

XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular

Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018



Universidad
Zaragoza



campus
iberus

Patrocinadores:



**Universidad
Zaragoza**



**campus
iberus**



**GOBIERNO
DE ARAGON**



Biomedal



VISAVET
UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018

Comite Organizador

Jesús A. Gonzalo

Grupo de Genética de Micobacterias – Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública – Universidad de Zaragoza / Campus Iberus

Carlos Martín

Grupo de Genética de Micobacterias – Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública – Universidad de Zaragoza / Campus Iberus

José A. Aínsa

Desarrollo de Antimicrobianos y Mecanismos de Resistencia – Grupo de Genética de Micobacterias – Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública – Universidad de Zaragoza / Campus Iberus

María F. Fillat

Regulación génica y fisiología de cianobacterias – Grupo de Biología Estructural – Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular – Universidad de Zaragoza / Campus Iberus

Rosa Bolea

Departamento de Patología Animal – Universidad de Zaragoza / Campus Iberus

Página web y diseño:

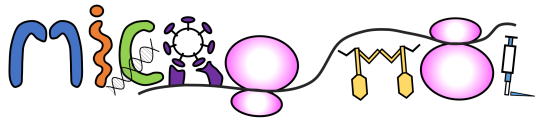
Alberto Cebollada – CIBERES - Universidad de Zaragoza / Campus Iberus



Universidad
Zaragoza



campus
iberus



XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018

Comité Científico

Por parte del Grupo de Microbiología Molecular:

Bruno González Zorn
Universidad Complutense de Madrid

Junkal Garmendia García
CSIC/UPNA/G. de Navarra; Instituto de Agrobiotecnología

Susana Campoy Sánchez
Universidad Autónoma de Barcelona

José Berenguer Carlos
Universidad Autónoma de Madrid

M^a Ángeles de la Torre Ruiz
Universidad de Lleida

Félix Sangari García
Universidad de Cantabria

Josep Casadesús
Universidad de Sevilla

José Antonio Gil Santos
Universidad de León

Adela González de la Campa
Instituto de Salud Carlos III

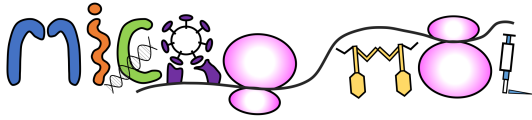
Alejandro Mira Obrador
Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Valencia

Víctor Jiménez Cid
Universidad Complutense de Madrid

Juan Alfonso Ayala Serrano
Universidad Autónoma de Madrid

José Antonio Bengoechea Alonso
Queen's University Belfast, UK

Alicia M. Muro Pastor
CSIC-Universidad Sevilla



XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018

Comité Científico

Por parte de Campus Íberus
(Campus de Excelencia Internacional del Valle del Ebro):

Jesús A. Gonzalo Asensio
Universidad de Zaragoza

Carlos Martín Montañés
Universidad de Zaragoza

José A. Aínsa Claver
Universidad de Zaragoza

María F. Fillat Castejón
Universidad de Zaragoza

Rosa Bolea Bailo
Universidad de Zaragoza

Carmen Torres Manrique
Universidad de la Rioja

Cristina Solano Goñi
Universidad Pública de Navarra

Jaione Valle Turrillas
Universidad Pública de Navarra

Íñigo Lasa Uzcudun
Universidad Pública de Navarra

Enrique Herrero Perpiñán
Universitat de Lleida



www.campusiberus.es



INFORMACIÓN PRÁCTICA

Sede de la Reunión

Todas las actividades tendrán lugar en el **Hotel Silken Reino de Aragón**, en el centro de Zaragoza:

Hotel Silken Reino de Aragón
<https://www.hoteles-silken.com/es/hotel-reino-de-aragon-zaragoza/>
Calle Coso, 80
50001 – Zaragoza
Tel: 976-468200

- Inauguración, comunicaciones orales, almuerzos:
Salón Zaragoza, planta calle
- Coffee breaks, pósteres, Beer poster session:
Terraza (1ª planta)

Pósteres

En el Programa de la Reunión, cada comunicación (orales y pósteres) lleva asociado un **número** que corresponde con el panel en el que se instalará el poster correspondiente.

Cena de clausura

La cena de clausura (Viernes 7 de septiembre 2018. 22:00) tendrá lugar en el **Restaurante Aura**, en la orilla del Ebro:

Restaurante Aura
<https://aurarestaurante.com>
Av. José Atarés, 7.
50018 Zaragoza
Tel: 976 525 480



PROGRAMA Y COMUNICACIONES ORALES

Miércoles, 5 de septiembre de 2018

15:00-17:15 Entrega de documentación y colocación de pósteres

17:15-17:45 Ceremonia de inauguración

17:45-18:45 Conferencia inaugural

Prionemia and its detection

Olivier ANDRÉOLETTI (École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France)

Presenta y modera: Rosa Bolea (Universidad de Zaragoza – Campus Iberus)

18:45-21:00 Sesión I: Patogénesis

Moderadores: Álvaro San Millán (Hospital Universitario Ramon y Cajal-IRYCIS)
Cristina Solano (Universidad Pública de Navarra – Campus Iberus)

1. Caracterización de la interacción entre las proteínas CheA y RecA y su implicación en el movimiento en enjambre de *Salmonella enterica*

Elisabet Frutos, Miquel Sánchez-Osuna, Oihane Irazoki, M. Pilar Cortés, Jordi Barbé, Susana Campoy

2. Estudio de la relación entre SseK1, un efector de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, y las proteínas diana del hospedador

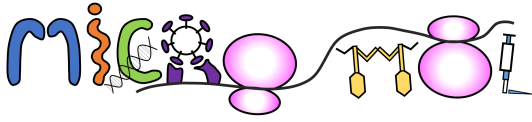
Juan Luis Araujo, Fernando Baisón Olmo, Francisco Romero, Francisco Ramos Morales

3. Studies on an ABC transport system in *Stenotrophomonas maltophilia* involved in the maintenance of outer membrane lipid asymmetry

Xavier Coves, Huedo, Pol; Daura, Xavier; Mamat, Uwe; Yero, Daniel; Gibert, Isidre

4. VtaA2 from *Haemophilus parasuis* is involved in attachment to extracellular proteins

L. García-Rodríguez, **Mar Costa-Hurtado**, V. Aragón



5. Potencial terapeutico de polifenoles de origen vegetal frente a la infección respiratoria por *Haemophilus influenzae* a través de su efecto dual antimicrobiano e inmunomodulador

Ariadna Fernández-Calvet, Begoña Euba, Lucía Caballero, Enrique Barraión-Catalán, Vicente Micol, Roberto Díez-Martínez, Junkal Garmendia

6. Common themes of gene duplications in the different *Escherichia coli* pathotypes

Manuel Bernabeu, Prieto, A., Sánchez-Herrero, J.F., Hüttener, M., Rozas, J., Juárez, A.

7. Heterogeneidad de la expresión del T3SS y del flagelo en *Pseudomonas syringae*

Nieves López-Pagán, Jose S. Rufián, Diego López-Márquez, Laurent Aussel, Javier Ruiz-Albert, y Carmen R. Beuzón

8. Aproximación multi-ómica a la biosíntesis de IAA en la bacteria fitopatógena *Pseudomonas savastanoi*

Adrián Pintado, Victoria Pastor, Miguel Cerezo, Víctor Flors, Cayo Ramos

21:00 Cóctel de bienvenida

Jueves, 6 de septiembre de 2018

9:00-11:00 Sesión II: Antimicrobianos.

