

Características del bacteriófago virulento C1 de estreptococos del grupo C. I. Morfología y propiedades biomoleculares del fago C1

JOSÉ LUIS COLL¹, T. V. GUPALOVA², A. N. SUVOROV², V. I. GOLUBKOV² y A. A. TOTOLIAN²

1. Dirección de Investigaciones Científicas D. C., La Habana, Cuba

2. Instituto Científico Investigativo de Medicina Experimental de Leningrado, URSS

Recibido en octubre de 1985

RESUMEN

El bacteriófago C1 específico para la cepa C4540 se ha utilizado para la producción de una lisozima asociada al fago (LAF), que tiene la propiedad de lisar estreptococos y otras bacterias. Sin embargo, poco se conoce de las características biomoleculares de este fago, que es capaz de reproducirse en otras cepas del grupo C de estreptococos, y del grupo A, bacterias capaces de producir enfermedades en animales y en el hombre. Mediante el intercambio genético entre el fago y los correspondientes estreptococos, podrían ser estudiados los factores genéticos de patogenicidad de estas bacterias, para lo cual se hace necesario el conocimiento de las características del propio bacteriófago. En el presente trabajo se estudiaron las características morfológicas, fisicoquímicas y biomoleculares de la partícula del fago C1 y sus proteínas. La microscopía electrónica muestra que el fago C1 posee una cabeza hexagonal de la cual surge un pequeño vástago constituido por 6-8 filamentos; la densidad de flotación de la partícula es de 1,462 g/cm³ en CsCl; la cápsula del fago presenta siete polipéptidos electroforéticamente diferentes. Los datos evidenciaron la ausencia, en la estructura de la cápsula, de la potente lisozima asociada (LAF) al fago C1, lo que contradice los datos de la literatura.

SUMMARY

The bacteriophage C1, specific for the strain C4540, has been utilized for the production of a lysozyme associated to phage (LAF), which has the property of lysis of streptococcus and other bacteria. However little is known about the biomolecular characteristics of this phage, which is able to reproduce in other strains of group C and A streptococcus, bacteria able to produce diseases in man and animals. Through the genetic interchange between the phage and the correspondent *streptococcus* the genetic factors of pathogenicity of this bacteria could be studied; it is necessary to know the bacteriophage characteristics. The morphologic, physicochemicals and biomolecular characteristics of the phage's particle and its protein, have been studied. The electronic microscopy shows that phage C1 have an hexagonal head from which emerge a little vantage constituted by 6-8 filaments; the flotation density of the corpuscles is 1,462 g/cm³ in CsCl; the phage capsule presents seven polipeptides electroforetically different (MW, Kd: 73; 69; 59; 40,5; 35; 27,5 and 13,5). Data evidence lack of the potent lysozyme associated to phage C1 in the capsule structure, it is in disagreement with the literature data.

INTRODUCCION

Los estreptococos del grupo C pueden provocar en el hombre y en los animales enfermedades tales como la endocarditis causada por los estreptococos de los grupos C, D y H. Los factores

genéticos de patogenicidad de los estreptococos del grupo C, hasta el momento, no han sido publicados; estos factores pueden ser estudiados mediante el intercambio genético de los estreptococos con sus correspondientes bacteriófagos por los mecanismos de transfección (Higuchi *et al.*, 1977; Nugent y Cole, 1977; Parsons *et al.*, 1973; Ronda *et al.*, 1978); y de transducción (Malke, 1969 a y b, 1972, 1973 a y b, 1974; Malke y Köhler, 1973; Totolian, 1977), para lo que se hace necesario conocer las características biomoleculares de las partículas, sus proteínas y el ADN del propio bacteriófago. Estas características de los fagos de estreptococos solo han sido reportadas para los del grupo H.

El fago C1 tiene la capacidad de reproducirse no solo en los estreptococos del grupo C, sino también en los del grupo A (Wannamaker *et al.*, 1973), estreptococos causantes de enfermedades en el hombre.

Evans (1940), descubrió una enzima que se producía en el ciclo lítico del fago C1, capaz de producir la lisis de los estreptococos de los grupos C y A, enzima que nombró como lisozima asociada al fago (LAF) C1. Posteriormente se han realizado numerosos trabajos sobre métodos de obtención y purificación de LAF, así como también sobre su utilización para el estudio de los estreptococos (Fishetti *et al.*, 1971; Fox, 1963; Fox y Wittner, 1965; Friend y Slade, 1966; Kantor y Cole, 1960; Krause, 1957, 1958; Markowitz y Dorfman, 1962).

