MDI de 1/40. Después de aproximadamente 3 horas, de incubación el cultivo se lisó totalmente, añadiéndose entonces DNA-asa (100µg/ml) y RNA-asa (20µg/ml) y se continuó la incubación a 37°C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se centrifugó el cultivo a 6000 xg durante 15 minutos recogiendo el sobrenadante. A este sobrenadante se añadió ClNa (0,5M) y polietilenglicol 6000 (10% peso/volumen) y se dejó toda la noche a 4°C. A continuación se centrifugó a 6000 xg durante 15 minutos, recogiendo el precipitado y resuspendiéndolo en TBT (aproximadamente un 2% del volumen inicial).

La purificación del fago consta básicamente de dos ultracentrifugaciones sucesivas en gradiente de cloruro de cesio:

- Primer paso: la muestra resuspendida en TBT se colocó encima de un gradiente a pasos de ClCs preparado de la siguiente forma: 3 ml de ClCs de $\rho = 1,7 \text{ g/cm}^3$; 10 ml de ClCs de $\rho = 1,5 \text{ g/cm}^3$ y 10 ml de ClCs de $\rho = 1,3 \text{ g/cm}^3$. Se centrifugó en un rotor Sorvall AH 627 a 26.000 rpm durante 150 minutos. Una banda azulada que corresponde al fago se extrajo con jeringuilla, sin quitar las capas superiores de cloruro de cesio.

- Segundo paso: la muestra obtenida del primer paso se ultracentrifugó en un rotor Sorvall A-841 a 35.000 rpm durante 16 horas. La banda azulada se extrajo nuevamente con jeringuilla por pinchazo lateral del tubo.

2.6. Cálculo de células viables y titulación de fagos

Las técnicas utilizadas en el recuento de bacterias viables y de unidades formadoras de placas de lisis fueron las que se utilizan normalmente en muchos laboratorios (213, 103).

Para las células viables se siguió el método siguiente: 0,1 ml de bacterias a la dilución adecuada se añadió a 15 ml de medio C_{pH}^8 (con tampón fosfato 0,15M en lugar del normal 0,05M) conteniendo agar al 1%, y se añadió sobre placas Petri. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

En el caso de la titulación de fagos el método fue el siguiente: como capa basal de las placas Petri se añadieron 15 ml de medio C_{pH}^8 (con tampón fosfato 0,15M) conteniendo agar al 1% y 0,5 ml de catalasa (10.000 U/ml). A continuación se agregó una segunda capa conteniendo: 1ml de la solución de fagos a la dilución apropiada, 1 ml de célula huésped (R6), 0,1 ml de catalasa (10.000 U/ml) y 5 ml de medio C_{pH}^8 (con tampón fosfato 0,15M) conteniendo agar al 0,8%. Las placas se incubaron durante toda la noche a 30°C.

2.7. Obtención de paredes y sus fracciones

La preparación de paredes de Streptococcus pneumoniae se hizo basándonos en el método descrito por Mosser y Tomasz (9).

Para ello se sembró la estirpe salvaje de S. pneumoniae R6 en medio C_{pH8} (ver apartado 2.3). La incubación se hizo en baño a 37°C sin agitación, hasta llegar a una concentración celular de $1-1,2 \times 10^8$ células/ml en que se centrifugó a 6000 xg durante 10 minutos, para a continuación resuspender el sedimento en agua destilada y desionizada. La suspensión celular se calentó a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar la autolisina; las células se rompieron mediante tratamiento durante 15 minutos con un homogeneizador Omnimixer en presencia de polvo de vidrio (Ballotini N° 13). A continuación se centrifugó a 2000 x g durante 5 minutos, para eliminar las células no rotas y los Ballotini. El sobrenadante se centrifugó a 17.500 x g durante 10 minutos y el sedimento resultante se resuspendió en acetona incubándose en baño sin agitación a 45°C durante 20 minutos. La acetona se eliminó por centrifugación y el sedimento se lavó varias veces con agua destilada y desionizada y se resuspendió en Tris 0,1M, pH 7,8 añadiéndose tripsina (100µg/ml) y unas gotas de tolueno y de cloruro cálcico 1M. Después de una incubación a 37°C durante toda la noche se lavó el precipitado final varias veces con solución salina.

Para la obtención de paredes de células EA se siguió el mismo procedimiento, excepto que dichas células se multiplicaron en medio C_{den} - etanolamina.

Los métodos de obtención de fracciones de pared con distintos agentes, a partir de paredes purificadas de la estirpe salvaje R6 (ver figura 2), se basan, asimismo, en lo descrito por Mosser y Tomasz (9).

En resumen, las distintas fracciones de paredes se obtuvieron según los métodos siguientes:

1) Tratamiento con autolisina: 0,9 ml de paredes purificadas (30 mg peso seco/ml) se trataron con 0,1 ml de crudo de autolisina de R6 (ver apartado 2.12):. La incubación a 37°C se prolongó toda la noche. A continuación se añadieron 20 μ l de formaldehído al 40% y 20 μ l de albúmina bovina al 4% y se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se purificó el fragmento conteniendo colina por cromatografía de filtración (9).

2) Tratamiento con ácido clorhídrico: 1 ml de paredes purificadas (30 mg peso seco/ml) se trataron con ácido clorhídrico 0,1N. La incubación a 37°C se prolongó durante 65 horas. A continuación se neutralizó y se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se purificó el fragmento conteniendo colina por cromatografía de filtración (9,214).

3) Tratamiento con hidróxido sódico: 1 ml de paredes purificadas (30 mg peso seco/ml) se trataron con hidróxido sódico 0,1N.

La incubación a 37°C se prolongó durante 40 horas. Luego se siguió el mismo procedimiento anterior, purificándose el fragmento conteniendo colina por cromatografía de filtración (9,214).

4) Tratamiento con formamida: en esta ocasión el sustrato de la reacción fue la fracción marcada con colina resultante del tratamiento con autolisina (ver anteriormente) de aproximadamente 35 mg de paredes purificadas. 1 ml de esta solución acuosa se trató con formamida al 100%, a 170°C durante 20 minutos. Al cabo de este tiempo, se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos, se tomó el sobrenadante y se purificó la fracción conteniendo colina por cromatografía de filtración (9, 215).

5) Tratamiento con ácido nitroso: también aquí el sustrato fue el mismo del caso anterior. A 1 ml de dicha solución acuosa se añadió 1 ml de nitrito sódico al 5% y 1 ml de ácido acético 5,8N (216). La solución se incubó a 25°C durante 30 minutos ajustándose a continuación el pH a 5-6 con una solución de carbonato sódico. La fracción conteniendo colina se purificó por cromatografía de filtración (9).

2.8. Obtención de protoplastos y membranas

Para la preparación de protoplastos seguimos fundamentalmente el procedimiento descrito por Seto y colaboradores (217). En esencia la técnica consiste en cultivar la bacteria R6 en medio C_{PH}⁸ hasta una concentración celular de $1,4 \times 10^8$ células/ml; en este punto, el cultivo se centrifugó y se resuspendió en un tampón de protoplastos. A continuación se añadió (10% del volumen total) un crudo de autolisina (ver apartado 2.12) y se incubó a 30°C. La formación de protoplastos, que se siguió por observación con un microscopio de contraste de fases, se completó en aproximadamente 30 minutos, donde más del 95% de las células adquirían forma esférica.

La obtención de membranas se consigue lavando estos protoplastos por centrifugación (3 veces) a 8.000 x g durante 10 minutos, y resuspendiéndolos finalmente en el mismo tampón de protoplastos pero sin la sacarosa al 25%. Esta suspensión se congela (a -20°C) y se descongela (a 37°C) varias veces.

2.9. Obtención de ácido lipoteicoico

La preparación del ácido lipoteicoico de membrana (LTA o Fag) se hizo según el esquema general de Goebel y colaboradores (218), modificado posteriormente por Briles y Tomasz (44). Un cultivo de 2,25 litros de S. pneumoniae R6 se cultivó en medio C_{pH}⁸ hasta alcanzar una densidad de $1,2 \times 10^8$ células/ml. En este punto, el cultivo se enfrió a 4°C se centrifugó a 6.000 x g durante 15 minutos y se resuspendió el precipitado en 25 ml de acetato sódico 0,05M conteniendo 10 gotas de tolueno. Esta solución bacteriana se dejó autolisarse a 37°C durante 72 horas; al cabo de este tiempo, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético y se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos. El precipitado se lavó varias veces con tampón acetato 0,05M, pH 4,5, dializándose 4 horas contra 2 litros de solución salina. Después de una repetida tripsinización durante varios días (hasta que la solución tomó un color de leche diluida), el material se concentró frente a polietilenglicol 6.000 (PEG) hasta 22 ml. A continuación se llevó a cabo una eliminación de grasas secuencial, tratándolo sucesivamente con acetona 95%, etanol-éter (3:1) y finalmente cloroformo-metanol (1:1); el residuo seco se extrajo con 9 ml de agua destilada. El extracto acuoso se incubó con DNAasa (10 µg/ml) y RNAasa (50 µg/ml). A continuación se añadieron 4 volúmenes de etanol y se dejó toda la noche a 4°C. El precipitado resultante se recogió, se dializó contra agua destilada y se concentró hasta 4,5 ml. Finalmente se hizo una reprecipitación con 150 ml de acetona durante toda la noche a 4°C, y se disolvió en 5 ml de agua destilada.

2.10 Marcaje de paredes de *S. pneumoniae*

Con el fin de obtener paredes de neumococo marcadas con colina tritiada, que servirán para los ensayos que se describirán más adelante, se siguió el procedimiento de obtención de paredes descrito en el apartado 2.7. La diferencia consiste en añadir el marcador radiactivo (^3H -colina) en una fase temprana de la multiplicación celular, para permitir que esta molécula se incorpore en gran cantidad en la bacteria.

Para ello, se sembró *S. pneumoniae* R6 en medio C_{pH}^8 . Cuando se alcanzó una concentración celular de $1,5 \times 10^7$ células/ml se añadió colina tritiada (15Ci/mmol), continuándose la incubación en baño a 37°C sin agitación. Los siguientes pasos fueron los mismos que los descritos en el apartado 2.7. El lavado final, sin embargo, se hizo varias veces con solución salina hasta que se redujo el número de cuentas libres en el sobrenadante procedentes de fracciones de paredes de bajo peso molecular. La radiactividad final se ajustó a $6-7 \times 10^5$ cpm/ml.

En el caso del marcaje de paredes de células EA seguimos el mismo procedimiento anterior, excepto que dichas células se multiplicaron en medio C_{den} -etanolamina y que el marcador radiactivo fue ^{14}C -etanolamina (44 mCi/mmol); en este caso, la radiactividad final se ajustó a 10^5 cpm/ml.

2.11. Marcaje de proteínas

La preparación de células de neumococo marcadas radiactivamente en sus proteínas, que nos servirán en los ensayos que se describirán más adelante, es muy similar a la preparación de células marcadas radiactivamente en su pared con colina tritiada.

El método consistió en incubar la bacteria CW-1 en medio C_{den}-colina + Y (ver apartado 2.3).

Una muestra de este cultivo que se incubó a 37°C durante 6 horas, se sembró en el mismo medio que contenía una menor concentración de fenil-alanina (10 µg/ml).

A 10 ml de una concentración celular de $1,5 \times 10^7$ células/ml se añadieron 5 µCi/ml de ³H-fenil-alanina (17Ci/mmol). La incubación a 37°C se continuó hasta que el cultivo alcanzó una concentración de $6,25 \times 10^7$ células/ml. En este punto se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos y el precipitado se re-suspendió en medio C + Y, que no contenía ³H-fenil-alanina, a una concentración de $2,5 \times 10^7$ células/ml. La incubación a 37°C se prolongó hasta alcanzar una concentración de $6,25 \times 10^7$ células/ml. En estas condiciones, las células aparecían marcadas radiactivamente en sus proteínas y se usaron en los ensayos de infección por Dp-1.

2.12. Obtención de extractos crudos de células

El procedimiento que describimos a continuación es válido para todos los tipos de bacterias utilizados en esta Memoria, es decir: R6, cw-1, EA, MEA y DEA.

Para ello se sembraron 400 ml de Streptococcus pneumoniae en su medio adecuado (ver apartado 2.3.) La incubación se hizo a 37°C sin agitación, hasta llegar a una concentración celular de $1 \pm 2 \times 10^8$ células/ml. En este momento, el cultivo se enfrió rápidamente a 4°C. A continuación se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos, resuspendiéndose el precipitado en solución salina. Una vez homogeneizada la suspensión, las células se rompieron por ultrasonido en un sonicador MSE modelo MK2 en tres tratamientos sucesivos procurando que la suspensión estuviera siempre en frío. Finalmente se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos, para eliminar los restos de células no rotas. Se tomó el sobrenadante, descartándose el precipitado.

El crudo de células R6 así obtenido también se denomina, en algunos experimentos, crudo de autolisina el cual se empleó en varios experimentos descritos en esta Memoria.

2.13. Conversión de la amidasa, de su forma E a la forma C, biológicamente activa

La autolisina biológicamente inactiva (forma E) obtenida a partir de las células-EA posee un peso molecular de 35000 (95), sin embargo, la forma C, que es activa, posee un peso molecular más elevado.

La conversión "in vitro" de la forma E a la forma C se consigue incubando esta forma E a 0°C durante 5 minutos y en presencia de paredes que contienen colina pero en ausencia de cofactores. En el sobrenadante de esta incubación se obtiene una sustancia de peso molecular más elevado que posee actividad biológica cuando se incuba en presencia de paredes que contienen colina y que comparte toda una serie de propiedades (59) comunes a la autolisina biológicamente activa (forma C) obtenida de S. pneumoniae multiplicado en presencia de colina.

Los datos que se poseen hasta hoy sugieren que la forma E se asocia fuertemente con porciones de ácido teicoico de alto peso molecular. Esta asociación es capaz de inducir en la proteína algún cambio estructural o conformacional que resulta ser esencial para llevar a cabo su actividad catalítica. Además, el polímero de ácido teicoico asociado con el enzima puede que contribuya en alguna de sus nuevas propiedades, tales como el tamaño molecular y la estabilidad.

Tanto la determinación de la estructura de la autolisina forma C, como el posible papel del ácido teicoico en el mantenimiento de su estructura requerirán ulteriores estudios con la autolisina purificada.

2.14. Determinación de la actividad enzimática

Vamos a describir a continuación las condiciones de valoración enzimática, tanto para la autolisina de Streptococcus pneumoniae como para la PAL (ver apartado 3.1.).

La N-acetilmuramil-L-alanil amidasa de S. pneumoniae es un enzima que rompe los enlaces amídicos localizados entre las moléculas N-acetilmurámico y L-alanina de la pared celular (9, 219).

La mezcla de reacción contiene 10 μ l de paredes marcadas con ^3H -colina (0,15 mg de peso seco/ 10^6 cpm/ml), cantidades variables del extracto enzimático crudo (ver apartado 3.1.) y 200 μ l de tampón fosfato sódico 0.02M, pH 6,9. La mezcla se incuba 1 hora a 37°C y la reacción se para añadiendo 10 μ l de formaldehído al 4% y 10 μ l de albúmina bovina al 4%. Las muestras se centrifugan en una microcentrífuga Hawksley a 10.000 x g durante 15 minutos. A continuación se toman 200 μ l del sobrenadante de cada muestra y se añaden 5 ml de líquido de centelleo (Ready-Solv, Beckman), contándose en un contador de centelleo líquido Intertechnique modelo SL32.

La valoración enzimática de la PAL es muy similar a la descrita para la autolisina de neumococo. La diferencia fundamental consiste en la presencia o no de un agente reductor (ditiotreitól, 10 mM) en el tampón fosfato usado normalmente. Esto determina que el tiempo de incubación se prolongue 1 hora (con ditiotreitól) ó 4 horas (sin ditiotreitól). La mezcla de reacción contiene cantidades variables de crudo con PAL e iguales can

tidades de paredes marcadas y de tampón. Al término de la correspondiente incubación a 37°C, la reacción se para del mismo modo citado anteriormente y se cuentan también 200 µl de cada sobrenadante.

2.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las electroforesis analíticas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). La técnica empleada fue descrita por Laemmli y Favre (220) utilizando geles de poliacrilamida en placa (160 x 100 x 2mm). Las concentraciones finales fueron 10% de acrilamida y 0,5% de N,N'-metilenbisacrilamida en el gel inferior, mientras que el gel concentrador tenía 5% de acrilamida y 0,25% de N,N'-metilenbisacrilamida (ver apartado 2.3). Las muestras se trataron con el tampón de ruptura, se hirvieron 2 minutos a 100°C y se añadió glicerol y azul de bromofenol como marcador. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, a corriente constante de 40mA, hasta que el marcador llegó aproximadamente a 1 cm del extremo inferior del gel.

2.16. Valoración de proteínas

La valoración de proteínas se hizo siguiendo el método de Lowry (221).

Las muestras que contenían 2-mercaptoetanol se dializaron contra la solución salina durante 2 horas. Las muestras controles también fueron dializadas para que contuvieran la misma cantidad de reductor que las muestras problema. La misma dialisis se llevó a cabo con las muestras que contenían detergente.

2.17. Microscopía electrónica

Las muestras de bacteriófagos se prepararon de la siguiente manera: una cantidad adecuada de fagos (normalmente 10^{11} UFP/ml) se dializó contra 1 litro de acetato amónico 0,1M pH 7,0 durante 3 horas. La solución dializada se mezcló (1:1) con fosfotungstato potásico al 2% (pH 7,0) y una gota de la mezcla se colocó cuidadosamente sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono, y se mantuvieron así durante 5 minutos. A continuación se eliminó el exceso de líquido y las rejillas se colocaron en un desecador antes de procederse a su examen microscópico.

Las muestras de células EA, en presencia o ausencia de colina, en las condiciones experimentales que se describen en el apartado 3.3.2. se prepararon de manera similar a la descrita en el párrafo anterior. Concretamente, las células se tomaron a diferentes tiempos (ver figuras 44 a 54), se lavaron 3 veces por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos con acetato amónico 0,1M y se resuspendieron finalmente en acetato amónico 0,1M, pH 7,0. A continuación estas suspensiones bacterianas se mezclaron (1:1) con fosfotungstato potásico (pH 7,0), colocándose una gota de cada suspensión sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono, y se mantuvieron así 5 minutos. Luego, se eliminó el exceso de líquido y las rejillas se colocaron en un desecador.

Todas las muestras se examinaron en un microscopio electrónico Phillips EM300 a 80 Kv, a los aumentos adecuados para cada caso.

2.18. Preparación de antígenos

Se usaron 0,5 ml de solución de PAL electroforéticamente pura (aproximadamente 50 μ g de proteína). Esta solución se mezcla muy enérgicamente, en cuatro fracciones con 1,5 ml de adyuvante completo de Freund y de nuevo se emulsiona muy enérgicamente.

La solución antigénica así preparada se usó para una primera inoculación. Para inyecciones posteriores la preparación del antígeno fue similar a la descrita anteriormente excepto que se usó adyuvante incompleto de Freund en lugar del completo.

2.19. Animales de experimentación

Se emplearon conejos blancos de la raza New Zealand de 3 a 3,5 kg de peso, después de mantenerlos unas semanas en observación en el estabulario.

2.20. Pauta de inmunización

El suero anti-PAL se obtuvo inmunizando conejos mediante cuatro inyecciones distribuidas a intervalos de 15 días. La primera inyección se hizo por vía intramuscular. Las restantes inyecciones se hicieron por vía intramuscular y en las almohadillas plantares.

Una semana después de la última inyección se obtuvo suero del conejo por punción cardíaca. La sangre recogida en tubos de centrifuga se deja coagular a 37°C durante 1 hora y después de desprender el coágulo de las paredes, se mantiene a 4°C durante 12 horas para que se retraiga el coágulo. Seguidamente se centrifuga a 200 x g durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante.

Los sueros así obtenidos se guardan en pequeñas alícuotas a -20°C .

2.21. Otros anticuerpos empleados

El suero control (NRS o "normal rabbit serum") se obtuvo por punción cardíaca de un conejo normal no inmunizado.

El suero anti-E se obtuvo inmunizando conejos mediante inyecciones del antígeno correspondiente (enzima E purificado), distribuidas a intervalos de 15 días, tal y como se ha descrito previamente (231).

El suero anti Dp-1 se obtuvo inmunizando conejos mediante inyecciones del antígeno (bacteriófago Dp-1 purificado tratado con un tampón conteniendo Tween-80 tal y como se ha descrito previamente (106)), distribuidas a intervalos de 15 días.

La proteína de mieloma TEPC-15 conteniendo anticuerpos específicos anti-fosforilcolina (2mg de proteína/ml) fue cedida amablemente por el Profesor Alexander Tomasz de la Universidad Rockefeller de Nueva York.

El anticuerpo monoclonal anti-Forssman M1/22.25 fue suministrado amablemente por César Milstein.

2.22. Inmuno-precipitación en gel de agar

Se siguió la técnica de Ouchterlony (222). El gel soporte era agarosa al 1% en tampón Tris-barbiturato pH8,6 (ver apartado 2.3).

Los portaobjetos (2,5x7 cm) previamente desengrasados se recubren con una pequeña capa de agarosa. Una vez secos, se les añaden 3 ml de agar dejándolos solidificar. Los pocillos se hicieron con un cilindro metálico conectado a una bomba de vacío. Se guardan a 4°C en cajas húmedas.

En el pocillo central se coloca el antígeno y en los 6 pocillos exteriores diluciones en PBS (ver apartado 2.3) del suero que



se desee titular. Se incubó a 37°C durante 24 horas leyéndose los resultados en luz indirecta frente a un fondo oscuro. El título del antisuero es la dilución más baja del antisuero con la que se ha obtenido banda de precipitación.

Las preparaciones antes de teñidas se lavan en PBS durante 72 horas con frecuentes cambios y después con agua destilada. Se secan envolviéndolas en papel de filtro húmedo (llenando previamente los pocillos con agua para que no queden burbujas que produzcan resquebrajamiento del agar) a temperatura ambiente.

Una vez secas se tiñen con el colorante azul de Coomassie durante 15 minutos, lavándose a continuación con solución destañadora (ver apartado 2.3).

2.23. Inmunolectroforesis en gel de agar

Se siguió la técnica descrita por Grabar y Williams (223). El gel soporte fue agarosa al 1% en tampón Tris-barbiturato pH8,6 (ver apartado 2.3).

El ensayo se realizó en dos etapas:

- 1) La solución de antígenos se colocó en los pocillos, a continuación se sometió a una electroforesis a temperatura ambiente, con una tensión de 4-5V/cm, utilizándose azul de bromofenol como marcador.
- 2) Una vez completada la electroforesis se hizo un pocillo central en la agarosa, más largo y paralelo a la dirección de migración. Este pocillo se llenó con el correspondiente suero y se incubó a 37°C durante 24 horas leyéndose los resultados en la luz indirecta frente a un fondo oscuro.

2.24. Materiales y reactivos

Durante el presente trabajo hemos utilizado los siguientes materiales:

- Bomba de presión y vacío Millipore.
- Ultracentrífuga Sorvall modelo OTD 65.
- Centrífuga Beckman modelo J-21B.
- Homogeneizador Omnimixer 17106, Sorvall.
- Microscopio Leitz, Wetzlar, modelo Orthoplan.
- Sonicador MSE, modelo Mk2.
- Microcentrífuga Hawksley
- Contador de centelleo líquido Intertechnique, modelo SL32.
- Liofilizador, New Brunswick.
- Refractómetro PZO, modelo RL-1.
- Fuente de tensión LKB, modelo 3371E.
- Microscopio electrónico Phillips EM300.
- Ballotini, 125-200 μ (80-120 mallas), Serva.
- Lámpara ultravioleta (UV), Chromatolux 2L.
- Filtros GF/A, Whatman.
- Columnas cromatográficas Pobel y Pharmacia.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania), excepto los siguientes:

- Casaminoácidos, Difco.
- Bacto-agar, Difco.
- Etanolamina, Calbiochem.
- Desoxicolato sódico, Difco.
- Dodecilsulfato sódico, Fluka.

- Productos radiactivos: (metil-³H) colina, 15Ci/mmol, Amersham
(2-¹⁴C) etanolamina, 44mCi/mmol, Amersham.
(2,3-³H) fenilalanina, 17Ci/mmol, Amersham.
- Polietilenglicol-6000, Serva.
- Soportes cromatográficos: Sephadex G-25 (50-150 μ), Pharmacia
Sephadex G-50 (50-150 μ), Pharmacia
Sephadex G-100(40-120 μ), Pharmacia
Sephadex G-200(40-120 μ), Pharmacia
Bio-Gel P-60 (100-200 mallas), BioRad
Agarosa A-5m, (200-400 mallas), BioRad
- Agarosa, BDH
- Acrilamida y N,N-metilen-bisacrilamida, Eastman
- TEMED, Serva
- Desoxirribonucleosa, Worthington
- Ribonucleasas. Sigma
- Albúmina (fracción V) (suero bovino), Sigma
- Ovoalbúmina, Sigma
- Catalasa, Sigma
- Glicerol, Serva
- Adyuvantes de Freund, Difco
- PPO y POPOP, Sigma
- Ready-Solv, Beckman

115

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento y purificación de una lisina inducida por el bacteriófago Dp-1 en un mutante de S.pneumoniae deficiente en autolisina.

3.1.1. Lisis de la estirpe salvaje de neumococo y de un mutante deficiente en autolisina por el bacteriófago Dp-1.

En el proceso infeccioso de la estirpe salvaje de S.pneumoniae por el bacteriófago Dp-1 juega un papel preponderante la mureín-hidrolasa del huésped, N-acetilmuramil-L-alanil amidasa.

En efecto, se ha demostrado que esta autolisina está implicada en la etapa final de la infección, esto es en la liberación de la progenie fágica al medio de cultivo y la consiguiente lisis de las células (80). Esta lisis se producía incluso cuando se empleaban bajas multiplicidades de infección. En contraste con este comportamiento, un mutante de neumococo deficiente en autolisina (cw-1) solo se lisaba cuando la infección por el mismo fago se hacía a altas multiplicidades de infección (Fig. 10).

Este resultado fue bastante sorprendente pues los mutantes cw-1, obtenidos por Lacks mediante tratamiento con nitrosguanidina (93), solo contenían niveles residuales de actividad amidásica (alrededor del 0,1% de la que se encuentra en el tipo salvaje); este hecho a nivel fisiológico, se pone de manifiesto porque ciertos agentes capaces de provocar la autólisis de la estirpe salvaje (detergentes, inhibidores de la síntesis de la pared celular, etc) eran completamente ineficaces para lisar a las células mutantes.

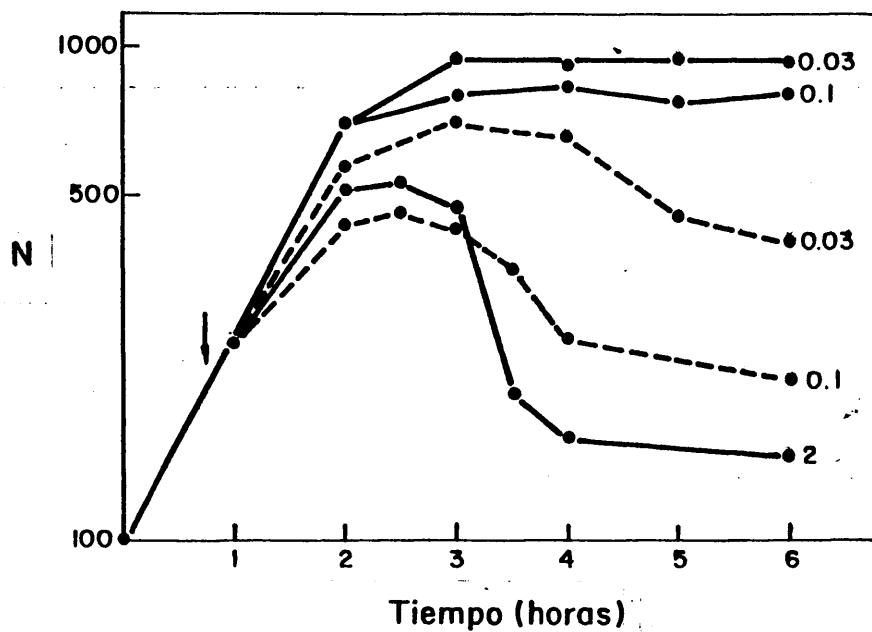


Figura 10.- Lisis de *S. pneumoniae* tipo salvaje y deficiente en autolisina infectados por Dp-1 a diferentes multiplicidades de infección (MDI). Tanto el mutante (●—●), como el tipo salvaje (●---●), se multiplicaron (en el medio C+Y) y la infección se realizó al tiempo indicado por la flecha, a las MDI indicadas por los números en las curvas. La multiplicación y la lisis se siguen por nefelometría.

La diferencia de comportamiento de las estirpes salvaje y mutante frente a la lisis inducida por el bacteriófago Dp-1, sugería que, en las condiciones experimentales expuestas anteriormente, el fago lisaba a la estirpe mutante a través de un mecanismo alternativo o complementario con respecto al que se ha sugerido para la estirpe salvaje (80).

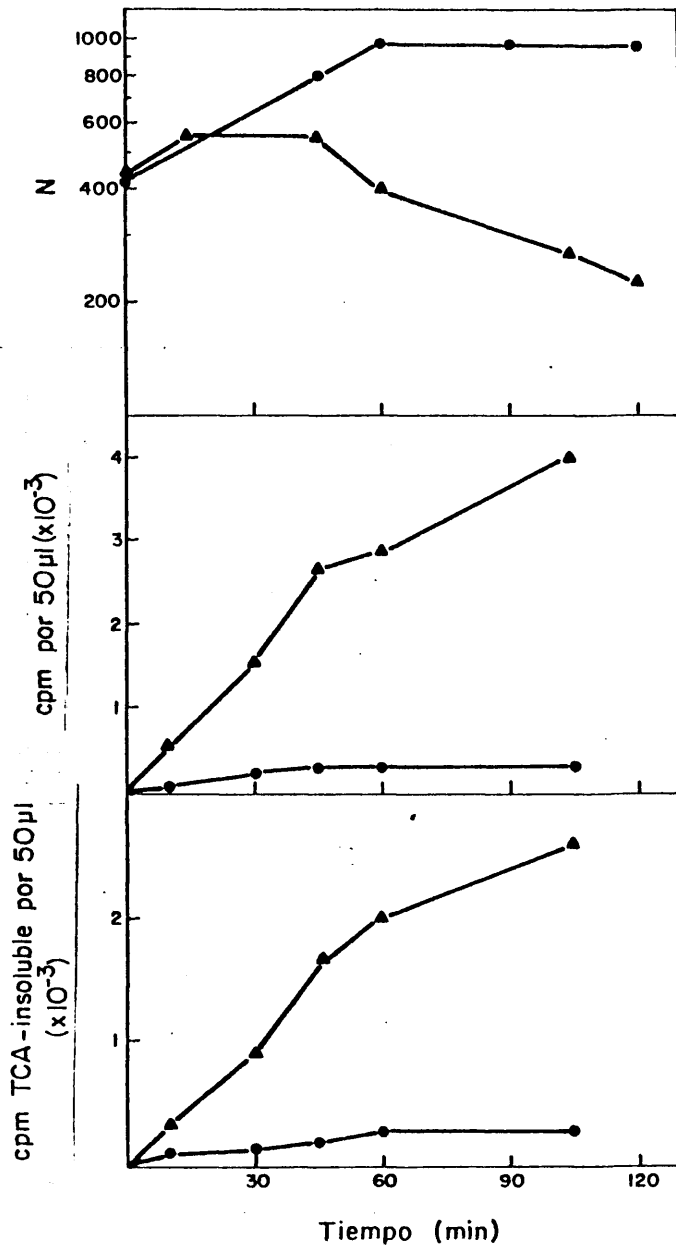
3.1.2. Detección de actividad lítica en los lisados de cw-1

El primer paso para comprobar la existencia de una actividad lítica sobre las paredes de S. pneumoniae durante el ciclo lítico del fago Dp-1 consistió en marcar la bacteria huésped, cw-1, con colina tritiada que se incorpora específicamente en el ácido teicoico de pared y en el antígeno de Forssman (ácido lipoteicoico de membrana). El cultivo se resuspende en medio sin radiactividad y se infecta con Dp-1, a una MDI de 5. En estas condiciones, la lisis de las células va acompañada de la degradación gradual del material de la pared celular hasta llegar a un 90% del total del ácido teicoico de pared cuando se alcanza la lisis total (Fig. 11).

Esta alteración de las estructuras periféricas se puso asimismo de manifiesto a través de un experimento que consistió en marcar radiactivamente las proteínas del mutante cw-1 con ^3H -fenilalanina, según se describe en la Fig. 12. Una vez eliminado el isótopo libre en el medio, se siguió comparativamente la liberación al medio de cultivo de cuentas totales en cultivos infectados y no infectados por Dp-1. Se puede comprobar que las proteínas marcadas se liberan tempranamente y en gran cantidad solo en

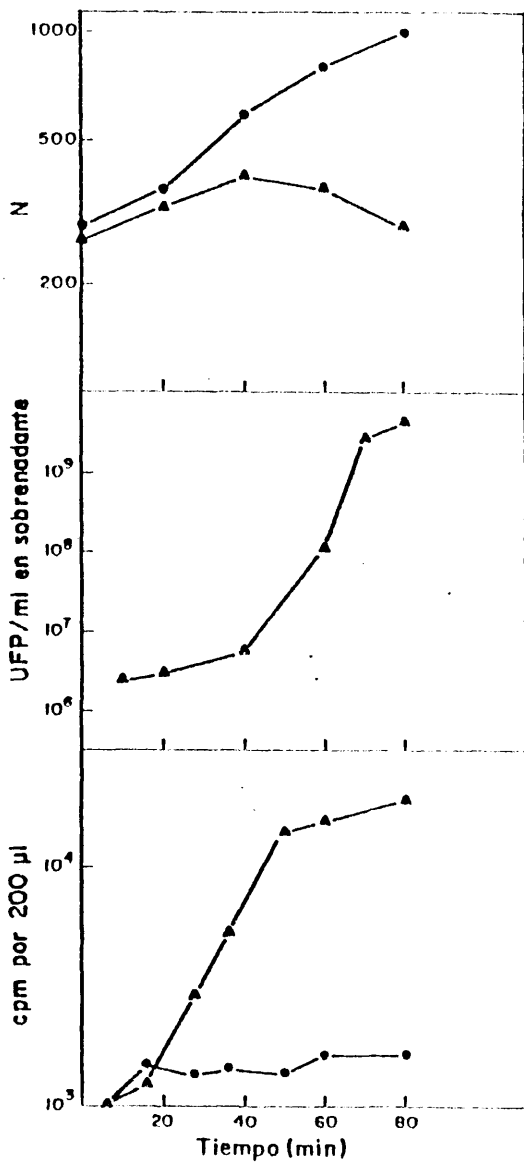
118 G5

Figura 11.- Liberación al medio de cultivo de material marcado radiactivamente con ^3H -colina de un cultivo de cw-1 infectado con Dp-1. El mutante cw-1 en medio C+Y se multiplicó durante tres generaciones en presencia de colina radiactiva (^3H -colina, $2\mu\text{Ci}$ y $5\mu\text{g/ml}$). El cultivo se centrifugó ($8.000\times g$ durante 10 minutos) y se resuspendió en medio C+Y y a una concentración de $6,2\times 10^7$ UFC/ml la mitad del cultivo (\blacktriangle — \blacktriangle) se infectó con Dp-1 (MDI=5). Después de 20 minutos, el exceso de fagos se eliminó por centrifugación y se resuspendió en medio fresco. La otra mitad del cultivo recibió el mismo tratamiento excepto que no se infectó con Dp-1 (\bullet — \bullet). La multiplicación del cultivo se siguió por nefelometría (panel superior). A distintos tiempos después de la infección se tomaron muestras de ambos cultivos, se centrifugaron ($8.000\times g$ durante 10 minutos) y se valoró la radiactividad total liberada (panel central) y la macromolecular (es decir, precipitable por ácido tricloroacético frío: panel inferior) de los cultivos infectados y no infectados.