Moderadores: Olga Zafra (Universidad Francisco de Vitoria)
Santiago Ramón-García (ARAID-Universidad de Zaragoza –
Campus Iberus)

9. Fighting superbugs: new promising compounds against *Helicobacter pylori*

Sandra Salillas, M. Alías, V. Michel, A. Mahía, A. Lucía, L. Rodrigues, J. Bueno, J.J. Galano, A. Velázquez-Campoy, J.A. Carrodegua, C. Sostres, J. Castillo, J.A. Aínsa, M.D. Díaz de Villegas, Á. Lanas, E. Touati, J. Sancho

10. An unexploited antimicrobial target against *Mycobacterium tuberculosis*, the FAD synthetase

Ernesto Anoz-Carbonell, Ainhoa Lucía Quintana, José Antonio Aínsa, Milagros Medina

11. Caracterización de la resistencia a colistina en aislados de *Salmonella* procedentes de ganado porcino antes de la introducción de políticas de reducción de su uso

Eloisa Sevilla, Juan P. Vico, Inmaculada Martín-Burriel, Bruno González-Zorn, Rosa Bolea, Raúl C. Mainar-Jaime



12. Detección de los genes *cfp* y *optrA* de resistencia a linezolid en *Enterococcus* y *Staphylococcus* de origen clínico y de granjas porcinas

Laura Ruiz-Ripa Laura Ruiz-Ripa, Susana Sanz, Carmen Olart, Carla Andrea Alonso, José Manuel Azcona-Gutiérrez, Carmen Aspiroz, Mar Olga Pérez-Moreno, Cristina Seral, Juan-Ignacio Alós, Luis Torres, Rosa Fernández-Fernández, Javier Castillo, Carmen Torres

13. Análisis genómico del flujo de metiltransferasas del ARNr 16S en *E. coli* resistentes a plazomicina procedentes de aguas residuales y naturales

José F. Delgado-Blas, Cristina M. Ovejero, William Calero-Cáceres, Sara Monzón, Isabel Cuesta de la Plaza, Fernando de la Cruz, María Pilar Garcillán, Maite Muniesa, Bruno Gonzalez-Zorn

14. Evolución experimental de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de ceftazidima y ceftazidima/avibactam

Fernando Sanz-García, Sara Hernando-Amado, José Luis Martínez

15. Evolución de la resistencia a antibióticos generada por inestabilidad genética en micobacterias

Alfredo Castañeda García, Isabel Martínez Blecua, Jesús Blázquez

11:00-11:30 Café y sesión de pósteres

11:30-13:45 Sesión III: Biotecnología Microbiana.

Moderadores: Silvia Blanco (CERTTEST)
Íñigo Lasa (Universidad Pública de Navarra – Campus Iberus)

16. Biolog phenotype microarray: a tool for the identification of multidrug resistance efflux pumps inducers

Paula Blanco, Fernando Corona, José Luis Martínez

17. Using attenuated mycobacteria as experimental treatment for asthma in mice models

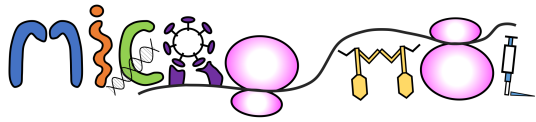
Raquel Tarancón, Santiago Uranga; Carlos Martín; Nacho Aguiló

18. Role of conjugative relaxases in DNA transfer and integration. Development of biotechnological tools

Dolores L. Guzmán-Herrador, Samuel Steiner, Anabel Alperi, Coral González-Prieto, Craig R. Roy, Matxalen Llosa

19. Influence of human fecal bacteria's secretome in the maturation of the neonatal liver and hepatic regeneration in the adult.

Joana I. Almeida, Laurens Verscheijden, Pilar Sainz-Arnal, Borja Sánchez, David Bernardo, Pedro Baptista



20. Development of *E. coli* synthetic adhesins targeting human tumor cells

Eva Pico Sánchez, Carmen Mañas Torres, Luis Ángel Fernández

21. Engineering the translocation of protein effectors and nanobodies into tumor cells by the Synthetic Injector *E. coli* (SIEC) strain

Alejandro Asensio, Beatriz Álvarez, David Ruano-Gallego, Luis Ángel Fernández

22. Engineering biofilm formation to enhance dibenzothiophene biodegradation in *Rhodococcus erythropolis*

Pedro Dorado-Morales, Igor Martínez, Eduardo Díaz, Iñigo Lasa, Cristina Solano

23. Comparación de seis métodos de procesamiento de muestras fecales para facilitar la identificación de cepas hipervirulentas de *Clostridium difficile* mediante qPCR

Eva Machetti-Mareca, Fabio César Blasco-Cerqueira, Ángela Sanz, Silvia Blanco, Francisco Javier Castillo, Cristina Seral

24. Achieving optogenetic control on bacterial amyloidogenesis

Rafael Giraldo

13:45-15:45 Almuerzo

15:45-17:00 Sesión IV: Fisiología y metabolismo.

Moderadoras: Montserrat Argandoña (Universidad de Sevilla)
 María F. Fillat (Universidad de Zaragoza – Campus Iberus)

25. The characterization of Gpm, a new phosphatase, supports the existence of a new gluconeogenic pathway in *Brucella suis* biovar 5

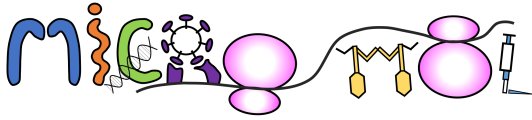
Leticia Lázaro-Antón, M^a Jesús de Miguel, Francesca Baldin, Emile Van Schaftingen, Raquel Conde-Álvarez, Pilar M. Muñoz, Maite Iriarte, Jean-Jacques Letesson, Amaia Zúñiga-Ripa, Ignacio Moriyón

26. Caracterización de las FBPasas en *Synechocystis* sp PCC 6803

Luis López Maury, Raquel M^a García-Cañas, María José Huertas, Francisco J. Florencio

27. Cerrando el ciclo de Krebs en cianobacterias. Introducción de los genes que codifican el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803

María J. Huertas, Luis López-Maury, Francisco J. Florencio



28. Membrane protein HgIK is involved in intercellular communication and nanopore formation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena*

Sergio Arévalo, Rafael Pernil, Roman Ladig, Enrico Schleiff, E. Flores

29. El desbalance del metabolismo de glucosa por inactivación génica condiciona la interacción hospedador-patógeno durante la infección respiratoria por *Haemophilus influenzae*

Nahikari López-López, Begoña Euba, Lucía Caballero, Sergio Cuesta-Ferre, Irene Rodríguez-Arce, Goiezeder Almagro, Sara Martí, José Ramos-Vivas, Roberto Díez-Martínez, Ulrike Kappler, Junkal Garmendia

17:00-17:30 Café y sesión de pósteres

17:30-19:00 Sesión V: Evolución y transferencia genética.

Moderadoras: M^a Ángeles Tormo (Instituto de Investigación Sanitaria La Fé)
Carmen Torres (Universidad de La Rioja – Campus Iberus)

30. Genome analysis of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* isolates from human infections reveals a cargo of virulence genes in lineage ST1256

Joaquín Giner-Lamia, Pablo Vinuesa, Laura Betancor, Claudia Silva, Julieta Bisio, Lorena Soleto, José A. Chabalgoity, José Luis Puente, the Salmolber CYTED Network, Francisco García-del Portillo

31. Origen y evolución de los sistemas flagelares en *Bradyrhizobium* y *Rhizobiales*

Daniel Garrido-Sanz, Miguel Redondo-Nieto, David Durán, Esther Blanco-Romero, Elias Mongiardini, Juan I. Quelas, Marta Martín, Anibal Lodeiro, Rafael Rivilla y Julia Althabegoiti

32. ICEth1 & ICEth2, two mobile genetic elements coordinated in *Thermus thermophilus* transjugation

Ignacio Baquedano, A. Blesa, M. Mencía, J. Berenguer

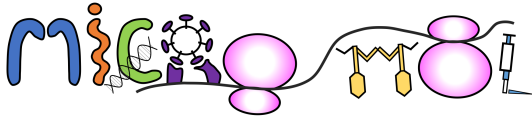
33. Regulación de la transposición de la secuencia de inserción ISPpu9 de *Pseudomonas putida* por RNAs pequeños

Guillermo Gómez-García, Fernando Rojo, Renata Moreno

34. Multicopy plasmids facilitate evolutionary innovation in bacteria

Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Craig MacLean, Rafael Peña-Miller, **Álvaro San Millán**

19:00-21:00 Beer poster session



Viernes, 7 de septiembre de 2018

9:00-11:00 Sesión VI: Regulación (I).

Moderadoras: Silvia Marqués (Estación Experimental del Zaidín-CSIC)
Jaione Valle (Universidad Pública de Navarra – Campus Iberus)

35. Análisis global de las respuestas transcripcionales a la carencia de nitrógeno en la cianobacteria *Nostoc* sp. mediante la construcción de una red de co-expresión
Manuel Brenes-Álvarez, Ana Sousa-Ortega, Jens Georg, Wolfgang R. Hess, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor

36. Nuevas implicaciones de FurC (PerR) en la modulación de la actividad de sus parálogos FurA y FurB en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120
Cristina Sarasa, Isabel Valero, María Luisa Peleato, Adrián Velázquez-Campoy, María F. Fillat, Emma Sevilla

37. Un polimorfismo en *soxR* en una cepa de *Escherichia coli* resistente al carvacrol causa expresión diferencial en genes relacionados con el estrés oxidativo
Elisa Pagán, **Diana Sancho**, Daniel Berdejo, Rafael Pagán, Diego García-Gonzalo

38. Regulation of dNTP synthesis under changing oxygenation conditions: a network perspective
Lucas Pedraz López, Eduard Torrents Serra

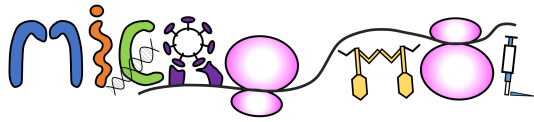
39. Nuevos aspectos en la distribución y la regulación por variación de fase de los genes *wlaN* y *cgtB* en *Campylobacter jejuni*
Pedro Guirado, Sonia Paytubi, Yaidelys Iglesias, Elisenda Miró, Ferran Navarro, Carlos Balsalobre, Cristina Madrid

40. Análisis genómico del regulón directo de FleQ en *Pseudomonas fluorescens* F113 y *Pseudomonas putida* KT2440
Esther Blanco-Romero, Miguel Redondo-Nieto, Francisco Martínez-Granero, Daniel Garrido-Sanz, Maria Isabel Ramos-González, Marta Martín, Rafael Rivilla

41. Análisis funcional del metiloma Dam en *Salmonella*
M^a Antonia Sánchez-Romero, David R. Olivenza, Ignacio Cota, Gabriel Gutiérrez, Josep Casadesús

42. A portable epigenetic switch for subpopulation formation in bacteria
David R. Olivenza, Ignacio Cota, Josep Casadesús

11:00-11:30 Café y sesión de pósteres



11:30-13:30 Sesión VII: Regulación (II).