En la actualidad, se ha establecido que la actividad lítica de LAF tiene lugar sobre los estreptococos de los grupos A, C, E y H, incluso a temperaturas tan bajas como de 0 a 2°C (Raina, 1981).

Los autores de estos trabajos no se han limitado solo al estudio de LAF, sino también han reportado en ellos propiedades del fago C1 y de otros bacteriófagos del grupo C; así, han determinado el diámetro de las colonias negativas de estos fagos (0,5-1,0 mm), el período latente de reproducción de diez minutos y la fertilidad media de 130 unidades formadoras de colonias (UFC) por UFC bacteriana.

También estos fagos han sido utilizados para la tipificación de los estreptococos del grupo C (Vereanu y Mihalcu, 1979). Fishetti y Zabriskie (1968), determinaron la constante de adsorción del fago C1 a la pared bacteriana. La morfología del fago C1 ha sido reportada por Zabriskie *et al.* (1972), correspondiendo esta al grupo B₃ de la clasificación de Ackerman (1973).

En el presente trabajo se estudiaron características morfológicas, biomoleculares y físico-químicas de la partícula y sus proteínas, del bacteriófago virulento C1.

MATERIALES Y METODOS

El bacteriófago C1 y la cepa C4540 de estreptococos, fueron recibidas del laboratorio del doctor A. R. Maxted (C.S.L. London, England). Las cepas de *E. coli* HB 101 y HB 101 (pBR 322) se obtuvieron del cepario del Instituto Politécnico Kalinin, de Leningrado.

La cepa 4540 se hizo crecer en medio BHI (Brain Heart Infusion "Difco"), al que se le añadió extracto de levadura (0,1 por ciento). Fue cultivado hasta una DO₆₅₀ de 0,4, al que se le añadió el fago C1 para una relación de infección de 0,1, produciéndose el aclaramiento completo de los cultivos en un período de 26 minutos. Todas las incubaciones se hicieron a 37°C. La titulación del fago se hizo por el método de Totolian (1960).

La obtención y purificación del bacteriófago se realizó según el método descrito por Coll (1982).

La microscopía electrónica del corpúsculo del fago se llevó a cabo por el método de Tijenenko (1977), en el microscopio electrónico EVM-100 LM.

La inmunización de los conejos se realizó con el fago nativo purificado (10¹⁰ UFC/ml), inyectándose 1 ml de este preparado, con el coadyuvante de Freund, en la extremidad trasera de los conejos. Esto se repite a las dos semanas, pero sin el coadyuvante. Dos semanas más tarde los conejos fueron desangrados y se separó el suero, comprobando entonces la actividad del suero contra el fago según la reacción de neutralización de Adams (1959).

La actividad LAF fue determinada por el método de Fishetti *et al.* (1971).

Las electroforesis de las proteínas de la cápsula del fago se hicieron por el método de Laemli (1970).

Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford (1976).

RESULTADOS

Características del bacteriófago C1

Morfología: Los preparados de 10^{12} y 10^{13} UFC/ml del fago C1, fueron utilizados en la microscopía electrónica y coloreados negativa y positivamente con acetato de uranilo al 1 por ciento (figura 1).

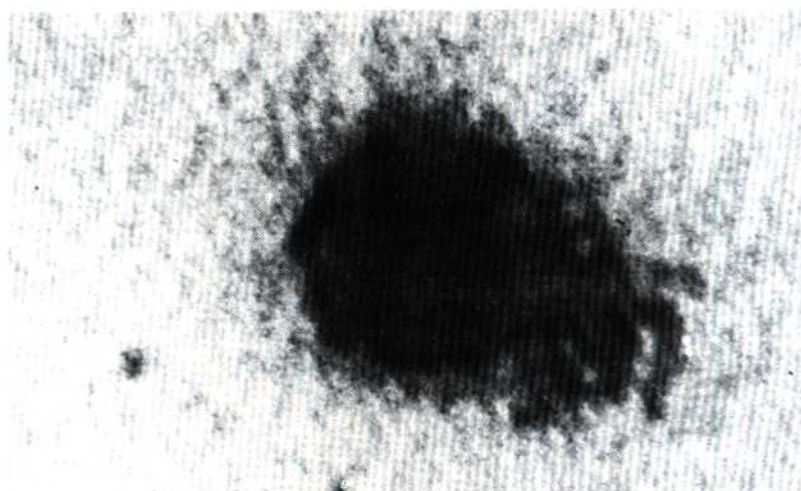


FIG. 1. Microfotografía electrónica del fago C1.