119 *ht*

Figura 12.- Liberación al medio de cultivo de material marcado radiactivamente con ^3H -fenilalanina de un cultivo de cw-1 infectado con Dp-1. El mutante cw-1 se multiplicó en medio C+Y conteniendo ^3H -fenilalanina (2-5 μCi y 6 $\mu\text{g/ml}$) durante tres generaciones. El cultivo se centrifugó (8.000xg durante 10 minutos) y se resuspendió en medio C+Y fresco; la mitad del cultivo ($\blacktriangle\text{---}\blacktriangle$) se infectó con Dp-1 (MDI=5). La otra mitad se usó como control no infectado ($\bullet\text{---}\bullet$). La multiplicación se siguió por nefelometría (panel superior). A diferentes tiempos después de la infección (tiempo 0), se tomaron muestras de ambos cultivos, se centrifugaron (8.000xg, 10 minutos) y se determinaron las cuentas totales liberadas a los sobrenadantes (panel inferior). El panel central muestra la liberación de la progenie fágica al medio de cultivo.



los cultivos infectados.

Como consecuencia de los resultados anteriores, se recogió el lisado obtenido de un cultivo de cw-1 infectado con el fago Dp-1 a una MDI de 5 y se ensayó frente a paredes de neumococo marcadas radiactivamente para detectar una posible actividad lítica ca.

Estos ensayos fueron positivos ya que, como demuestra la Tabla 2, se detectaba una actividad lítica frente a paredes de neumococo. Un ensayo paralelo, empleando los sobrenadantes obtenidos por sonicación de células cw-1 no infectadas, probó que los mutantes solo contenían niveles residuales de actividad lítica. Estos resultados sugerían la presencia de una actividad lítica asociada al bacteriófago (PAL).

Sin embargo, la actividad lítica sobre paredes, obtenida empleando los lisados de cw-1 infectados por Dp-1 era notoriamente más baja que la correspondiente a la autolisina obtenida a partir de la estirpe salvaje R6, siendo necesario, además, prolongar la incubación a 37°C durante 4 horas para ponerla de manifiesto.

3.1.3. Síntesis de actividad lítica durante la infección fágica

Una vez demostrada la aparición de una actividad lítica en los lisados de cultivos de cw-1 infectados por Dp-1 a alta MDI, estudiamos las variaciones de los niveles de dicha actividad a lo largo del ciclo infectivo. Más concretamente, se intentó determinar en qué momento se liberaba al medio esa actividad degradativa de paredes de neumococo y qué factores eran los que regulaban dicha actividad.

Tabla 2

Ensayo de la actividad lítica sobre paredes de neumococo marcadas radiactivamente con ^3H -colina

Exp.	Condiciones	cpm. liberadas después de (*)	
		1 hora	4 horas
1	Crudo de autolisina de neumococo (ver apartado 2.12)	7.400 (100%)	7.400
2	Sobrenadante de cultivos de cw-1 infectados con Dp-1 (NDI=5)	920	7.100
	+ DTT (10mM)	7.500	7.400
3	Crudo sonicado de cw-1 no infectado	220	560
	+ DTT (10mM)	200	540

(*) Las condiciones de ensayo para la actividad lítica fueron las siguientes: 10 μl de paredes de neumococo marcadas radiactivamente con ^3H -colina (0,15 mg peso seco/ml; 10^6 cpm/ml), 100 μl de lisado (experimentos 2 y 3) o 10 μl de crudo de autolisina (experimento 1) y 100 μl de tampón fosfato 0,02M, pH 6,9 se incubaron durante 1 ó 4 horas a 37°C. La reacción se paró añadiendo 20 μl de formaldehído al 38% y 20 μl de albúmina bovina al 4%. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a 10.000xg durante 15 minutos. Se tomaron 200 μl de los sobrenadantes y se contó la radiactividad en un contador Intertechnique de centelleo líquido.

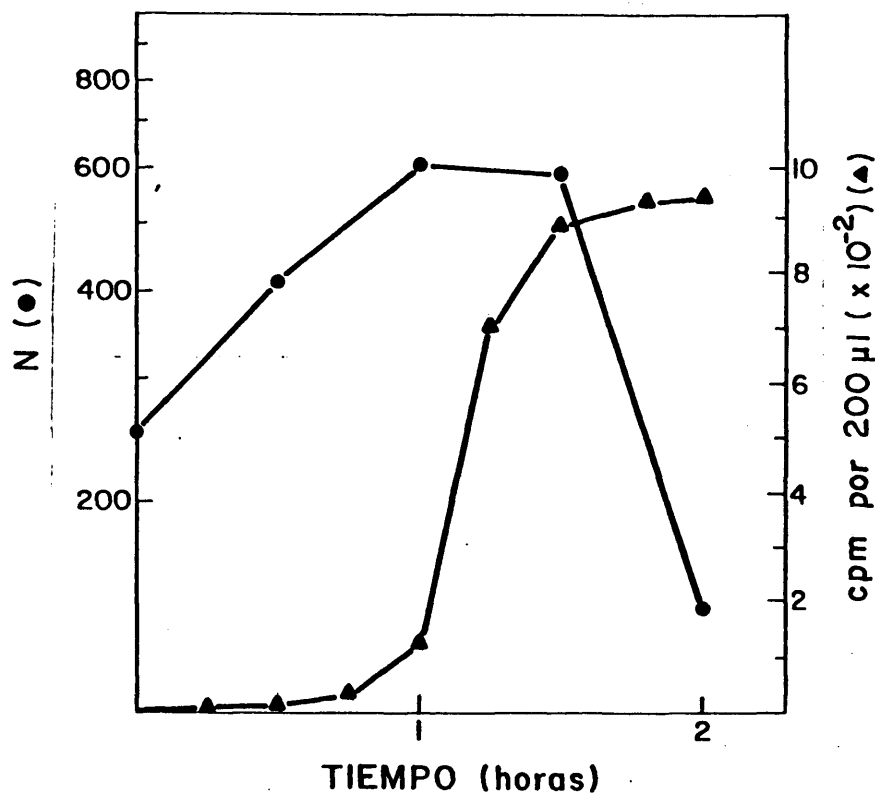


Figura 13.- Liberación de la actividad lítica al medio de cultivo después de la infección de cw-1 por Dp-1. Un cultivo de cw-1 se infectó a una concentración celular de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml con Dp-1 (MDI=5). A diferentes tiempos se tomaron muestras, se centrifugaron (8.000xg, 10 minutos) y se valoró la actividad lítica de los sobrenadantes usando como sustrato paredes celulares de neumococos marcadas radiativamente con 3 H-colina. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría.(●—●).

La relación entre la lisis del cultivo de cw-1 por el fago Dp-1 y la liberación de la mureín-hidrolasa al medio se muestra en la Fig. 13. Como se puede apreciar, la actividad lítica se detecta libre en el medio de cultivo 60 minutos después de la infección fágica y antes de que el cultivo comience a lisarse. Este resultado contrasta con lo observado por otros autores (206, 224) para el caso de los estreptococos del grupo C, donde la actividad lítica se detecta en el medio concomitantemente con la lisis del cultivo.

Por otra parte, la estirpe cw-1 deficiente en autolisina, es completamente resistente a la lisis por detergentes (p. ejem desoxicolato). Sin embargo, como se observa en la Fig. 14, los cultivos de cw-1 infectados se vuelven sensibles a la lisis por desoxicolato sódico cuando se encuentran en fase exponencial de multiplicación y no ha empezado aún la lisis del cultivo. Como estos detergentes inducen la lisis de los neumococos tipo salvaje a través del disparo de la actividad mureín-hidrolásica, la observación anterior sugiere la aparición de una actividad hidrolásica de paredes en el cultivo cw-1 infectado con Dp-1.

En la Fig. 15 se demuestra que la aparición de la actividad lítica en cw-1 requiere una síntesis proteica "de novo". Para ello, se infectó cw-1 con Dp-1, en las condiciones referidas anteriormente, pero añadiendo a distintos tiempos cantidades suficientes de un inhibidor de la síntesis de proteínas, como es la estreptomycin. Los resultados obtenidos demuestran claramente que tanto la liberación de la PAL al medio como la lisis del cul-

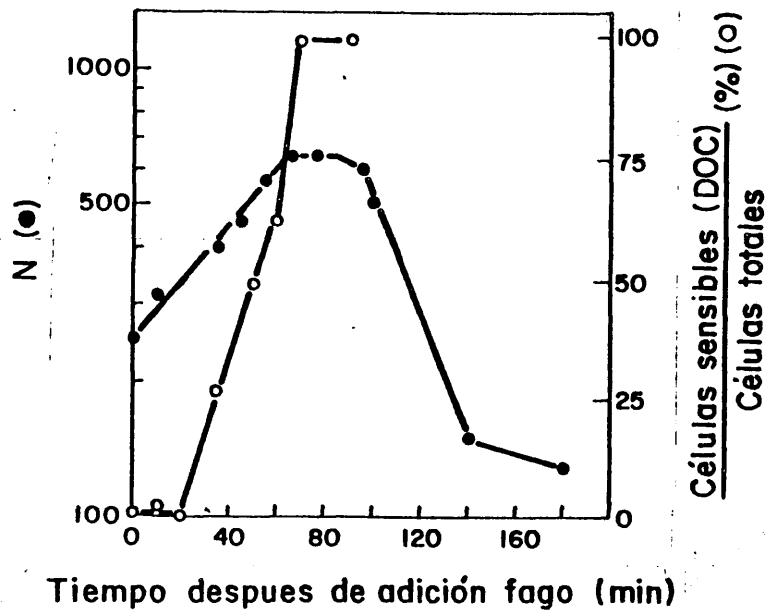


Figura 14.- Sensibilidad a la lisis por desoxicolato sódico (DOC) de cultivos de cw-1 infectados por Dp-1. Un cultivo de la bacteria mutante cw-1 se multiplicó en medio C+Y y se infectó con Dp-1 (MDI=5) a una concentración de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml. La multiplicación se siguió por nefelometría (●—●). La sensibilidad a la lisis inducida por DOC se determinó a diferentes tiempos (○—○) tal y como se ha descrito en (63). 100%: lisis completa; 0%: lisis no observable. En un cultivo control no infectado no se observaba lisis por DOC.

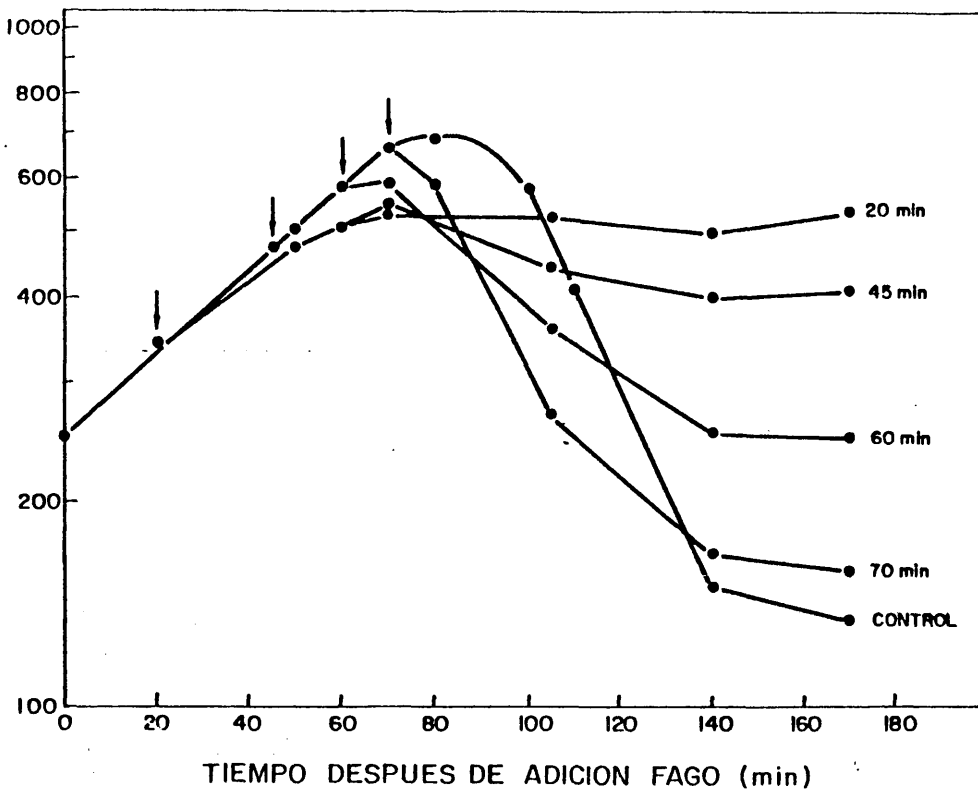


Figura 15.- Efecto protector de la estreptomicina de la lisis de un cultivo de cw-1 infectado por Dp-1. El mutante cw-1 se cultivó en medio C+Y y a una concentración de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml se infectó con Dp-1 (MDI=5) a tiempo 0. A diferentes tiempos (indicado por las flechas y por los números de la curva) se tomaron muestras que recibieron $100 \mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Un cultivo control recibió fago pero no antibiótico. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría.

tivo podía bloquearse por la adición de estreptomicina hasta 45 minutos después del momento de la infección. Esto nos permite concluir que la actividad enzimática empieza a aparecer poco después del comienzo de la infección fágica pero no alcanza niveles elevados hasta 45 minutos después de la infección. El hecho de que la liberación del enzima al medio se empiece a detectar solo cuando han transcurrido 45 minutos del comienzo de la infección (Fig. 15), sugiere que el proceso lítico es un problema de cantidad de enzima presente en la célula infectada.

Por otra parte, cuando el enzima lítico se obtenía a partir de lisados preparados en presencia de fluorodeoxiuridina (FUdR), una sustancia que detiene la síntesis de DNA (115) al inhibir irreversiblemente la timidilato sintetasa (225) y que en nuestro caso produce una reducción de más del 80% de la producción de partículas fágicas activas [figura 16], la cantidad de actividad enzimática producida en presencia de FUdR era similar a la obtenida en ausencia de este inhibidor. Este resultado indica que no es necesario la replicación del DNA fágico para la síntesis del enzima lítico.

En experimentos previos se había sugerido un paralelismo entre el comportamiento de células cw-1 infectadas con Dp-1 y "curadas fenotípicamente" con autolisina de neumococo (80, 226) y el de cw-1 tratadas con penicilina (88).

El experimento que aparece en la Fig. 17 muestra que inmediatamente después de la infección de cw-1 con Dp-1 la síntesis de pared se detiene bruscamente aunque el crecimiento celular en los cultivos infectados continúa inalterado con respecto a los no infectados. Este hecho unido a otras observaciones, también puestas de manifiesto cuando los cultivos de cw-1 fueron tratados con antibió-

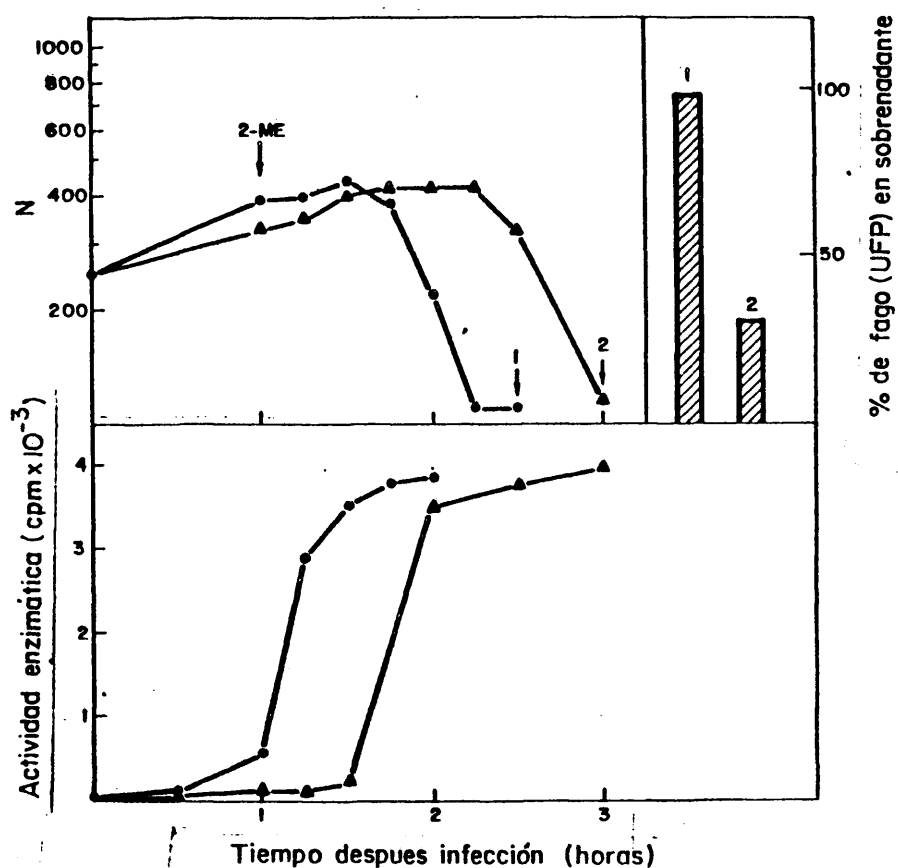
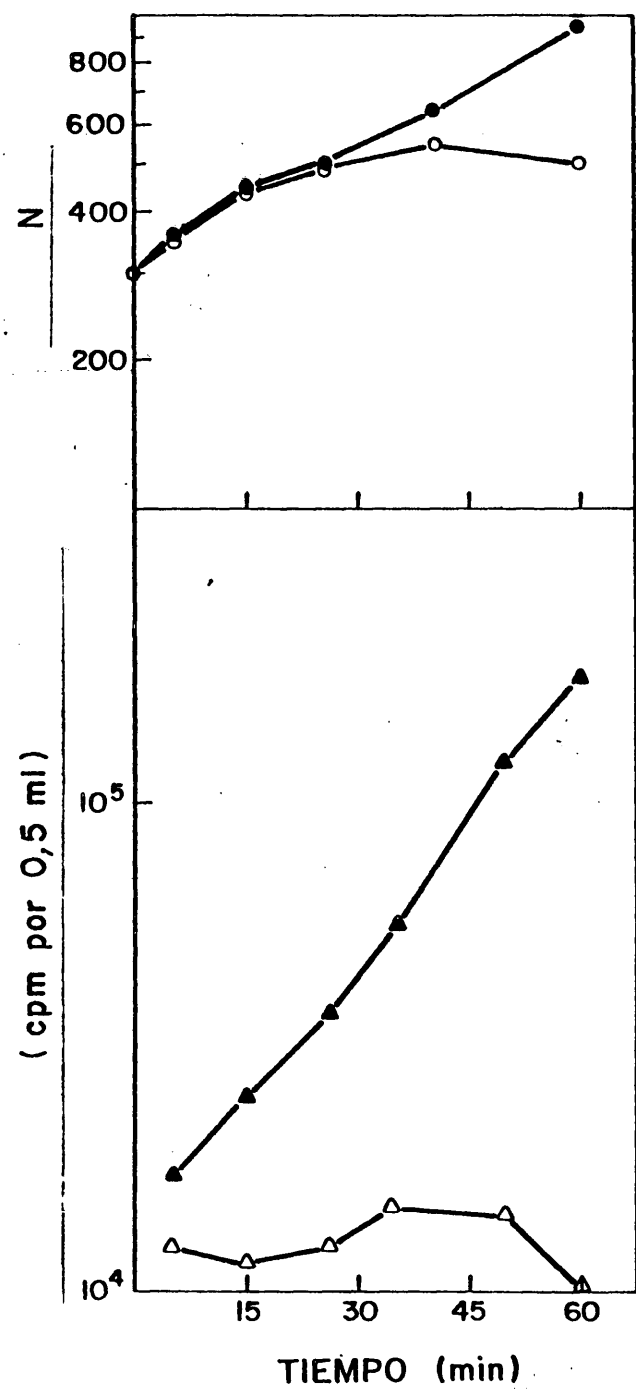


Figura 16.- Efecto de fluorodeoxiuridina (FUdR) sobre la producción del fago Dp-1 y sobre la síntesis de la PAL. Un cultivo de cw-1, a una concentración de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml, se infectó con Dp-1 (MDI=5); después de 20 minutos, el cultivo se dividió en 2 alícuotas, una recibió $20 \mu\text{g/ml}$ de FUdR (\blacktriangle — \blacktriangle , 2) y el otro se usó como control (\bullet — \bullet , 1). Después de 1 hora de incubación a 37°C ambos cultivos recibieron 10mM de mercaptoetanol (2-ME). La multiplicación y la lisis de los cultivos se siguieron por nefelometría. El total de fagos producidos se determinó en ambos cultivos después de la lisis completa (indicado por las flechas). El panel inferior muestra la cinética de aparición de la PAL en los sobrenadantes de ambos cultivos, valorada según la técnica descrita en el apartado 2.14.

12765

Figura 17.- Biosíntesis de la pared celular en cw-1 infectado con Dp-1. Un cultivo de cw-1 se multiplicó en medio C+Y hasta una concentración celular de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml. El cultivo se dividió en dos partes: una se infectó con Dp-1 (MDI=5), se incubó a 37°C durante 20 minutos, se centrifugó para eliminar los fagos libres ($8.000 \times g$ 10 minutos) y se resuspendió en medio C+Y fresco. La otra mitad del cultivo se usó como control no infectado. A diferentes tiempos se tomaron muestras (1 ml) y se añadió 3H -colina ($1 \mu Ci/ml$, $2,5 \mu g/ml$); se incubaron a 37°C, 5 minutos y luego se precipitaron por la adición de ácido tricloroacético frío al 10%. Después de 30 minutos a 4°C las muestras se filtraron sobre membranas GFA, se secaron y se contó la radiactividad de los filtros, que indica principalmente la colina incorporada en los ácidos teicoicos de la pared celular. La multiplicación y la lisis de los cultivos se siguieron por nefelometría. Símbolos: cultivos no infectados (\bullet , \blacktriangle) e infectados (\circ , Δ).

TASA DE SINTESIS DE PARED CELULAR



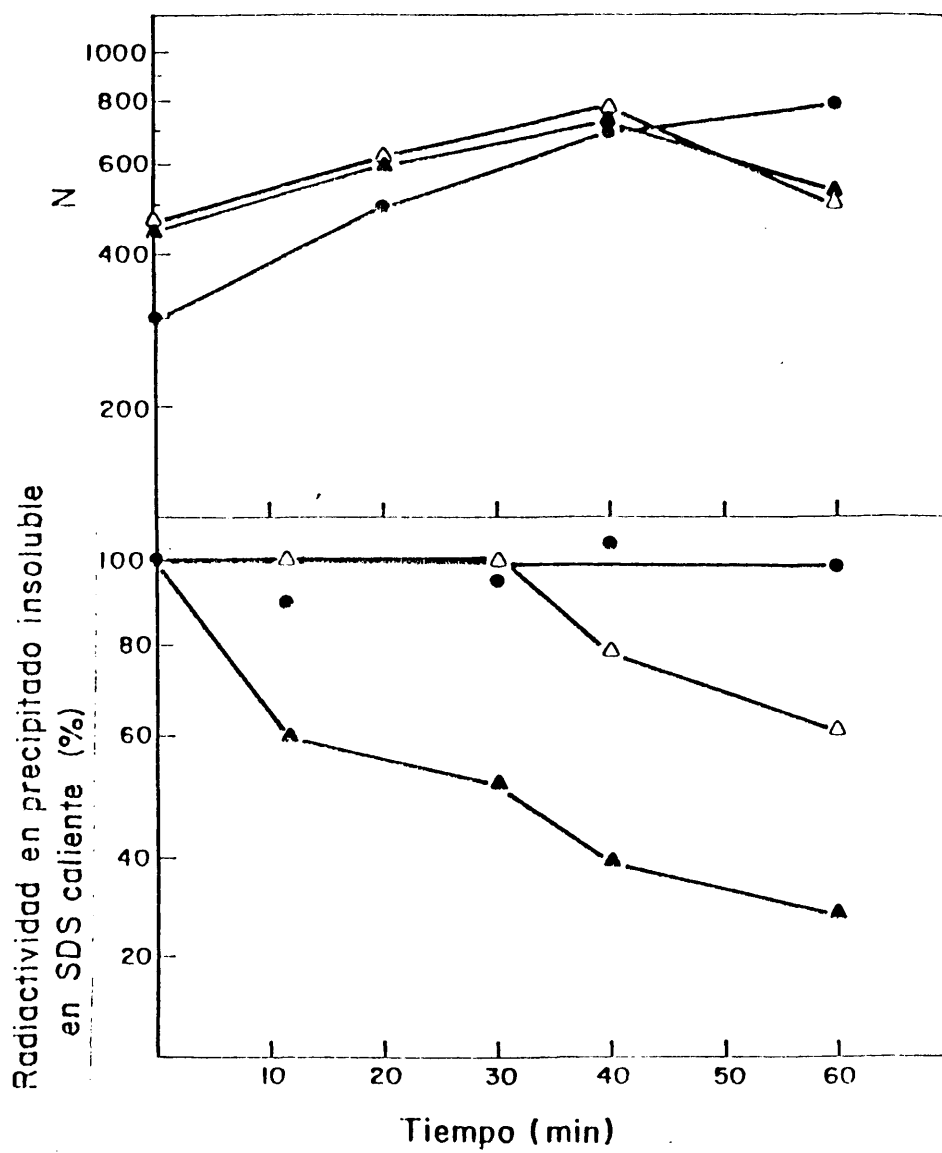
ticos beta-lactámicos (p.ejem. secreción de LTA y de otras macromoléculas al medio, etc) han sido sugeridas como condiciones necesarias para que en la célula tenga lugar un "acondicionamiento" previo del sustrato que permita la actuación de la autolisina (88). Por tanto, nuestros experimentos parecen sugerir que se generaría una situación similar para la actuación de la PAL.

Un dato experimental adicional que habla en favor de este "acondicionamiento" del sustrato viene dada por el experimento de la Fig.18. En ella se observa otro efecto potencialmente importante de la infección por Dp-1 de células cw-1: inmediatamente después de la infección, el material de la pared celular podía liberarse de las células por un tratamiento combinado de autolisina añadida exógenamente seguida de una extracción con SDS caliente. Una posible explicación a este fenómeno sería que el esqueleto de mureína de la pared celular estuviera débilmente entrecruzado por los puentes peptídicos como consecuencia de la infección fágica lo que convertiría a la pared en un sustrato particularmente sensible a la acción de la autolisina exógena en el caso del experimento de la Fig.18. Esta disposición de la pared ya había sido sugerida para explicar el mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos (227).

Como se puede deducir de todo lo expuesto hasta el momento, el mecanismo de la lisis de un cultivo de cw-1 por el bacteriófago Dp-1 podía deberse a una estabilización o activación de una actividad mureín-hidrolásica latente en la bacteria o bien esta lisis era consecuencia de la aparición de una nueva lisina asociada al fago (PAL) que se sintetizaba a lo largo del proceso infectivo. Con el fin de adquirir un mejor conocimiento sobre este mecanismo de lisis se hacía imprescindible purificar la mureín-hidrolasa que aparecía en los lisados de cultivos cw-1 por el fago Dp-1.

130 bis

Figura 18.- Sensibilización de cw-1 infectado con Dp-1 a la autolisina exógena. Las paredes celulares de un cultivo del mutante cw-1 se marcaron con ^3H -colina como se ha descrito en el apartado 2.10. A continuación las bacterias se transfirieron a un medio no radiactivo y se multiplicaron durante 2 ó 3 generaciones. La mitad del cultivo marcado se infectó con Dp-1 (20 minutos de incubación a MDI=5). Los fagos libres en el sobrenadante se eliminaron por centrifugación (8.000xg, 10 minutos) y ambos cultivos (infectado y control) se resuspendieron en medio fresco a 37°C a una concentración de $5-8 \times 10^7$ UFC/ml. La multiplicación se siguió por nefelometría (panel superior). A diferentes tiempos se tomaron dos muestras del cultivo infectado (0,9 ml), una de las cuales recibió 100 μl de crudo de autolisina (preparado según se ha descrito en el apartado 2.12) (\blacktriangle — \blacktriangle) y la otra recibió 100 μl de tampón fosfato sódico 0,1M (pH 7,0) (\triangle — \triangle). Asimismo se tomó una muestra del cultivo no infectado (\bullet — \bullet), que se trató con 100 μl del crudo de autolisina. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 37°C, se centrifugaron (10.000xg, 15 minutos, en una microcentrífuga) y los sedimentos se resuspendieron en 500 μl de SDS al 2% y se calentaron a 80°C durante 30 minutos. Después de enfriar las muestras las bacterias tratadas con SDS se centrifugaron (10.000xg, 15 minutos) en una microcentrífuga) y los precipitados se lavaron y se resuspendieron en agua, determinándose la fracción de radiactividad que quedaba insoluble en SDS caliente (es decir, la radiactividad asociada a la mureína). La figura muestra (panel inferior) que con el breve pretratamiento con autolisina exógena se extrae una porción sustancial de material asociado a la mureína, en las células infectadas (\blacktriangle — \blacktriangle). La liberación de radiactividad asociada a mureína cuando las células infectadas no fueron tratadas con autolisina (\triangle — \triangle) solo se observó tardíamente (35-40 minutos después del comienzo de la incubación). En los cultivos no infectados (\bullet — \bullet) tratados con autolisina y SDS no se observó liberación de radiactividad al sobrenadante.



3.1.4. Estimulación de la actividad lítica por agentes reductores

Nuestros primeros intentos para purificar la actividad lítica que se liberaba al medio de cultivo de cw-1 infectados con Dp-1 tropezaron con serias dificultades. El procedimiento que seguimos fue el que se emplea habitualmente para la purificación de proteínas: precipitación de los lisados con sulfato amónico y distintas cromatografías en columna de adsorción y filtración. Por estos métodos, sin embargo, no se lograba la separación entre la actividad lítica y los fagos, ya que estos últimos se iban arrastrando en las sucesivas etapas de purificación. Aún más, después de algunos pasos de purificación, la actividad lítica y los bacteriófagos coelúan de una columna de agarosa A-5m.

Los procedimientos combinados de tratamiento de los crudos con sulfato amónico seguido de ultracentrifugación tampoco aportaron ninguna ventaja adicional. No obstante, el obstáculo más importante para conseguir purificar el enzima era la progresiva pérdida de actividad enzimática a lo largo de los diferentes pasos de purificación. Estas limitaciones en el procedimiento de purificación de este tipo de actividades líticas asociadas a bacteriófagos ya habían sido descritas por otros investigadores en los primeros intentos de purificación de las lisinas asociadas a fagos que infectaban a los estreptococos del grupo A y del grupo C (205,206,224). Teniendo en cuenta estos precedentes, probamos la posibilidad de que los agentes reductores protegieran al enzima de los agentes alquilantes y formadores de compuestos mercaptídicos. Como se demuestra en la Tabla 3, la actividad lítica sobre paredes radiactivamente marcadas, en ensayos "in vitro", se estimula claramente en presencia de agentes reductores.

Tabla 3

Efecto de agentes reductores, EDTA y detergentes sobre la actividad lítica de la PAL.

Exp.	Condiciones ^(a)	cpm liberadas (%)
1	Control, tampón fosfato pH 7,0	870 (15)
2	2-ME, 1mM	2.730 (47)
	2-ME, 5mM	2.900 (50)
	2-ME, 10mM	4.350 (75)
	2-ME, 25mM	4.520 (78)
3	DTT, 1mM	2.600 (45)
	DTT, 5mM	4.640 (80)
	DTT, 10mM	5.800 (100)
	DTT, 25mM	4.590 (79)
4	EDTA, 5 mM	1.040 (18)
	EDTA, 10mM	990 (17)
5	DTT, 10 mM más EDTA, 5mM	6.960 (120)
6	DTT, 10 mM más SDS, 0,1%	120 (2)
7	DTT, 10 mM más Sarcosil NL97, 0,1%	60 (1)
8	DTT, 10 mM más DOC, 0,1%	170 (3)
9	DTT, 10 mM más Triton X-100, 0,1%	5.680 (98)
	DTT, 10 mM más Triton X-100, 2%	5.570 (96)
10	DTT, 10 mM más Urea 6M	870 (15)
11	DTT, 10 mM más cloruro de guanidinio 6M	60 (1)

(a)

Las condiciones de ensayo fueron: 10 μ l de paredes de neumococo marcadas radiactivamente con 3 H-colina (0,15 mg peso seco/ml; 10^6 cpm/ml), 100 μ l de lisado de cw-1 infectado con Dp-1 (MDI=5) y 100 μ l de tampón fosfato 0,02M pH 7,0 con las adiciones señaladas. El tratamiento fue similar al descrito en la tabla 2, excepto que el tiempo de incubación fue 30 minutos.

Asimismo, se observó que el etiléndiaminotetraacetato (EDTA) estimula la actividad lítica más débilmente; algunos detergentes como el dodecil sulfato sódico (SDS) y el sarcosil destruyen la actividad lítica, mientras que el Triton X-100 no afecta a dicha actividad. Por último, en la misma tabla 3, se muestra que agentes típicos de desnaturalización de proteínas como la urea o el cloruro de guanidinio inactivan al enzima.

3.1.5. Purificación de la actividad lítica asociada al fago

Como ya hemos indicado, la principal dificultad con que se tropezó durante los pasos iniciales de purificación de la actividad enzimática fue la progresiva pérdida de actividad a lo largo de las diferentes etapas de purificación. No obstante, el empleo de agentes reductores hizo posible la purificación a homogeneidad del enzima asociado al fago (PAL), lo que sugiere que tales agentes además de un efecto estimulador ejercen un efecto protector como había sido previamente sugerido en otros sistemas (228, 229, 230).