Moderadores: M^a Trinidad Gállegos (Estación Experimental del Zaidín-CSIC)
Enric Herrero (Universitat de Lleida – Campus Iberus)

43. Characterization of the regulon of Two-component systems of *Staphylococcus aureus*

Beatriz Rapún, Andreas Haag, Begoña García, Joaquín Fernández-Irigoyen, Cristina Solano, Iñigo Lasa

44. Regulación post-transcripcional mediada por 3'UTRs en bacterias

Pilar Menéndez-Gil, Alejandro Toledo-Arana

45. Regulación especie-específica dependiente de sigma^B de la síntesis del exopolisacárido PIA/PNAG en estafilococos

Maite Echewerz, Saioa Burgui, Iñigo Lasa, Jaione Valle

46. Comparative study of *M. tuberculosis* vs *M. bovis* *in vivo* infection and the possible role of the serine/threonine kinase pknH in the regulation of their virulence phenotype

Elena Mata, Santiago Uranga, Carlos Martín, Nacho Aguiló

47. Una aproximación global basada en dual RNA-seq *in vivo* revela el papel de la competencia natural bacteriana durante la infección pulmonar por *Haemophilus influenzae*

Begoña Euba, Nahikari López-López, Lucía Caballero, Celia Gil-Campillo, Roberto Díez-Martínez, Mariette Barbier, Junkal Garmendia

48. Regulation of the cell division gene *zapB* by bile salts in *Salmonella enterica*

Rocío Fernández-Fernández, Verónica Urdaneta, Josep Casadesús

49. Patterns of bistable expression among SOS genes

Ángela Mérida-Floriano, J. Casadesús

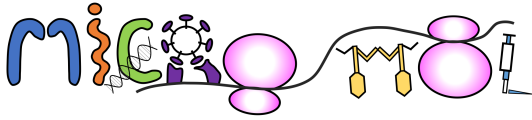
14:00-16:00 Almuerzo

16:00-17:00 Sesión de pósteres

17:00-17:15 Entrega de premios a las mejores comunicaciones

17:15-18:00 Entrega del premio Biomedal y Conferencia de Clausura

18:00-18:30 Asamblea del Grupo de Microbiología Molecular



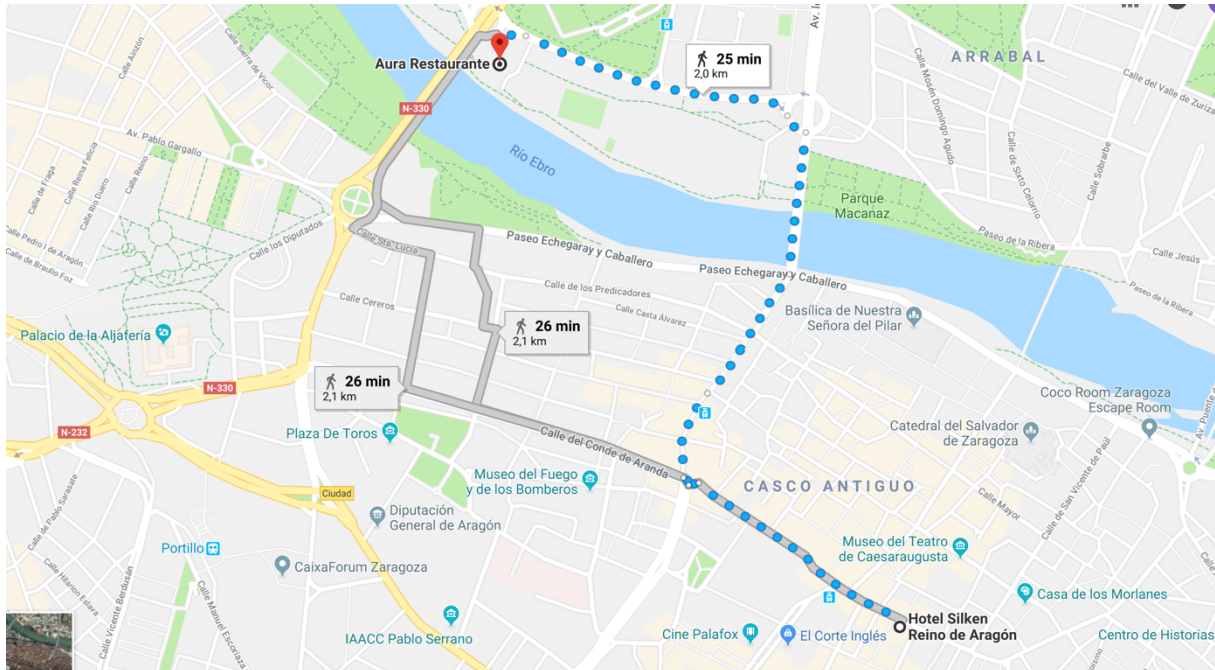
20:30-22:00 Visita turística (pendiente de confirmación)

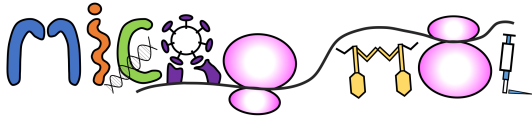
22:00 Cóctel de clausura.

Lugar: Aura Restaurante

<https://aurarestaurante.com>

Av. José Atarés, 7. 50018 Zaragoza. 976 525 480





COMUNICACIONES EN POSTER

50. Further insights into synergy between ethambutol and the circular bacteriocin AS-48 as a strategy for fighting *M. tuberculosis* infection

Clara Aguilar-Pérez, Begoña Gracia, Rubén Cebrían, Nathalie Deboosère, Ok-ryul Song, Priscille Brodin, Mercedes Maqueda, José A. Aínsa

51. Caracterización biológica de una nueva serie de compuestos químicos con actividad antimicrobiana

Raquel Alonso-Román, Ainhoa Lucía, José Antonio Aínsa, Santiago Franco, Santiago Ramón-García

52. Improving the current brucellosis vaccine Rev1: reversion of its resistance to streptomycin

Beatriz Aragón Aranda, Ignacio Moriyón Uría, and Raquel Conde Álvarez

53. Interacciones proteína-proteína *in vivo* en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*: confirmación de una red de regulación cruzada entre sistemas de dos componentes

Rosa García-Valero, Joaquín J. Nieto, Carmen Vargas y Montserrat Argandoña

54. Los plásmidos ColE1 como plataformas de captura genéticas: aumentando la plasticidad bacteriana

Manuel Ares-Arroyo, Cristina Bernabe-Balas, Jose Francisco Delgado-Blas, Gabriel Moyano, Bosco R. Matamoros, Natalia Montero y Bruno Gonzalez-Zorn

55. From the understanding to the treatment of biofilm wound infections

Aida Baelo, Marija Vukomanovic and Eduard Torrents

56. Biogénesis de centros Fe-S, daño al DNA y mecanismos de respuesta en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Jordi Pijuan, Enrique Herrero y Gemma Bellí.