El fago tiene una cabeza hexagonal de la cual sale un corto vástago constituido por 6-8 filamentos.

Densidad de flotación

La curva de distribución del título del fago C1 en el gradiente de CsCl se presenta en la figura 2, donde se observa que los corpúsculos biológicamente activos se concentran en la zona del gradiente de CsCl de $1,462 \text{ g/cm}^3$ (tabla 1, figura 2).

Tabla 1

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL CORPÚSCULO DEL FAGO C1 Y SU ADN

<i>Propiedades del corpúsculo</i>	
Densidad de flotación en gradiente de CsCl	$1,462 \text{ g/cm}^3$
Número de polipéptidos que contiene la cápsula del fago	7
Pesos moleculares de los polipéptidos de la cápsula (kD)	73; 69; 59; 40,5; 35; 27,5; 18,5
Peso total de los polipéptidos (kD)	322,5

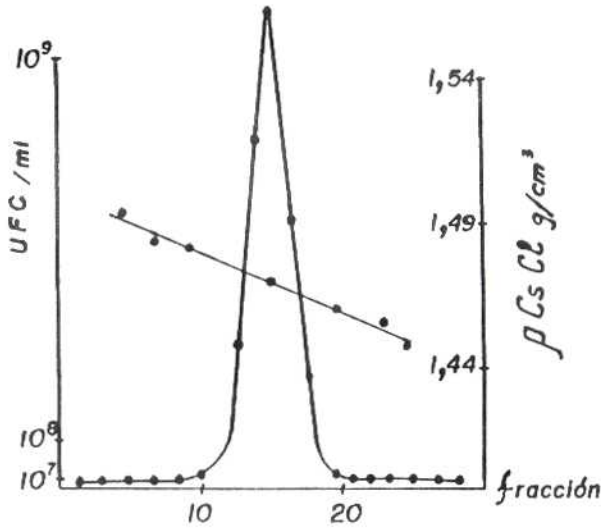


FIG. 2. Distribución de la actividad lítica del fago C1 en el gradiente de densidad de CsCl.

Esta densidad de flotación fue confirmada por la distribución de radiactividad (^3H -timina) de los corpúsculos del fago C1 en el mismo gradiente.

Los polipéptidos del corpúsculo C1 se separaron por electroforesis de poliácridamida en presencia de SDS.

En la figura 3 se muestra el densitograma del gel, se observa que en la composición del corpúsculo participan siete polipéptidos, de los cuales, los correspondientes a los picos 2 y 3 son los más abundantes. En la tabla 1 se presentan los pesos moleculares de los polipéptidos, cuya suma es de 322,5 kD. Partiendo de este peso se calculó la magnitud de nucleótidos que determinan los polipéptidos del corpúsculo del fago que es igual a 7,9 kb.

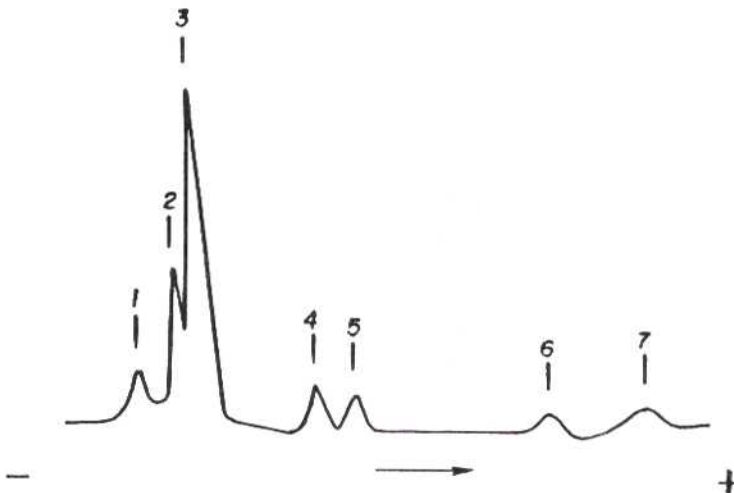


FIG. 3. Densitograma de los polipéptidos de la partícula del fago C1, separados electroforéticamente en gel de 10 por ciento PAA.