Todas las etapas de purificación que describimos a continuación se llevaron a cabo a 4° C.

3.1.5.1. Preparación del lisado

Se inocularon 2 litros de medio C + Y con un cultivo de cw-1 a una concentración de 2×10^7 células/ml. El cultivo se incubó a 37° C y a una concentración de $6,2 \times 10^7$ células/ml se añadió bacteriófago Dp-1 purificado a una MDI de 5; 60 minutos más tarde se añadió 2-mercaptoetanol (2-ME) a una concentración final

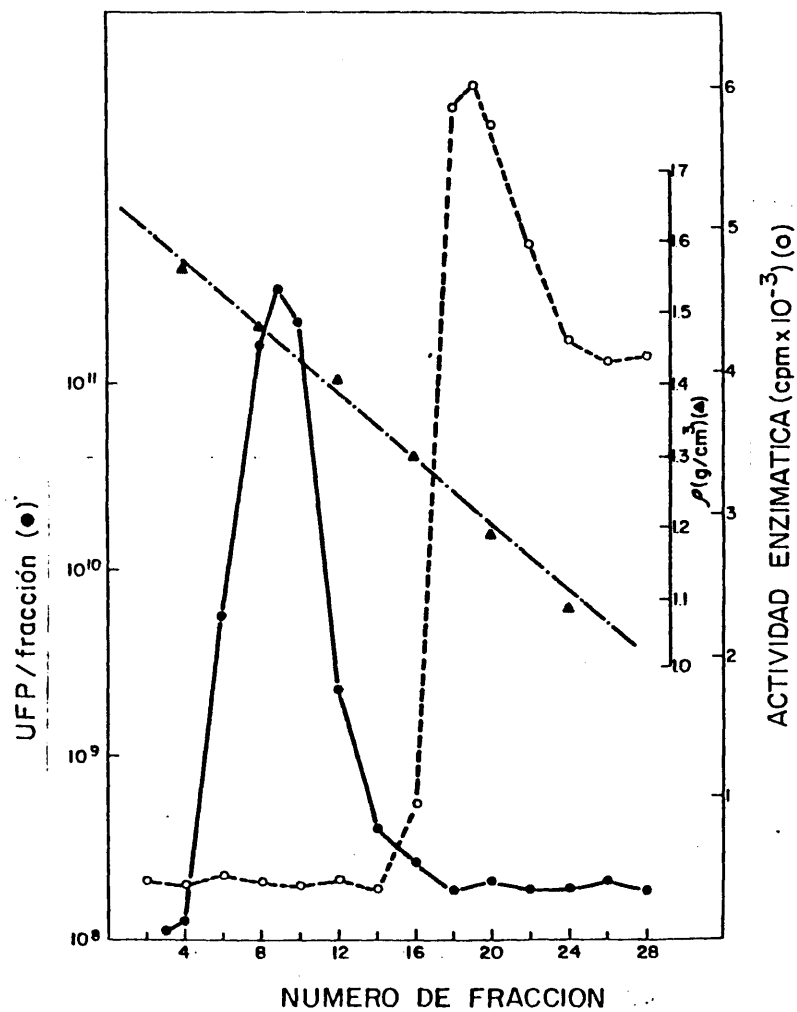


Figura 19.- Purificación de la PAL. 10 ml de un crudo obtenido por precipitación con PEG de un lisado de un cultivo de cw-1 infectado por Dp-1 (apartado 3.1.5.2.) se aplicaron sobre un gradiente a pasos de ClCs, se centrifugó a 25.000 rpm. durante 150 minutos en las condiciones descritas en el apartado 3.1.5.3. Se recogieron fracciones de 1,2 ml de la parte inferior del tubo, en las cuales se valoró los fagos viables (●—●) y la actividad lítica sobre paredes de neumococo marcadas radiactivamente con ³H-colina (○—○). El índice de refracción de las fracciones (▲—▲) se determinó en un refractómetro PZO.

de 10mM y la incubación continuó hasta la lisis completa del cultivo, que ocurrió aproximadamente 90 minutos después de la adición de los fagos. El lisado se enfrió en hielo a 4°C y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 6000 xg durante 20 minutos a 4°C, se conservó el sobrenadante y se desechó el precipitado resultante.

3.1.5.2. Precipitación con polietilenglicol

Al sobrenadante anterior conteniendo el crudo enzimático se añadió ClNa (concentración final 0.5M) y polietilenglicol 6000 a una concentración final del 10% (peso/volumen) dejándolo toda la noche a 4°C. El precipitado se recogió por centrifugación a 10.000 xg durante 15 minutos, resuspendiéndolo en 40 ml de tampón TBT conteniendo 10mM de 2-ME.

3.1.5.3. Centrifugación en gradientes de cloruro de cesio

El crudo obtenido en el paso anterior, resuspendido en TBT y 2-ME, se aplicó a un gradiente a pasos de ClCs preparado de la siguiente forma: 3ml de ClCs a una densidad de 1,7g/cm³; 10ml de densidad 1,5g/cm³ y 10ml de densidad 1,3g/cm³. El cloruro de cesio se disolvió en tampón conteniendo TBT y 2-ME. Después de centrifugar a 25.000 rpm en un rotor Sorvall AH627 durante 150 minutos se recogieron fracciones de 1,2ml pinchando los tubos por el fondo. En estas fracciones se probaron tanto su actividad lítica como la formación de placas infectivas como muestra la Fig.19. Como se puede observar, la actividad lítica se separaba nítidamente de la zona donde se recuperaban más del 99% de los fagos viables. Con el fin de descartar la posibilidad de que la PAL fuera un componente estructural de las partículas fágicas maduras, que necesitara ser solubilizada por algún tratamiento químico, como sucede en el caso

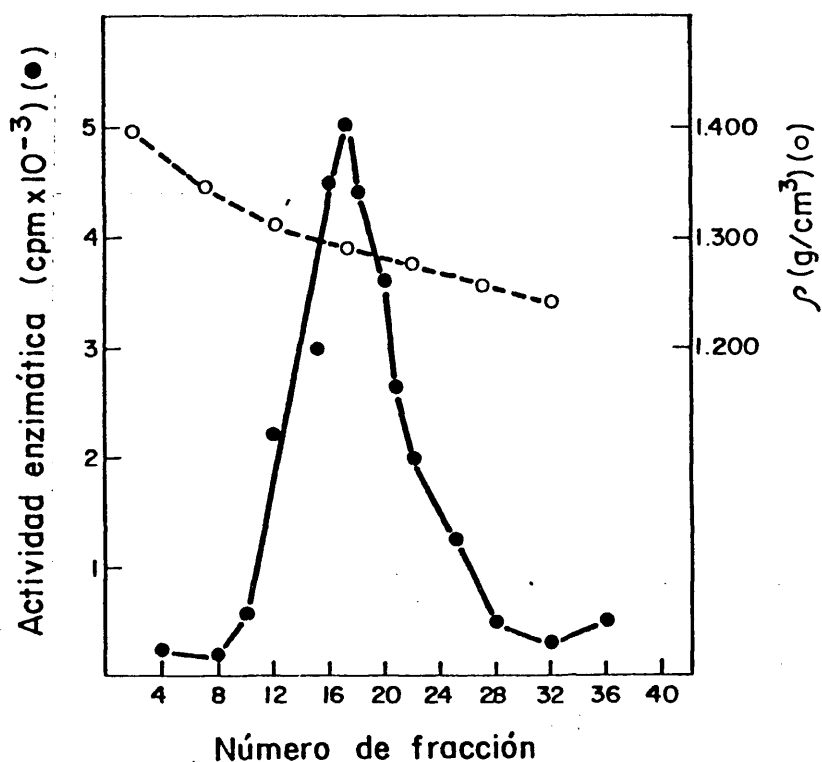


Figura 20.- Purificación de la PAL. Las fracciones 17 a 23 de la figura anterior se juntaron y se ajustó su densidad a $1,3 \text{ g/cm}^3$ con ClCs, se centrifugaron a 40.000 rpm durante 60 horas, según se describe en el apartado 3.1.5.4. En las diferentes fracciones se determinó la actividad lítica (●—●) y el índice de refracción (○—○).

Tabla 4

Ensayo de la actividad lítica en partículas purificadas de Dp-1.

Exp.	Condiciones ^(a)	cpm liberadas(%)
1	Crudo de PAL ^(b)	6.800 (100)
2	Dp-1 ^(c)	400 (0)
3	Dp-1 + DTT(10mM)	600
4	Dp-1 + Tween 80 (0,4%)	540
5	Dp-1 + DOC (1%)	530
6	Dp-1 + TritónX-100 (0,5%)	580
7	Dp-1 + Cloroformo	450
8	Dp-1 + Fosfolipasa C (50µg/ml)	470

(a) Las condiciones de ensayo fueron similares a las descritas en la Tabla 2.

(b) Se usaron 100 µl del concentrado de las fracciones 18 a 22 de la figura 19.

(c) La concentración final de Dp-1 fue 10^{11} UFP

del bacteriófago Ø6 de Pseudomonas phaseolicola (196), el bacteriófago Dp-1 purificado se sometió a una serie de tratamientos que se resumen en la tabla 4. Los resultados indican la ausencia de actividad lítica en las partículas maduras de Dp-1 purificado en ClCs.

3.1.5.4. Centrifugación a equilibrio en ClCs

Las fracciones activas del paso anterior (de la 17 a la 23) se mezclaron y su densidad se ajustó a $1,3\text{g/cm}^3$ con cloruro de cesio disuelto en el mismo tampón citado anteriormente. A continuación se ultracentrifugó a 40.000 rpm en un rotor Sorvall A-841 durante 60 horas a 4°C . Se recogieron fracciones de 0,5ml como en el paso anterior y se probó su actividad lítica frente a paredes de neumococo marcadas radiactivamente. Como se aprecia en la fig. 20, el pico de actividad se obtenía a una densidad de $1,3\text{g/cm}^3$. Las fracciones activas se juntaron y se dializaron durante 36 horas frente a 4 litros de tampón fosfato sódico 0,01M pH6,9 conteniendo 2-ME a 10mM, con varios cambios de dichos tampón.

La observación al microscopio electrónico de estas fracciones activas mostró (Fig. 21) que la actividad enzimática se recuperaba junto con partículas que morfológicamente eran similares al bacteriófago Dp-1. Esta observación será discutida más adelante.

3.1.5.5. Cromatografía de filtración

El material dializado del paso anterior se trató con Tritón X-100 al 0,1%, disuelto en el tampón fosfato anteriormente citado conteniendo 2-ME, durante 60 minutos a 4°C . A continuación se aplicó a una columna (Pharmacia, 4,2 x 85 cm) de Bio-Gel P-60 (Bio-Rad, 100-120 mallas) equilibrada con tampón fosfato sódico 0,02M pH 6,9 conteniendo 2-ME a 10mM y Triton X-100 al 0,05%. Se eluyó con el mismo tampón con un flujo aproximado

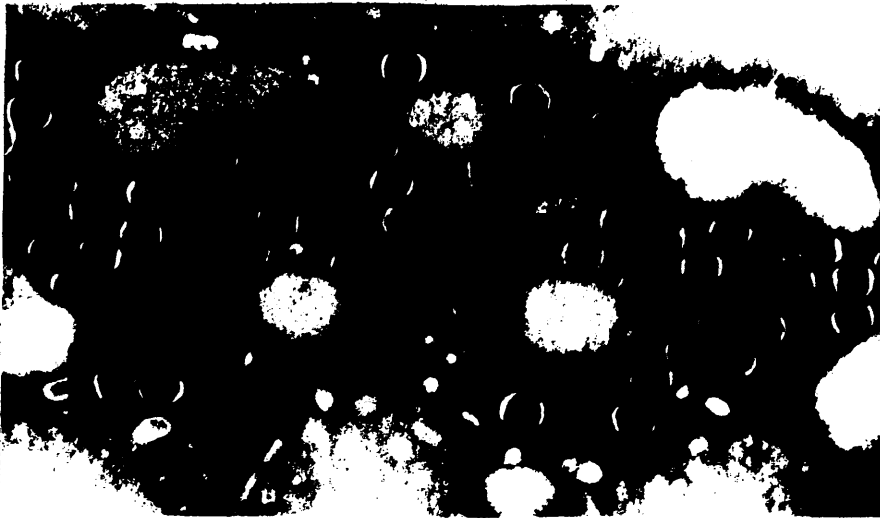


Figura 21.- Micrografía electrónica de partículas fágicas vacías y colas. La preparación se hizo a partir de una muestra de la fracción 17 del gradiente mostrado en la figura 20, según la técnica descrita en el apartado 2.17. (aumentos x 60.400).

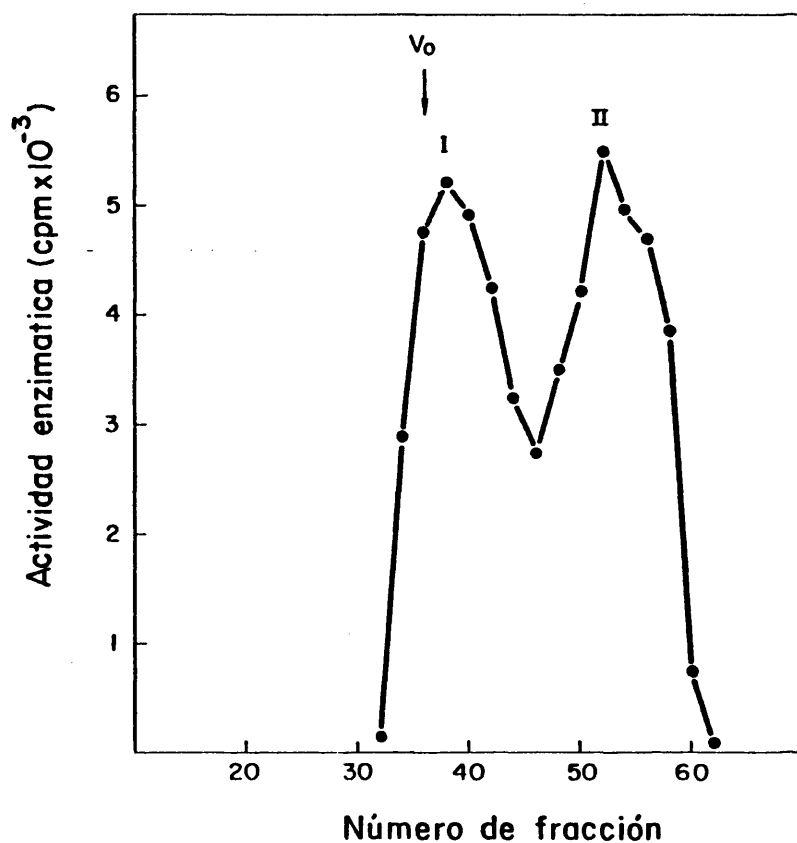


Figura 22. - Purificación de la PAL. Cromatografía de filtración sobre Bio-Gel P-60. Este paso de purificación se describe en el apartado 3.1.5.5. La actividad enzimática de las fracciones se determinó usando 100 μ l de cada fracción, como se describe en el apartado 2.14. La flecha indica la posición del volumen de exclusión (V_0).

de 15 ml/hora; se recogieron fracciones de 8,7 ml y la actividad enzimática se determinó en 100 μ l de cada fracción (Figura 22). Las fracciones activas 25 ml de los dos picos activos, I y II) se concentraron mediante una membrana Diaflo (Amicon, filtro PM10) hasta un volumen final de 3 ml.

En la tabla 5 se resumen los resultados obtenidos en las diferentes etapas de purificación del enzima lítico que acabamos de describir.

El concentrado del pico II obtenido después del último paso de purificación fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico de acuerdo con el método de Laemmli y Favre (220). Después de teñir el gel con azul de Coomassie R-250 se observó una sola banda de proteína (figura 23).

3.1.6. Papel de las partículas fágicas vacías en la actividad lítica

El estudio de las lisinas asociadas a fago ha recibido especial atención por parte de muchos investigadores, como ya vimos en la Introducción de esta Memoria. En la literatura se han descrito varios tipos de lisinas con un mecanismo de acción peculiar para cada una de ellas. Concretamente en el caso de los estreptococos del grupo C, la lisina asociada al fago es una proteína unida a la partícula fágica (130, 231) en contraste con lo que sucede en los estreptococos del grupo A donde la actividad lítica inducida por el bacteriófago A-25 que infecta a Streptococcus pyogenes no está unida al fago (206).

Tabla 5

Purificación de la lisina asociada a fago (PAL) de neumococo

Pasos	Volumen ml	Proteína total mg	Actividad enzi- mática total Unidades (a)	Actividad específica Unidades/mg	Recuperación %	Factor purificac.
Extracto crudo	2.000	280	260.000	928,6	100	1
Precipitación con PEG	40	41,4	210.000	5.088,2	80	5,5
Centrifugación en CLCs (I)	56,5	27,1	130.500	4.787	50	5,2
Centrifugación en CLCs (II)	12,0	12,3	125.000	10.162	48,1	10,9
Cromatografía en Bio-Gel P-60 y concentración en Amicón... PM-10	3,0	0,3	67.500	225.000	26	242,3

(a) Una unidad de actividad de PAL (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis (solubilización) de 1 µg de pared celular (815 cpm) durante 30 minutos a 37°C.

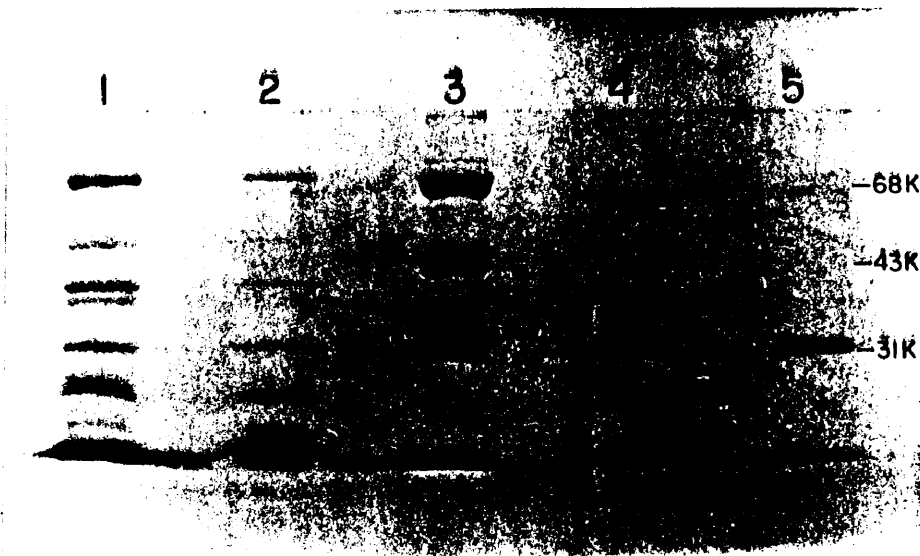


Figura 23.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en placa en presencia de dodecilsulfato sódico. En los canales 1 y 2 se aplicaron 10 μ l y 5 μ l respectivamente de un concentrado obtenido por liofilización de las fracciones 36 a 42, de la figura 22. En los canales 4 y 5 se aplicaron 10 μ l y 5 μ l (10 μ g y 5 μ g de proteína respectivamente) de un concentrado obtenido de las fracciones 52 a 56 de la figura 22. En el canal 3 se aplicaron 10 μ g de cada una de las siguientes proteínas patrones: albúmina bovina, ovoalbúmina y DNA-asa. Se usó el método de Laemmli y Favre (220).

En nuestro caso encontramos que durante el proceso de purificación, descrito anteriormente, la actividad parecía ir asociada a partículas que, observadas al microscopio electrónico, recordaban mucho al bacteriófago Dp-1 (apartado 3.1.5.4.). Sin embargo, la baja densidad de estas partículas y el hecho de que siempre aparezcan como partículas vacías junto con la constatación experimental de que las partículas maduras intactas nunca mostraran actividad lítica requirió una investigación más detallada acerca de una posible relación entre la partícula intacta, de baja densidad y la actividad lítica. El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, (figura 24) de las partículas obtenidas por centrifugación a equilibrio en ClCs (ver apartado 3.1.5.4.) reveló que estas partículas contenían las principales proteínas estructurales presentes en las partículas maduras del Dp-1 (106). Además, la proteína identificada (figura 24) como la responsable de la actividad lítica estaba también presente en estas partículas junto con las otras proteínas.

Por otra parte, para aclarar la relación existente entre la actividad enzimática y estas partículas, investigamos la naturaleza química de su posible unión. Para ello llevamos a cabo la purificación hasta el paso del equilibrio en ClCs, en ausencia o en presencia de 2-mercaptoetanol. Las fracciones activas se concentraron por separado y se analizaron en una columna (Pharmacia 0,5 x 15 cm) de Bio-Gel A-5m (Bio-Rad, 200-400 mallas). Como se muestra en la figura 25, en el perfil de elución aparece un solo pico de actividad (en el volumen de exclusión) cuando a lo largo del proceso de purificación no estaba presente el 2-ME, mientras

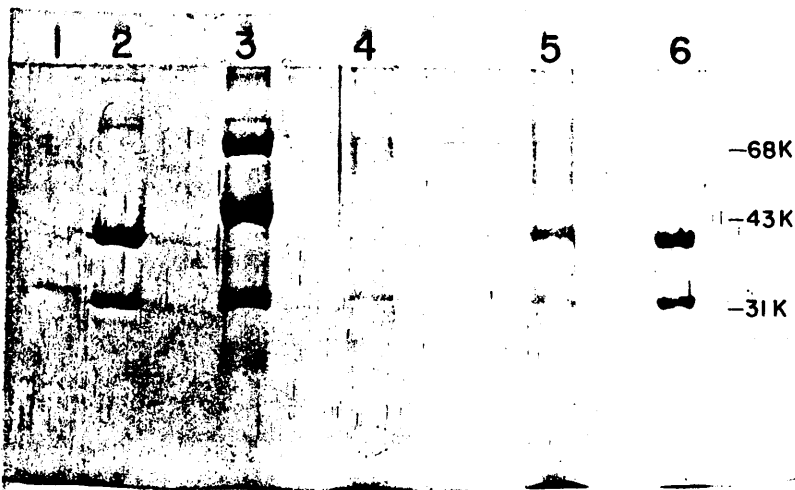


Figura 24.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en placa en presencia de dodecilsulfato sódico. Las muestras aplicadas fueron: canal 1: 3 μg de PAL purificada (675 Unidades); canal 2: 100 μg de bacteriófago Dp-1 purificado; canal 3: 10 μg de cada proteína patrón (albúmina bovina, ovoalbúmina y DNA-asa); canal 4: 1,5 μg de PAL purificada (338 Unidades); canal 5: 20 μg de crudo procedente de la figura 20; canal 6: 50 μg de bacteriófago Dp-1 purificado.

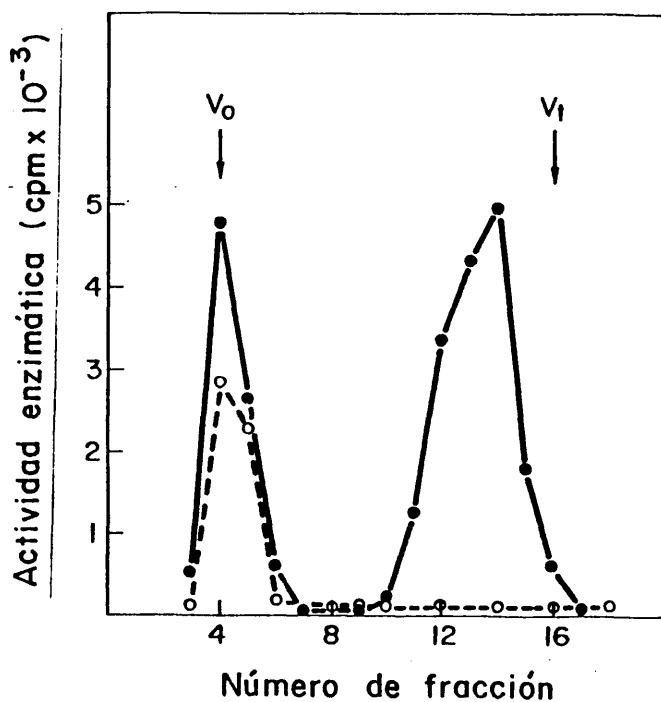


Figura 25.- Cromatografía de filtración sobre Bio-Gel A-5m, en ausencia o en presencia de agentes reductores, de un crudo de PAL parcialmente purificado. Las fracciones activas del segundo gradiente en CICs (figura 20), obtenidas en presencia (●—●) o en ausencia (○- -○) de agentes reductores se aplicaron a una columna de Bio-Gel A-5m (15x0,5 cm). La columna se eluyó con tampón fosfato 0,02M, pH 6,9 en presencia (●—●) o en ausencia de 10mM de ME. Se recogieron fracciones de 0,3 ml. V_0 : volumen de exclusión; V_t : volumen total.

que aparecen 2 picos, uno incluido en la columna, cuando la actividad se obtiene en presencia de 2-ME. Estos resultados sugieren la presencia de un enlace covalente entre el enzima lítico (PAL) y las partículas vacías, aunque en este momento no podemos determinar con exactitud la relación entre tales partículas y los fagos maduros que no contienen PAL.

3.1.7. Caracterización parcial de la actividad lítica purificada

Una vez obtenido el enzima electroforéticamente puro vamos a estudiar algunas de sus propiedades químicas:

3.1.7.1. Peso molecular

El peso molecular del enzima lítico (PAL) se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, usando varias proteínas de pesos moleculares apropiados y conocidos como patrones. Cuando las movilidades electroforéticas de estas proteínas se representangráficamente frente al logaritmo de su peso molecular (figura 26), se obtuvo un peso molecular de 31.000 para la proteína lítica que estudiamos.

3.1.7.2. Efectos del pH y de la molaridad del tampón

Para estudiar la influencia que sobre la PAL tenían los distintos pH y molaridades del tampón del medio de reacción se operó de la siguiente forma: se ensayó a distintos pH y molaridades una mezcla conteniendo 5 μ l de enzima purificado (265U) en tampón fosfato sódico, ditiotreitól a 10mM y 10 μ l de paredes marcadas radiactivamente. La incubación se realizó a 37°C durante 60 minutos.

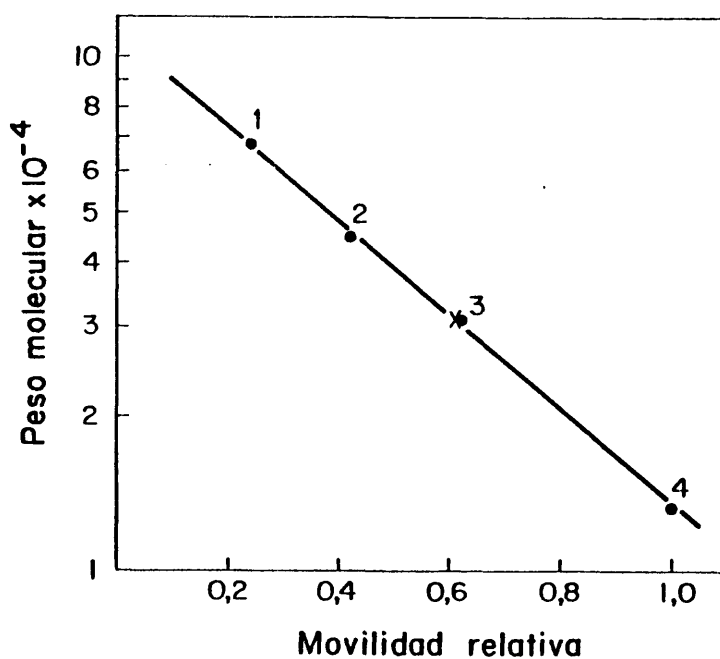


Figura 26.- Determinación del peso molecular de la PAL purificada. Las movilidades relativas se obtuvieron a partir de la electroforesis en gel de poliacrilamida en placa en presencia de SDS como aparece en la figura 23. Las proteínas patrones (●) fueron: 1, albúmina bovina de suero; 2, ovoalbúmina; 3, DNA-asa; 4, lisozima. La movilidad de la PAL purificada se representa por x.

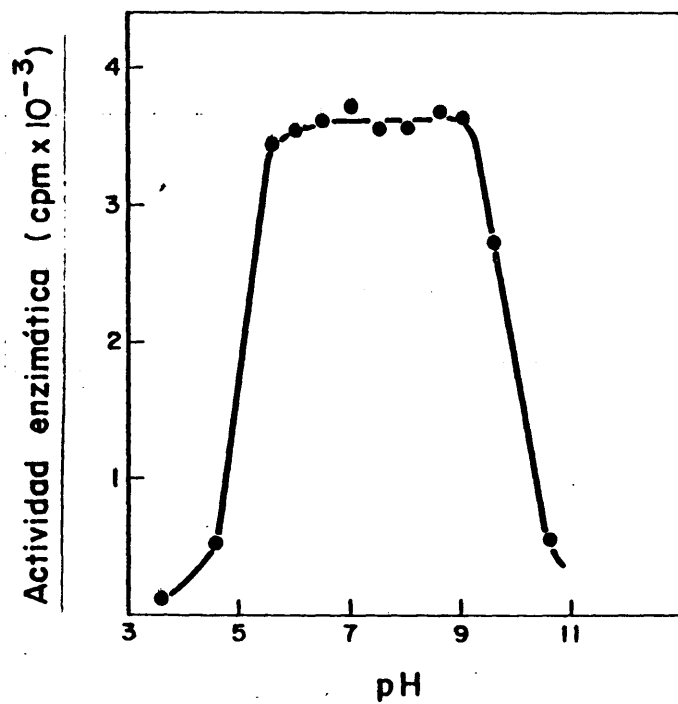


Figura 27.- Actividad enzimática de la PAL en función del pH. Muestras de 5 μ l de PAL purificada (265 Unidades) se probaron a varios pH en presencia de 10 mM de ditioneitol.

Los resultados de estos ensayos aparecen en la figura 27. Como se ve, la actividad enzimática se mantiene estable dentro de valores de pH entre 6,0 y 9,0.

En cuanto a la molaridad del medio hay una mayor estabilidad pues la actividad enzimática es máxima dentro de un rango bastante amplio (figura 28).

De estos datos podemos concluir que las exigencias para obtener una actividad óptima de la PAL no son muy estrictas, en contraste con la estricta dependencia del pH encontrado para el caso de la amidasa de Streptococcus pneumoniae (95).

3.1.7.3. Efecto de las sales y de varios enzimas

Se han probado la influencia de distintos aniones y cationes así como de una serie de tratamientos enzimáticos sobre la actividad de la PAL. Como control (100%) se usaron las mismas condiciones que en el caso anterior.

Como se puede deducir de la tabla 6 no se ha encontrado efecto estimulador alguno, sin embargo, hay una inhibición drástica de la actividad por parte de los iones de los metales pesados: Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} . Asimismo se hace también patente el efecto inhibitor de los cationes divalentes Mg^{++} y Ca^{++} , siendo mucho más acusado el ejercido por el Ca^{++} que puede llegar a suprimir la actividad enzimática a concentraciones de $10^{-2}M$.

El tratamiento con distintos enzimas nos confirma la naturaleza exclusivamente proteica de la PAL.

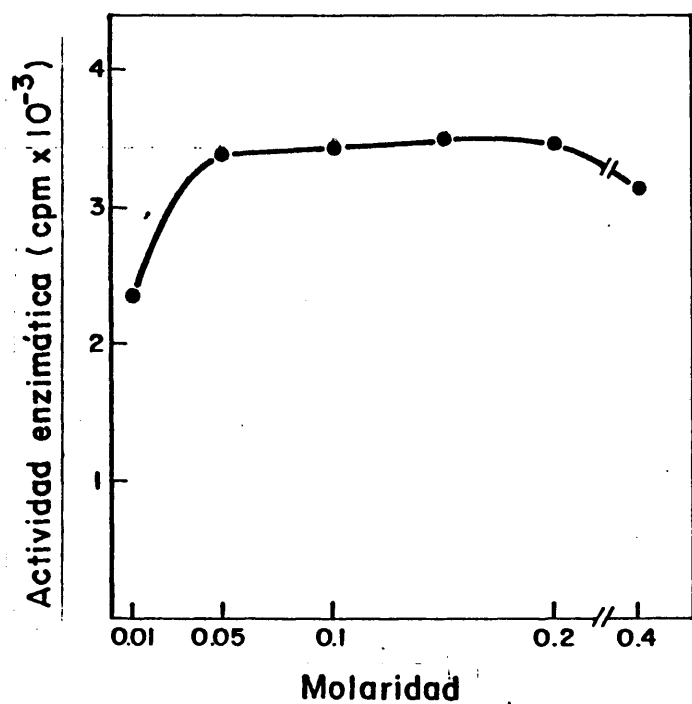


Figura 78.- Actividad enzimática de la PAL en función de la molaridad. Muestras de 5 μ l de PAL purificada (265 Unidades) se ensayaron a distintas molaridades en tampón fosfato sódico 0,1M conteniendo 10 mM de ditioneitol.

Tabla 6

Efecto de sales y de tratamientos enzimáticos sobre la actividad enzimática de la PAL.

	Concentración M	Actividad enzimática (% del control)
<u>Sales</u>		
Tampón fosfato sódico (control)	10^{-1}	100
	5×10^{-2}	100
	10^{-2}	68
ClLi	10^{-2}	90
ClNa	10^{-2}	88
ClK	10^{-2}	75
Cl ₂ Mg	10^{-2}	51
Cl ₂ Ca	10^{-2}	7
	10^{-3}	57
SO ₄ Fe	10^{-3}	4,1
SO ₄ Cu	10^{-2}	3,2
Cl ₂ Zn	10^{-2}	6,4
Cl ₂ Hg	10^{-5}	64
<u>Enzimas</u>		
Tripsina (a)		17
Pronasa E		13
Proteinasa K		8
Fosfolipasa C		105
Glucosidasa		98
RNA-asa		95
DNA-asa		107

(a) El método de ensayo fue similar al descrito en la tabla 2 excepto que la PAL se preincubó a 37°C durante 30 minutos con los distintos enzimas, a una concentración de 50 µg/ml, antes de añadir las paredes marcadas radiactivamente con ³H-colina.

3.1.7.4. Cinética

En primer lugar estudiamos la dependencia de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática; para ello utilizamos distintas concentraciones de PAL purificada frente a una cantidad fija de sustrato, bajo las condiciones óptimas de ensayo citadas con anterioridad. Como se aprecia en la figura 29 la tasa de reacción era proporcional a la concentración enzimática hasta 240 μ l de proteína/ml.

Por otro lado en la figura 30 se muestra la cinética de la reacción lítica de paredes de la PAL en ausencia o en presencia de agentes reductores, poniéndose de manifiesto el efecto estimulador que ejercen dichos agentes sobre la actividad enzimática.