57. Las secuencias de inserción como mecanismo evolutivo de adaptación plasmídica a nuevas familias bacterianas

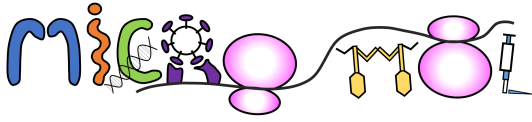
Cristina Bernabe-Balas, Manuel Ares-Arroyo, Alfonso Santos-Lopez, Andreas Hoefler, Gabriel Moyano, Jose F. Delgado-Blas, Bosco R. Matamoros, Carlos Serna-Bernaldo, Natalia Montero, Didier Mazel y Bruno Gonzalez-Zorn

58. Impacto de la aerobiosis en la actividad de Fur (Ferric uptake regulator) del patógeno anaerobio estricto *Clostridium difficile*

Ángela Fernández-Otal, Andrés González, M^a Luisa Peleato, María F. Fillat, Ángel Lanás, M^a Teresa Bes

59. Development of a new TB-HIV combined vaccine through the expression of HIV epitopes in the live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* MTBVAC

Esther Broset, Narcís Saubi, Nacho Aguiló, Carlos Martín, Joan Joseph Munné, Jesús Gonzalo-Asensio



60. Myco-MIGE: Optimization of a new powerful tool for Mycobacterial genome engineering

Calvet, Juan; Campos-Pardos, Elena; Aínsa, José A.; Martín, Carlos; Gonzalo-Asensio, Jesús

61. Towards genome remodelling in *Mycobacterium* by optimization of a minimalistic CRISPR system

Campos-Pardos, Elena; Pérez, Irene; Calvet, Juan; Martín, Carlos; Gonzalo-Asensio, Jesús

62. Elucidating the different behavior of clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains during lung infection

María del Mar Cendra and Eduard Torrents

63. Variaciones nucleotídicas en la secuencia de los terminadores de transcripción generan RNA antisentidos funcionales

Laurène Bastet, Carlos J. Caballero, Sergio Cuesta-Ferre, Leticia Matilla, Maite Villanueva, Iñigo Lasa y Alejandro Toledo-Arana

64. Identificación del papel de los distintos Sistemas de Secreción de Tipo VI (T6SSs) presentes en *Pseudomonas fluorescens* F113

David Durán, Rafael Rivilla, Marta Martín

65. Estudios iniciales para la caracterización del modo de acción molecular de las avermectinas como agentes anti-tuberculosos

Ezquerro, José Manuel; Millán, Ana Cristina; Lucía, Ainhoa; Aínsa, José Antonio; Ramón-García, Santiago

66. Explorando la capacidad de las proteínas FUR(ferric uptake regulator) de la cianobacteria *Anabaena* para aumentar la tolerancia de levaduras a estreses abióticos

Violeta C. Sein-Echaluze, María Luisa Peleato, M. Teresa Bes, María V. Barja, José Miguel Mulet y María F. Fillat

67. FleQ de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, un regulador multifuncional

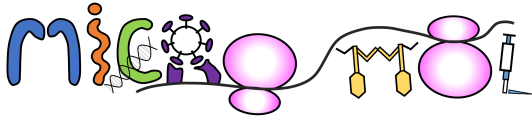
M^a Trini Gallegos, Antonia Felipe, M^a Dolores Ferreiro, Harold A. Prada-Ramírez y Daniel Pérez-Mendoza

68. Estudio genómico comparativo del plásmido pMUM001 de *Mycobacterium ulcerans*

Airam Pedro Benitez, Fernando Lázaro, Carmelo Benítez y María Jesús García

69. Caracterización del genoma de una posible nueva especie del género *Mycobacterium*

Carolina Cárdenas, Ana Vicente, María del Carmen Menéndez, Jesús Mingorance y María Jesús García



70. Development of a high-throughput method for synergistic drug combinations screening

Gómara, Marta; Aínsa, José A.; and Ramón-García, Santiago

71. Profiling 16S rRNA of microbial components of visible colonies that grow in Altamira Cave

Candela González-Riancho, Mónica Molina, M^a Cruz Rodriguez González and Juan M^a García Lobo

72. Biodegradación de isómeros del hexaclorociclohexano por la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

Jorge Guío, Sara Abizanda, María F. Fillat, Emma Sevilla and María Luisa Peleato

73. Global analysis of the gene expression mediated by AHL and DSF quorum sensing signals in *Stenotrophomonas maltophilia* reveal key components involved in DSF turnover

Pol Huedo, Xavier Coves, Daniel Yero, Xavier Daura, Isidre Gibert

74. Efficacy of chitosan-based nanoformulation of daptomycin against *Staphylococcus aureus*

Ainhoa Lucía, Laura De Matteis, Joanna Empel, Sonia García-Embid, Abdessalem Rekiki, Aurore Gaudin, Daniel Pérez, Waleria Hryniewicz, Andrea Tamellini, Jesús Martínez de la Fuente, Jose Antonio Aínsa

75. RedR1 and RedR2 belonging to the NtrC family are 97% identical but are controlled by opposed mechanisms to activated transcription from three σ^{54} -dependent promoters

Daniel Pacheco-Sánchez, Patricia Marín and Silvia Marqués.

76. AmrZ regula los niveles de di-GMPc en respuesta a las condiciones ambientales en *Pseudomonas fluorescens* F113

C. Muriel, E. Arrebola, M. Redondo-Nieto, F. Martínez-Granero, B. Jalvo, S. Pfeilmeier, E. Blanco-Romero, I. Baena, J. G. Malone, R. Rivilla y M. Martín

77. Análisis integrativo de datos ómicos para el estudio de la adaptación metabólica en respuesta a la salinidad y temperatura de la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*

Lourdes Martínez-Martínez, Francine Piubeli, Montserrat Argandoña, Manuel Salvador, Carmen Vargas y Joaquín. J. Nieto

78. Ribosome profiling revela asociación entre las metiltransferasas del ARNr 16S adquiridas y la motilidad bacteriana

Bosco R. Matamoros, Andreas Hoefler, Dorota Klepacki, Nora Vázquez-Laslop, Alexander S. Mankin, Bruno Gonzalez-Zorn

79. Estudio de las propiedades amiloides de la familia de proteína BAP

Leticia Matilla, Agustina Taglialegna, Iñigo Lasa and Jaione Valle



80. Molecular characterization of a ferredoxin-NADP⁺ reductase from the *Brucella ovis* pathogen

Marta Martínez-Júlvez, Víctor Taleb, Daniel Pérez-Amigot, Ernesto Anoz-Carbonel, María Sebastián, Sergio Boneta, Víctor Polo and Milagros Medina

81. Preliminary studies to elucidate the mode of action of a new chemical series with antimicrobial activity

Millán, Ana Cristina; Ezquerro, José Manuel; Lucía Quintana, Ainhoa; Aínsa, José Antonio; Ramón-García, Santiago

82. Detección y caracterización de *S. aureus* del linaje CC398 en muestras cárnicas de La Rioja. Genotipos de resistencia y virulencia y marcadores de adaptación al huésped.

Liliana Morales, Olouwafemi Mama, Laura Ruiz-Ripa, Rosa Fernández-Fernández, Sara Ceballos, Carmen Torres

83. Nuevas aproximaciones para la lucha contra la resistencia a antibióticos: del gen al animal

Gabriel Moyano, Bosco R. Matamoros, Natalia Montero y Bruno Gonzalez-Zorn

84. RNAs reguladores que se expresan específicamente en heterocistos

Elvira Olmedo-Verd, Manuel Brenes-Álvarez, Marina Minguet, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor

85. Homeostasis del hierro y síntesis de ectoínas en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*: determinación de los regulones de los reguladores globales Fur1 y Fur2 mediante ChIP-seq

Emilia Naranjo, Joaquín J. Nieto, Alberto Danielli, Carmen Vargas y Montserrat Argandoña

86. Flavivirus as probes to study *Brucella* effector proteins

Yelina Ortiz Pérez and Félix J. Sangari García

87. Rational construction of attenuated vaccines against TB based in *phoP/fadD26* gene deletions

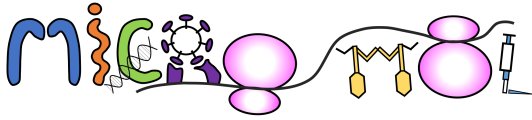
Irene Pérez, Santiago Uranga, Nacho Aguiló, Carlos Martín and Jesús Gonzalo-Asensio

88. Establecimiento de la huella genética de variedades de *Agaricus bisporus* mediante AFLP

Estela Pérez-Lago, Olga Zafra, Raquel Francisco-Álvarez, Daniel García, Cruz Santos

89. Construcción de un modelo transcripcional y traduccional a escala genómica de la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens* para optimizar la producción de ectoínas

Francine Piubeli, Lourdes Martínez-Martínez, Joaquín J. Nieto, Montserrat Argandoña y Carmen Vargas



90. Expression of a novel class of bacterial Ig-like proteins by IncHI resistance plasmids

Hüttener, M., Prieto, A., Bernabeu, M., Aznar, S., Glaria, E., Valledor, A., and Juárez, A

91. Anthelmintic avermectins for the treatment of non-tuberculous mycobacteria infections in cystic fibrosis

Lara Muñoz Muñoz, and Santiago Ramón-García

92. Una vacuna viva de *Salmonella* que inyecta el antígeno PcrV a través de un sistema de secreción tipo III protege contra *Pseudomonas aeruginosa*