Investigación de la actividad LAF en los preparados del fago C1 purificado. La densidad óptica a 650 nm de la suspensión del cultivo de estreptococos SM60 no disminuyó en presencia del fago purificado (10^{11}) ni en sus diluciones. Fue obtenido antisuero para el fago purificado, el cual inhibía a este totalmente, y sin embargo, este antisuero no fue capaz de disminuir la actividad de LAF usada como control en el cultivo SM60, a diferencia del antisuero contra LAF que sí fue capaz de inhibir la enzima y no al fago purificado.

DISCUSION

Sobre el bacteriófago C1 solo se reporta en la literatura la descripción de su morfología y de LAF.

La estructura del fago C1, observada por nosotros, se diferencia en la forma de la cabeza de la reportada por Zabriskie *et al.* (1972).

La densidad de flotación del fago C1 muestra un solo pico en la concentración de CsCl de 1,462 g/cm³, lo que indica que es homogéneo. Esta densidad es menor que la que podría esperarse para un fago sin larga cola y esto posiblemente se deba al pequeño genoma de este fago (16,9 kb) lo que hace menor la relación ADN/proteína: 1,375 (Coll, 1982).

Electroforéticamente se observaron diez polipéptidos diferentes, pero debe considerarse que el método empleado con SDS presupone la separación completa de todos los monómeros, por lo que cabe la posibilidad de que sea menor el número de fracciones si es que alguno de los picos electroforéticos está constituido por polipéptidos complejos (dímeros, tetrámeros); por otra parte, el número de fracciones podría ser mayor si polipéptidos diferentes tienen igual corrida electroforética.

Según Fox y Wittner (1965), LAF en el fagolisado presenta dos formas: una enlazada a la partícula del fago y otra libre. Datos análogos fueron dados por Fishetti *et al.* (1971). El descubrimiento de LAF en la estructura del fago permitió a los autores suponer que LAF está determinado por la estructura del fago. Nuestros resultados no coinciden con los publicados, ya que el antisuero al fago purificado no contenía anticuerpos contra LAF, ni tampoco esta enzima se inactivó a diferencia del antisuero contra LAF, que sí la inactivó. Por otra parte, los pesos moleculares de los polipéptidos que forman la estructura de la cápsula del fago C1 hallado por nosotros (tabla 1), no se corresponden con los 98 kD que caracterizan a LAF. ponden con los 98 kD que caracterizan a LAF.

REFERENCIAS

- ACKERMAN, H. W. (1973). *Bacteriophages: the morphology of bacteriophages*. En: A. J. Larkin and H. A. Lechevalier (ed.). CRC Handbook of microbiology, Chemical Rubber Co. Press, Cleveland, Ohio 1: 573-612.
- ADAMS, M. H. (1959). *Bacteriophages*. N. Y. London.
- BRADFORD, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-256.
- COLL, J. L. (1982). *Características comparativas de bacteriófagos virulentos de estreptococos*. Tesis C. Dr. Leningrado, URSS.
- EVANS, A. C. y E. M. SOCKRIDER (1942). *Another serologic type of Streptococci bacteriophage*. J. Bacteriol. 44: 211-214.
- FISHETTI, V. A. y J. B. ZABRISKIE (1968). *Studies on streptococcal bacteriophages. II. Adsorption studies on group A and group C streptococcal bacteriophages*. J. Exp. Med. 127: 498-505.