3.1.7.5. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la PAL

Asimismo estudiamos el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad enzimática. En la figura 31 se resumen estos experimentos, concluyéndose que el enzima es muy dependiente de la temperatura para mantener su actividad enzimática. En efecto, la incubación durante 5 minutos a temperaturas inferiores a 40°C no afectaba la estabilidad enzimática, pero por encima de esa temperatura había una pérdida drástica de actividad. Esto justifica las precauciones que deben tomarse para la purificación y manipulación del enzima si se quiere evitar cualquier tipo de inactivación.

3.1.7.6. Inhibición de la actividad de la PAL

Previamente se ha descrito que el ácido lipoteicoico (LTA) es un potente y específico inhibidor de la autolisina de neu

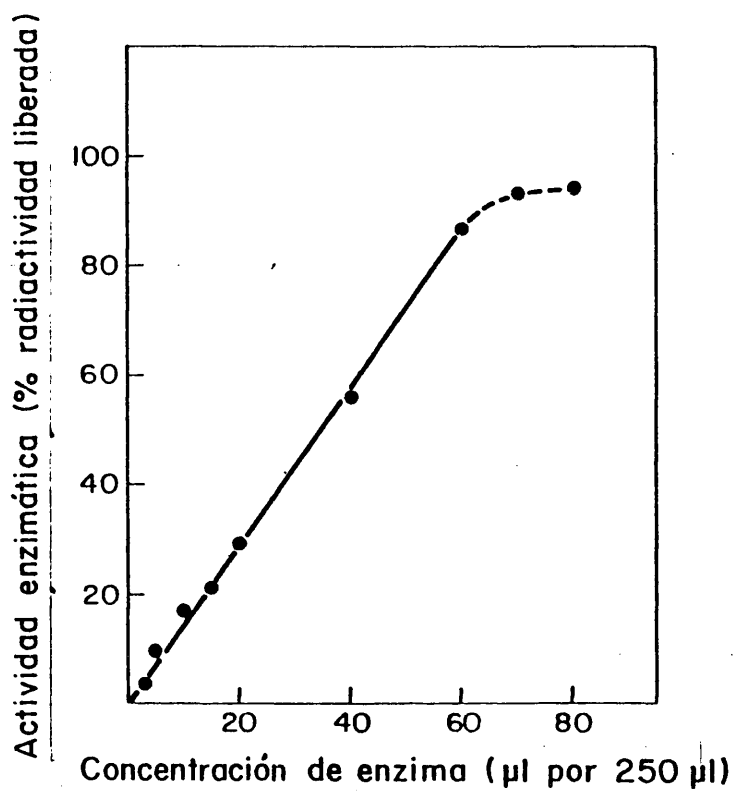


Figura 29.- Actividad enzimática de la PAL en función de la concentración de enzima. La reacción se llevó a cabo usando varias concentraciones de PAL purificada y una cantidad fija de paredes celulares marcadas radiactivamente con ^3H -colina. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 60 minutos en las condiciones descritas en el apartado 2.14.

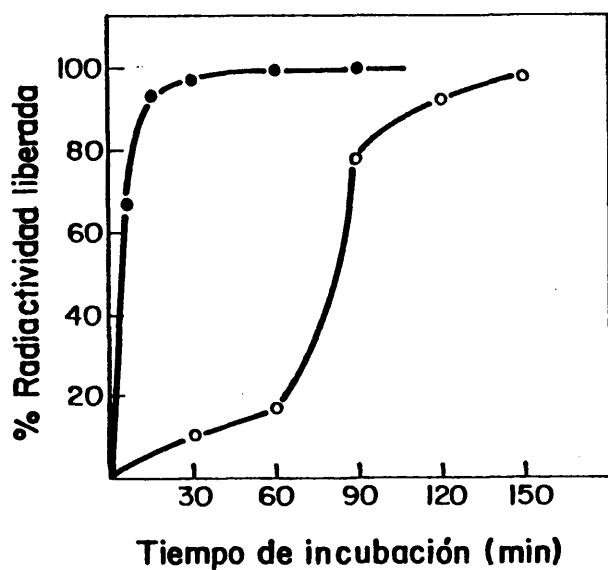


Figura 30.-Estimulación de la actividad enzimática de la PAL en presencia de agentes reductores. Paredes de neumococo marcadas radiactivamente con ^3H -colina se incubaron a 37°C con $5\ \mu\text{l}$ de PAL purificado en presencia (\bullet — \bullet) o en ausencia (\circ — \circ) de $10\ \text{mM}$ de ditiotreitól. A diferentes tiempos se tomaron muestras, se centrifugaron (10.000xg , 15 minutos) y se analizó la radiactividad liberada en los sobrenadantes.

nococo (48). Este hecho nos llevó a estudiar el efecto que el LTA ejercía sobre la lisina asociada al fago Dp-1 (PAL) purificada. Los resultados (figura 32) demostraron que el LTA ejercía un efecto inhibitor similar sobre los dos enzimas. Sin embargo, en claro contraste con este resultado la cardiolipina mostró un efecto inhibitor sobre la PAL mientras que este fosfolípido no tenía apenas efecto sobre la autolisina de neumococo (figura 33).

Otra prueba adicional en favor de que los dos enzimas líticos (autolisina y PAL) son distintos viene dada por su diferente comportamiento frente al antisuero preparado contra la autolisina (anti-E) (232), en experimentos "in vitro". Como se muestra en la figura 34, el antisuero anti-E no mostraba ningún efecto sobre la actividad lítica de paredes de la PAL, mientras que inhibía completamente la actividad de la autolisina purificada. En la misma figura se comprueba que tanto un suero control (NRS) como un suero contra el Dp-1 (anti-Dp1) tampoco afectan a la actividad de la PAL.

3.1.8. Productos de degradación enzimática

Todos los datos expuestos anteriormente apuntaban hacia el hecho de que la lisina inducida en cw-1 por el fago Dp-1 y la autolisina de neumococo eran dos enzimas distintos. Una prueba adicional para sostener esta afirmación consistió en comparar los productos de degradación de ambos enzimas. Esto constituye una caracterización química imprescindible en cualquier enzima y en nuestro caso particular, los ensayos se llevaron a cabo utilizando el mismo sustrato: paredes de neumococo marcadas radiativamente con colina tritiada (ver apartado 2.10).

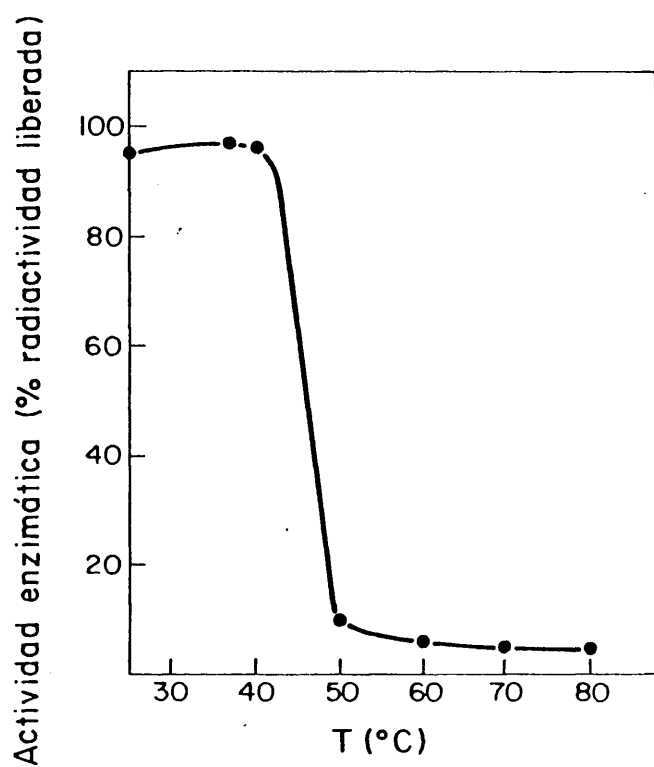


Figura 31.- Estabilidad de la actividad enzimática de la PAL en función de la temperatura. Muestras de PAL purificada (5 μ l) se incubaron durante 5 minutos a las temperaturas indicadas. Las muestras se enfriaron y la actividad lítica sobre paredes se midió por el método habitual de ensayo a 37°C. El 100% de actividad se considera el obtenido con una muestra de PAL que se incubó directamente a 37°C sobre paredes.

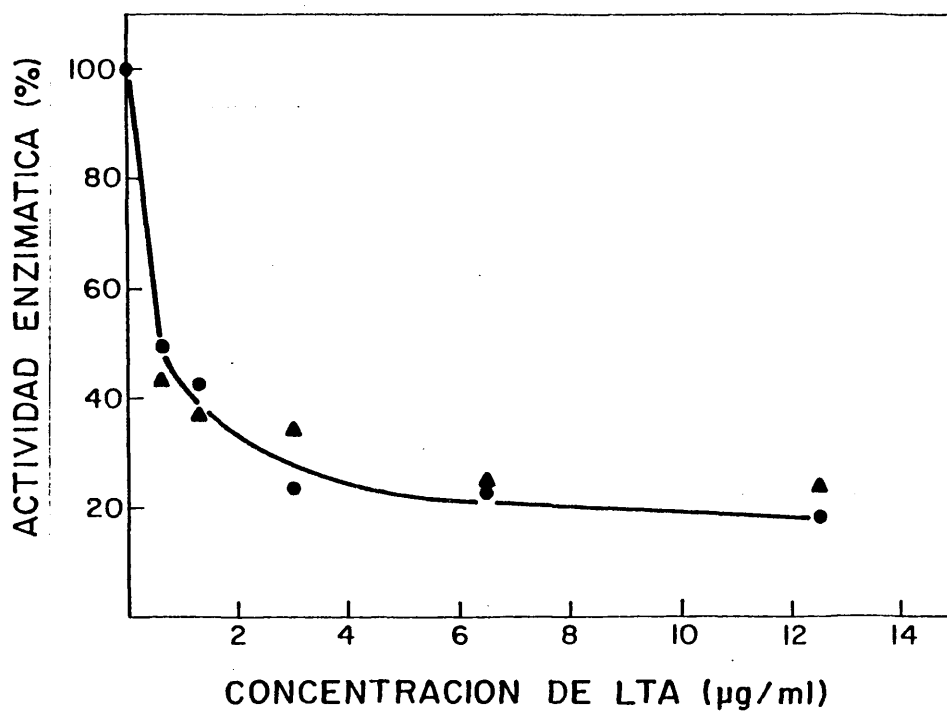


Figura 32.- Inhibición de la actividad enzimática de la PAL por el antígeno de Forssman. El antígeno de Forssman se añadió en las cantidades indicadas en la gráfica a mezclas de reacción conteniendo 5 µl de PAL (●—●) o 5 µl de amilasa (▲—▲). Las actividades enzimáticas se midieron bajo las condiciones habituales de ensayo.

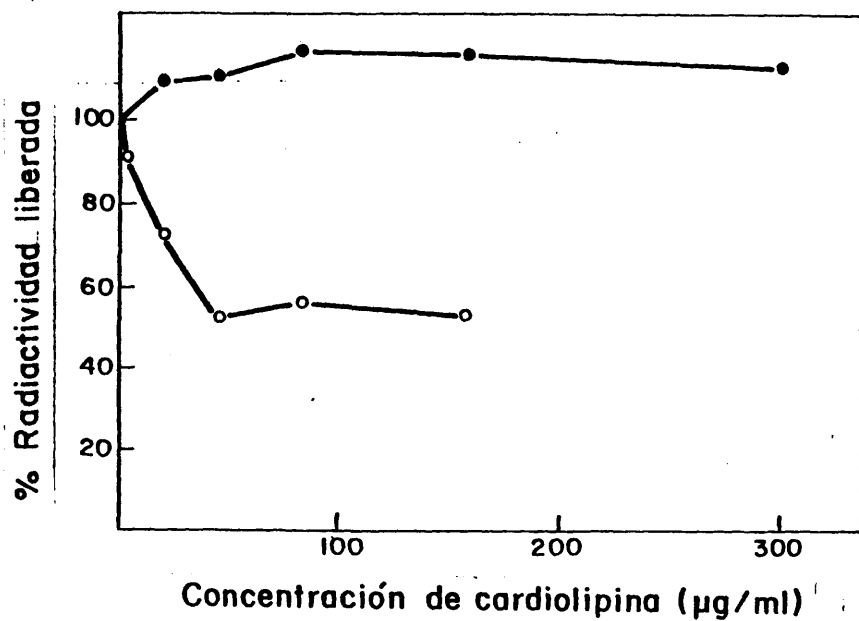


Figura 33.- Inhibición de la actividad enzimática de la PAL por la cardiopina. Mezclas de reacción conteniendo 5 µl de PAL (○—○) o 5 µl de amidasa (●—●) recibieron diferentes concentraciones de cardiopina y las actividades enzimáticas se midieron bajo las condiciones habituales de ensayo.

Las reacciones enzimáticas se realizaron en las condiciones de incubación óptimas para ambas enzimas y después del período de incubación a 37°C (17 horas) las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos en una microcentrífuga recogiéndose ambos sobrenadantes con pipeta Pasteur. A continuación las dos muestras fueron cromatografiadas, por separado, a través de una columna Pobel (2,5 x 40 cm) de Sephadex G-200 y eluidas con ClNa 0,15M. Se recogieron fracciones de 3,4 ml y se contaron 200 μ l para medir la radiactividad de las fracciones.

El resultado, como se observa en la figura 35 demuestra que los dos enzimas producen fragmentos de pared de distinto peso molecular, lo que con toda probabilidad indica que ambas enzimas son distintas y cortan por puntos distintos de la pared celular. El enzima C de neumococo (N-acetilmuramil-L-alanil amidasa) muestra el perfil esperado, que corresponde a los fragmentos de pared que han sido descritos previamente en la literatura (9). En marcado contraste, la PAL no da lugar al pico de exclusión mayoritario que produce la degradación de las paredes con la amidasa; por el contrario, produce unos fragmentos de menor tamaño molecular que se incluyen en la columna. En la actualidad desconocemos la naturaleza y el punto de corte del enzima, por lo que serán necesarios experimentos adicionales para responder a estas preguntas.

3.1.9. Requerimiento de colina para la actividad de la PAL

Como ya hemos señalado anteriormente, la autolisina de neumococo es absolutamente dependiente de la presencia de colina en la pared bacteriana para su actividad enzimática (33, 63). El enzima aislado por nosotros (PAL) parece requerir, asimismo,

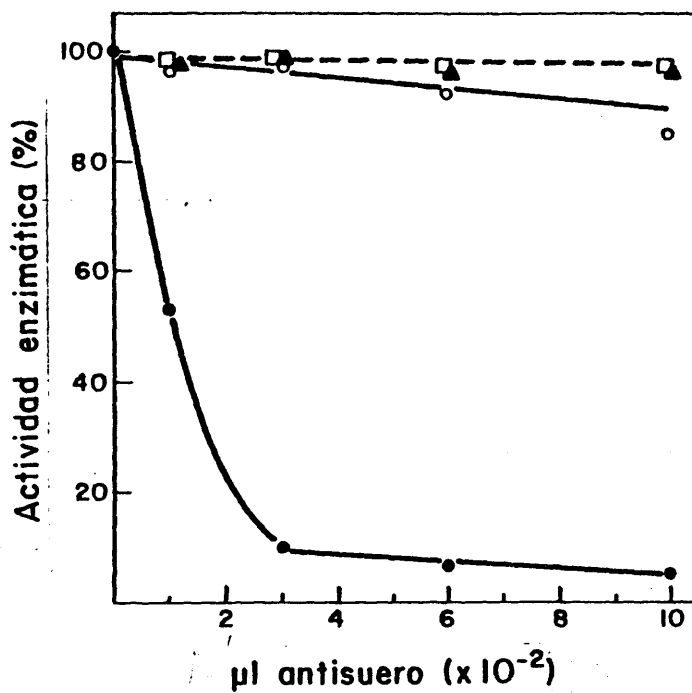


Figura 34. - Efecto de diferentes antisueros frente a la PAL y a la autolisina de neumococo. 10 μl de PAL purificada se incubaron con anti-E (o—o), o anti-Dp-1 (Δ — Δ) o suero normal de conejo (\square — \square) durante 5 minutos a 0°C; a continuación, se añadieron paredes marcadas radiactivamente con ^3H -colina y las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos a las condiciones habituales de ensayo. Como control, la amidasa de neumococo purificada se incubó a 0°C durante 5 minutos con diferentes cantidades de anti-E y su actividad se ensayó por el método habitual (●—●).

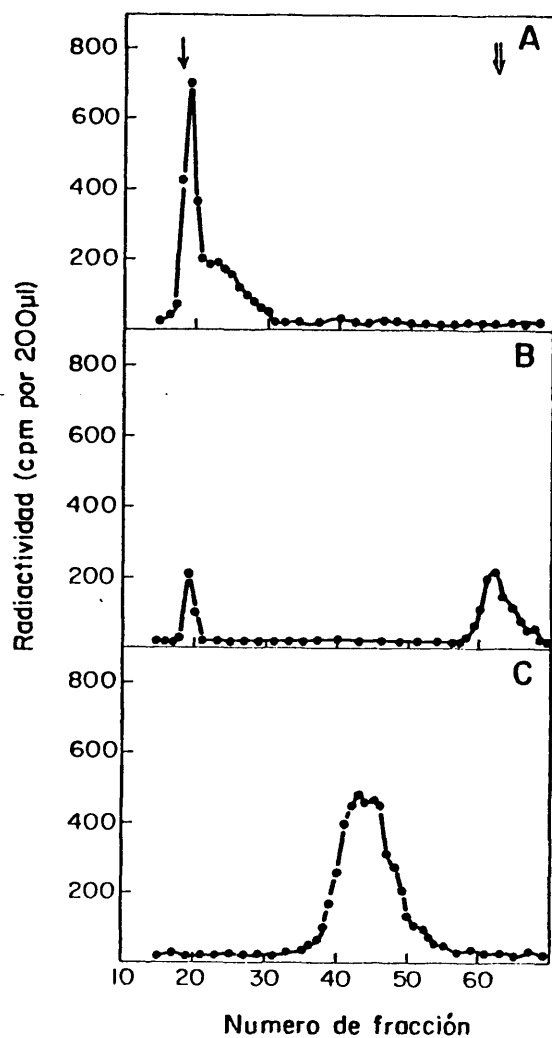


Figura 35.- Cromatografía de filtración sobre Sephadex G-200 de los fragmentos de pared celular marcados con ^3H -colina producidos por tratamiento de paredes purificadas con: A, 10 μl de amidasa de neumococo purificada; B, 100 μl de extracto crudo del mutante deficiente en autolisina, cw-1; C, 10 μl de PAL purificada. Las columnas se eluyeron con solución salina, recogiendo fracciones de 2 ml. \downarrow : volumen de exclusión; \Downarrow : volumen total.

colina en el sustrato de reacción ya que no es capaz de degradar paredes preparadas a partir de células EA (con etanolamina en lugar de colina). No obstante, quisimos demostrar de forma más directa la importancia de los residuos de colina para lo cual se trataron las paredes de neumococo purificadas con un anticuerpo obtenido de mieloma (TEPC-15) que reconoce específicamente la fosforilcolina; es decir, llevamos a cabo "in vitro" un recubrimiento de los residuos de fosforilcolina. Como demuestra la tabla 7, esta proteína inhibe fuertemente la actividad de la PAL, de manera análoga a como lo hace con la autolisina de la estirpe salvaje R6. La especificidad del efecto inhibitor de la proteína de mieloma se puso de manifiesto por el hecho de que tal inhibición puede revertirse por la adición de fosforil-colina al medio de incubación. Esta reversión, como se ve en la misma tabla 7 es mucho más eficaz para la autolisina C que para la PAL.

Tabla 7

Inhibición de la reacción enzimática de la PAL por la proteína de mieloma anti-fosforilcolina específica (TEPC-15)

Adiciones a la PAL o a la amidasa (R6)	% radiactividad liberada	
	PAL	amidasa
Ninguna (solo PAL)	100	—
Ninguna (solo amidasa)	—	100
Proteína de mieloma		
5 μ l	20,2	70,8
10 μ l	8,3	—
25 μ l	7,2	43,1
50 μ l	—	22,7
10 μ l+20 μ g de fosforilcolina	53,8	—
50 μ l+20 μ g de fosforilcolina	—	103

El método de ensayo fue el siguiente: 250 μ l de tampón fosfato 0.02M, pH 7,0 conteniendo DTT a 10mM, 5 μ l de PAL purificada (0,5 μ g), 10 μ l de paredes de neumococo marcadas radiactivamente con 3 H-colina (0,15mg peso seco/ml y 7×10^5 cpm/ml) más las cantidades de proteína de mieloma (2 mg de proteína/ml) indicadas arriba. El enzima se añadió en último lugar. Las muestras se incubaron a 37°C, 30 minutos. La reacción se paró añadiendo 10 μ l de formaldehído al 38% y 10 μ l de albúmina bovina al 4%; las muestras se centrifugaron (10.000xg, 15 minutos) y se determinó la radiactividad liberada en 200 μ l de los sobrenadantes.

Cuando se ensayó la PAL purificada (10 μ l), como se describe en esta tabla, empleando como sustrato las paredes de neumococo purificadas marcadas radiactivamente con 14 C-etanolamina (0,15 mg peso seco y 10^5 cpm/ml), el número de cuentas liberadas al sobrenadante fue solo un 2% del total de radiactividad contenida en las paredes.

3.2. Obtención de un antisuero frente a la PAL

De cuanto llevamos dicho hasta el momento se puede deducir que en el proceso de infección de la bacteria mutante de neumococo cw-1 por el bacteriófago Dp-1 se sintetiza un nuevo enzima que interviene, de alguna manera, en la liberación de la progenie fágica al medio. Anteriormente (80) se había sugerido que durante la infección de la estirpe salvaje de neumococo (R6) por Dp-1 a alta multiplicidad de infección intervenía, al menos para la salida de los fagos, la autolisina del huésped.

De los datos expuestos a lo largo de este capítulo se puede concluir, por tanto, que en el caso de la infección del mutante cw-1 existe un mecanismo diferente al postulado en la estirpe salvaje para que se produzca la lisis del cultivo y la liberación consiguiente de fagos al medio.

Con el fin de encontrar apoyos experimentales adicionales a esta conclusión preparamos un suero anti-PAL. El uso combinado del anti-PAL con el anti-E (un antisuero preparado por nosotros contra la autolisina del huésped (232, 74)), nos permitiría además comparar inmunológicamente ambos enzimas con el fin de poner de manifiesto la existencia o no de comunidad antigénica entre los dos enzimas líticos.

A partir de la PAL purificada obtuvimos un antisuero anti-PAL siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 2.20. Este antisuero se tituló, de acuerdo con la técnica descrita por Ouchterlony (222), obteniéndose un título de 1:32. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis inmunolectroforético para confirmar que se obtenía una sola banda de precipitación en-



Figura 36.- Inmunolectroforesis en placa de agarosa de la PAL frente a su antisuero. El pocillo superior contiene PAL purificada (3 μ g, 675 Unidades). El pocillo central contiene antisuero anti-PAL. El pocillo inferior contiene extracto crudo de células EA. Se siguió la técnica de Grabar y Williams (223), según se explica en el apartado 2.23.

tre la PAL y su antisuero. Como se ve en la figura 36, aparece una sola banda con dos ondas lo cual sugiere la existencia en las preparaciones de PAL de un cierto grado de agregación molecular a causa de la presencia del detergente según se ha descrito previamente en la literatura (222).

A continuación vamos a resumir una serie de experimentos de inmunodifusión, llevados a cabo según la técnica de Ouchterlony (222), en los que empleamos los dos antisueros citados anteriormente, anti-PAL y anti-E, y los siguientes extractos enzimáticos:

- a) enzima E purificado, obtenido según se describió en nuestra Memoria de Tesina (232).
- b) enzima PAL purificado, según el método expuesto en el apartado 3.1.5.
- c) enzima E convertido en C (forma activa de la amidasa de neumococo), según se describe en el apartado 2.13.
- d) crudo de células de neumococo tipo salvaje R36A
- e) crudo de células del mutante cw-1
- f) crudo de células EA

Estos tres últimos crudos se obtienen según el método descrito en el apartado 2.12.

Combinando estas preparaciones de antígenos y anticuerpos según se describe en las figuras 37 a 40 obtuvimos los siguientes resultados:

- 1) El anti-PAL no da banda de precipitación frente al enzima E purificado (figura 37); asimismo el anti-E tampoco da banda frente a la PAL pura (figura 37). Esto demuestra que la PAL no tiene

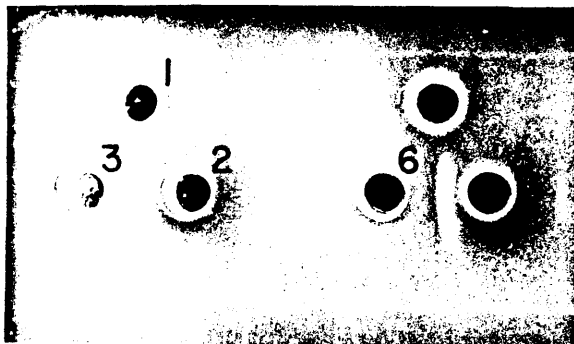


Figura 37.- Placa de inmunodifusión en agarosa siguiendo la técnica de Ouchterlony (222). Pocillo 1: anti-E; pocillos 2 y 5: anti-PAL; pocillo 3: PAL purificada (3 μ g, 675 Unidades); pocillo 4: enzima E purificado; pocillo 6: enzima E convertido en C (ver apartado 2.13).

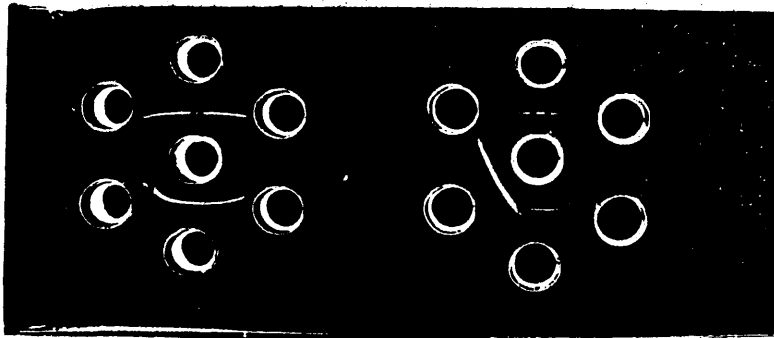


Figura 38.- Placa de inmunodifusión en agarosa siguiendo la técnica de Ouchterlony (222). Pocillo central A: anti-E; pocillo central B: anti-PAL; pocillos 1 y 4: extractos crudos de células EA; pocillo 2: extracto crudo de células cw-1; pocillo 3: paredes purificadas de células R6; pocillo 5: tampón PBS; pocillo 6: extracto crudo de células R6.

comunidad antigénica con el enzima E, que es la forma inactiva de la autolisina de la bacteria huésped.

2) El anti-PAL si da lugar, sin embargo a una banda de precipitación frente al enzima E convertido en la forma C (figura 37). Este resultado nos indica que el anti-PAL reconoce algún determinante antigénico de la autolisina del huésped en su forma activa (enzima C). Es posible que el determinante reconocido esté enmascarado en la forma E y se ponga al descubierto en el proceso de activación que, como ya hemos dicho, en el apartado 2.13 implica la unión de un fragmento de pared celular, con el consiguiente aumento de su peso molecular (95). Para excluir la posibilidad de que las paredes purificadas den lugar a algún artefacto, se comprobó (figura 38) que dichas paredes no formaban banda de precipitación frente al anti-PAL.

3) El anti-PAL da una sola banda de precipitación frente a los extractos crudos obtenidos a partir de células R6 o cw-1 y 2 bandas frente a las células EA (figura 38). Estas bandas forman entre sí una banda continua de precipitación lo cual indica la presencia en las tres estirpes bacterianas de una sustancia con comunidad antigénica. Por su parte el suero anti-E, como se muestra en la misma figura 38, reconoce el enzima E presente en las tres estirpes.

4) Las bandas de precipitación obtenidas entre la estirpe R6 (o cw-1 ó EA) frente al anti-E se cruzan con las bandas de precipitación obtenidas entre R6 (o cw-1 o EA) frente al anti-PAL (figuras 39 y 40). Además la banda obtenida con el anti-E frente al enzima E convertido (es decir frente al enzima C) se cruza con la banda que

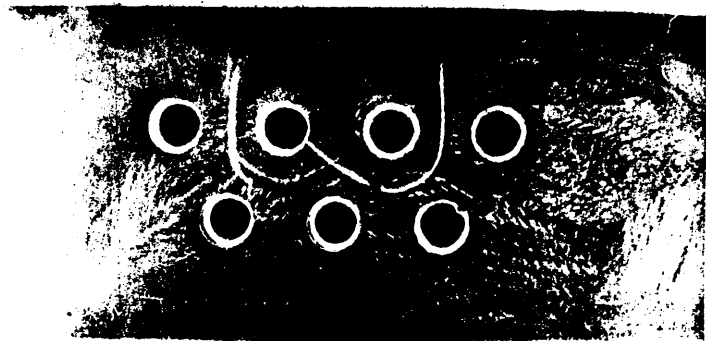


Figura 39.- Placa de inmunodifusión en agarosa siguiendo la técnica de Ouchterlony (222). Pocillos 1 y 5: extracto crudo de células R6; pocillo 2: anti-PAL; pocillo 3: anti-E; pocillos 4 y 7: extracto crudo de células EA; pocillo 6: enzima E convertido en C (ver apartado 2.13).

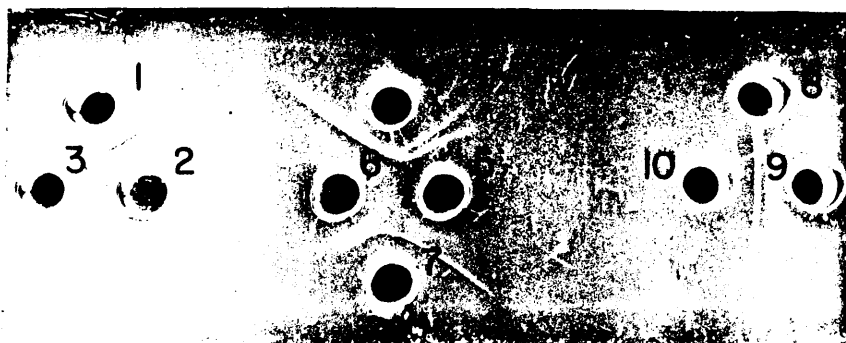


Figura 40.- Placa de inmunodifusión en agarosa siguiendo la técnica de Ouchterlony (222). Pocillos 1, 4 y 8: anti-PAL; pocillos 3, 7 y 10: anti-E; pocillos 5 y 9: extracto crudo de células EA; pocillos 2 y 6: extracto crudo de células R6.

reconoce el anti-PAL frente a ese mismo enzima E convertido (figura 39). Estos resultados tomados en su conjunto muestran que el enzima C es reconocido por ambos antisueros (anti-PAL y anti-E), aunque las bandas de precipitación no son idénticas.

Por otra parte, hemos empleado suero anti-PAL en experimentos de bloqueo enzimático "in vitro" frente a los enzimas C y PAL. En la figura 41 se puede observar que el anti-PAL es capaz de bloquear "in vitro" la degradación de paredes de neumococo catalizada tanto por el enzima C de la bacteria como por la lisina asociada al fago Dp-1 (PAL).

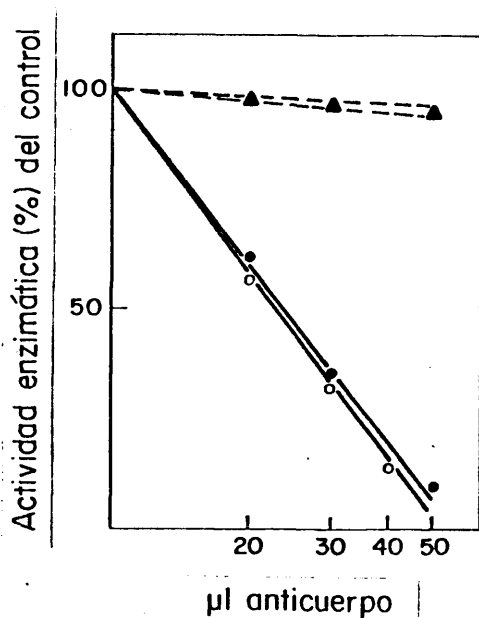


Figura 41.- Efecto del antisuero anti-PAL sobre la actividad enzimática de la amidasa de neumococo y sobre la PAL. 10 µl de PAL purificada (225 Unidades) (○—○) y 10 µl de enzima E convertido en C (ver apartado 2.13) (160 Unidades) (●—●) se incubaron con anti-E o con suero normal de conejo (▲---▲) durante 5 minutos a 0°C; a continuación se añadieron paredes marcadas radiactivamente con ³H-colina bajo las condiciones habituales de ensayo, se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se centrifugaron (10.000xg durante 15 minutos) y se analizó la radiactividad liberada a los sobrenadantes.

3.3. Influencia de la colina en la adsorción del bacteriófago

Dp-1 a *S. pneumoniae*

En este apartado vamos a comenzar el estudio detallado del proceso de adsorción del bacteriófago Dp-1 a *S. pneumoniae*, haciendo especial énfasis en el papel fundamental que juega la colina en esta primera etapa de la infección.