Julia Aguilera Herce, Meritxell García Quintanilla, Rocío Romero Flores, Michael J. McConnell, Francisco Ramos Morales

93. Estudio del transcriptoma de *Pseudomonas fluorescens* F113. Relevancia de factores externos e internos en el mapa transcripcional

Miguel Redondo-Nieto, Francisco Martínez-Granero, Rafael Rivilla, Marta Martín

94. Metagenomic analysis of a soil PCB-degrading microbial

Garrido-Sanz D., Manzano J., Martín M., Redondo-Nieto M., Rivilla R

95. The essential response regulator *ArsR* from *Helicobacter pylori* as target for novel potential antimicrobial drugs

Andrés González, Sandra Salillas, Adrián Velázquez-Campoy, José A. Aínsa, María F. Fillat, Javier Sancho, Ángel Lanas

96. WadD, a new *Brucella* lipopolysaccharide core glycosyltransferase identified by genomic search and phenotypic characterization

Miriam Salvador-Bescós, Yolanda Gil-Ramírez, Amaia Zúñiga-Ripa, Estrella Martínez-Gómez, María J. de Miguel, Pilar M. Muñoz, Axel Cloeckert, Michel S. Zygmunt, Ignacio Moriyón, Maite Iriarte, Raquel Conde-Álvarez

97. Tuberculosis debida a *Mycobacterium africanum* en Aragón en los últimos 12 años ¿Hay transmisión en nuestra población?

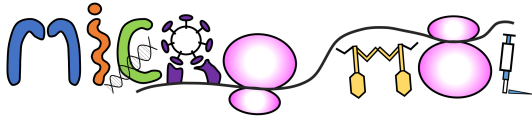
Isabel Otaí, María Luisa Monforte, Daniel Ibarz, Alberto Cebollada, María Asunción Vitoria, Luis Torres, María José Iglesias, Sofía Samper por la Red de Estudio Molecular de la Tuberculosis en Aragón.

98. Avances en la caracterización de los factores que modulan la síntesis de exopolisacáridos en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

Andrés Sandoval, Cristina Sarasa, María Luisa Peleato, María F. Fillat, Emma Sevilla and Andrés González

99. Impacto global de la sobreexpresión de la proteína FurC (PerR) en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

Emma Sevilla, Cristina Sarasa, Andrés González, María Luisa Peleato and María F. Fillat



100. La expresión de dos de las tres CSPs de *Staphylococcus aureus* está regulada por 5'UTRs-termosensoras

Arancha Catalán-Moreno y Alejandro Toledo-Arana

101. Endolisinas procedentes de bacteriófagos de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*: una posible alternativa al tratamiento antibiótico

Patricia Bernabe-Quispe, Mercedes Cervera-Alamar, Leticia Ortí, Katerina Guzman-Markevich, Antonio Pineda-Lucena y María Ángeles Tormo-Mas

102. Mecanismo de movilización de las islas de patogenicidad por fagos endógenos en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*

Mercedes Cervera-Alamar, Katerina Guzman-Markevich, Migle Ziemyte, Javier Pemán y María Ángeles Tormo-Mas

103. Artificial analogues of antimicrobial peptides: synergetic activity of nano-gold simultaneously functionalized with different amino acids

Marija Vukomanovic and Eduard Torrents

104. Aerobic vitamin B₁₂ biosynthesis is essential for *Pseudomonas aeruginosa* class II ribonucleotide reductase activity during planktonic and biofilm growth

Anna Crespo, Núria Blanco-Cabra and Eduard Torrents

105. Genómica comparativa de aislados de *S. aureus* CC398 (MRSA y MSSA) que colonizan simultáneamente personal con contacto profesional con ganado porcino ¿Distintos estadios evolutivos del linaje CC398?

Paula Gómez, Carmen Aspiroz, Nazreen F. Hadjirin, Daniel Benito, Myriam Zarazaga, Mark A. Holmes, Carmen Torres

106. Design of thermosensitive promoters for the expression of toxic proteins at high temperatures

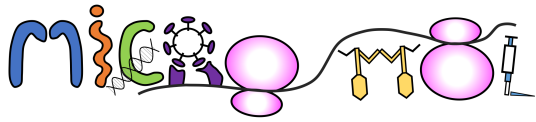
C. Verdú, J. Berenguer, M. Mencía

107. Genotipado y caracterización molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemos

Olga Zafra, Manuel Palacios, Alba Blesa, Estela Pérez-Lago, Cruz Santos

108. The fast-growing *Brucella suis* 513 depends on the gluconeogenic synthesis of phosphoenolpyruvate but not on the catabolism of 6C and 5C substrates for virulence

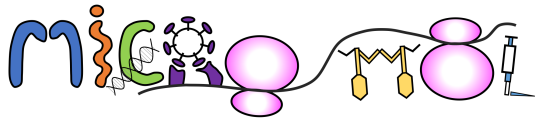
Amaia Zúñiga-Ripa, Leticia Lázaro-Antón, Thibault Barbier, M^a Jesús de Miguel, Raquel Conde-Álvarez, Pilar M. Muñoz, Jean J. Letesson, Maite Iriarte and Ignacio Moriyón



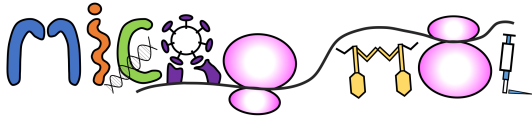
XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

(oral y póster)



XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018



Caracterización de la interacción entre las proteínas CheA y RecA y su implicación en el movimiento en enjambre de *Salmonella enterica*

Elisabet Frutos, Miquel Sánchez-Osuna, Oihane Irazoki, M. Pilar Cortés, Jordi Barbé y Susana Campoy

Grup de Microbiologia Molecular, Departament de Genètica i de Microbiologia,
Universitat Autònoma de Barcelona.

El movimiento en enjambre, también conocido como *swarming*, es un movimiento poblacional especializado y altamente coordinado que desplaza la colonia bacteriana por la superficie y que está asociado con la virulencia bacteriana y con el incremento de la resistencia a antibióticos de las bacterias que están en movimiento.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado en trabajos anteriores que, en algunos patógenos como *Salmonella enterica*, este movimiento está estrechamente relacionado con la interacción entre la proteína RecA, que además de ser la recombinasa principal de la célula, es también la proteína encargada de activar el sistema SOS, una respuesta génica global frente a lesiones en el DNA, y la proteína CheW, que se encarga de acoplar los receptores de quimiotaxis con la cadena de fosforilación responsable de los cambios de giro del flagelo y de la estructuración de las agrupaciones polares de quimiorreceptores, que son esenciales para el movimiento de *swarming*.

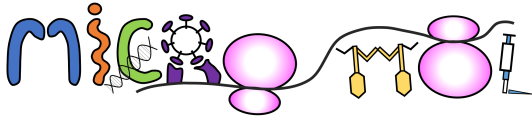
En el presente trabajo se ha determinado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, que RecA no sólo interacciona con CheW sino que también lo hace con la proteína CheA, una histidina quinasa que tiene un papel central en la respuesta quimiotáctica.

Además, partiendo de las estructuras tridimensionales resueltas existentes en las bases de datos para ambas proteínas, se han realizado estudios de modelaje, identificando los posibles residuos que podrían estar involucrados en dicha interacción. Estos modelos se han corroborado mediante mutagénesis dirigida de *recA* y *cheA* verificando la capacidad de interacción de las proteínas recombinantes generadas. Por otro lado, y mediante ensayos *in vivo*, se ha evaluado la implicación de la interacción entre ambas proteínas en el movimiento en enjambre.

Los resultados obtenidos no sólo han permitido determinar las características de la interacción entre las proteínas RecA y CheA, sino que también permiten hipotetizar sobre el posible encaje de dicha interacción en la estructuración de los quimiorreceptores de *S. enterica*, en los que además de CheW y CheA, RecA parece tener también un papel crucial.

En este estudio se pretende ver con más detalle el papel de RecA en estos complejos estudiando también con profundidad la interacción con CheA, confirmada en el presente trabajo mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y co-localización por microscopía STED (del inglés, *Stimulated Emission Depletion*). Por técnicas de co-inmunoprecipitación también se determinan las regiones de interacción entre proteínas recombinantes RecA y CheA mutantes para determinados residuos producidos por mutagénesis directa. Estas pruebas se complementan con ensayos de motilidad para demostrar de forma *in vivo* la implicación de las mutaciones de estudio. Además, se determinan las constantes de disociación de RecA con CheA y CheW para establecer con qué proteína tiene mayor afinidad.