- FISHETTI, V. A.; E. C. GOTSCHLICH y A. W. BERNHEIMER (1971). *Purification and physical properties of group C streptococcal phage-associated lysin*. J. Exp. Med. 133: 1105-1117.
- FOX, E. N. (1963). *Intracellular M-protein of group A Streptococcus*. J. Bacteriol. 85: 536-540.
- FOX, E. N. y M. K. WITTNER (1965). *Observations on the group C streptococcal bacteriophage and lytic enzyme system*. J. Bacteriol. 89: 496.
- FRIEND, P. y H. SLADE (1966). *Characteristic of group A streptococcal bacteriophages*. J. Bacteriol. 92: 148-154.
- HIGUCHI, M.; G. H. RHEE y S. ARAYA (1977). *Transfection of Streptococcus sanguis by phage deoxy-ribonucleic acid isolated from Streptococcus mutants*. Infection and Immunity 15: 945-949.
- KANTOR, F. S. y R. M. COLE (1960). *Preparation and antigenicity of M protein released from group A, type 1 streptococcal cell walls by phage-associated lysin*. J. Exp. Med. 112: 77-96.
- KRAUSE, R. M. (1957). *Studies on bacteriophages of hemolytic streptococci. I. Factors influencing the interaction of phage and susceptible host cell*. J. Exp. Med. 106: 365-384.
- KRAUSE, R. M. (1958). *Studies on the bacteriophages of hemolytic streptococci. II. Antigens released from the streptococcal cell wall by a phage-associated lysin*. J. Exp. Med. 108: 803-821.
- LAEMMLI, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄*. Nature 227: 680-685.
- MALKE, H. (1969). *Transduction of Streptococcus pyogenes K56*. Microb. Conet. Bull. 31: 23.
- MALKE, H. (1969). *Transduction of Streptococcus pyogenes K56 by temperature-sensitive mutants of the transducing phage A25*. Z. Naturforschg 24B: 1556-1561.
- MALKE, H. (1972). *Transduction in group A. Streptococci*. En: Streptococci and Streptococcal Diseases. L. Wannamaker y J. M. Matsen (ed.) Cap. 8, Academic Press, New York, London.
- MALKE, H. (1973). *Phage A25-mediated transfer induction of a prophage in Streptococcus pyogenus*. Molec. Gen. Genet. 125: 251-264.
- MALKE, H. y W. KOHLER (1973). *Transduction among group A Streptococci: Transducibility of strains representative of thirty different M types*. Zbl Bact. Hyg., J. Abt. Orig. A 224: 124-201.
- MALKE, H. (1974). *Genetics of resistance to macrolide antibiotics and lincomycin in natural isolates of Streptococcus pyogenus*. Molec. Gen. Genet. 135: 349-367.
- MARKOWITZ, A. y J. DORFMAN (1962). *Synthesis of capsular polysaccharide (hyaluronic acid) by protoplast membrane preparations of group A streptococci*. J. Biol. Chem. 237: 273.
- NUGENT, K. M. y R. M. COLE (1977). *Characterization of group H streptococcal temperate bacteriophage ϕ 227*. J. Virol. 21: 1061.
- PARSONS, C. L. y R. M. COLE (1973). *Transfection of group H streptococcus*. J. Bacteriol. 113: 1505-1506.
- RAINA, I. L. (1981). *Purification of Streptococcus group C bacteriophage lysin*. J. Bacteriol. 145: 661-663.
- RONDA, C.; R. LOPEZ; A. TOMAS y A. PORTALES (1978). *Transfection of Streptococcus pneumoniae with Bacteriophage DNA*. J. Virology 26: 221-225.
- TIJONENKO, T. I. (1977). *Biojimiia virusny chactits, M*.
- TOTOLIAN, A. A. (1960). *K izucheniiu streptococovij bakteriofagov. II. Lizogeniia u streptococov. Diapazon liticheskoi aktivnosti fagov. Vliianiie tripsina na adsorbtsionnuuu sposovnost fagov*. Ezhegodnik za 1959 g. Izd. IE M AMN CCCP L. str. 346-350.
- TOTOLIAN, A. A.; T. G. KOLIESNICHENKO y L. A. BUROVA (1977). *Transduksiia M⁺ y SOR priznakov v strptococki gruppy A*. Zh. Microbiol. Epidemiol. immunologii T.54 (12), str. 72-77.
- VEREANU, A. y F. MIHALCU (1979). *Improved lysotyping schema for group C Streptococci with new phage preparations*. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. 38: 265-272.
- WANNAMAKER, L.; S. ALMQUIST y S. SKJOLD (1973). *Intergroup phage reactions and transduction between group C and group A Streptococci*. J. Exp. Med. 137: 1338-1353.
- ZABRISKIE, J.; S. READ y S. FISHETTI (1972). *Lysogeny in streptococci*. En: Streptococci and Streptococcal Disease. L. and W. Wannamaker y J. M. Matsen (ed.). Cap. 7, Academic Press, New York and London.