3.3.1. Efecto del aminoalcohol de la pared en la adsorción fágica

Como ya hemos señalado en repetidas ocasiones, los neumococos tienen un requerimiento nutricional por ciertos aminoalcoholes (42, 63) los cuales se utilizan selectivamente para su incorporación en el ácido teicoico de pared (210) y en el ácido lipoteicoico de membrana (antígeno de Forssman) (44). La obtención de neumococos conteniendo distintos aminoalcoholes en los ácidos teicoicos se puede conseguir multiplicando las bacterias en un medio químicamente definido que contenga el componente aminoalcohólico apropiado (ver apartado 2.3.). De esta manera, probamos el efecto de la composición del ácido teicoico en la susceptibilidad bacteriana a la infección por Dp-1. Anteriormente ya se había demostrado la resistencia de los neumococos cultivados en presencia de etanolamina (células EA) a la infección por Dp-1 (33). Como se aprecia en la figura 42, los neumococos cultivados en presencia de etanolamina o N-monometil-etanolamina (células EA o MEA respectivamente) mostraban una reducida capacidad para adsorber fagos incluso cuando se emplearon altas concentraciones de Dp-1 y una prolongada incubación a 37°C. Cuando la colina de la pared se sustituía por la N,N-dimetil-etanolamina (DEA) se conseguía una neutralización de los fagos hasta un 70%, aunque esta inactivación

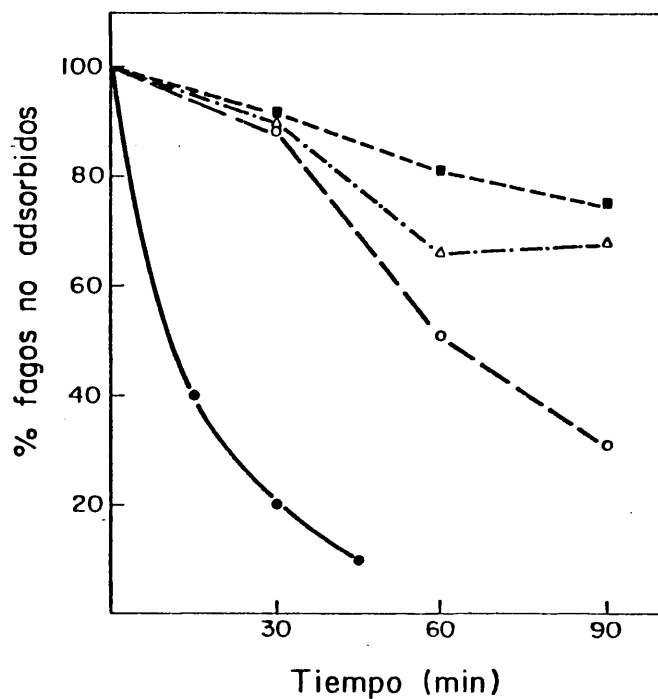


Figura 42.- Efecto del aminoalcohol del ácido teicoico de pared sobre la adsorción del bacteriófago Dp-1. Cultivos de *S. pneumoniae* en fase exponencial de crecimiento (5×10^7 UFC/ml) conteniendo distintos aminoalcoholes en los ácidos teicoicos [etanolamina (■), N-monometiletanolamina (Δ) y N-N-dimetiletanolamina (○) o colina (●)] se incubaron con bacteriófago Dp-1 purificado (MDI=2). A diferentes tiempos se tomaron muestras de los cultivos, se centrifugaron ($10.000 \times g$, durante 10 minutos) y se contaron los fagos libres en los sobrenadantes.

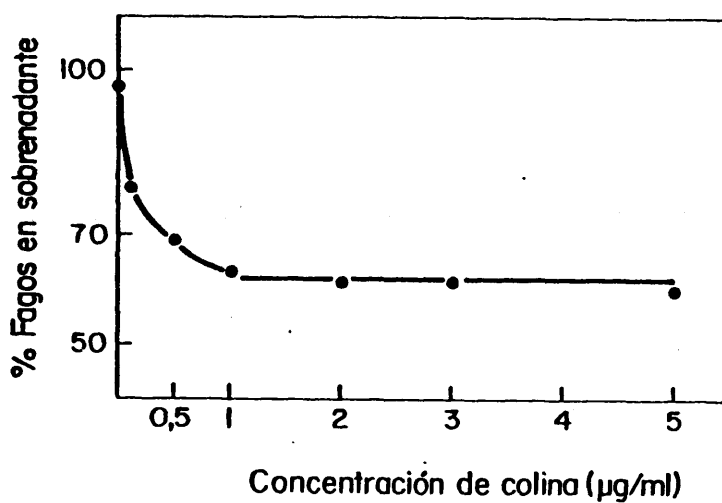


Figura 43.-Adsorción del bacteriófago Dp-1 a células EA pulsadas con diferentes cantidades de colina. Muestras de un cultivo de células EA recibieron diferentes concentraciones de colina, se incubaron a 37°C durante 10 minutos y a continuación se enfriaron a 0°C; bacteriófago Dp-1 purificado se añadió a todas las muestras (MDI=2). Después de 15 minutos de incubación a 0°C, las muestras se centrifugaron a 10.000xg durante 10 minutos, determinándose en los sobrenadantes el título de los fagos no adsorbidos.

era muy lenta (se prolongaba hasta 90 minutos). Este experimento ilustra claramente la importancia del componente aminoalcohólico del ácido teicoico en la adsorción fágica.

En un experimento paralelo se demostró claramente que la capacidad de adsorción del fago Dp-1 por las células EA, que como hemos visto era prácticamente nula, se restablecía rápidamente cuando se añadían al cultivo diferentes concentraciones de colina (figura 43).

3.3.2. Localización topográfica de los sitios de adsorción fágica por microscopia electrónica

Después de poner de manifiesto la importancia de la colina en la adsorción fágica, centramos nuestra atención en la posible visualización de los sitios de unión del bacteriófago Dp-1 a S. pneumoniae aprovechando para ello el requerimiento absoluto que poseen los fagos por este aminoalcohol para que tenga lugar tal adsorción. Para ello nos basamos en un modelo experimental, propuesto anteriormente por Tomasz y colaboradores (63,210), sobre el mecanismo de incorporación y distribución de las moléculas de ácido teicoico de pared de neosíntesis conteniendo colina a células que se habían cultivado previamente en medios con etanolamina.

Un cultivo de células EA (multiplicadas en presencia de etanolamina) recibió una pequeña cantidad (0.08 µg/ml) de colina ("minipulso"). Se ha descrito anteriormente (210), que S. pneumoniae cultivado en presencia de diferentes aminoalcoholes utiliza la colina con preferencia a cualquier otro aminoalcohol.

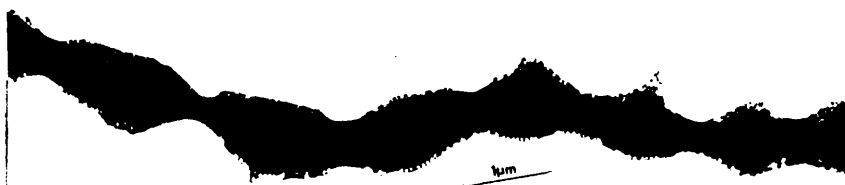


Figura 44.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Un cultivo de neumococos multiplicándose a 37°C en medio conteniendo etanolamina (40 µg de EA/ml), recibió un "minipulso" (0,08 µg/ml) de colina al tiempo 0 del experimento, y se continuó la incubación durante 5 minutos. Una muestra (1 ml) se incubó con bacteriófago Dp-1 purificado (MDI=100) a 0°C durante 45 minutos. A continuación, la muestra se centrifugó y se lavó 3 veces (10.000xg, 10 minutos) con acetato amónico 0,1M, pH 7,0 para su examen al microscopio electrónico, según se describe en el apartado 2.17. Este procedimiento de preparación de muestras para su observación al microscopio electrónico fue el mismo que se siguió en las figuras 45 a 54 (aumentos x18.000).



Figura 45.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Las condiciones de preparación de la muestra se describen en la figura 44. Se puede observar que las partículas fágicas se localizan exclusivamente en la región ecuatorial de las células (aumentos x47.300).

Como consecuencia de esta mayor afinidad por la colina, las células incorporan rápidamente este aminoalcohol y, una vez agotada la pequeña cantidad de colina añadida al medio de cultivo, comienzan a incorporar de nuevo etanolamina en sus ácidos teicoicos, según se ha demostrado anteriormente (63, 210). En nuestras condiciones experimentales, a diferentes tiempos después de la adición de este minipulso de colina, se tomaron muestras del cultivo y se añadió fago Dp-1 a alta multiplicidad de infección (MDI = 100). La mezcla se incubó a 0°C durante 45 minutos, se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos, se lavó tres veces y se preparó, como se describe en el apartado 2.17 para su observación al microscopio electrónico.

Como se puede apreciar en las figuras 44 y 45, cuando el Dp-1 se añadió 5 minutos después de que las células EA recibieran el minipulso de colina, las partículas fágicas se localizan exclusivamente en la zona ecuatorial de las células o en sus proximidades. En las muestras tomadas 45 minutos después de la adición de colina (lo cual equivale, aproximadamente al tiempo de duplicación de la población bacteriana), solo una de cada dos células de la cadena de células EA mostraba fagos adsorbidos; en estas bacterias los fagos se adsorbían en una región localizada entre la zona ecuatorial y los polos de las células (Figuras 46, 47 y 48).

Cuando el Dp-1 se añadía 90 minutos después de que las células EA se hubieran minipulsado con colina (lo que equivale aproximadamente a dos tiempos de generación), los fagos solo se visualizan en las regiones polares de las cadenas celulares (Fi-



Figura 46.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. El procedimiento usado fue similar al descrito en la figura 44, excepto que después del "minipulso" con colina las células se incubaron a 37°C durante 45 minutos, antes de la adsorción del bacteriófago Dp-1. (aumentos x8.500).



Figura 47.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Las condiciones de preparación de la muestra se describen en la figura 46. Se puede apreciar que los fagos se localizan cada dos células con tiguas de neumococo, mientras que las dos células vecinas no mues tran adsorción de fagos (aumentos x29.000).



Figura 48.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Las condiciones de preparación de la muestra se describen en la figura 46. Se puede observar en detalle que la zona de adsorción de los bacteriófagos Dp-1 está comprendida entre la zona de división y el polo de la célula (aumentos x87.000).

guras 49 y 50). Este último resultado concuerda perfectamente con la hipótesis previa (210) de que la rotura de la cadena de células EA parece ocurrir al cabo de 1,5 a 2 tiempos de duplicación después de la adición de colina, lo que sugiere que la separación de las células hijas tendría lugar solo en aquellas bacterias que contuvieran colina en sus extremos. A su vez, este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que una de las funciones fisiológicas de la autolisina de neumococo sería la de actuar al final del ciclo celular en el proceso de separación de las células hijas siempre y cuando la colina estuviera presente en las regiones polares de la célula.

Finalmente, las figuras 51 a 54 presentan el contraste esperado entre dos cultivos controles: en uno de ellos un cultivo de células EA recibió colina a alta concentración (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos (figuras 51 y 52) y en otros las células EA no recibieron colina en ningún momento (figuras 53 y 54). El primer control muestra la totalidad de la superficie celular cubierta de fagos mientras que el segundo presenta una superficie prácticamente libre de fagos.

En la figura 55 se representa de forma esquemática una interpretación de los resultados presentados anteriormente; en ella destaca la especificidad de la colina, presente en el ácido teicoico, para la adsorción del fago Dp-1. Además, los resultados demuestran, que la colina se incorpora en la zona ecuatorial de las células y se desplaza hacia los polos de la célula como ya había sido sugerido previamente en neumococo (63, 210).



Figura 49.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. El procedimiento usado fue similar al descrito en la figura 44, excepto que después del "minipulso" con colina las células se incubaron a 37°C durante 90 minutos, antes de la adsorción del bacteriófago Dp-1 (aumentos x30.300).



Figura 50.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. El procedimiento usado para la preparación de la muestra se describe en la figura 49. Se puede observar que, en este caso, los fagos se adsorben exclusivamente en uno de los polos de la cadena de células (aumentos x30.300).



Figura 51.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Un cultivo de neumococos multiplicándose a 37°C en medio conteniendo etanolamina (40 μg de EA/ml), recibió colina (5 μg /ml) en el medio de cultivo. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se tomó una muestra (1 ml) y se añadió bacteriófago Dp-1 purificado (MDI=100), incubándose a 4°C durante 45 minutos. Después de centrifugar y lavar las muestras (10.000 xg, durante 10 minutos) con acetato amónico 0,1M, pH 7,0 se prepararon para su examen al microscopio electrónico, según se describe en el apartado 2.17. (aumentos x11.000).



Figura 52.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Las condiciones de preparación de la muestra se describen en la figura 51. Se aprecia claramente que los fagos se adsorben a lo largo de toda la superficie celular.(aumentos x55.000).

Aunque "a priori" no podemos excluir la posibilidad de que otros componentes de la pared o de membrana puedan estar implicados en la etapa de adsorción, estos resultados sugieren que la colina presente en el complejo ácido teicoico-peptidoglicano juega un papel básico en el reconocimiento del receptor presente en las estructuras externas de neumococo por parte del fago Dp-1.



Figura 53.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Un cultivo de neumococos multiplicándose a 37°C en medio conteniendo etanolamina (40 µg de EA/ml) se incubó con bacteriófago Dp-1 purificado (MDI=100) durante 15 minutos a 4°C. A continuación, las muestras se trataron como en la figura 44 para su observación al microscopio electrónico (aumentos x11.000).



Figura 54.- Localización por microscopía electrónica de los sitios de adsorción fágica en la superficie de neumococos. Las condiciones de preparación de la muestra se describen en la figura 53. Se puede apreciar la casi total ausencia de fagos adsorbidos a la superficie de la cadena de células EA (aumentos x58.000).

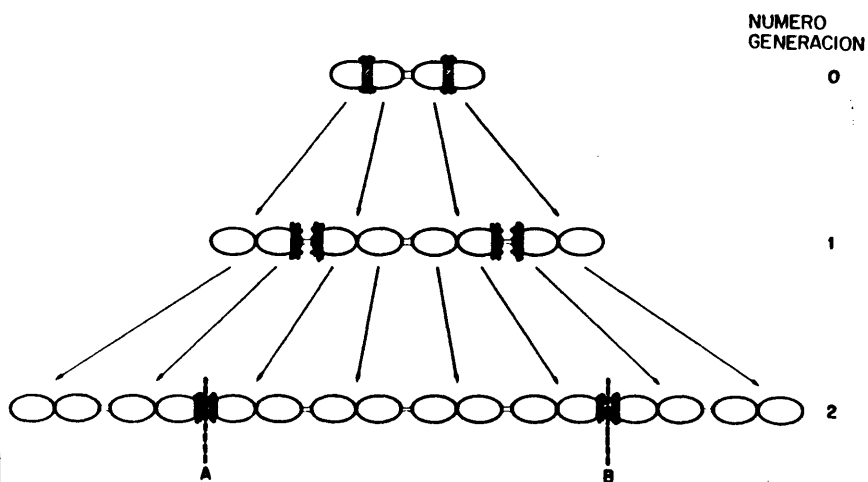


Figura 55.- Representación esquemática de la localización y segregación de los sitios de adsorción fágica (conteniendo colina) durante el crecimiento de neumococos. El esquema representa una interpretación de los experimentos descritos en las figuras 44 a 54. Se puede apreciar el desplazamiento de los receptores del fago Dp-1 a lo largo de las cadenas de células EA. Las zonas rayadas indican los segmentos de pared conteniendo colina; las líneas discontinuas A y B representan los puntos por donde se pueden romper las células EA cuando dichos segmentos de colina alcanzan los polos de las células.

3.4. Caracterización de los receptores de S. pneumoniae implicados en la adsorción del bacteriófago Dp-1.

Los experimentos descritos en el apartado anterior demuestran claramente que los fagos se adsorben a estructuras celulares que contienen colina. El siguiente objetivo experimental de nuestro trabajo lo constituyó la caracterización de los receptores de neumococo responsables de la unión primaria del Dp-1.

3.4.1. Capacidad de adsorción fágica de distintas fracciones subcelulares de S. pneumoniae

El primer paso para identificar los receptores fágicos lo constituye el fraccionamiento de la bacteria en varios de sus compuestos subcelulares con el fin de probar la capacidad de adsorción fágica de estas subfracciones y comprobar la influencia que ejerce la composición del ácido teicoico sobre dicha adsorción.

La tabla 8 muestra que las paredes celulares purificadas eran capaces de adsorber el Dp-1 con la misma eficiencia que los neumococos vivos cultivados en presencia de colina. Asimismo las bacterias muertas por irradiación ultravioleta o por calor retenían la misma capacidad de adsorción que las células vivas. Por el contrario, las bacterias multiplicadas en presencia de etanolamina o las paredes purificadas a partir de estas células EA eran incapaces de adsorber fagos. Asimismo, los protoplastos preparados a partir de células R6 con colina no eran capaces de inactivar al bacteriófago Dp-1. Sin embargo, las membranas obtenidas a partir de estos protoplastos eran capaces de inactivar al Dp-1.

Tabla 8

Capacidad de adsorción fágica de fracciones subcelulares de S. pneumoniae

Células o fracción (a)	Fagos no adsorbidos (b) (%)
Células-colina	20
Células-etanolamina	98
Células-colina inactivadas por UV (10 minutos a 8 cm)	18
Células-colina muertas por calor (56°C, 10 minutos)	22
Células-colina en presencia de sacarosa (25%)	50
Protoplastos	95
Paredes-colina (0,2ml) (c)	14
Paredes-colina (0,02 ml) (c)	26
Paredes-etanolamina (0,1 ml) (c)	100

- (a) Bacterias R6 en fase exponencial de crecimiento a una concentración de 5×10^7 UFC/ml. (o concentraciones similares en equivalentes celulares de paredes o protoplastos) se incubaron con bacteriófago Dp-1 (MDI=0,03) a 0°C durante 20 minutos. A continuación, las mezclas se centrifugaron a 20.000xg durante 10 minutos en frío. Los fagos libres en los sobrenadantes se titularon inmediatamente.
- (b) El 100% se considera el total de fagos añadidos a la mezcla, para conseguir una MDI de 0,03
- (c) 0,1 ml de preparaciones de paredes celulares corresponden aproximadamente a $1,5 \times 10^9$ equivalentes celulares.
Las paredes celulares y los protoplastos de neumococo se prepararon según los métodos descritos en los apartados 2.7 y 2.8.

Esta aparente contradicción puede ser explicada por el hecho de que, según se muestra en la tabla 8, la sacarosa interfiere claramente en el proceso de adsorción fágica incluso cuando se emplearon células vivas.

3.4.2. Adsorción fágica a paredes aisladas

Una vez puesta de manifiesto la capacidad de adsorción fágica de las paredes aisladas de neumococos que habían sido cultivados en presencia de colina, pasamos a estudiar en detalle algunas características de este proceso de adsorción.

La figura 56 demuestra que la adsorción fágica a paredes celulares a 0°C seguía una cinética de primer orden, de manera análoga a la encontrada utilizando células intactas multiplicadas en presencia de colina (figura 42). En ambos casos se ponía de manifiesto que la unión se completaba después de 30 minutos de incubación a 0°C.

Por otra parte, examinamos la capacidad máxima de adsorción de fagos de las paredes celulares purificadas. Para ello se incubó una cantidad fija de paredes con distintas concentraciones de bacteriófago. Como se muestra en la figura 57, cuando las paredes se incubaban con un exceso de fagos a 0°C, un picograma de paredes celulares era capaz de adsorber 2.100 partículas fágicas, lo que corresponde aproximadamente a 380 fagos por célula.

En estos cálculos se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones: se acepta que en bacterias Gram-positivas el peso seco de la pared celular representa el 20% del peso seco total de la célula (138, 139, 233). En las condiciones experimentales

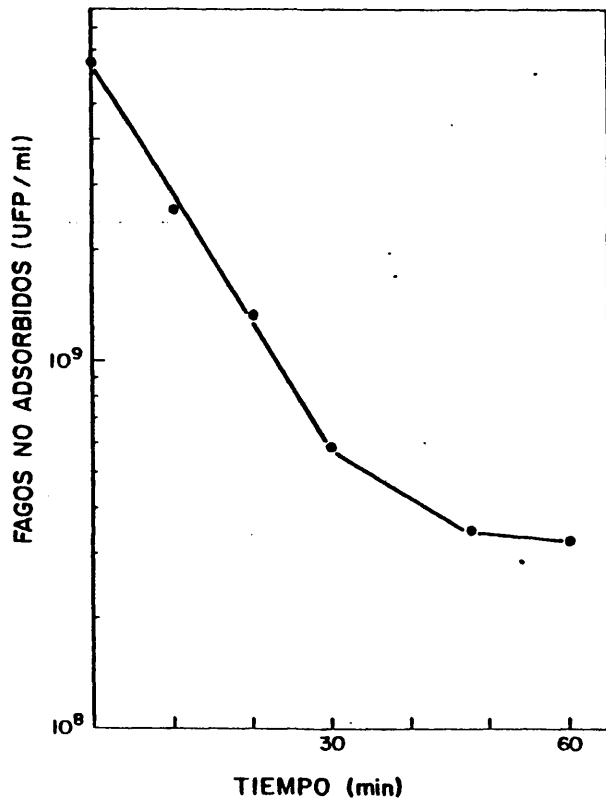


Figura 56. -- Cinética de adsorción del bacteriófago Dp-1 a paredes de neumococo purificada. Paredes de *S. pneumoniae* (2,4 $\mu\text{g/ml}$) se incubaron con bacteriófago Dp-1 ($6,5 \times 10^9$ UFP/ml) a 0°C . A diferentes tiempos se tomaron muestras del cultivo, se centrifugaron en frío (20.000xg durante 10 minutos) y en los sobrenadantes se titularon los fagos no adsorbidos.

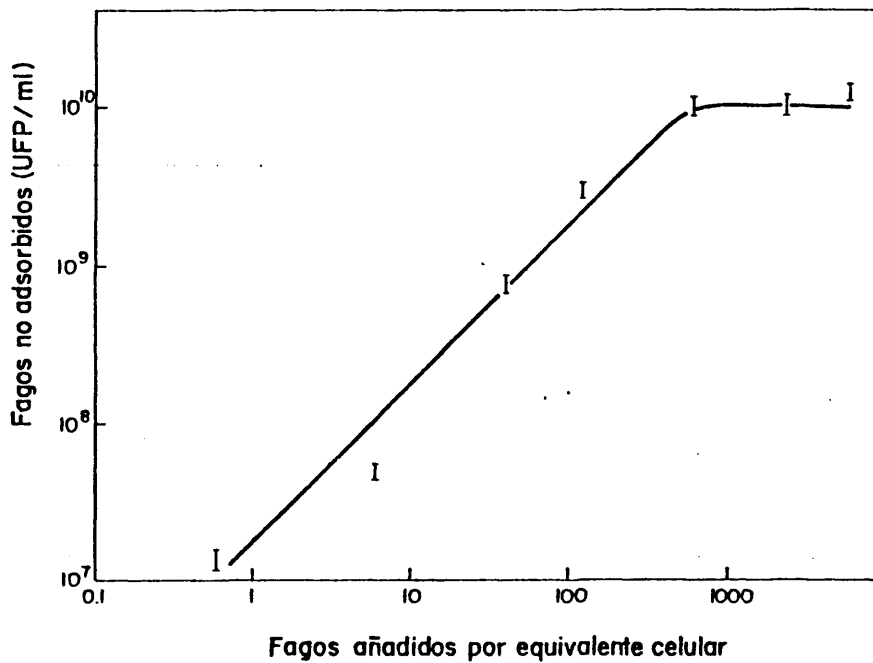


Figura 57.- Capacidad de las paredes purificadas de *S. pneumoniae* para adsorber Dp-1. Cantidades fijas de paredes celulares (4,76 μ g/ml) se incubaron con diferentes cantidades del bacteriófago Dp-1 a 0°C durante 60 minutos. A continuación, las mezclas se centrifugaron a 20.000xg durante 10 minutos en frío y se valoró en los sobrenadantes los fagos no adsorbidos, 1 μ g de paredes celulares corresponde a 5,5x10⁶ equivalentes celulares.

utilizadas en nuestro trabajo se comprobó que:

A 10^{10} células de S. pneumoniae corresponde un peso seco de 9,1 mg.

El 20% del peso seco de estas 10^{10} células corresponde a la pared bacteriana, es decir $1,82 \times 10^3 \mu\text{g}$; por tanto, $1 \mu\text{g}$ de paredés equivale a:

$$\frac{10^{10}}{1,82 \times 10^3} = 5,5 \times 10^6 \text{ equivalentes celulares}$$

Dado que en el experimento descrito en la figura 57, se usaron $4,76 \mu\text{g}$ de paredes, ésto corresponderá a $2,62 \times 10^7$ equivalentes celulares. Estos equivalentes celulares adsorben un máximo de 10^{10} UFP o sea:

$$\frac{10^{10}}{2,62 \times 10^7} \approx 380 \text{ partículas fágicas/equivalente celular}$$

y asimismo la relación :

$$\frac{\text{fagos adsorbidos}}{\text{picogramos de pared}} \text{ será } = \frac{10^{10}}{4,76 \times 10^6} = 2100 \text{ par tículas fágicas/pg de pared}$$

como se había señalado anteriormente.

Las figuras 58 y 59 muestran micrográfías electrónicas en las que se pueden observar las partículas fágicas adsorbidas a las paredes aisladas y purificadas de S. pneumoniae cultivados en presencia de colina.

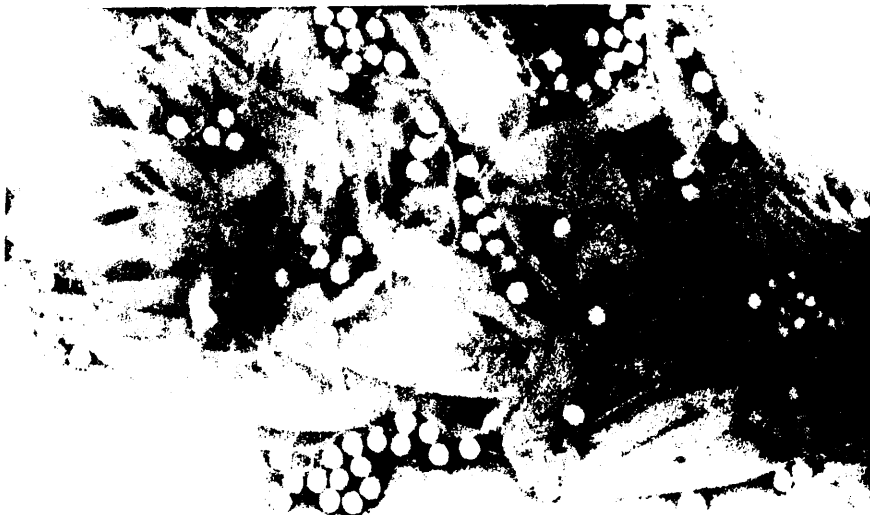


Figura 58.- Adsorción de fago Dp-1 a paredes purificadas de S. pneumoniae. Paredes purificadas de neumococo cultivadas en presencia de colina, se incubaron con bacteriófago Dp-1 (MDI=100) a 0°C durante 30 minutos. Se centrifugaron (12.000xg, 15 minutos) y los precipitados se resuspendieron en acetato amónico 0,1M, pH 7,0 y se prepararon para su observación al microscopio electrónico (aumentos: x68.500).

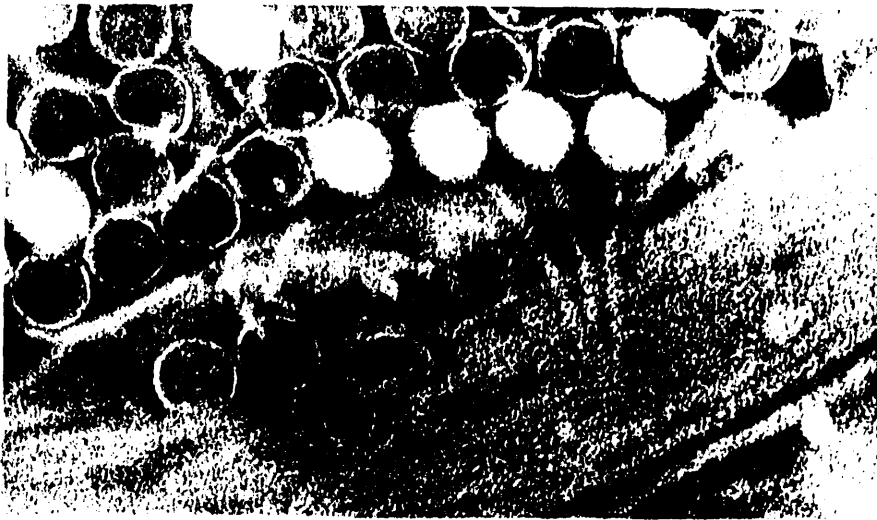


Figura 59.- Adsorción de fago Dp-1 a paredes purificadas de S. pneumoniae. Las muestras se prepararon como se describe en la figura 58. Se puede observar un detalle de las colas de fagos Dp-1 adsorbidas a las paredes de neumococo (aumentos x220.000).

3.4.3. Adsorción fágica a membranas aisladas

Las membranas plasmáticas de neumococo se prepararon a partir de protoplastos de la estirpe salvaje R6 según la técnica descrita en el apartado 2.8. Como se demuestra en la figura 60, las membranas así preparadas eran capaces de adsorber fagos, aunque con menor eficacia que las paredes celulares aisladas, cuando se emplearon concentraciones comparables de equivalentes celulares. Este resultado sugiere que en la membrana plasmática de neumococo pueden existir estructuras que actúan como receptores más débiles, o de tipo secundario, de los fagos. En este sentido conviene recordar que el 15% de la colina que incorpora la bacteria está presente en el ácido lipoteicoico de membrana (LTA).

3.4.4. Ensayos de competición entre paredes intactas y diferentes fracciones subcelulares de S. pneumoniae para la adsorción de Dp-1.

En vista de que en los experimentos "in vitro" llevados a cabo cuando se emplearon tanto paredes como membranas aisladas de neumococo se obtuvieron resultados positivos en lo que se refiere a su capacidad de adsorber fagos, el siguiente objetivo experimental se centró en buscar la subfracción celular o la entidad molecular más pequeña que fuera capaz, asimismo, de adsorber Dp-1. Para ello realizamos pruebas en las cuales se usaron en un mismo ensayo paredes intactas y diferentes subfracciones de pared (o membrana) y se ensayaron sus capacidades para competir con los receptores presentes en paredes intactas, según se detalla en la tabla 9.

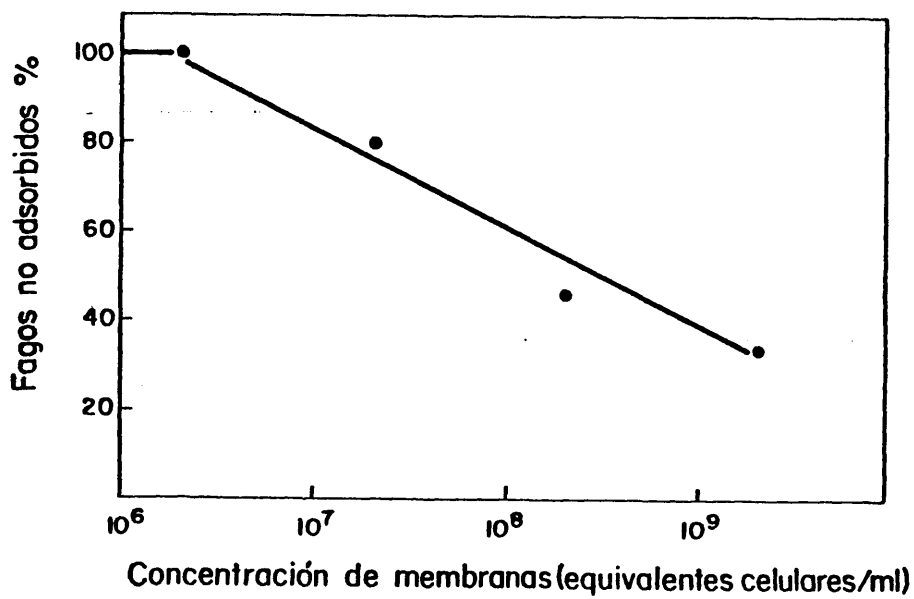


Figura 60.- Adsorción de Dp-1 a membranas purificadas de neumococo. Las membranas se prepararon a partir de protoplastos de la estirpe salvaje R6, según se describe en el apartado 2.8. Diferentes cantidades de membranas celulares se incubaron con fago Dp-1 a 0°C durante 30 minutos. Las mezclas se centrifugaron en frío a 22.000 xg durante 15 minutos y se titularon los fagos libres de los sobrenadantes.

Tabla 9

Ensayos de competición entre paredes celulares de neumococo y varias fracciones solubles de pared celular para la adsorción del bacteriófago Dp-1.

Material competidor (concentración en equivalentes celulares/ml)	Fagos no adsorbidos ^(a) (%)
Ninguno ^(b)	26
Complejo glicano-ácido teicoico (5×10^8)	75
Complejo glicano-ácido teicoico (10^9)	82
Antígeno de Forssman (5×10^8)	80
<u>Fracciones de pared celular</u>	
Acido nitroso (10^9)	23
Acido nitroso (2×10^9)	22
NaOH (10^9)	27
ClH (10^9)	24
Formamida (120°C) (8×10^9)	27

(a) 20 μ l de preparaciones de pared celular (2,4 mg/ml que corresponde a $1,3 \times 10^{10}$ equivalentes celulares/ml) se incubaron con fago Dp-1 (6×10^6 UFP/ml) solo o con fago y las diferentes fracciones indicadas en un volumen total de 1 ml, a 0°C durante 30 minutos. Las mezclas se centrifugaron a 20.000xg durante 10 minutos, titulándose los fagos libres en los sobrenadantes.

(b) Las paredes de neumococo y las fracciones solubles se prepararon a partir de bacterias R6 multiplicadas en presencia de colina, por los métodos descritos en los apartados 2.7 y 2.9.

Tanto las paredes purificadas como las diferentes subfracciones de las mismas y el LTA de membrana fueron preparadas a partir de bacterias cultivadas en presencia de colina, siguiendo las técnicas descritas en los apartados 2.7 y 2.9.

Como se ve en la tabla 9, los ensayos de competición entre las paredes intactas y las distintas fracciones solubles demostraron que solo los complejos ácido teicoico-cadena glicánica de alto peso molecular y el antígeno de Forssman (LTA) se comportaban como fuertes inhibidores de la adsorción fágica a las paredes celulares. Por el contrario, los fragmentos de pared conteniendo colina obtenidos mediante tratamiento con ácido, álcali, ácido nitroso o formamida caliente no inhibían prácticamente la adsorción fágica. La posibilidad de que exista alguna interferencia o artefacto en los ensayos de la tabla 9 como consecuencia de la presencia de restos de los reactivos usados en la obtención de las fracciones solubles debe descartarse pues los resultados presentados en la tabla 10 demuestran que se pueden recuperar fagos viables a partir de todos los ensayos en los cuales se emplearon subfracciones de pared obtenidas por tratamiento con diferentes agentes químicos. Sin embargo, cuando el bacteriófago Dp-1 se incubó a 37°C en presencia de paredes purificadas de neumococo se podía recuperar la mayor parte de las partículas fágicas añadidas a la mezcla de reacción mientras que el número de partículas viables disminuía si se sustituía las paredes por membranas purificadas de neumococo a pesar de la menor afinidad que éstas poseían para adsorber a los fagos, según se señaló en el apartado 3.4.3. En efecto, cuando se incubaron los fagos en presencia de paredes y membranas, el número de fagos viables recuperados era similar al número que se obtenía con

Tabla 10

Inactivación de Dp-1 adsorbido a diferentes fracciones subcelulares

Fracción pared (equivalentes celulares/ml)	Recuperación fagos viables ^(a) (%)
Paredes celulares	66
Paredes celulares + fracción ácido nitroso (10^9)	68
Paredes celulares + fracción ácido nitroso (2×10^9)	77
Paredes celulares + fracción ClH (10^9)	75
Paredes celulares + fracción NaOH (10^9)	73
Paredes celulares + fracción formamida (8×10^9)	75

(a) 20 μ l de preparaciones de pared celular (2,4mg/ml que corresponde a $1,3 \times 10^{10}$ equivalentes celulares/ml) se incubaron con fago Dp-1 (6×10^6 UFP/ml) solo o con fago y las diferentes fracciones indicadas en un volumen total de 1 ml, a 0°C durante 30 minutos. Las mezclas se centrifugaron a 20.000 x g durante 10 minutos, descartandose el sobrenadante y los precipitados fueron resuspendidos en medio $C_{pH}8$, titulándose los fagos viables.