Con todas estas pruebas se pretende entender la importancia de estas interacciones en el control de la motilidad bacteriana.



Estudio de la relación entre SseK1, un efector de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium, y las proteínas diana del hospedador

Juan Luis Araujo Garrido^a, Fernando Baisón Olmo^a, Francisco Romero^b, Francisco Ramos Morales^a

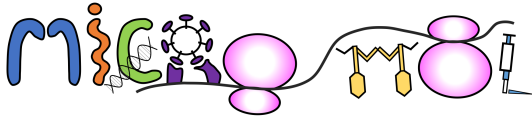
^aDepartamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

^bDepartamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

SseK1 es una proteína de *Salmonella* involucrada en el proceso de infección. Se trata de un efector que puede translocarse a las células hospedadoras tanto a través del sistema de secreción tipo III codificado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* como a través del codificado en la isla de patogenicidad 2. SseK1 pertenece a una familia de efectores que poseen actividad transferasa de N-acetilglucosamina a residuos de arginina de ciertas proteínas del hospedador.

El objetivo de este trabajo ha sido la detección de nuevas proteínas del hospedador que pudieran ser dianas de SseK1. Para ello se ha realizado un escrutinio de una genoteca de ADNc humano mediante el método del doble híbrido en levaduras. Esto nos ha permitido detectar varias proteínas candidatas. Para confirmar las interacciones de algunas de ellas se han utilizado dos técnicas adicionales. Por un lado, se han purificado por afinidad las proteínas de interés en fusión con glutatión-S-transferasa y se ha analizado su copurificación con SseK1 etiquetada con el epitopo 3xFLAG. Por otro lado, se han coimmunoprecipitado la proteína SseK1-3xFLAG y las proteínas humanas etiquetadas con el epitopo HA después de expresarlas simultáneamente en células epiteliales humanas HeLa. Por último, se ha estudiado la posibilidad de que las proteínas humanas analizadas pudieran ser sustratos de la actividad enzimática de SseK1

Financiación: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, SAF2013-46229-R y SAF2016-75365-R



Studies on an ABC transport system in *Stenotrophomonas maltophilia* involved in the maintenance of outer membrane lipid asymmetry

Coves, Xavier^{1,2}; Huedo, Pol¹; Daura, Xavier^{1,3}; Mamat, Uwe⁴; Yero, Daniel^{1,2}; Gibert, Isidre^{1,2}

¹ Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

² Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain

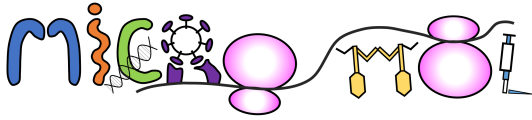
⁴ Cellular Microbiology, Priority Research Area Infections, Research Center Borstel, Borstel, Germany

Stenotrophomonas maltophilia is a ubiquitous environmental bacterium. However, it has been considered as an emerging multi-drug resistant nosocomial pathogen. Like in many other Gram-negative organisms, the outer membrane (OM) of *S. maltophilia* acts as a selective barrier, protecting the cells from antimicrobial molecules. In contrast to the inner membrane phospholipid (PL) bilayer, the OM is asymmetrically organized, with PLs in the inner leaflet and lipopolysaccharides in the outer leaflet. Some perturbations of the OM can force a migration of the inner leaflet PLs to the outer leaflet, leading to the formation of PL bilayer patches and, consequently, an impaired barrier function proven to be detrimental to the cells.

In this work, an ABC transport system (MlaABCDEF) predicted to maintain OM asymmetry in *S. maltophilia* K279a was studied. Markerless deletion mutants in components of this system were constructed by using a mutagenesis strategy based on the homing endonuclease I-SceI system (pGPI-SceI/pDAI-SceI-SacB). Complementation of the mutations was achieved by cloning of the corresponding wild-type alleles into the pBBR1-MCS1 vector.

Overall, disruption of the Mla system in *S. maltophilia* is associated with pleiotropic effects. The bacterial cells turned out to be more susceptible to polymyxins, minocycline, surfactants and membrane permeabilizing agents, as investigated by broth microdilution methods. Although cells exhibited normal growth, biofilm formation was reduced under static conditions, as observed by confocal microscopy of both monoculture and multispecies biofilms with *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, twitching motility was affected in Mla-defective cells. As seen by both transmission and scanning electron microscopy, cell morphology of the mutants was altered in the presence of EDTA, inducing the formation of spheroplasts-like cell forms and slightly increased release of OM vesicles. All complemented strains showed reversion to wild-type phenotypes. Finally, to identify possible ligands for this ABC transporter, the periplasmic component MlaC was purified after heterologous expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and subjected to mass spectrometric analyses, revealing that it can bind common bacterial PLs.

Altogether, we provide evidence that the Mla system in *S. maltophilia* is required for regulating antibiotic resistance and virulence related phenotypes, which could be exploited in the development of future antimicrobial drugs.



VtaA2 from *Haemophilus parasuis* is involved in attachment to extracellular proteins

L. García-Rodríguez, M. Costa-Hurtado and V. Aragon

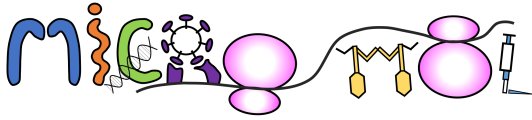
IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Haemophilus parasuis is part of the microbiota of the upper respiratory tract in swine. However, virulent strains can cause a systemic disease known as Glässer's disease. Several virulence factors have been described in *H. parasuis*, including the virulence-associated trimeric autotransporters or VtaA. VtaA2 was selected, among other VtaAs from virulent strains of *H. parasuis*, for functional evaluation by expression in *Escherichia coli*.

Gene *vtaA2* was cloned with its native promotor region in pACYC184, and the transformed *Echerichia coli* was used to perform functional *in vitro* assays. Biofilm formation was tested on plastic, mucin, BSA, fibronectin, collagen and plasma using a microtiter plate assay. Cell adhesion experiments were performed with the alveolar epithelial cell line A549. Serum resistance was assayed with rabbit serum. Phagocytosis resistance was determined by incubation with primary alveolar macrophages and analyzed by flow cytometry. *E. coli* with empty pACYC184 was used as a control.

A role of VtaA2 in attachment and biofilm formation was observed on plastic, mucin, BSA, fibronectin and collagen. As other VtaA from *H. parasuis*, the passenger domain of VtaA2 contains collagen domains. In order to examine the contribution of the collagen domains to VtaA2 function, a recombinant *vtaA2* without the central fragment that encodes for those domains was obtained and named *vtaA2OL*. VtaA2OL was studied in the same *E. coli* background as VtaA2. VtaA2OL showed similar capacity than VtaA2 to adhere to plastic, mucin, BSA, fibronectin and plasma. However, VtaA2OL showed a reduced capacity to attach to collagen, suggesting that the collagen domains of VtaA2 are essential for collagen attachment. No function in cell adhesion and serum or phagocytosis resistance was found for VtaA2.

In this study we demonstrate the role in attachment and biofilm formation of VtaA2, including adhesion to fibronectin and to collagen, being the latter, affected when collagen regions of VtaA2 are removed. We propose that VtaA2 plays a role in pathogenicity as an adherence mediator to the host by binding to mucin in the respiratory tract, but also to extracellular matrix proteins, and more specifically to collagen, in the connective tissue of systemic sites.

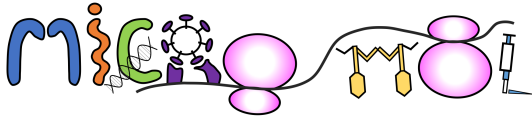


Potencial terapéutico de polifenoles de origen vegetal frente a la infección respiratoria por *Haemophilus influenzae* a través de su efecto dual antimicrobiano e inmunomodulador

Ariadna Fernández-Calvet¹, Begoña Euba^{1,2}, Lucía Caballero¹, Enrique Barrajón-Catalán³, Vicente Micol³, Roberto Díez-Martínez⁴, Junkal Garmendia^{1,2}

¹ Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), CSIC-Universidad Pública Navarra-Gobierno de Navarra; ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES); ³ Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), Universidad Miguel Hernández (UMH); ⁴ Ikan Biotech SL, The Zebrafish Lab, Centro Europeo de Empresas e Innovación de Navarra (CEIN).
E-mail: ariadna.fernandez@unavarra.es

Los polifenoles son metabolitos secundarios producidos por las plantas en situaciones de estrés como mecanismo de adaptación y defensa. Con frecuencia, los polifenoles de origen vegetal son detectados y tienen actividad señalizadora en organismos superiores, favoreciendo su pre-adaptación a situaciones de estrés, concepto conocido como *hormesis entre especies* o *xenohormesis*. Así, los polifenoles vegetales ingeridos a través de la dieta pueden presentar propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras con potencial terapéutico. Además, algunos compuestos polifenólicos poseen propiedades bactericidas, lo que los sitúa como alternativas terapéuticas al uso de antibióticos convencionales. Un cuadro pato-fisiológico donde el uso de terapias con dualidad antibacteriana e inmunomoduladora tiene claro interés clínico es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Las lesiones típicas de esta enfermedad son consecuencia de la inflamación persistente y el estrés oxidativo, y los pacientes EPOC sufren infecciones frecuentes por patógenos respiratorios que provocan periodos de agudización de los síntomas (exacerbaciones) que requieren hospitalización. Un patógeno oportunista frecuentemente aislado de muestras clínicas de pacientes EPOC es la bacteria Gram negativa *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi), causante de infección pulmonar persistente asociada a la progresión de la EPOC. En este contexto, la administración de terapias destinadas a reducir la inflamación basal y la infección persistente resulta muy conveniente, y la explotación terapéutica de moléculas con este tipo de dualidad funcional es pertinente. En este trabajo, se realizó un escrutinio del efecto de un papel de extractos vegetales con composición polifenólica conocida frente a *H. influenzae*, identificando el efecto bactericida del extracto de *Cistus salviifolius*. El efecto de los polifenoles incluidos en este extracto fue analizado frente a un panel de aislados clínicos de *H. influenzae*, en relación a su (i) capacidad bactericida-bacteriostática, (ii) aparición de resistencias, (iii) sinergia entre ellos, (iv) sinergia con antibióticos β -lactámicos y macrólidos, (v) modulación de la respuesta inflamatoria en epitelio respiratorio en respuesta a la infección, (vi) toxicidad en un modelo de embrión de pez cebra. Los resultados obtenidos identificaron un polifenol natural con capacidad bactericida, baja CMI, ausencia de aparición de resistencia, y potente efecto antiinflamatorio, seleccionado para su validación preclínica frente a *H. influenzae*.



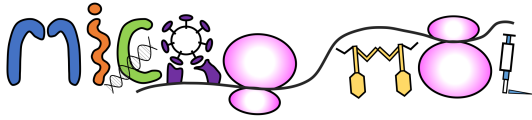
Common themes of gene duplications in the different *Escherichia coli* pathotypes

Bernabeu¹, M., Prieto¹, A., Sánchez-Herrero¹, J.F., Hüttener¹, M., Rozas¹, J. and Juárez¹, A.

¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Bacterial nucleoid associated proteins play relevant roles in the regulation of gene expression. Most enterobacteria encode, in addition to the *hns* and *hha* genes, paralogues of both (the *stpA* and *ydgT* genes respectively). In a recent report we noticed that the genome of the enteroaggregative *E. coli* (EAEC) strain 042 includes, in addition to the *hha* and *ydgT* genes, two additional paralogues, that we termed *hha2* and *hha3*. The presence of *hha2/hha3* genes is linked to pathogenic *E. coli* isolates belonging to a wide range of pathotypes, from entero- to uropathogenic.

To better understand the biological role of *hha2/hha3*, we decided to assess if their presence is linked to other genes, hypothetically those that should be targeted by them. We used the PancoreTool software to compare the genomes of four strains expressing *hha2/hha3* with those from four strains that do not express them. Strains expressing *hha2/hha3* also express the gene cluster *yeeR aec69 aec70*, which maps next to *flu*, the gene that codes for the outer membrane protein Ag43. *yeeR* codes for a putative transmembrane protein, and the *aec69* for a protein (IrmA) whose structure mimics the human cytokine receptors. As observed for *hha2/hha3*, *yeeR aec69 aec70* is encoded in a wide variety of *E. coli* isolates that belong to several pathotypes. Remarkably, the EAEC strain 042 and some others contain two or more copies of the *yeeR aec69 aec70* cluster. The fact that strain 042 contains four *hha* paralogues and two copies of the *yeeR aec69 aec70* has prompted us to investigate the extent of the gene duplications in the 042 genome. Using the RefSeq (GCA_000027125) from *E. coli* 042 and performing BlastP (all-vs-all protein similarity criteria), we identified duplicated proteins when they fulfil all the following parameters: >85% similarity, >85% alignment length and e-value < 10e-10. Out of some individual genes encoding transposases, three main regions (47,1 kb; 17,8 kb and 10 kb respectively) are duplicated in the 042 genome. Region 2 includes the *yeeR aec69 aec70* cluster. Further analyses have shown that the duplication of region 2 is widespread in most *E. coli* pathotypes.



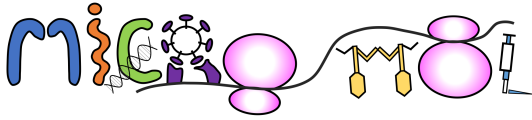
Heterogeneidad de la expresión del T3SS y del flagelo en *Pseudomonas syringae*

Nieves López-Pagán, Jose S. Rufián, Diego López-Márquez, Laurent Aussel, Javier Ruiz-Albert, y Carmen R. Beuzón

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. 29071, Málaga

²Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR, 7283, IMM, Marseille, France

La heterogeneidad o variación fenotípica en bacterias es un fenómeno descrito en poblaciones clonales desde hace décadas. Puede estar determinada por mecanismos epigenéticos, y dar lugar a linajes bacterianos con perfiles de expresión génica diferentes. Bajo el control de ciertos circuitos regulatorios, la heterogeneidad en la expresión génica puede dar lugar a un perfil de expresión bimodal en ambientes homogéneos, proceso conocido como biestabilidad. La relevancia de este proceso se ha demostrado en *Salmonella entérica* y en otros patógenos humanos durante el establecimiento de la resistencia a antibióticos, y se ha observado la implicación de este proceso en la expresión de genes de virulencia. *Pseudomonas syringae* es una bacteria fitopatógena cuya virulencia depende del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS). Mediante fusiones transcripcionales a proteínas fluorescentes en el genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* nuestro equipo ha descrito que genes de diferentes elementos del T3SS muestran biestabilidad en condiciones de inducción en el laboratorio. Además, las subpoblaciones bacterianas separadas según niveles de expresión muestran diferencias en virulencia, y dicha expresión es marcadamente heterogénea durante la colonización de los tejidos de la planta. Por otro lado, el flagelo es otro elemento importante tanto en el estilo de vida de *P. syringae* como en su interacción con el huésped, donde dispara inmunidad basal. Hemos observado que *fliC* el gen que codifica para la flagelina presenta expresión heterogénea, en este caso tanto en cultivos de laboratorio, como durante la proliferación en los espacios intercelulares de la hoja huésped. Dado que resultados previos de nuestro y otros laboratorios indican la existencia de un cierto grado de contra-regulación entre el flagelo y el T3SS, se pretende profundizar en la relación entre la motilidad flagelar y la regulación de la expresión génica del T3SS, así como en el impacto potencial que la expresión biestable del T3SS puede tener sobre la motilidad.



Aproximación multi-ómica a la biosíntesis de IAA en la bacteria fitopatógena *Pseudomonas savastanoi*

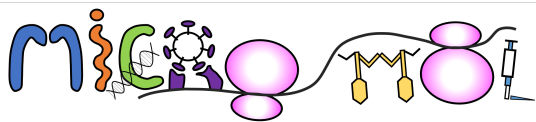
Adrián Pintado¹, Victoria Pastor², Miguel Cerezo², Víctor Flors², Cayo Ramos¹

¹ Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga-CSIC, Área de Genética, Campus de Teatinos, 29010. E-mail: crr@uma.es

² Metabolic Integration and Cell Signalling Group, Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I (UJI), Campus del Riu Sec, E-12071-Castelló de la Plana, España E-mail: flors@uji.es

Las cepas de *Pseudomonas savastanoi* productoras de tumores o excrecencias en las partes aéreas de plantas leñosas, pertenecen al complejo *Pseudomonas syringae* y se incluyen en los patovares savastanoi (Psv, olivo), nerii (Psn, adelfa), retacarpa (Psr, retama) y fraxini (Psf, fresno). La mayoría de estas cepas producen ácido indol-3-acético (IAA) desde el triptófano (Trp) a través de la ruta de la indol-3-acetamida (operón *iaaMH*). Aunque este operón no se codifica en Psv ni es frecuente en este complejo bacteriano, la mayoría de las cepas contienen uno o varios alelos del gen *iaaL*, responsable en cepas de Psn de la síntesis de IAA-Lys, un derivado con menor actividad biológica que el IAA. Aunque las cepas de Psv codifican dos alelos del gen *iaaL*, no se ha detectado IAA-Lys en cultivos de estas cepas. Resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que un mutante de Psv $\Delta iaaMH$ reduce drásticamente los niveles de IAA y no induce tumores en olivo. No obstante, en el sobrenadante de cultivos de esta cepa se detecta una concentración de IAA similar a la producida por cepas de Psf y otras *P. syringae* carentes de estos genes. Estos resultados sugieren la existencia de una ruta de biosíntesis de IAA alternativa. Con el fin de identificar dicha ruta y conocer el papel de los diversos alelos *iaaL* en estas cepas, hemos realizado un análisis genómico comparativo de 10 cepas de *P. savastanoi*, y se están construyendo mutantes de Psv en genes potencialmente implicados en la biosíntesis de IAA. De manera complementaria, estamos comparando los transcriptomas y metabolomas de una cepa silvestre de Psv y del mutante $\Delta iaaMH$, tanto en presencia como en ausencia de Trp. Hasta la fecha, hemos detectado varios intermediarios indólicos posiblemente implicados en la producción de IAA en estas cepas y en el patógeno de tomate *P. syringae* DC3000. Asimismo, estamos ensayando la funcionalidad de cuatro alelos *iaaL* diferentes mediante expresión heteróloga en Psv y análisis del efecto de estas cepas sobre la elongación de raíces de *Arabidopsis*.