Tabla 11

Inactivación de Dp-1 adsorbido a fracciones subcelulares de S. pneumoniae a 37°C.

Fracción celular	Fagos viables ^(a) (%)
Paredes	85
Membranas	45
Paredes + membranas	78

(a) 2×10^9 equivalentes celulares de paredes o de membranas o de ambas se incubaron a 37°C durante 30 minutos con fago Dp-1 (6×10^6 UFP) en medio C_{pH8} (volumen final 1 ml). A continuación las muestras se pipetearon enérgicamente y se titularon los fagos viables.

paredes solas. (Tabla 11).

3.4.5. Ensayos de competición para la adsorción de Dp-1 entre paredes intactas de *S. pneumoniae* y diferentes moléculas que pueden formar parte de los receptores fágicos.

En otros ensayos de competición similares a los descritos en el apartado anterior, encontramos (figura 61) que la fosforilcolina era capaz de inhibir fuertemente la adsorción del Dp-1 a las paredes purificadas de *S. pneumoniae*, a concentraciones similares a los niveles presentes de fosforilcolina en dichas paredes (19). Por el contrario, otros derivados aminoalcohólicos (p. ejem. fosforiletanolamina) e incluso la propia colina se mostraron ineficaces como competidores en la adsorción fágica.

Una confirmación adicional del importante papel que juega el grupo fosforilcolina en la adsorción del bacteriófago Dp-1 a *S. pneumoniae* viene dada a través de los experimentos de inhibición de la adsorción, "in vivo", cuando se emplearon anticuerpos específicos anti-fosforilcolina y anti-Forssman que aparecen en la figura 62. En estos experimentos se demuestra claramente que los anticuerpos anti-fosforilcolina inhiben eficazmente la unión del fago a la superficie celular de neumococo, mientras que el anticuerpo anti-Forssman no ejerce una inhibición importante.

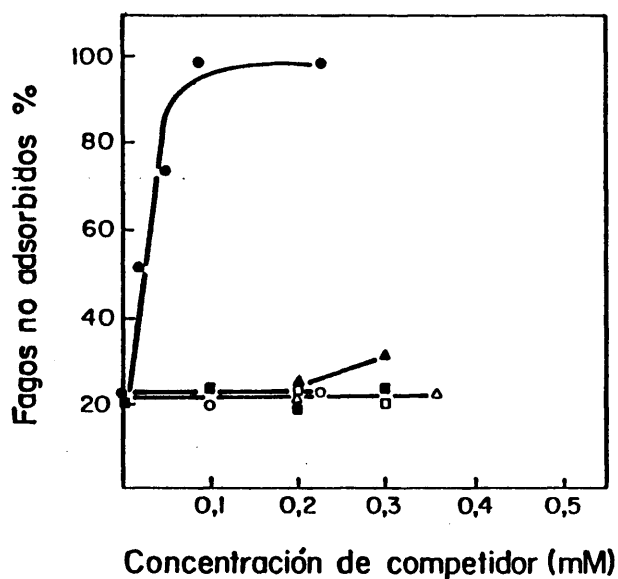


Figura 61.- Inhibición de la adsorción fágica a paredes celulares por varios competidores potenciales. 40 μ l de paredes celulares de neumococo (2,4 mg/ml) se incubaron con fago Dp-1 (8×10^6 UFP/ml) con las cantidades indicadas de competidor a 4°C durante 30 minutos; a continuación, las muestras se centrifugaron a 20.000xg durante 20 minutos y se titularon los fagos libres en los sobrenadantes. De acuerdo con Mosser y Tomasz (9), la concentración de colina en las paredes celulares es el 5% del peso. Este valor corresponde a una concentración de colina de 0,05mM en la cantidad de paredes celulares usadas en este experimento. Los competidores usados fueron; fosforilcolina (●); fosforiletanolamina (○); CDP-colina (▲); CDP-etanolamina (△); colina (■); etanolamina (□). El volumen final fue 1 ml.

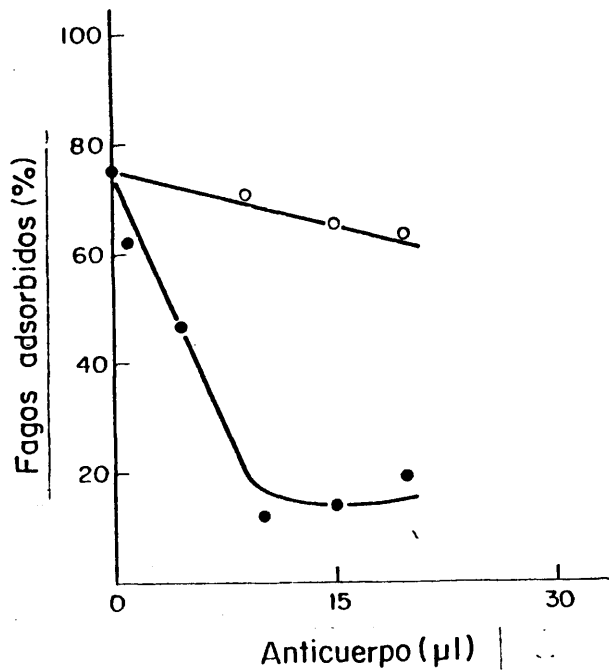


Figura 62.- Inhibición de la adsorción del Dp-1 a células R6 por la proteína de mieloma anti-fosforilcolina (TEPC-15) (●—●) o por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de Forssman (M1/22.25) (○—○). Muestras de células R6 ($2,5 \times 10^7$ UFC/ml) se incubaron con diferentes cantidades de la proteína de mieloma (2 mg de proteína/ml) o con el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de Forssman (0,8 a 1,2 mg de anticuerpo activo/ml). Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 10.000xg durante 15 minutos. A continuación se añadió Dp-1 (10^5 UFP) y las muestras se reincubaron a 4°C durante 30 minutos; al cabo de este tiempo, se centrifugaron a 10.000xg durante 15 minutos, titulándose los fagos libres en los sobrenadantes. Una muestra control con células R6 que no recibió antisuero, dejó en el sobrenadante aproximadamente el 20% de los fagos totales añadidos. Dos controles adicionales conteniendo medio $C_{pH}8$, fago Dp-1 y TEPC-15 o M1/22.25 (pero no células R6) dejaron en los sobrenadantes cerca del 100% de los fagos totales añadidos.

3.5. Estudios fisiológicos sobre la liberación de la progenie fágica en *S. pneumoniae* infectado por el bacteriófago Dp-1.

La última etapa del proceso infectivo es, como ya se ha dicho (apartado 1.4.) la liberación de la progenie fágica al medio de cultivo la cual va precedida de la rotura, al menos parcial, de la pared de la célula bacteriana. Ronda y colaboradores sugirieron (80) que en la estirpe salvaje de *S. pneumoniae*, el fago Dp-1 utilizaba la autolisina del huésped para la liberación de su progenie. El aislamiento y purificación de un nuevo enzima con actividad litica sobre las paredes de neumococo (PAL), detectado en el mutante cw-1, deficiente en autolisina, cuando se infectaba con Dp-1 y que hemos descrito en detalle en el apartado 3.1., planteó el interrogante de cual sería su papel "in vivo", en la célula infectada. Los resultados que exponemos a continuación contribuyen a aclarar esta cuestión.

3.5.1. Papel de la PAL en la liberación del Dp-1

Como ya hemos señalado en el apartado 3.1.3., la PAL se sintetiza cuando se infecta un cultivo de cw-1 con el bacteriófago Dp-1. La actividad de este enzima lítico se estimulaba en presencia de agentes reductores en experimentos "in vitro", como vimos en el apartado 3.1.4. En experimentos "in vivo" como el que se describe en la figura 63 se muestra cómo un cultivo de cw-1 infectado a baja multiplicidad de infección, que normalmente no se lisaba, sufría un claro proceso de lisis por la simple adición de ditiotreitól (10mM) al medio de cultivo. Estos resultados sugieren que la estimulación de la PAL también tenía lugar "in vivo".

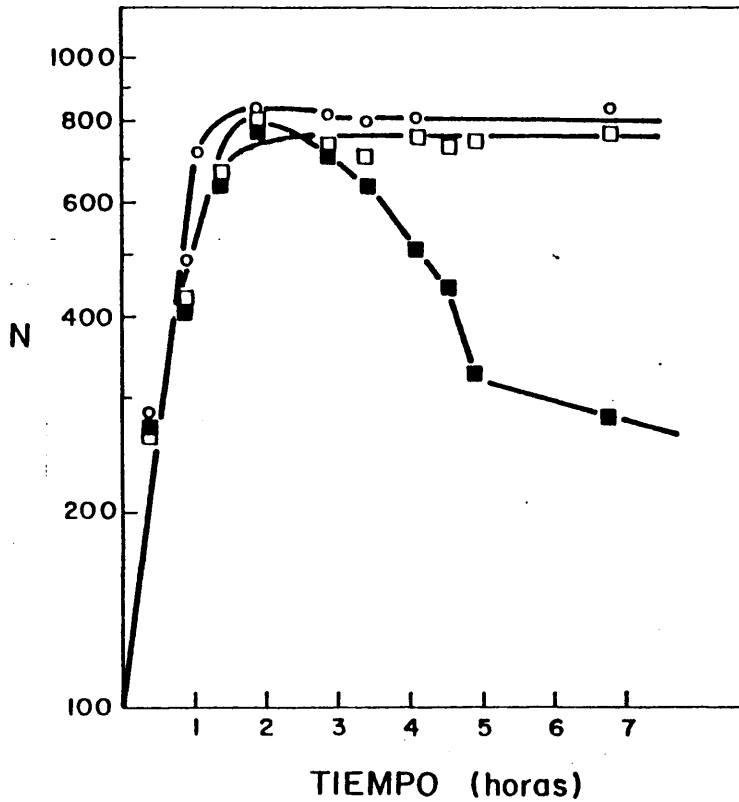


Figura 63.- Lisis inducida por fago Dp-1 a baja MDI de un cultivo de cw-1 en presencia de ditioneitol (DTT). Un cultivo de cw-1 se multiplicó en medio C+Y hasta una concentración celular de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml. Una parte del cultivo (20 ml) se infectó con Dp-1 a baja multiplicidad de infección (MDI=1/15) y se dividió en dos alícuotas, una (■—■) recibió 10mM de DTT (concentración final) y la otra no recibió nada (□—□). Un cultivo control recibió solo 10mM de DTT pero no se añadió fago (○—○).

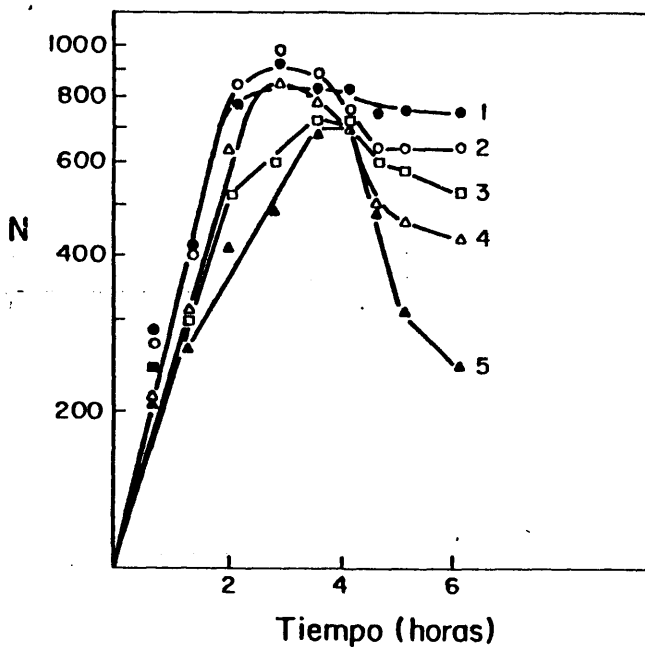


Figura 64.- Lisis inducida por fago Dp-1 a la baja MDI en células mutantes cw-1 tratadas con PAL. Un cultivo de cw-1 se multiplicó en medio C+Y hasta una concentración celular de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml. Una fracción del cultivo se trató con PAL purificada ($8 \mu\text{l}$, 180 Unidades) y a continuación se infectó con Dp-1 a baja MDI (1/50) y se subdividió en tres partes: una recibió cardioplipina ($100 \mu\text{g/ml}$; tubo 3); otra no recibió nada (tubo 4) y la tercera recibió 10mM de DTT (tubo 5). Otra fracción del cultivo no se trató con PAL pero se infectó con Dp-1 (MDI=1/50) y se subdividió en dos: una no recibió nada (tubo 1) y a otra se le añadió 10mM de DTT (tubo 2). Los cinco cultivos se incubaron a 37°C , siguiéndose la multiplicación y la lisis por nefelometría.

Una clara demostración de la participación de la PAL en el proceso de lisis de cw-1 infectada con Dp-1 se puede deducir del experimento esquematizado en la figura 64. En ella se puede apreciar que cuando la bacteria mutante fue fenotípicamente "curada" con el enzima PAL siguiendo un método similar al descrito previamente para la "curación fenotípica" de cw-1 con la autolisina de neumococo (94), un cultivo infectado a baja MDI se lisaba, a diferencia de lo que sucedía con un cultivo similar que no había sido previamente "curado". Además esta lisis podía inhibirse gradualmente por la adición al medio de cultivo de diferentes concentraciones de cardiolipina que, como vimos en el apartado 3.1.7.6. es, en condiciones "in vitro", un poderoso inhibidor de la actividad de la PAL.

Aún más, la PAL no es sólo capaz de provocar la lisis de un cultivo de cw-1 infectado a baja multiplicidad de infección, sino que puede, asimismo, ejercer su actividad lítica en ausencia de fago. Así, cuando el mutante cw-1 no infectado, fue fenotípicamente "curado" con la PAL estas células sufrieron un proceso de lisis en la fase estacionaria de cultivo, similar al de la estirpe salvaje R6 y en claro contraste con lo que sucede en las células cw-1 que no habían sido tratadas con la PAL, como se ve en el experimento descrito en la figura 65.

Otra prueba adicional sobre la participación de la PAL en el mecanismo de lisis viene dada por el uso en experimentos "in vivo" del antisuero preparado frente a la PAL (ver apartado 2.20). Como se muestra en la figura 66 el suero anti-PAL es capaz

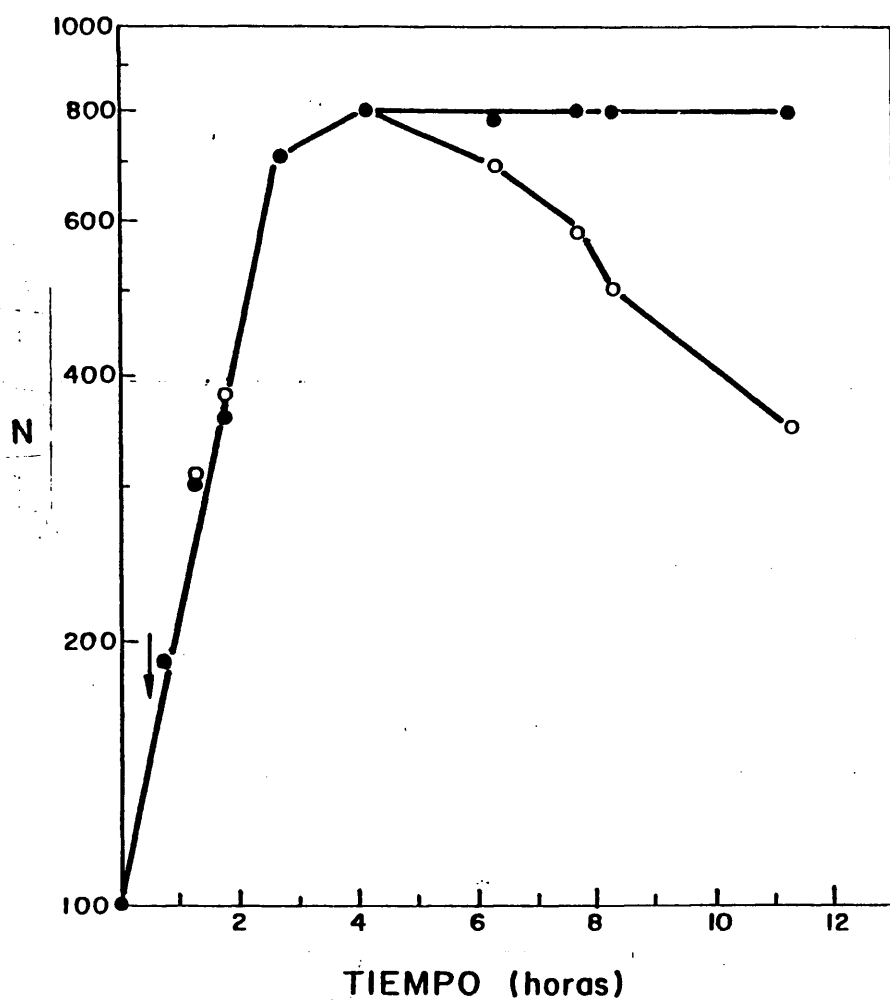


Figura 65.- Lisis en la fase estacionaria de un cultivo de cw-1 tratado con PAL. Un cultivo de cw-1 ($2,5 \times 10^7$ UFC/ml) se trató con PAL (50 μ l de enzima purificado, 1.125 Unidades) (○—○) y se incubó a 37°C. Un cultivo control (●—●) no recibió PAL. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría.

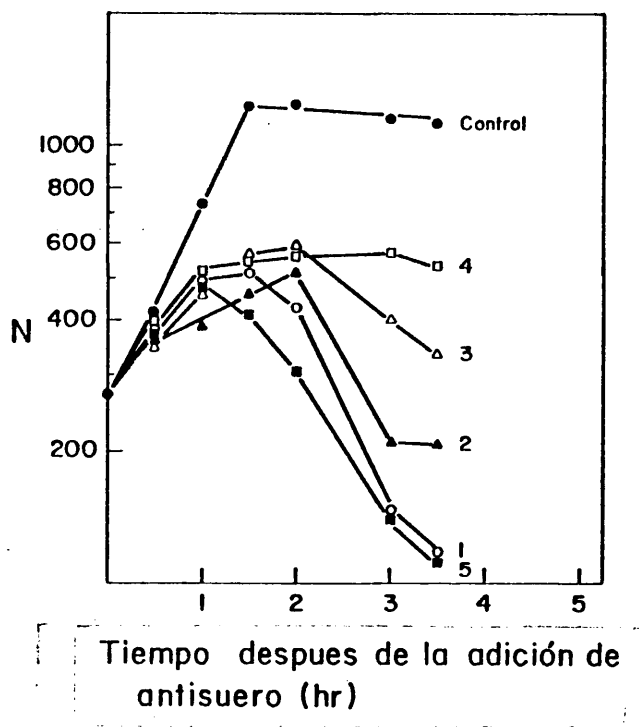


Figura 66.- Efecto protector de la lisis de un cultivo de cv-1 infectado con Dp-1 por el antisuero anti-PAL. Un cultivo de cv-1 se infectó con Dp-1 (MDI=5) a una concentración de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml y se continuó la incubación a 37°C durante 25 minutos. El cultivo se centrifugó (8.000xg, 10 minutos), se resuspendió en medio C+) y se distribuyó en varios tubos: 1, no recibió ningún suero; 2, 10 μ l/ml de anti-PAL; 3, 30 μ l/ml de anti-PAL; 4, 50 μ l/ml de anti-PAL; 5, 30 μ l/ml de anti-E. Un cultivo control no recibió Dp-1 ni antisuero. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría.

de inhibir la lisis de un cultivo de cw-1 infectado con Dp-1 a alta multiplicidad de infección, mientras que el antisuero anti-E no ejercía protección alguna. En un experimento análogo al anterior pero llevado a cabo sobre la estirpe salvaje R6 infectada con el mismo bacteriófago a alta MDI, se comprobó (figura 67) que el anti-PAL no era capaz de bloquear totalmente la lisis por el fago, aunque era notoria la inhibición parcial en la lisis de dicho cultivo. Este resultado sugiere que en la infección de R6 por Dp-1 funcionarían dos enzimas líticas: la propia autolisina del huésped y la PAL inducida en el momento de la infección fágica. El anti-PAL añadido al cultivo bloquearía específicamente este último enzima lítico, pero afectaría sólo parcialmente a la autolisina del huésped (Figura 67) con lo que el resultado final sería la inhibición parcial de la lisis observada experimentalmente.

3.5.2. Papel de la pared conteniendo colina en la liberación del Dp-1

La importancia de los residuos de colina del ácido teicoico para que se lleve a término un ciclo infectivo en cultivos de neumococo infectado con el bacteriófago Dp-1 ha sido sugerida previamente (103). Como hemos visto en los apartados 3.3. y 3.4 la presencia de colina en la pared celular de neumococo es condición imprescindible para que el bacteriófago Dp-1 se pueda adsorber a su correspondiente receptor.

Los experimentos que vamos a describir a continuación indican claramente que la presencia de residuos de colina en la

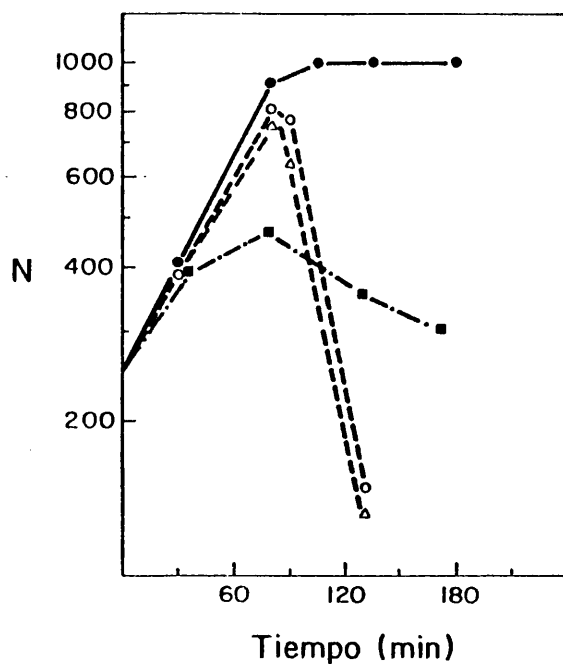


Figura 67.- Efecto protector de la lisis de un cultivo de R6 infectado con Dp-1 por el antisuero anti-PAL. Un cultivo de R6 se infectó con Dp-1 (MDI=5) a una concentración de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml y se continuó la incubación a 37°C durante 25 minutos. El cultivo se centrifugó ($8.000 \times g$, 10 minutos), se resuspendió en medio $\text{C}_{\text{pH}8}$ y se distribuyó en varios tubos al tiempo 0: no recibió ningún suero (○ - - ○); $50 \mu\text{l/ml}$ de anti-PAL (■ - · - ■); $30 \mu\text{l}$ de suero normal de conejo (△ - - △). Un cultivo control no recibió Dp-1 ni antisuero. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría.

pared celular de neumococo constituye, asimismo, un requerimiento esencial para que tenga lugar la liberación de la progenie fágica en S. pneumoniae infectado con Dp-1.

El diseño experimental básico consistió en añadir a un cultivo de células EA que se encontraba en la mitad de la fase exponencial de multiplicación en medio C_{den} -etanolamina, un "mini-pulso" de colina (0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$) junto con fago Dp-1 a una alta multiplicidad de infección (MDI = 5). Tales cultivos, como demostramos en el apartado 3.3.2. comienzan inmediatamente a utilizar la colina para la biosíntesis de sus ácidos teicoicos, y estos polímeros conteniendo colina aparecen también inmediatamente en la zona ecuatorial de crecimiento de las células, permitiendo así la adsorción fágica. Después de 20 minutos de incubación a 37°C el cultivo se enfrió a 4°C y se añadió antisuero anti-Dp-1 durante 10 minutos. A continuación el cultivo se dividió en dos, se centrifugó (8000 x g, 10 minutos) y se resuspendió en medio conteniendo etanolamina (C_{den} -EA) o colina (C_{PH} 8). La incubación se continuó durante 3 horas a 37°C y se tomaron muestras a diferentes tiempos en las que se tituló el fago liberado al sobrenadante. Asimismo, se siguió la multiplicación o la lisis del cultivo por nefelometría. Como muestra la figura 68, tales cultivos infectados y resuspendidos en C_{den} -EA liberaban fagos con una cinética aparentemente normal aunque con una baja productividad aun cuando no se ponía de manifiesto la lisis del cultivo.

Estos resultados indican que los fagos se han multiplicado en el interior de la cadena de células EA pero solo han si-

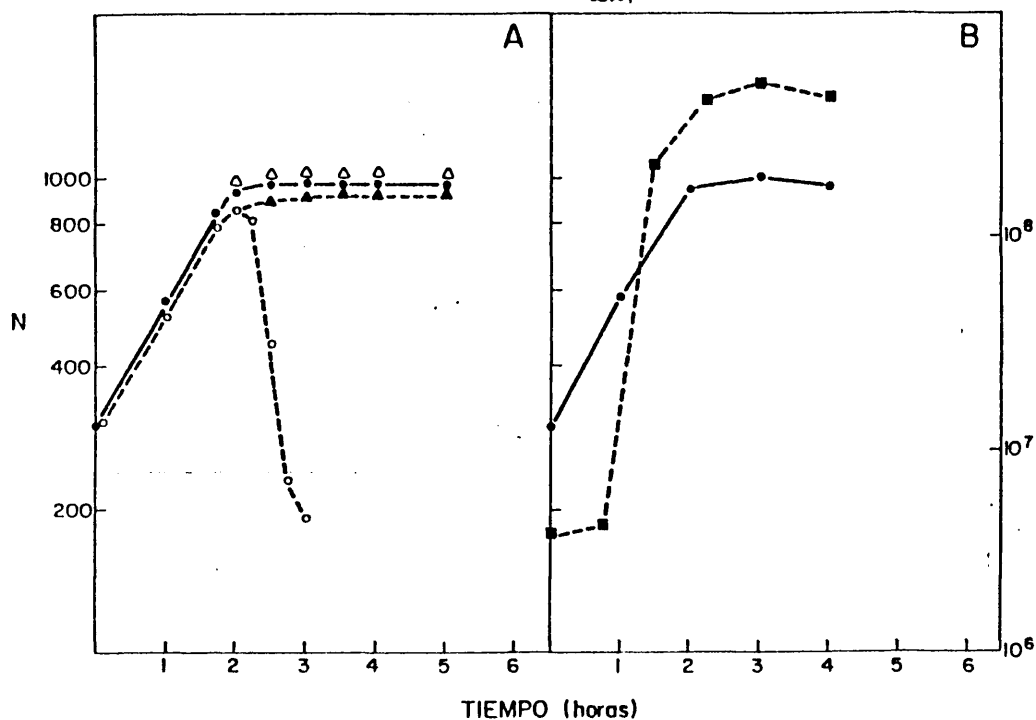


Figura 68.-Respuesta lítica de células EA infectadas con Dp-1 en presencia de diferentes cantidades de colina en el medio de cultivo. Un cultivo de células EA en fase exponencial de crecimiento (40 μg de etanolamina por ml) recibió un "minipulso" de colina (0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 5 minutos más tarde se añadió Dp-1 purificado (MDI=5). La incubación se continuó a 37°C durante 20 minutos. En este momento el cultivo se enfrió rápidamente a 4°C añadiéndose anti-Dp-1 durante 10 minutos. La muestra se dividió en dos porciones, se centrifugó y se lavó (10.000xg, 10 minutos) a 4°C, resuspendiéndose en medio conteniendo etanolamina (●), o en el mismo medio conteniendo 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colina (○). Asimismo, se muestran cultivos controles no infectados, multiplicados en medio con etanolamina y resuspendidos en presencia (Δ) o en ausencia (▲) de colina. La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría (panel A). El panel B muestra la siguiente fase del experimento. A distintos tiempos se tomaron muestras de los cultivos infectados que habían sido resuspendidos en medio conteniendo etanolamina (● del panel A y B). Muestras de este cultivo se centrifugaron (10.000xg durante 10 minutos) a diferentes tiempos después del "minipulso" de colina y en los sobrenadantes se titularon los fagos liberados (■).

do capaces de liberarse al medio de cultivo en aquellas células que poseen, al menos parcialmente, residuos de colina en los ácidos teicoicos de su pared celular. En efecto, en un experimento relacionado con el anterior, un cultivo de neumococo de la estirpe salvaje R6 se marcó radiactivamente con ^3H -colina de manera similar a la descrita en el apartado 2.10. La bacteria se diluyó 200 veces en medio fresco conteniendo etanolamina ($\text{C}_{\text{den}}\text{-EA}$) en vez de colina y se dejó multiplicar el cultivo durante 5 generaciones. La adición de desoxicolato a este cultivo no produjo un descenso apreciable de turbidimetría, al contrario de lo que sucedía cuando el detergente se añadió inmediatamente después de la adición de colina (tabla 12). Sin embargo, toda la radiactividad se solubilizó cuando el cultivo se trató con el detergente (un total de 2.500 cpm por mililitro de cultivo). El marcaje radiactivo procedía, presumiblemente, de la pequeña fracción de población bacteriana (aproximadamente 1-2% del total) que había heredado los segmentos de superficie que contenían colina de la bacteria parental.

En la figura 69 se muestra un claro ejemplo de "rescate" de fagos intracelulares a partir de células multiplicadas en presencia de etanolamina. El diseño experimental fue muy similar al de la figura 68, siguiéndose la multiplicación celular o la lisis del cultivo por nefelometría y titulándose los fagos liberados al medio de cultivo. Se puede observar en la citada figura 69 que el número de partículas fágicas detectables en el sobrenadante de cultivos de células EA manipuladas con colina podía aumentarse a casi el doble si se añadía un segundo minipulso de

Tabla 12

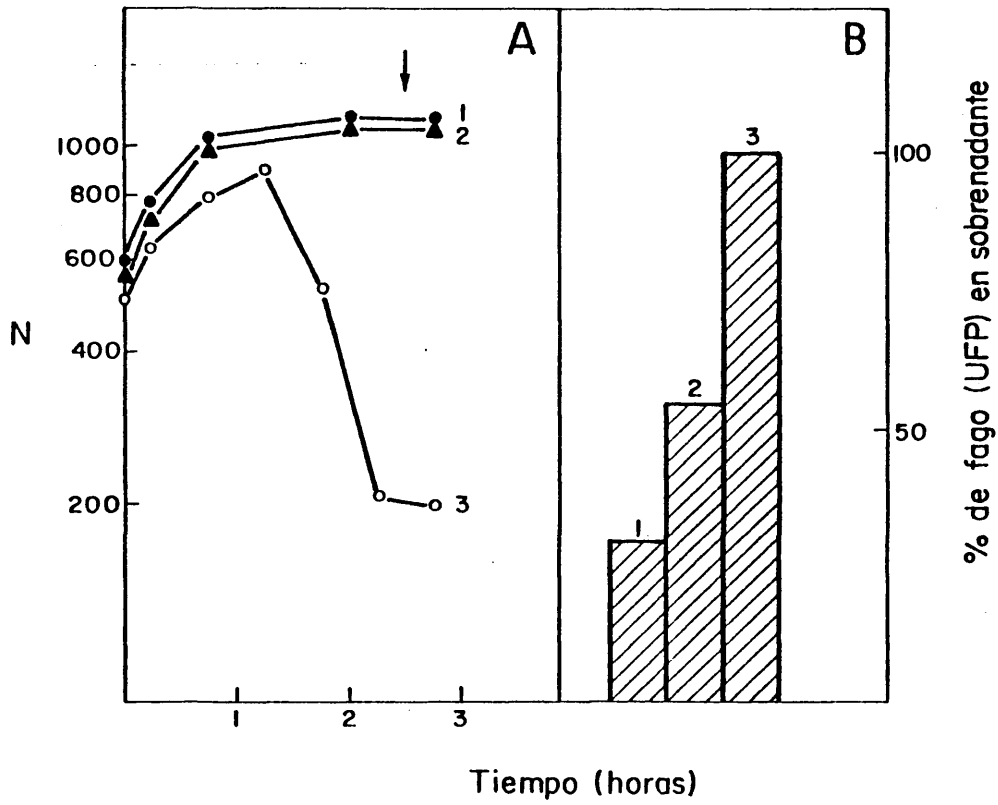
Efecto de la incorporación de ^3H -colina sobre la sensibilidad a la lisis de S. pneumoniae cultivados en $C_{\text{den}}\text{-EA}$.

Condiciones experimentales	Lisis inducida por detergente(%)	cpm liberadas en el sobrenadante(%)
Células EA + ^3H -colina(5 minutos)	100	2.600 (85-95)
Células EA + ^3H -colina(5 minutos) y posteriormente incubadas durante 5 generaciones en $C_{\text{den}}\text{-EA}$	0	2.500 (85-95)

Un cultivo de S. pneumoniae multiplicado en medio $C_{\text{den}}\text{-EA}$ recibió un "minipulso" de ^3H -colina ($0,08\mu\text{g/ml}$, $0,002\mu\text{Ci/ml}$), continuándose la incubación a 37°C durante los tiempos indicados. Muestras del cultivo se trataron con DOC, midiéndose la lisis por nefelometría y la radiactividad se determinó en el sobrenadante de las muestras previamente centrifugadas ($10.000\times\text{g}$, 15 minutos).

223 bis

Figura 69.- Rescate de fagos intracelulares a partir de células EA infectadas con Dp-1. Un cultivo de células EA en fase exponencial de crecimiento fue "minipulsado" con colina ($0,08 \mu\text{g/ml}$); 5 minutos más tarde se añadió bacteriófago Dp-1 a una MDI de 5. La incubación se continuó a 37°C durante 20 minutos. A continuación, el cultivo se enfrió rápidamente, se centrifugó (10.000xg durante 10 minutos) y se resuspendió en medio fresco conteniendo etanolamina. Este cultivo se incubó a 37°C durante 2 horas más (aproximadamente 2 tiempos de duplicación). El cultivo se enfrió a 4°C , se centrifugó, se lavó 2 veces (10.000xg durante 10 minutos) y se resuspendió en medio precalentado conteniendo etanolamina. El número de fagos libres en el sobrenadante bajo estas condiciones (tiempo 0), fue $2,7 \times 10^7$ UFP/ml. El cultivo se dividió en tres partes: (1) no recibió nada (\bullet); (2) recibió un segundo "minipulso" ($0,08 \mu\text{g/ml}$) (\blacktriangle) de colina y (3) recibió $5 \mu\text{g/ml}$ de colina (\circ). La multiplicación y la lisis se siguieron por nefelometría (panel A). El panel B muestra los títulos de los fagos extracelulares ensayados en las tres muestras después de 2,5 horas de incubación a 37°C (ver flecha en panel A). El 100% corresponde a $2,2 \times 10^9$ UFP/ml.



colina a tales cultivos hacia el final del período de incubación (ver curva 2, barra 2). Aún en estas circunstancias no era posible sin embargo poner de manifiesto una apreciable lisis del cultivo. No obstante, la adición de una mayor cantidad de colina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) al cultivo doblemente pulsado provocó un claro "rescate" de fagos intracelulares como se aprecia por la liberación de los isómeros al sobrenadante que iba acompañada de la lisis total del cultivo bacteriano infectado.

Estos resultados aparecen claramente relacionados con los descritos en la tabla 7 (apartado 3.1.9.). Los experimentos se llevaron a cabo "in vitro" empleando el enzima PAL electroforéticamente pura y como sustrato paredes purificadas a partir de células R6 o EA de S. pneumoniae.

De los resultados mostrados en la tabla 7, se puede concluir que la actividad del enzima PAL "in vitro" depende claramente de la presencia de residuos de colina libre en las paredes de neumococo ya que: i) cuando el sustrato contenía ^{14}C -etanolina en lugar de colina o ii) cuando las paredes contenían colina en su ácido teicoico pero habían sido previamente tratadas con anticuerpos anti-fosforilcolina, que bloquean específicamente estos residuos, las paredes no eran degradadas por el enzima. Un comportamiento similar ha sido descrito anteriormente (33), y se muestra asimismo en la tabla 7, para la autolisina de S.pneumoniae.

El paralelismo entre estos resultados "in vitro" y los descritos anteriormente en este mismo apartado será comentado en la Discusión de esta Memoria.

4. DISCUSSION

Como hemos señalado anteriormente, los objetivos fundamentales de nuestro trabajo se centraban en el estudio del papel que jugaban las mureín-hidrolasas de neumococo en una serie de importantes fenómenos biológicos, en particular en lo que se refiere al proceso de liberación fágica, así como en esclarecer la naturaleza química de los receptores fágicos de S. pneumoniae.

Siguiendo este planteamiento inicial, en este apartado vamos a considerar secuencialmente las dos etapas del proceso de infección fágica de las cuales nos hemos ocupado en nuestro trabajo.

4.1. Adsorción del bacteriófago Dp-1 a S. pneumoniae

Previamente se ha demostrado que la presencia de ácido teicoico conteniendo colina es esencial para que tenga lugar un ciclo lítico en neumococos infectados con el bacteriófago Dp-1, ya que la sustitución biosintética de los residuos de colina por el análogo estructural etanolamina convierte a la bacteria en resistente a la infección fágica (103). Hasta ese momento, sin embargo, no aparecía claro si tal requerimiento por la colina estaba relacionado exclusivamente con los receptores del fago o tenía que ver con algún fenómeno más complejo tal como la posible necesidad de un sistema autolítico activo del huésped para la entrada del fago, pues los residuos de colina en el ácido teicoico se sabe que desempeñan múltiples funciones reguladoras en el control del sistema autolítico de neumococo (33).

Por otra parte, de los experimentos descritos por McDonnell y colaboradores (103) no se podía concluir si la resis

tencia del neumococo a la infección por Dp-1 se debía a una carencia de adsorción fágica o simplemente a un bloqueo intracelular de la progenie del fago originado por una incapacidad del enzima o enzimas líticos implicados en el proceso de liberación fágica para degradar las paredes que contenían residuos de etanolamina. De este aspecto, en particular, nos ocuparemos en la segunda parte de este apartado.

Limitándonos de momento al proceso de adsorción hemos de señalar que las observaciones descritas a lo largo de esta Memoria apoyan la primera de las opciones señaladas más arriba para explicar la resistencia de los neumococos a la infección fágica, es decir que los residuos de colina en el ácido teicoico de neumococo son componentes esenciales de los receptores del bacteriófago Dp-1.

Esta conclusión se basa en una serie de observaciones entre las que podemos destacar las siguientes: los experimentos de adsorción "in vivo" demostraron (figura 42) que el fago Dp-1 se adsorbía eficazmente a las células que contenían colina en su pared, mientras que la sustitución de este aminoalcohol de la pared por otros análogos estructurales iba disminuyendo progresivamente su capacidad de adsorción fágica. Además, cuando se emplearon neumococos cultivados en presencia de etanolamina no se detectaba adsorción del fago Dp-1 como se demuestra por la observación directa de tales células al microscopio electrónico (figuras 53 y 54) ni por experimentos "in vitro" (tabla 8) empleando células intactas o paredes celulares purificadas de células EA.

Por el contrario, los neumococos vivos multiplicados en medios que contienen colina, así como estas células muertas por calor o por radiación ultravioleta o las paredes purificadas de tales bacterias eran capaces de adsorber Dp-1 (Tabla 8). Además, los complejos solubles glicano-ácido teicoico de pared preparados por hidrólisis enzimática a partir de paredes celulares de bacterias multiplicadas en presencia de colina, podían competir eficazmente con paredes celulares por la adsorción del Dp-1 (Tabla 9). Asimismo, células cultivadas en medios que contienen etanolamina, a las cuales se les añade colina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), incubadas durante un corto período de tiempo, eran capaces de adsorber claramente grandes cantidades del bacteriófago Dp-1 como se demuestra por las observaciones al microscopio electrónico (figuras 51 y 52).

En un intento de profundizar aún más en la estructura del receptor fágico, se realizaron ensayos de competición entre distintas moléculas. Nuestros resultados muestran que la fosforilcolina era un eficaz inhibidor de la adsorción del Dp-1 a las paredes purificadas de neumococo conteniendo colina (Tabla 7). Por el contrario, otros competidores potenciales tales como colina, etanolamina, fosforiletanolamina, CDP-colina, CDP-etanolamina se mostraron ineficaces para competir con tales paredes (figura 61).

El hecho experimental de que una molécula tan simple como la fosforilcolina sea capaz de competir en ensayos de adsorción del fago Dp-1 guarda un estrecho paralelismo con resultados muy recientes obtenidos por otros autores (233) en el sistema del

bacteriófago T5 de E. coli, donde una molécula de trimanósido competía eficazmente en ensayos de adsorción fágica similares a los descritos en la figura 61. Así, para la mayoría de fagos específicos de lipopolisacárido, el receptor consiste en una corta secuencia de azúcares (122). Un constituyente esencial del receptor para el fago T4 en el lipopolisacárido de E. coli B es un residuo terminal de glucosa (234). La unión del fago a tales receptores es asimismo inhibida claramente por ciertos mono y disacáridos (235). Asimismo en Pseudomonas aeruginosa se ha sugerido que la presencia de residuos de galactosamina es fundamental para que el bacteriófago ØPLS27 interactúe con su correspondiente receptor bacteriano (236). Por otra parte, también existen ejemplos en bacterias Gram-positivas donde mutantes gta de B. subtilis, incapaces de glucosilar el ácido teicoico de su pared celular, se vuelven resistentes a la adsorción con el fago Ø29 (163).

Sin embargo, experimentos en los cuales Heller y Braun (233) trataron de hidrolizar el trimanósido por ácido y probar la posible unión del dimanósido no obtuvieron resultados positivos. Estos autores sugieren que esta carencia de competición por parte de tales moléculas se debía a un cambio conformacional que destruía su capacidad para actuar como receptor fágico, ya que incluso el simple calentamiento de trimanósido sin hidrólisis detectable destruía completamente su capacidad para adsorber las partículas fágicas. Esta sugerencia de la alteración de una molécula por un cambio conformacional puede explicar los datos obtenidos por nosotros en los cuales no se demostró actividad inhibi-

dora de la adsorción fágica en los ensayos de competición llevados a cabo entre paredes de neumococo conteniendo colina y diversas fracciones de pared preparadas por tratamiento con ClH, NaOH o formamida caliente (Tabla 9).

Los estudios bioquímicos comparativos realizados con los neumococos multiplicados en presencia de colina o de etanolamina han demostrado que las paredes celulares de estas bacterias poseían unas estructuras primarias muy similares, si no idénticas, entre sí excepto por el hecho de que se diferencian en el componente aminoalcohólico del ácido teicoico (33). Por consiguiente, la drástica diferencia observada entre los neumococos multiplicados en presencia de colina o etanolamina en lo que se refiere a su capacidad de adsorción del fago Dp-1 indica el papel fundamental que los residuos de colina de la superficie de neumococo juegan en la interacción entre el fago Dp-1 y su célula huésped.

Como ha quedado demostrado anteriormente, los neumococos multiplicados en presencia de etanolamina (células EA) son incapaces de adsorber fago Dp-1; sin embargo, la capacidad de adsorción se restaura rápidamente por la simple exposición de las bacterias a una pequeña cantidad ("minipulso") de colina añadida al medio de cultivo. La observación al microscopio electrónico reveló que las partículas fágicas se unían a tales bacterias exclusivamente en la zona ecuatorial, es decir precisamente en el sitio donde, empleando un diseño experimental similar al descrito en nuestros experimentos, se ha demostrado que los ácidos teicoicos de nueva síntesis (conteniendo colina) se incorporan en la su-

perficie celular de neumococo (63).

En los experimentos descritos en el apartado 3.5.2. (figuras 68 y 69) se demuestra claramente que en las células EA manipuladas con colina reaparecen los sitios de adsorción. Más adelante se discutirá como tales receptores son funcionales, en el sentido de que el fago Dp-1 se incorpora y se replica normalmente en la célula.

En estos experimentos se pone claramente de manifiesto que inmediatamente después del minipulso de colina, los bacteriófagos se adsorben exclusivamente en la región ecuatorial de las largas cadenas de las células EA. En una incubación posterior de las bacterias manipuladas con colina y multiplicadas en medio conteniendo etanolamina, los sitios de adsorción se "desplazan" a lo largo de las cadenas de bacterias de idéntica manera al modo conservativo de segregación de la pared celular postulado para esta bacteria (210, 63), tal y como se esquematiza en la figura 55. Estos resultados, tomados en su conjunto, demuestran nuevamente que los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared celular son componentes esenciales de los receptores del bacteriófago Dp-1. Esta afirmación viene apoyada por experimentos realizados "in vivo" con un anticuerpo (TEPC-15) específico frente a los residuos de fosforilcolina (Figura 62). El hecho de que el bloqueo de los residuos de fosforilcolina con este anticuerpo da como resultado una completa inhibición de la adsorción del Dp-1 a células intactas de neumococo cultivadas en presencia de colina, confirma nuestra suposición de que dichos residuos forman parte fundamental del receptor del bacteriófago.

Por otra parte, como se ha señalado anteriormente, la membrana de neumococo contiene alrededor del 15-20% de la colina presente en las estructuras de esta bacteria que se ha sugerido que posee una estructura primaria similar a la del ácido teicoico de la pared (44). La posibilidad de que el ácido lipoteicoico de membrana (antígeno de Forssman) pueda jugar también un papel en la adsorción fágica se desprende de los resultados que aparecen en la figura 60 y en la tabla 9. En efecto, se puede observar que el antígeno de Forssman es un poderoso inhibidor de la adsorción del Dp-1 a las paredes celulares de neumococo (Tabla 9). Asimismo, la capacidad de las membranas plasmáticas de neumococo cultivado en presencia de colina para adsorber Dp-1 (Figura 60) podría deberse, con toda probabilidad, a la presencia del antígeno de Forssman en tales preparaciones. Cuando se utilizó un anticuerpo anti-antígeno de Forssman en experimentos de adsorción de Dp-1 (Figura 62), se pudo observar que tal anticuerpo no ejerció ningún efecto inhibitorio sobre la misma, pues dicho anticuerpo no bloquea los residuos de fosforilcolina. Estos resultados dejan abierta la posibilidad de que en los receptores fágicos de membrana, la fosforilcolina sea nuevamente el componente fundamental de los mismos.

Teniendo en cuenta los resultados discutidos anteriormente junto con los modelos descritos en otros sistemas bacterianos, se puede sugerir que los receptores localizados en la pared celular podrían ser considerados como "receptores primarios" del bacteriófago Dp-1, responsables de la adsorción reversible, es de-

cir del lugar donde se produce la interacción inicial entre el fago y la bacteria, sin que llegue a producirse la inyección del DNA de Dp-1. Esta afirmación viene apoyada asimismo por el hecho de que, en experimentos de adsorción "in vitro" empleando paredes purificadas de neumococo, los fagos podían ser recuperados en su forma activa (Tabla 10). Por el contrario, los experimentos que aparecen en la Tabla 11 muestran que cuando el fago Dp-1 se incubaba a 37°C con membranas se produce una inactivación irreversible del mismo. Estos resultados sugieren que en una segunda etapa del proceso de adsorción existiría un segundo receptor localizado en membrana. Este "receptor secundario" sería el responsable de la adsorción irreversible del fago con la consiguiente inactivación e inyección del DNA dentro de la célula. En cualquier caso, la condición "sine qua non" para que se produzcan ambos procesos es que el ácido teicoico de pared contenga fosforilcolina. Este modelo de adsorción no posee aun los suficientes apoyos experimentales que permitan afirmar que el bacteriófago Dp-1 sigue el mecanismo de infección que hemos postulado. Una alternativa a este modelo sería la sugerencia de que existiera solo un único receptor localizado en pared, pero que, sin embargo, el fago Dp-1 necesitaría de algún componente de membrana (quizás el ácido lipoteicoico) para su adsorción irreversible.

Así, en el caso de bacteriófago T5 de E. coli se ha sugerido recientemente (233) una unión reversible a la polimánosa durante la cual el fago podría desplazarse a lo largo de la superficie celular, mientras que cuando varias fibras de la cola del

fago se unen simultáneamente a un antígeno o del lipopolisacárido se produciría una adsorción irreversible.

De cuanto hemos señalado, cabría esperar que las preparaciones de protoplastos de neumococo fuesen capaces de adsorber Dp-1, al igual que las preparaciones de paredes y de membranas purificadas. Los resultados de la tabla 8 muestran, no obstante, una fuerte disminución en la capacidad de adsorción de tales preparaciones de protoplastos. La explicación más plausible a este comportamiento estaría en la posible interferencia con la adsorción del bacteriófago de la sacarosa presente en el medio hipertónico. Esta conclusión viene apoyada por el hecho de que la simple adición de sacarosa a células no tratadas con autolisina disminuye drásticamente la capacidad de adsorción de tales células (Tabla 8).

Los resultados mostrados en el apartado 3.3. y 3.4 no solo nos han permitido establecer la importancia fundamental de los residuos de colina, tanto para la adsorción reversible como irreversible del fago Dp-1 a neumococo, sino que asimismo nos han servido como diseño experimental para confirmar el modelo de incorporación y distribución de moléculas de ácido teicoico de neosíntesis a las estructuras periféricas previamente postuladas por Tomasz y colaboradores (210, 63).

Previamente, los elegantes estudios de Archibald y colaboradores sobre los receptores del fago SP50 de B. subtilis (138, 139) habían establecido no solo la importancia de los ácidos teicoicos de pared como componentes de tales receptores sino asimismo habían sugerido un mecanismo de incorporación de los polímeros de la pared celular de nueva síntesis en la superficie bacteriana. Estos autores postulaban que en este sistema, el material de re-

ciente síntesis se intercalaba en un gran número de puntos a lo largo de la superficie interna de la pared celular alcanzando la superficie exterior de forma gradual y como consecuencia del recambio de la pared celular. Recientemente, estos autores han sugerido que la incorporación de nuevas moléculas de ácido teicoico en la superficie interna de la pared, bajo condiciones de cultivo de limitación de fosfato, que hacen que los receptores fágicos aparezcan sólo y exclusivamente en la superficie interna, llevaría implícito el que las moléculas de ácido teicoico recién incorporado adoptasen una disposición no radial en la estructura preexistente (237).

Los datos discutidos anteriormente demuestran el papel de los ácidos teicoicos que contienen colina como receptores fágicos de neumococo. Los resultados que aparecen en las figuras 44 a 54 demuestran que los receptores de neosíntesis, a diferencia de lo que sucede en B. subtilis (138), aparecen en la superficie de neumococo de forma accesible al Dp-1 sin que exista un apreciable período de latencia (ver figura 43); asimismo, los receptores de síntesis reciente se localizaban en la zona de crecimiento de la pared celular (es decir, en la zona ecuatorial) y se segregarían a las células hijas de forma conservativa, de acuerdo con el modelo de segregación de los ácidos teicoicos de pared de neumococo previamente sugerido a través de estudios autorradiográficos (210) y con el empleo de un modelo experimental análogo al descrito en nuestro trabajo (63). La conservación de los receptores fágicos es también consistente con la carencia de recambio de pared en neumococo (63).

4.2. Purificación y caracterización de una PAL asociada al bacteriófago Dp-1 y su papel en la liberación de la progenie fágica.

Como ya hemos señalado repetidamente, otro objetivo de nuestro trabajo era estudiar, dentro del proceso de infección de S. pneumoniae por el bacteriófago Dp-1, el mecanismo a través del cual este fago lisa a la célula huésped y se libera al medio de cultivo. Más específicamente, nuestra investigación tenía como punto de partida la observación de dos hechos experimentales, inexplicables a primera vista:

a) la aparente incapacidad del fago Dp-1 para infectar, a bajas multiplicidades de infección, a un mutante de neumococo (cw-1) deficiente en autolisina y b) la lisis completa de los mismos cultivos mutantes cuando se infectaban a una mayor multiplicidad de infección.

El comportamiento del mutante cw-1 contrastaba con el de la estirpe salvaje R6 que se lisaba tanto a alta como a baja multiplicidad de infección.

Como demostramos en el apartado 3.1.2., en los lisados de cw-1 producidos por el fago Dp-1 aparecía una actividad lítica de paredes de neumococo, que no se detectaba ni en los extractos de células no infectadas ni en el fago purificado (Tabla 2). Este hecho apuntaba claramente hacia la intervención de una mureínhidrolasa en el proceso de lisis del mutante cw-1 por el bacteriófago Dp-1. Los intentos llevados a cabo para purificar a homoge-

neidad esta actividad enzimática dieron resultados positivos, aislándose una proteína que denominamos PAL (ver abreviaturas y apartado 3.1.5.).

Esta nueva actividad lítica asociada al fago Dp-1 (PAL) comparte con la autolisina de la estirpe salvaje R6 (N-acetilmuramyl-L-alanyl amidasa) una serie de propiedades entre las que destacaremos las siguientes:

- 1) Ambos enzimas son dependientes de la presencia de colina en la pared (sustrato) para ejercer su actividad litica (ver apartado 3.1.9.).
- 2) Como complemento de la afirmación anterior se observó que las paredes celulares preparadas a partir de neumococos multiplicados en presencia de etanolamina eran completamente resistentes a la acción de la PAL (tabla 7), de manera similar a lo que se ha descrito anteriormente para la amidasa de neumococo (33).
- 3) La actividad de la PAL era inhibida fuertemente por el antígeno de Forssman (figura 32), cosa que también ocurría con la amidasa (95).
- 4) Ambos enzimas eran sensibles a los enzimas proteolíticos (Tabla 6).

Por el contrario, los dos enzimas diferían claramente en otra serie de propiedades, entre las que se pueden destacar las siguientes:

- a) El antisuero preparado frente a la amidasa de neumococo (anti-E) no inhibía la acción enzimática de la PAL (figura 34).

b) La cardiolipina, un fosfolípido que no afectaba la actividad de la amidasa, ejercía una inhibición parcial sobre la PAL (figura 33).

c) La actividad enzimática de la PAL se estimulaba fuertemente en presencia de agentes reductores, mientras la amidasa, ni en su forma purificada ni en extractos crudos presentaba tal efecto estimulador (Figura 30).

d) El peso molecular de la amidasa (forma E) es de 35.000 (95), mientras que el de la PAL es algo más bajo, 31.000 (figura 26).

e) La actividad enzimática de la amidasa muestra una fuerte dependencia del pH del medio (95), una propiedad que no se da en la PAL pues presenta un rango de pH óptimo bastante amplio (figura 27).

f) La forma purificada de la amidasa (forma E) necesita ser incubada en presencia de paredes conteniendo colina (sustrato) a 0°C antes de que se convierta en la forma activa (forma C) de la enzima (59, 95). Este proceso de activación, vía sustrato, aún no bien definido, no es necesario en el caso de la PAL.

g) Los productos de degradación de ambas enzimas son completamente diferentes: utilizando como sustrato paredes de neumococo marcadas radiactivamente con colina tritiada, los fragmentos de pared producidos por la acción de la amidasa se excluyen en una columna de Sephadex G-200, mientras que los fragmentos originados por la acción de la PAL quedan incluidos en el mismo tipo de columna. Por otra parte, hemos seguido un esquema experimental similar al anteriormente descrito, pero utilizando paredes de neutro-

coco marcadas radiactivamente en la cadena peptídica del peptidoglicano (con lisina tritiada). Los resultados que hasta ahora poseemos (todavía preliminares) parecen indicar, asimismo, que los productos de degradación de estas paredes marcadas con lisina tritiada son diferentes para ambas enzimas. Este problema será motivo de trabajos posteriores que posiblemente aclararán el punto de corte de la PAL sobre la pared de neumococo. Estos estudios son muy interesantes por la incidencia que tienen sobre la biosíntesis y degradación del ácido murámico de la pared celular de neumococo, lo que constituye un buen modelo de estudio en bacterias Gram-positivas.

Antes de analizar el papel biológico de la PAL, quizás convenga señalar que el comportamiento de la bacteria mutante cw-1, al ser infectada por el fago Dp-1 a baja MDI, puede relacionarse de una forma directa con la deficiencia en la actividad autolítica que presentan dichas bacterias. Así, el "recubrimiento" de las células antes de la infección, denominado también "curación fenotípica", tanto con autolisina de la bacteria tipo salvaje (94) como con la PAL podía permitir un ciclo fágico productivo (y la lisis eventual del cultivo) a baja MDI (figura 64). Por otra parte, una prueba adicional de la intervención de la PAL en el mecanismo de lisis bacteriana por el fago Dp-1 viene dada por el hecho de que era posible inducir la lisis del cultivo de cw-1 infectado a baja multiplicidad de infección por la simple adición al medio de cultivo de un agente reductor como el ditioneitol (DTT) (figura 63) que estimulaba fuertemente la actividad

enzimática de la PAL "in vitro" (Tabla 3).

La actividad de este nuevo enzima lítico (PAL) se detecta incluso en células cw-1 infectadas por Dp-1 bajo condiciones que suprimen en gran medida (más del 80%) la formación de las partículas fágicas maduras, como es el uso de la fluorodeoxiuridina (FUDR) (Figura 16). La adición al medio de cultivo de un inhibidor de la síntesis de proteínas, como es la estreptomicina, poco tiempo después de la infección, podía también evitar la lisis del cultivo (Figura 15). Esto parece indicar que la PAL es una protefina inducida por el fago Dp-1 que se sintetiza en un estadio temprano del ciclo infectivo. Alternativamente, la supresión de la lisis del cultivo bajo las condiciones citadas anteriormente puede estar relacionada con el fenómeno ampliamente observado, pero no del todo bien conocido, de la supresión de los sistemas autolíticos bacterianos en células tratadas con inhibidores de la biosíntesis de proteínas (88, 226).

Otro aspecto particularmente interesante de este sistema se ilustra con los experimentos en los que la PAL parece reemplazar o imitar alguna de las funciones de la autolisina de la estirpe salvaje de neumococo. Así por ejemplo, las células mutantes cw-1 al ser infectadas por el Dp-1 recuperan rápidamente la sensibilidad a la lisis inducida por detergentes (Figura 14), propiedad, ésta última, muy característica de los neumococos tipo salvaje; además cuando se añade la PAL a un cultivo de cw-1 se lisa en su fase estacionaria (figura 65), en claro paralelismo con el comportamiento de la estirpe salvaje R6 que tiene unos niveles normales

de autolisina (Figura 9).

Las figuras 17 y 18 proporcionan nuevas líneas de evidencia que sugieren que el mecanismo de acción de la PAL requiere condiciones fisiológicas similares a las que se han demostrado previamente para la amidasa de neumococo (92). Así, la infección fágica trae consigo una rápida inhibición de la biosíntesis de la pared celular inmediatamente después de la entrada del fago (figura 17), lo que puede conducir a que los inhibidores potenciales de la actividad de la PAL, actividad que comienza a detectarse inmediatamente después de la infección, sean liberados al medio de cultivo siguiendo un modelo similar al descrito recientemente en la literatura (80) para explicar el mecanismo de acción de la amidasa de neumococo en cultivos tratados con penicilina.

En este mismo sentido hay que señalar que, de forma similar a la situación que se genera en cultivos de neumococo tratados con penicilina (Tómasz A. comunicación personal), la infección por Dp-1 conducía a una rápida sensibilización de la bacteria a la autolisina exógena del huésped, como se demuestra por la conversión de una porción de material de pared celular en una forma extractable por tratamiento con SDS caliente (Figura 18).

Las similitudes existentes entre la PAL y la amidasa de neumococo no solo se limitan a sus propiedades químicas, como hemos señalado anteriormente, sino que, asimismo, se dan situaciones fisiológicas muy similares en la célula huésped durante, o inmediatamente antes de que actúen la PAL o la amidasa sobre la pared de neumococo, como acabamos de señalar.

Por otra parte, el empleo de la PAL purificada nos permitió poner de manifiesto de forma directa la intervención de este enzima en el proceso de liberación de la progenie fágica en el mutante cw-1 en el cual no se ha detectado, en las condiciones experimentales descritas en nuestro trabajo, la presencia de la amidasas de la estirpe salvaje de neumococo en su forma activa. Los hechos experimentales que apoyan esta afirmación se podrían resumir de esta forma:

- a) Los cultivos de cw-1 resistentes a la infección por el fago Dp-1 cuando se infectaban a baja MDI, exhibían una clara lisis si al medio de cultivo se añadía la PAL purificada ("curación fenotípica") (Figura 64), como ya hemos señalado.
- b) Asimismo, como ya se ha dicho, cultivos de cw-1 infectados a baja MDI, se lisaban completamente si poco después de la adición del bacteriófago Dp-1 se añadía al medio DTT a una concentración final de 10mM (figura 63). Este resultado sugiere que la actividad de la PAL "in vivo" es claramente estimulada por los agentes reductores como sucede en los experimentos "in vitro" realizados con este enzima (Tabla 3).
- c) La presencia de un antisuero específico obtenido frente a la PAL inhibió la lisis de los cultivos de cw-1 infectados a alta MDI y tratados en las condiciones experimentales descritas en los apartados anteriores (Figura 66).
- d) De igual forma, la lisis de los cultivos de cw-1 infectados a baja MDI y "curados fenotípicamente" con PAL purificada pudo

ser inhibida con cardiolipina, un fosfolípido que inhibía, en gran medida, la actividad de la PAL en experimentos "in vitro" sobre paredes purificadas de neumococo (figura 64).

Los resultados discutidos anteriormente y aquellos otros previamente descritos en la literatura (80) en los que se postulaba una intervención de la murefn-hidrolasa en la liberación de la progenie de Dp-1 que infectaba a S. pneumoniae de tipo salvaje, nos permiten suponer que una u otra, o ambas hidrolasas son las responsables directas de la liberación al medio de cultivo de la progenie fágica en las distintas estirpes de S. pneumoniae.

De la primera parte de esta Discusión se deduce claramente la importancia fundamental que poseen los residuos de colina del ácido teicoico durante el proceso de adsorción fágica. Aprovechando el diseño experimental descrito en las figuras 44 a 54, nos propusimos estudiar la posible importancia que estos residuos de colina del ácido teicoico podrían ejercer en el proceso de liberación del bacteriófago Dp-1 al medio de cultivo.

En los experimentos que aparecen en las figuras 68 y 69 se demuestra que en ausencia de una lisis detectable del cultivo sólo se produce una liberación parcial de la progenie fágica de neumococos multiplicados en presencia de etanolamina. La interpretación de estos experimentos sería la siguiente: el minipulso inicial de colina hace posible que la mayoría de las bacterias, si no todas, sean infectadas por el fago Dp-1 añadido a alta MDI debido a la disponibilidad de los ácidos teicoicos de pared con-

teniendo colina en la región ecuatorial de las células (figuras 44 y 45) que como hemos discutido en el apartado anterior es un componente esencial de los receptores del fago Dp-1. Sin embargo, después de la entrada de los fagos en la célula huésped, las bacterias vuelven a utilizar la etanolamina presente en el medio de cultivo y, consecuentemente, sintetizan material de pared que como se sabe es resistente a la acción hidrolítica tanto de la autolisina del huésped (33) como de la PAL (Tabla 7). Al final de la incubación en este medio conteniendo etanolamina, las células que llevan los segmentos de material de pared conteniendo la colina del minipulso (y por tanto sensibles a la lisis) deben representar una minoría del total de la población bacteriana (63), según se esquematiza en la figura 55 teniendo en cuenta los resultados de nuestros experimentos de adsorción (figuras 44 a 54) y los descritos anteriormente por Tomasz y colaboradores (210, 63). Lo que probablemente ocurre es que los fagos detectados en los sobrenadantes de estos cultivos se liberan de esta minoría de células que llevan los segmentos de colina, mientras que el resto de los fagos intracelulares quedarían "bloqueados" en las bacterias que contienen exclusivamente etanolamina en sus ácidos teicoicos y que por tanto no se lisarían.

Esta interpretación está apoyada por un experimento de diseño similar al anterior (Tabla 12) en el cual se marcó radiactivamente un cultivo de S. pneumoniae con colina tritiada y una vez eliminada la colina se cultivaron las células en medio conteniendo etanolamina durante más de 20 generaciones. Cuando muestras de este cultivo se trataron con desoxicolato la colina

tritiada se recuperaba, prácticamente en su totalidad, en forma soluble en el sobrenadante sin que por ello se alterase significativamente la turbidez de tales cultivos, ya que las células conteniendo colina solo representarían una porción residual de las largas cadenas de células EA. Probablemente, estas mismas células serían aquellas capaces de liberar la progenie fágica al medio de cultivo.

En efecto, la aplicación a las células infectadas, en experimentos como los descritos en la figura 68, de un segundo "mipulso" de colina provocaría la introducción de material de pared sensible a la lisis en la mayoría de las bacterias infectadas con fago, que no se habían lisado, lo que daría lugar posteriormente a la liberación de la progenie fágica y a la lisis del cultivo, como se demuestra en los experimentos que aparecen en la figura 69.

Estos experimentos representan un auténtico "rescate" de los fagos que permanecían bloqueados en el interior de las células. Asimismo, sugieren que el requerimiento de la colina para la infección del Dp-1 a los neumococos es debido a una función doble de estos residuos aminoalcohólicos: en primer lugar como parte integrante de los receptores del fago Dp-1 y en segundo lugar como ligando o grupo esencial que proporciona una superficie de pared celular sensible a la actividad de las mureínhidrolasas que son aparentemente esenciales para la liberación de las partículas fágicas de las bacterias huésped.

En este sentido, cabe destacar que los ensayos realizados "in vitro" con la PAL (Tabla 7) demuestran claramente el re-

querimiento absoluto que posee este enzima por los residuos de colina del ácido teicoico para ejercer su función hidrolítica ya que en presencia del antisuero TEPC-15 que bloquea específicamente los residuos de colina, las paredes celulares de neumococo quedan totalmente protegidas de la degradación enzimática, protección que desaparece en gran medida al añadir al medio de incubación fosforilcolina. Este comportamiento de la PAL, una vez más, es similar al ya descrito para la murefn-hidrolasa de neumococo (33, 63) como se observa en la misma Tabla 7.

Finalmente, los experimentos de inmunodifusión en agarosa siguiendo la técnica de Ouchterlony (222) demostraron que el antisuero anti-E no reconocía ningún determinante antigénico de la PAL (figura 37); por su parte el anti-PAL tampoco reconocía al enzima E, pero sí daba banda de precipitación (figura 37) con el enzima E convertido a su forma activa (forma C).

Por otro lado, la banda de precipitación que se obtiene empleando el antisuero anti-E frente al enzima E convertido (es decir, la forma C) se cruza con la banda que da este mismo enzima frente al anti-PAL (figura 39). Además, el antisuero anti-PAL daba banda de precipitación frente a extractos obtenidos a partir de células R6, cw-1 o EA no infectadas con Dp-1 donde existían bien la amidasa de neumococo (células R6) o su precursor (células EA) (figura 38).

Con respecto a estos últimos resultados, parece poco probable que el precursor de la amidasa activa (forma E) sea el responsable de la banda de precipitación frente al anti-PAL ya

que el enzima E purificado no forma banda frente a este antisuero (figura 37).

Es concebible, sin embargo, la existencia de una proteína en la célula huésped, precursora de la PAL, presente en todas las estirpes estudiadas de neumococo que sería modificada por algún proceso dependiente de fago (p. ejem. una proteólisis o adición de una nueva proteína), convirtiendo a este hipotético precursor en la forma PAL activa frente a paredes de neumococo. De todas maneras, se requerirán estudios posteriores para aclarar este problema.

En cualquier caso, de estos ensayos inmunológicos se puede concluir que los dos enzimas líticos de paredes de neumococos, C y PAL, son inmunológicamente diferenciables.

Por último, los numerosos experimentos llevados a cabo con preparaciones purificadas del bacteriófago Dp-1 demostraron que no aparecía actividad mureín-hidrolásica detectable, en ensayos de liberación de radiactividad a partir de preparaciones de paredes marcadas con ^3H -colina (Tabla 4). Por consiguiente, la actividad lítica (PAL) no parece ser un componente de las partículas de fago maduras, como se ha descrito en el caso del enzima C de estreptococos (199, 224) o en el del fago Ø6 de Pseudomonas phaseolicola (196). A esta conclusión también se llega a través del análisis comparativo en electroforesis desnaturalizante en presencia de SDS de la PAL purificada y del fago Dp-1 (figura 24), ya que no parece que este enzima forme parte estructural

de la partícula fágica madura como sucede en el caso citado del fago Ø6.

En este caso, la PAL de S. pneumoniae es similar a la mureín-hidrolasa asociada a fago, que se ha descrito en los estreptococos del grupo A infectados con fago A25 (206). Asimismo, una fracción de la lisina asociada al fago C de estreptococos también aparece en los cultivos en forma soluble (205).

Los resultados descritos hasta aquí parecen apuntar hacia el hecho de que el proceso de lisis de la bacteria mutante cw-1 por el fago Dp-1 se lleva a cabo a través de la intervención de una nueva mureín-hidrolasa inducida por el fago. Sin embargo, la posibilidad alternativa de que la actividad autolítica residual del huésped sea estabilizada o activada por algún producto del fago no se puede excluir completamente en este momento. El hecho experimental más fuerte en contra de esta última interpretación lo constituye el empleo del antisuero preparado frente a la amidasas de neumococo purificada (anti-E) ya que este antisuero no fue capaz de inhibir la actividad enzimática de la PAL (figura 34).

Por otra parte, el empleo combinado de los antisueros anti-E y anti-PAL en experimentos "in vivo" llevado a cabo con las bacterias R6 (estirpe salvaje) y cw-1 (estirpe mutante deficiente en autolisina) ha revelado aspectos importantes del mecanismo de lisis mediada por el bacteriófago Dp-1. De la figura 66 parece deducirse que en la bacteria mutante cw-1 el enzima lítico fundamental, si no el único, responsable de la lisis parece ser

la PAL que se produce cuando el fago infecta a la bacteria, ya que la lisis en este mutante podía ser inhibida eficazmente mediante el uso del anti-PAL. En el caso de la bacteria salvaje R6 la situación requiere una interpretación complementaria ya que estas células poseen cantidades normales de autolisina activa que permiten, entre otras cosas, que en la infección por Dp-1 a baja MDI se produzca la lisis completa del cultivo. No obstante, también en este caso parece lógico suponer que la PAL se sintetiza en el momento de la infección; presumiblemente este enzima colaboraría con la autolisina del huésped degradando la pared celular, ayudando así a la salida de la progenie fágica. En efecto, esta suposición se ve confirmada por el hecho de que al añadir anti-PAL a un cultivo de R6 infectado por Dp-1 a alta MDI, la lisis del cultivo era parcialmente inhibida (figura 67).

251

5. CONCLUSIONES

Al revisar algunos antecedentes que se refieren a la problemática relacionada con el mecanismo de la infección fágica en neumococo que presentamos en la primera parte de esta Memoria de Tesis y tomando como apoyo algunos resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio sobre aislamiento, purificación y propiedades biológicas de los bacteriófagos de S. pneumoniae pudimos comprobar la existencia de varios interrogantes cuya resolución era imprescindible para un conocimiento íntimo de algunas etapas del proceso de infección fágica; en particular, en aquello que se refiere a los procesos de adsorción y liberación de la progenie fágica del bacteriófago Dp-1.

Todo ello nos llevó al planteamiento experimental que se desarrolla a lo largo de este trabajo, y de cuyos resultados podemos deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- En un mutante de S. pneumoniae, cw-1, infectado con el bacteriófago Dp-1, se ha aislado y purificado un nuevo enzima lítico, PAL.
- 2.- Según hemos demostrado experimentalmente, este enzima PAL es capaz de reconocer y degradar "in vitro" paredes de neumococo que contienen colina.
- 3.- En los ácidos teicoicos de estas paredes bacterianas, la sustitución de la colina por alguno de sus análogos estructurales, tales como la etanolamina, las convierte en resistentes a la acción de la PAL.

4.- El papel fundamental de los residuos de colina, para la actividad lítica de la PAL, queda confirmado de una forma directa mediante el empleo de un antisuero específico anti-fosforilcolina.

5.- Se han estudiado algunas propiedades de la PAL y se ha comprobado su similitud con las de la amidasa de la célula huésped utilizando los siguientes criterios:

- a) las paredes celulares preparadas a partir de células cultivadas en presencia de etanolamina son resistentes a ambas enzimas.
- b) las actividades líticas de ambas enzimas, amidasa y PAL, resultaron inhibidas por el antígeno de Forssman extraído de neumococo.

6.4 Asimismo se ha determinado la posibilidad de diferenciación entre la PAL y la amidasa de neumococo, utilizando los siguientes criterios:

- a) un antisuero preparado frente a la amidasa purificada (anti-E) no es capaz de inhibir la actividad "in vitro" de la PAL, mientras que sí puede inhibir la acción de la amidasa.
- b) la PAL se activa en presencia de agentes reductores mientras que éstos no afectan a la actividad enzimática específica de la amidasa.
- c) los productos de degradación enzimática obtenidos, tratando paredes de neumococo con amidasa o con PAL, se diferencian claramente a través de análisis cromatográficos de filtración.
- d) la actividad de la PAL resultó ser marcadamente inhibida por la cardiolipina; fosfolípido que, por otra parte, no fue capaz de afectar a la actividad de la amidasa.

e) la PAL, para su activación, no requiere una incubación a 0°C con paredes de neumococo purificadas, mientras que esto es imprescindible en el caso de activación de la amidasa.

f) la PAL no presenta una dependencia del pH tan estricta como la señalada para el caso de la amidasa.

g) el peso molecular de ambas enzimas difiere ligeramente: amidasa= 35.000 D; PAL= 31.000 D.

7.- Se ha comprobado que el enzima PAL no es un componente estructural de la partícula fágica madura.

8.- La infección de neumococos con el bacteriófago Dp-1 da lugar a alteraciones fisiológicas en la célula huésped, similares a las originadas por tratamiento de estas células con penicilina, como son la detención inmediata de la síntesis de pared y la subsiguiente sensibilización de estas paredes a la acción de la autolisina.

9.- Después de un detallado examen de la bibliografía relacionada con el tema, podemos afirmar que el enzima PAL descrito en este trabajo es la primera mureín-hidrolasa asociada a un bacteriófago de S. pneumoniae.

10.- Nuestros resultados demuestran que la PAL es el único enzima responsable de la liberación de la progenie fágica al medio de cultivo en aquellas células mutantes de neumococo que carecen de amidasa activa.

11.- En estirpes salvajes de neumococo la liberación de la progenie fágica sería consecuencia tanto de la intervención de la amidasa del huésped como de la PAL.

12.- La actividad de la PAL y de la amidasa "in vivo" para que se produzca la liberación de la progenie fágica al medio de cultivo requieren, al igual que en los ensayos "in vitro", la presencia de residuos de colina en la pared de la célula huésped.

13.- Se ha demostrado que los residuos de colina del ácido teicoico son esenciales para que tenga lugar la adsorción del bacteriófago Dp-1 a neumococo.

14.- La comprobación de que la fosforilcolina inhibe la unión de Dp-1 a las paredes purificadas de neumococo, sugiere, junto con los otros resultados obtenidos, que la fosforilcolina es el sitio específico de adsorción primaria del Dp-1.

15.- Las membranas purificadas de neumococo, que contienen colina como componente del antígeno de Forssman, también son capaces de adsorber Dp-1.

16.- Nuestros resultados apuntan hacia el interesante hecho de que en las paredes de neumococo se encuentran los receptores responsables de una adsorción reversible, mientras que las membranas por sí solas (o junto con las paredes) serían los lugares en que se llevase a cabo una adsorción irreversible del fago.

17.- Los experimentos de adsorción de fagos a células EA, visualizados mediante pulsos de colina, nos han servido para la localización topográfica de ácidos teicoicos conteniendo colina en la pared celular.

18.- Las moléculas de ácido teicoico sintetizadas "de novo" y que contienen colina, aparecen en la superficie externa de la bacteria casi inmediatamente después de que el aminoalcohol sea añadido al medio de cultivo.

19.- Nuestros resultados confirman que el mecanismo de segregación de la pared celular de neumococo, durante el crecimiento y la división celular, es de índole conservativa.

257

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 . Twort, F.W. (1915). *Lancet* 2, 1241-1243.
- 2 . D'Hérelle, F. (1917). *Compt. Rend.* 165, 373-375.
- 3 . Arber, W. y Dussoix, D. (1962), *J. Mol. Biol.* 5, 18-36.
- 4 . López, R., Ronda, C., Tapia, A., Waks, S. y Tomasz, A. (1976). *Antimicrob. Agents Chemother.* 10, 697-706.
- 5 . Ronda, C., López, R., Tapia, A. y Tomasz, A. (1977). *J. Virol.* 21, 366-374.
- 6 . Deibel, R.H. y Seeley, H.W. (1974). Family II. Streptococcaceae .
En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (Eds. Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E.) 8ª Edición. The Williams and Wilkins Co. pp. 490-509.
- 7 . Wilson, G.S. y Miles, A. (1975). The streptococci. En:
Topley's and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity (Eds. Wilson, G.S., Miles, A.). 6ª Edición. Vol. 1. The Williams & Wilkins Co. pp. 712-763.
- 8 . Austrian, R. y MacLeod, C.M. (1949). *J. Exp. Med.* 89, 439-450.
- 9 . Mosser, J.L. y Tomasz, A. (1970). *J. Biol. Chem.* 245, 287-298.
- 10 . Bracco, R.M., Krauss, M.R., Rae, A.S. y MacLeod, C.M. (1957) *J. Exp. Med.* 106, 247-259.
- 11 . Pakula, R. (1963). *Recent Prog. Microb.* 8, 617-624.
- 12 . Ravin, A.W. y DeSa, J.D.H. (1964). *J. Bacteriol.* 87, 86-96.
- 13 . Chen, C.C. y Ravin, A.W. (1966). *J. Mol. Biol.* 22, 109-121.
- 14 . Weissman, S.M., Reich, P.R. y Somerson, N.L. (1966). *J. Bacteriol.* 92, 1372-1377.
- 15 . Stryker, L.M. (1916). *J. Exp. Med.* 24, 49-68.

16. Tomasz, A. (1964). Bact. Proc. p. 29.
17. MacLeod, J.W. y Gordon, J. (1922). Biochem. J. 16, 499-506.
18. Hadley, F.P., Hadley, P. y Leathen, W.W. (1941). J. Infect. Dis. 68, 264-277.
19. Austrian, R. (1974). Streptococcus pneumoniae (pneumococcus).
En: Manual of Clininal Microbiology (Lennette, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P. Eds.): American Society for Microbiology. pp. 109-115.
20. Dubos, R.J. y Hirsh, J.G. (1965). En: Bacterial and mycotic infections of man. (Dubos, R.J. Ed). 4^º Edicion. J.B. Lippincott. Philadelphia. pp. 392-400.
21. Bowers, E.F. y Jefferies, L.R. (1955). J. Clin. Pathol. 8, 58-60.
22. Bowen, M.K., Thiele, L.C., Stearman, B.D. y Shaub, J.G. (1957). J. Lab. Clin. Med. 49, 641-642.
23. Smith, D.T., Conant, N.F. y Willet, H.P. (1967). The pneumococcus. En: Zinsser Microbiology (Joklik, W.K. y Willett, H.P. Eds). 13^º edición. Appleton Century Crafts. New York. pp. 407-415.
24. Lund, E. y Rasmussen, P. (1966). Acta Pathol. Microb. Scand. 68, 458-460.
25. Larm, O. y Lindberg, B. (1976). Adv. Carbohyd. Chem. 33, 295-322.
26. Watkins, W.M. (1966). Science 152, 172-181.
27. Rytel, M.W. (1975). Adv. Intern. Med. 20, 37-60.

28. Austrian, R., Douglas, R.M., Shiffman, G., Coetze, A.M., Koornhof, H.J., Hayden Smith, S. y Raid, R.D.W. (1976). Trans. Assoc. Amer. Phys. 89, 184-194.
29. Center for Disease Control (1978). Morbid. Mortal. Weekly Rep. 27, 25-31.
30. Dubos, R.J. (1976). Bacterial variability. En: The Professor, the Institute, and DNA. (Dubos, R.J. Ed.). The Rockefeller University Press, New York. pp. 125-138.
31. Tipper, D.J. (1972). Subunits in biological systems. En: Biological macromolecules series. Vol VI B (Forsman, G.D. y Timasheff, S.N. Eds.) Marcel Dekker. New York. pp. 121-205, 371-345.
32. Ghuysen, J.M. (1968). Bacteriol. Rev. 32, 425-464.
33. Holtje, J.V. y Tomasz, A. (1975). J. Biol. Chem. 250, 6072-6076.
34. Glaser, L. (1964). J. Biol. Chem. 239, 3178-3186.
35. Young, F.E. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 2377-2384.
36. Chatterjee, A.N., Mirelman, D., Singer, H.T. y Park, J.T. (1969). J. Bacteriol. 100, 846-853.
37. Glaser, L. Ionesco, H. y Shaffer, P. (1966). Biochim. Biophys. Acta 124, 415-417.
38. Davie, J.M. y Brock, T.D. (1966). J. Bacteriol. 92, 1623-1631.
39. Baddiley, J. (1970). Chem. Res. 3, 98-105.
40. Winkelstein, J.A. y Tomasz, A. (1978). J. Immunol. 120, 174-178.

41. Rand, L. y Subboron, Y. (1940). J. Bacteriol. 40, 695-704.
42. Tomasz, A. (1967). Science 157, 694-697.
43. Brundish, D.E. y Baddiley, J. (1968). Biochem. J. 110, 573-582.
44. Briles, E.B. y Tomasz, A. (1973). J. Biol. Chem. 248, 6394-6397.
45. Poxton, I.R., Tarelli, E. y Baddiley, J. (1978). Biochem. J. 175, 1033-1042.
46. Schiffman, G., Bornstein, D.L. y Austrian, R. (1971). J. Exp. Med. 134, 600-617.
47. Kaplan, M.H. y Volanakis, J.E. (1974). J. Immunol. 112, 2135-2147.
48. Holtje, J.V. y Tomasz, A. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1690-1694.
49. Higginbotham, J.D., Heidelberg, M. y Götschlich, E.C. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 138-142.
50. Tipper, D.J. y Wright, A. (1979). The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. En: The bacteria-a treatise on structure and function. Vol7: mechanisms of adaptation (Sokatch, G.R. and Ornston, J.N. Eds). Academic Press. pp. 291-496.
51. Heckels, J.E., Archibald, A.R. y Baddiley, J. (1975). Biochem. J. 149, 637-647.
52. MacLeod, C.M. y Avery, O.T. (1941). J. Exp. Med. 73, 183-190.
53. Mc Carty, M. (1947). J. Exp. Med. 85, 491-498.
54. Koj, A. (1974). Acute phase reactants: their synthesis, turnover, and biological significance. En: Structure and function of plasma proteins (Allison, A.C. Ed.) Plenum Press New York. pp. 73-125.

55. Mortensen, R.F., Osmond, A.P., Lint, T.F. y Gewurz, H. (1976). *J. Immunol.* 117, 774-781.
56. Kindmark, C.O. (1971). *Clin. Exp. Immun.* 8, 941-948.
57. Osmond, A.P., Mortensen, R.F., Siegel, J. y Gewurz, H. (1975). *J. Exp. Med.* 142, 1065-1077.
58. Tomasz, A. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 86-93.
59. Tomasz, A. y Westphal, M. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2627-2630.
60. Bean, B. and Tomasz, A. (1977). *J. Bacteriol.* 130, 571-574.
61. Tomasz, A., Mc Donnell, M., Westphal, M. y Zanati, E. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 337-341.
62. Tomasz, A., Zanati, E. y Ziegler, R. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1848-1852.
63. Tomasz, A. Westphal, M., Briles, E.B. y Fletcher, P. (1975). *J. Supramolec. Struct.* 3, 1-16.
64. Popkin, T.J., Theodore, T.S. y Cole, R.M. (1971). *J. Bacteriol.* 107, 907-917.
65. Wicken, A.J. y Knox, K.W. (1975). *Science* 187, 1161-1167.
66. Knox, K.W. y Wicken, A.J. (1973). *Bacteriol. Rev.* 37, 215-248.
67. Holtje, J.V. y Tomasz, A. (1975). *J. Bacteriol.* 124 1023-1027.
68. Cleveland, R.F., Holtje, J.V. Wicken, A.J., Tomasz, A., Daneo-Moore, L. y Shockman, G.D. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1128-1135.
69. Manck, J. y Glaser, L. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2386-2390.

70. Beachey, E.H. y Offek, I. (1976). *J. Exp. Med.* 143, 759-771.
71. Goebel, W.F. y Adams, M.H. (1943). *J. Exp. Med.* 77, 435-449.
72. Bailey, G.H. y Shorb, M.S. (1931). *Ann. J. Hyg.* 13, 831-856.
73. Jenkins, C.R. (1963). *Advan. Immunol.* 3, 351-376.
74. García, E., Rojo, J.M., García, P., Ronda, C., López, R.
y Tomasz, A. (1982). *FEMS Microbiol. Letters* (en prensa).
75. Briles, E.B. y Tomasz, A. (1975). *J. Gen. Microb.* 86, 267-274.
76. Rogers, H.J. (1970). *Bacteriol. Rev.* 34, 194-214.
77. Shockman, G.D., Daneo-Moore, L. y Higgins, M.L. (1974).
Problems of cell wall and membrane growth, enlargement and
division. En: Mode of action of antibiotics on microbial
walls and membranes. *Ann. New York Acad. Sci.* Vol 235. (Salton
M.R.J. y Tomasz, A. Eds). New York Academy of Sciences.
pp. 161-197.
78. Young, F.E. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 3462-3467.
79. Weidel, W. y Pelzer, V.M. (1964). *Advan. Enzymol.* 26, 193-
232.
80. Ronda-Lain, C., Lopez, R., Tapia, A. y Tomasz, A. (1977).
J. Virol. 21, 366-374.
81. Tomasz, A. (1974). The role of autolysins in cell death. En:
Mode of action of antibiotics on microbial walls and membranes
(Salton, M.R.J., and Tomasz, A. Eds.). *Ann. New York Acad.*
Sci. Vol. 235. pp. 439-448.
82. Tomasz, A. y Holtje, J.V. (1977). Murein hydrolases: and the
lytic of penicillin. En; *Microbiology 1977* (Schlessinger, D.
Ed.). American Society for Microbiology. pp. 209-215.

83. Shockman, G.D., Thompson, J.S. y Conover, M.J. (1965). *J. Bacteriol.* 90, 575-588.
84. Herbold, D.R. y Glaser, L. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 1676-1682.
85. Lacks, S. y Neuberger, M. (1975). *J. Bacteriol.* 124, 1321-1329.
86. Holtje, J.V. y Tomasz, A. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 7032-7034.
87. Venkateswaran, P.S. y Stanton, N. (1978). *Proc. Am. Soc. Microb.* K186.
88. Tomasz, A. y Waks, S. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4162-4166.
89. Horne, D. y Tomasz, A. (1979). *J. Bacteriol.* 137, 1180-1184.
90. Horne, D. y Tomasz, A. (1977). *Antimicrob. Agents. Chemo-ther.* 11, 888-896.
91. Horne, D., y Tomasz, A. (1977). *J. Bacteriol.* 132, 704-717.
92. Hakenbeck, R. Waks, S., Tomasz, A. (1978). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 13, 302-311.
93. Lacks, S. (1970). *J. Bacteriol.* 101, 373-383.
94. Tomasz, A. y Waks, S. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 1311-1319.
95. Holtje, J.V. y Tomasz, A. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 4199-4207.
96. Tomasz, A., Albino, A. y Zanati, E. (1970). *Nature* 227, 138-140.

97. Rogers, H.J. y Forsberg, C.W. (1971). *J. Bacteriol.* 108, 1235-1243.
98. Bert, G.K., Bert, N.H. y Koval, A. V. (1974). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 6, 825-830.
99. Sabath., L.D. (1979). Staphylococcal tolerance to penicillins and cephalosporins. *En : Microbiology 1979* (Schlessinger, D. Ed.). American Society for Microbiology pp. 299-303.
100. Holloway, Y., Dankert, J. y Hess, J. (1980). *Lancet*, 1, 589.
101. Lopez, R., Ronda-Lain, C., Tapia, A., Waks, S. y Tomasz, A. (1976). *Antimicrob. Agents. Chemother* 10, 697-706.
102. Tiraby, J.G., Tiraby, E. y Fox, M.S. (1975). *Virology* 68, 566-569.
103. McDonnell, M., Ronda-Lain, C. y Tomasz, A. (1975) *Virology* 63, 577-582.
104. Bernheimer, H.P. (1977). *Science* 195, 66-68.
105. Bernheimer, H.P. (1979). *J. Bacteriol.*, 133, 618-624.
106. López, R., Ronda, C., Tomasz, A. y Portolés, A. (1977). *J. Virol.* 24, 201-210.
107. López, R., Ronda, C. y Portolés, A. (1979). Competence for transfection in *Streptococcus pneumoniae*. *En: Transformation 1979* (S.W. Glover y L.O. Butler Eds). Costwold Press, Oxford, 1979, pp. 274-291.
108. Ronda, C., López, R. Tomasz, A. y Portolés, A. (1978). *J. Virol.* 26, 221-225.
109. Porter, R.D. y Guild, W.R. (1976). *J. Virol.* 19, 659-667.

110. Porter, R.D. y Guild, W.R. (1978). *J. Virol.* 25, 60-72.
111. Porter, D.R., Shoemaker, N.B., Rampe, G. y Guild, W.R. (1979). *J. Bacteriol.* 137, 556-567.
112. Goodell, E.W., López, R. y Tomasz, A. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3293-3297.
113. Seto, H., López, R. Garrigan, O. y Tomasz, A. (1975). *J. Bacteriol.* 122; 676-685.
114. García, E., Ronda, C. y López, R. (1979). *Eur. J. Biochem.* 101, 59-64.
115. López, R., García, E. y Ronda, C. (1980). *FEBS Lett.* 111, 66-68.
116. Nugent, K.M. y Cole, R.M. (1977). *J. Virol.* 21, 1061-1073.
117. García, E. Ronda, C. y López, R. (1980). *Virology* 105, 405-414.
118. Ivarie, R.D. y Pene, J.J. (1973). *Virology* 52, 351-362.
119. Eiserling, F.A. (1979). *Bacteriophage structure*. En: *Comprehensive virology*, Vol. 13 (Fraenkel-Conrat y R.R. Wagner Eds.). Plenum Publishing Corp., New York. pp. 543-580.
120. Ronda, C., López, R. y García, E. (1981). *J. Virol.* 40 551-559.
121. Lindberg, A. (1973). *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 205-241.
122. Lindberg, A. (1977). En: *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. (Sutherland, I.W. Ed.) Academic Press pp. 289-356.
123. Archibald, A.R. (1980). En: *Virus receptors. Part. 1 Bacterial Viruses*. (Randall, L.L. y Philipson, L. Eds.) pp 7-26. London and New York, Chapman and Hall.
124. Bradley, D.E. (1967). *Bact. Rev.* 31, 230-314.

125. Archibald, A.R. y Coapes, H.E. (1972). *J. Gen. Microbiol.* 73, 581-585.
126. Birdsell, D.C. y Doyle, R.J. (1973). *J. Bacteriol.* 113, 198-202.
127. Fischetti, V.A. y Zabriskie, J.B. (1968). *J. Exp. Med.* 127, 489-505.
128. Nordström, K.; Forsgren, A. y Cox, P. (1974). *J. Virol.* 14, 203-206.
129. Watanabe, T. y Shiomi, T. (1976). *Jap. J. Microbiol.* 20, 147-149.
130. Krause, R.M. (1957). *J. Exp. Med.* 106, 365-384.
131. Benchetrit, L.C., Gray, F.D., Edstrom, R.D. y Wannamaker, L.W. (1978). *J. Bacteriol.* 134, 221-228.
132. Benchetrit, L.C., Gray, E.D. y Wannamaker, L.W. (1977) *Infect. Immun.* 15, 527-532.
133. Wu, T.C.M. y Park, J.T. (1971). *J. Bacteriol.* 108, 874-888.
134. Cleary, P.P. y Johnson, Z. (1977). *Infect. Immun.* 16, 280-292.
135. Nordström, K.J. y Forsgren, A. (1974). *J. Virol.* 14, 198-202.
136. Maxted, W.R. (1955). *J. Gen. Microbiol.* 12, 484-495.
137. Jacobson, E.D. y Landman, D.E. (1975). *J. Bacteriol.* 124, 445-458.
138. Archibald, A.R. (1976). *J. Bacteriol.* 127, 956-960.
139. Archibald, A.R. y Coapes, H.E. (1976). *J. Bacteriol.* 125, 1195-1206.

140. Joys, T.M. (1965). *J. Bacteriol.* 90, 1575-1577.
141. Lovett, P.S. (1972). *Virology.* 47, 743-752.
142. Eiserling, F.A. (1967). *J. Ultrastruct. Res.* 17, 342-347.
143. Raimondo, L.M., Lundh, N.P. y Martínez, R.J. (1968). *J. Virol.* 2, 256-264.
144. Wilson, J. y Takahashi, I. (1978). *Can. J. Microbiol.* 24, 1-8.
145. Aebi, U., Smith, P.R., Dubochet, J. Henry, C. y Kellenberger, E. (1973). *J. Supramol. Biol.* 1, 498-522.
146. Sleytr, U.B. (1978). *Int. Rev. Cytology.* 53, 1-64.
147. Howard, J. y Tipper, D.J. (1973). *J. Bacteriol.* 113, 1491-1504.
148. Archibald, A.R. (1972). *En: The Staphylococci* (Cohen, J.D. Ed.), John Wiley and Sons Inc., pp. 75-109.
149. Rosenblum, E.D. y Tyrone, S. (1964). *J. Bacteriol.* 88, 1737-1742.
150. Burnet, F.M. y Lush, D. (1935). *J. Path. Bacteriol. Lond.* 40, 455-469.
151. Rakieta, M.L. y Rakieta, T.L. (1937). *J. Bacteriol.* 34, 285-300.
152. Rakieta, M.L. y Tiffany, E.J. (1938). *J. Bacteriol.* 36, 155-173.
153. Ralston, D.J. (1963). *J. Bacteriol.* 85, 1185-1193.
154. Morse, S.I. (1962). *J. Exp. Med.* 116, 247-251.
155. Rosato, R.R. y Camerton, J.A. (1964). *Biochim. Biophys. Acta.* 83, 113-119.

156. Coyette, J. y Ghuysen, J.M. (1968). *Biochemistry*. 7, 1385-1389.
157. Chatterjee, A.N. (1969). *J. Bacteriol.* 38, 519-527.
158. Murayama, Y., Kotani, S. y Kato, K. (1968). *Biken. J.* 11, 269-291.
159. Shaw, D.R.D. y Chatterjee, A.N. (1971). *J. Bacteriol.* 108, 584-585.
160. Hemphill, H.E. y Whiteley, H.R. (1975). *Bacteriol. Rev.* 39, 257-315.
161. Doyle, R.J., McDannel, M.J., Streips, U.N., Birdsell, D.C. y Young, F.E. (1974). *J. Bacteriol.* 118, 606-615.
162. Shiflett, M., Brooks, D. y Young, F.E. (1977). *J. Bacteriol.* 132, 681-690.
163. Yasbin, R.E., Maino, V.C. y Young, F.E. (1976). *J. Bacteriol.* 125, 1120-1126.
164. Birdsell, D.C., Hathaway, G.M. y Rutberg, L. (1969). *J. Virol.* 4, 264-270.
165. Jacobson, E.D. y Landman D.E. (1976). En: Microbiology 1976 (Schlessinger, D. Ed.). Am. Soc. Microbiol. Washington D.C. pp. 238-253.
166. Ward, J.B. (1981). *Microbiol. Rev.* 45, 211-243.
167. Anderson, J.C., Archibald, A.R. Baddiley, J. Curtis, M.J. y Davey, N.B. (1969). *Biochem. J.* 113, 183-189.
168. Douglas, L.J. y Wolin, M.J. (1971). *Biochemistry*. 10, 1551-1555.

169. Yokokuro, T. (1977). *J. Gen. Microbiol.* 100, 139-145.
170. Watanabe, K. y Takesue, S. (1975). *J. Gen. Virol.* 29, 29-35.
171. Watanabe, K., Takesue, S. y Ishibashi, K. (1977). *J. Gen. Virol.* 34, 189-194.
172. Watanabe, K. y Takesue, S. (1973). *J. Gen. Virol.* 20, 319-326.
173. Cleary, P.P., Wannamaker, L.W., Fisher, M. y Laible, N. (1977). *J. Exp. Med.* 145, 578-593.
174. Chionglo, D.T. y Hayashi, J.A. (1969). *Archs. Biochem. Biophys.* 130, 39-47.
175. Schleifer, K.H. y Steber, J. (1974). *Arch. Microbiol.* 98, 251-270.
176. Schleifer, K.H. y Kandler, O. (1972). *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477.
177. Vidaver, A.K. y Brock, T.D. (1966). *Biochim. Biophys. Acta.* 121, 298-314.
178. Oram, J.D. (1971). *J. Gen. Virol.* 13, 59-71.
179. Lovett, P.S. y Shockman, G.D. (1970). *J. Virol.* 6, 125-134.
180. Lovett, P.S. y Shockman, G.D. (1970). *J. Virol.* 6, 135-144.
181. Jacobson, E.D. y Landman, O.E. (1977). *J. Virol.* 21, 1223-1227.
182. Tosi, M. y Anderson, D.L. (1976). *J. Virol.* 12, 1548-1559.
183. Brumfitt, W. (1960). *J. Path. Bact. Lond.* 79, 1-9.
184. Black, L.W. y Hogness, D.S. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 1968-1975.

185. DeMartini, M., Halegoua, S. y Inouye, M. (1975). *J. Virol.* 16, 459-461.
186. Inouye, M., Arnheim, N. y Sternglanz, R. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 7247-7252.
187. Koteswara Rao, G.R. y Burma, D.P. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 6474-6479.
188. Prymē, I.F. y Berentsen, S.A. (1970). *Biochim. Biophys. Acta.* 204, 630-632.
189. Tsugita, A., Inouye, M., Terzaghi, E. y Streisinger, G. (1968). *J. Biol. Chem.* 243, 392-397.
190. Weidel, W. y Katz, W. (1961). *Z. Naturforsch* 16, 156-162.
191. Emrich, J. (1968). *Virology* 35, 158-165.
192. Harris, A.W., Mount, D.W., Fuerst, C.R. y Siminovitch, L. (1968). *Virology* 32, 553-569.
193. Streisinger, G., Mukai, F., Dreyer, W.J., Miller, B. y Horiuchi, S. (1961). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 25-30.
194. Taylor, A. (1971). *Nature. (London) New Biol.* 234, 144-145.
195. Mukherjee, P.K. y Mandel, R.K. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 302-309.
196. Mindich, L. y Lehman, J. (1979). *J. Virol.* 30, 489-496.
197. Eichholtz, H., Freund-Molbert, E. y Stirm, S. (1975). *J. Virol.* 15, 985-993.
198. Murphy, J.S. (1960). *Virology* 11, 510-513.
199. Fox, E.N. y Wittner, M.K. (1965). *J. Bacteriol.* 89, 496-502.

200. Zabriskie, J., Read, S. y Fischetti, V. (1972). En:
Lysogeny in streptococci, Streptococci and streptococcal
diseases (Wannamaker, L.W. y Masten, J.M. Eds.) Academic Press.
Inc. New York. pp. 99-118.
201. Wheeler, J., Holland, J., Terry, J. y Blainey, J. (1980). J.
Gen. Microbiol. 120, 27-33.
202. Horne, D. y Tomasz, A. (1980). Antrimicrob. Agents Chemother.
17, 235-246.
203. Kantor, F. y Cole. R. (1960). J. Exp. Med. 112, 77-96.
204. Krause, R.M. (1958). J. Exp. Med. 108, 803-821.
205. Raina, J. (1981). J. Bacteriol. 145, 661-663.
206. Hill, J. y Wannamaker, L. (1981). J. Bacteriol. 145, 696-703.
207. Tomasz, A. (1979). Ann. Rev. Microb. 33, 113-137.
208. Griffith, F. (1928). J. Hyg. 27, 113-159.
209. Avery, O.T., McLeod, C.M. y McCarty, M. (1944). J. Exp.
Med. 79, 137-158.
210. Briles, E. y Tomasz, A. (1970). J. Cell Biol. 47, 786-790.
211. Tomasz, A. (1966). J. Bacteriol. 91, 1050-1061.
212. López, R. (1975). En: Aspectos actuales en la transmisión
de información genética de microorganismos. Monografías bá-
sicas de la Sociedad Española de Microbiología 1 (Portolés,
A. y Baquero, F. Eds.) Madrid. pp. 197-221.
213. Adams, M.H. (1959). En: Bacteriophages. Interscience
Publishers Inc. New York.
214. Hughes, R. y Tanner, P. (1968). Biochem. Biophys. Res. Commun.
33, 22-28.

215. Krause, R. y McCarty (1961). *J. Exp. Med.* 114, 127-134.
216. Williamson, A. y Zamenhof, S. (1963). *Anal. Biochem.* 5, 47-50.
217. Seto, H., López, R. y Tomasz, A. (1975). *J. Bacteriol.* 122, 1339-1350.
218. Goebel, W., Shedlovsky, T., Lavin, G. y Adams, M.H. (1943). *J. Biol. Chem.* 148, 1-13.
219. Tomasz, A. (1981). *Rev. Infect. Dis.* 3, 190-211.
220. Laemmli, U.K. y Favre, M. (1973). *J. Mol. Biol.* 80, 575-599.
221. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
222. Ouchterlony, O. y Nilsson, L.A. (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *En: Handbook of Experimental Immunology Vol. 1. 3ª Edición (Weir, D.M. Ed.)*. Blackwell Scientific Publications.
223. Grabar, P. y Williams, C.A. (1953). *Biochim. Biophys. Acta* 10, 193-197.
224. Fischetti, V.A., Gotschlich, E.C. y Bernheimer, A.W. (1971). *J. Exp. Med.* 133, 1105-1117.
225. Cohen, S., Flaks, J.G., Barner, H., Loeb, M.R. y Lichtenstein, J. (1958). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 44, 1004-1012.
226. Tomasz, A. (1979). *Rev. Inf. Dis.* 1, 434-467.
227. Tomasz, A., Kitano, K., López, R. y DeFreitas, C. (1979). *En: Drug action and design: mechanism-based enzyme inhibitors. (Kalman, T.I. Ed.) Developments in Biochemistry, Vol.6 Elsevier North Holland. pp. 197-224.*

228. Doughty, C. y Hayashi, J.A. (1961). *J. Bacteriol.* 83, 1058-1064.
229. Bleiweis, A.S. y Zimmerman, L.N. (1961). *J. Microbiol.* 7, 363-369.
230. Reiter, B. y Oram, J.D. (1963). *J. Gen. Microbiol.* 32, 29-33.
231. García, P. (1978). Tesina. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.
232. Strominger, J. (1962). En: *The Bacteria* (Gunsalus, I.C. y Stanier, R. Eds.) Vol. III. Academic Press. New York. pp. 413-470.
233. Heller, K. y Braun, V. (1982). *J. Virol.* 41, 222-227.
234. Prehm, P., Jann, B., Jann, K., Schmidt, G. y Stirm, S. (1976). *J. Mol. Biol.* 101, 277-281.
235. Dawes, J. (1975). *Nature (London)* 256, 127-128.
236. Jarrell, K. y Kropinski, A. (1981). *J. Virol.* 40, 411-420.
237. Lang, W.K. y Archibald, A.R. (1982). *FEMS Microbiol. Letters* 13, 93-97.
238. López, R., García, P., Ronda, C. y García, E. (1982). En: *Microbiology-82* (Schlessinger, D., ed.) American Society for Microbiology, Washington (en prensa).