Financiado por AGL2014-53242-C2-1-R y AGL2017-82492-C2-1-R (MINECO-FEDER).



Fighting superbugs: new promising compounds against *Helicobacter pylori*

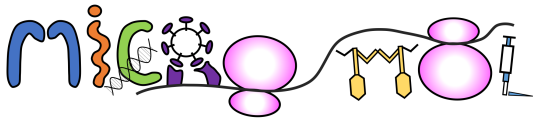
S. Salillas^{1,2,3*}, M. Alías^{1,2}, V. Michel⁴, A. Mahía^{1,2,3}, A. Lucía^{3,5,6}, L. Rodrigues^{3,5,6,7},
J. Bueno⁵, J. J. Galano^{1,2,3}, A. Velázquez-Campoy^{1,2,3,7}, J. A. Carrodeguas^{1,2,3}, C.
Sostres³, J. Castillo⁵, J. A. Aínsa^{1,3,5,6}, M. D. Díaz de Villegas⁸, Á. Lanas³, E. Touati⁴,
J. Sancho^{1,2,3}

¹Biocomputation and Complex Systems Physics Institute (BIFI)-Joint Units: BIFI-IQFR (CSIC) and GBsC-CSIC, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain ³Aragon Health Research Institute (IIS Aragón), CIBERehd, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ⁴Helicobacter Pathogenesis Unit, CNRS ERL6002, Department of Microbiology, Institut Pasteur, 25-28 Rue du Dr. Roux, Paris, France, ⁵Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ⁶CIBER de Enfermedades Respiratorias-CIBERES, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁷Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), Zaragoza, Spain, ⁸Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH), CSIC - Universidad de Zaragoza, Departamento de Química Orgánica, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

* Correspondence: sandrasb @unizar.es

The increasing prevalence of antibiotic-resistant bacteria has become a global health concern worldwide. It has been estimated that by 2050, if successful treatments against resistant microorganisms are not discovered, these infections will kill ten million people annually -more than the current deaths recorded for cancer-. *Helicobacter pylori* (*Hp*) is one of the twelve antibiotic-resistant bacteria listed by the World Health Organization (WHO) to constitute a threat to human health [1]. This bacterium is the main cause of chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer all over the world, and it has been classified as a group I carcinogen by the WHO. Conventional therapy to treat this infection accomplishes middling success rates due to the increasing resistance of *Hp* to clarithromycin and metronidazole, so new therapeutics, which do not ideally perturb the human microbiota, are required [2]. Accordingly, the flavodoxin from *Hp* (*Hp*-Fld), which is involved in an essential process for *Hp* viability, has been identified as a possible target for the development of new selective antibiotics against this bacterium. In a previous work of the group, several molecules were identified as *Hp*-Fld inhibitors [3, 4]. By modifying some of its functional groups, we have tried to improve its efficacy, toxicity and biophysical properties. The *in vitro* (against three reference *Hp* strains) and *in vivo* (in *Hp*-infected mice) activity assays revealed the antimicrobial potential of some of the new developed compounds against *Hp*. We are now studying the mechanism of action and the pharmacokinetic properties of the best ones and developing new derivatives with higher solubility in order to obtain new specific and improved antibiotics against *Hp*.

[1] Tacconelli E., *et al. Lancet Infect Dis* 2018; 18: 318-327. [2] Malfertheiner P., *et al. Gut*. 2012; 61 (5): 646-664. [3] Cremades N., *et al. ACS Chem Biol* 2009; 4 (11): 928-938. [4] Galano J. J., *et al. J Med Chem* 2013; 56: 6248-6258.



An unexploited antimicrobial target against *Mycobacterium tuberculosis*, the FAD synthetase

Ernesto Anoz-Carbonell^{1,2,3}, Ainhoa Lucía Quintana³, José Antonio Aínsa^{1,3},
Milagros Medina^{1,2}

¹ Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Spain

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain

³ Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza and CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III

Bifunctional FAD synthetases (FADS), prokaryotic enzymes that catalyze the biosynthesis of the essential cofactors flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), are essential proteins in flavin and flavoproteome homeostasis [1]. This crucial role in cellular metabolism, together with the significant differences with their eukaryotic counterparts (monofunctional riboflavin kinases and FMN adenyltransferases), converts the FADS in promising drug targets for the development of inhibitors with antimicrobial activity [2]. In a previous study [3], we have identified inhibitors of the FADS of *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFADS) endowed with antimicrobial activity against Gram positive and negative microorganisms.

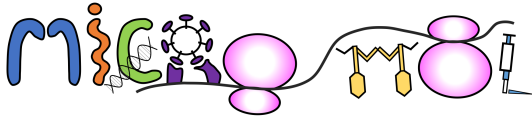
In this study, we have observed that the effect on *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* was fainter in comparison with *C. ammoniagenes* and *C. diphtheriae* (phylogenetic closely related species), pointing to significant differences among these enzymes in spite of their high sequence and structural identity.

Therefore, we have further characterized the essentiality of the mycobacterial FADS by the generation of *MtFADS* knock-out (KO) and tetracycline-inducible knock-down strains (KD). Surprisingly, in spite of the fact that the FADS KO mutants were expected to not be viable, small colonies appear after transformation with the recombinering linear substrate. However, these colonies were no further viable when subculturing in both liquid and solid media. Our observation is consistent with the depletion of flavin cofactors through successive cellular division until reaching a critical limit of no return. In a further step, FADS KO and KD strains will allow us to identify new specific inhibitors by the high- throughput whole-cell screenings of chemical libraries.

[1] Frago S. *et al.* (2008) *BMC Microbiol.* 8, 160.

[2] Serrano A. *et al.* (2013) *Curr Pharm Des.* 19, 2637-2648.

[3] Sebastián M. *et al.* (2018) *J Enzyme Inhib Med Chem.* 33, 1, 241–254



Caracterización de la resistencia a colistina en aislados de *Salmonella* procedentes de ganado porcino antes de la introducción de políticas de reducción de su uso.

Eloisa Sevilla¹, Juan P. Vico², Inmaculada Martín-Buriel³, Bruno González-Zorn⁴, Rosa Bolea¹, Raúl C. Mainar- Jaime¹

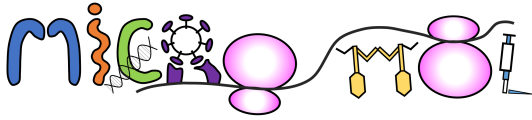
¹Dpto. de Patología Animal y ³Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO), Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza; ²IRNASUS-CONICET-Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina. Dpto. de Sanidad Animal y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

La salmonelosis humana es la segunda toxiinfección alimentaria en la UE y el cerdo y sus productos una de sus fuentes de infección más importantes. Junto a otras infecciones entéricas producidas por bacterias Gram-, ha sido tradicionalmente controlada con antimicrobianos y, particularmente, con colistina, un antibiótico considerado de último recurso en humanos. Esta polimixina se ha utilizado de forma masiva en lechones post-destete. Aunque la prevalencia de resistencia a colistina ha sido normalmente baja, desde 2015 se han ido detectando diversos genes plasmídicos relacionados con resistencia a este antibiótico por todo el mundo, obligando a reducir su consumo en el ganado.

En este trabajo se analiza la resistencia a colistina de 625 cepas de *Salmonella* aisladas de cerdos sacrificados en matadero de 75 explotaciones porcinas de Aragón entre 2008 y 2009, antes de iniciar las políticas de reducción del uso de colistina en porcino. Para cada cepa se estimó la concentración mínima inhibitoria (CMI) (ISO 20776-1:2006), considerando una cepa resistente aquella con una CMI \geq 4 mg/l. Se realizó un análisis de polimorfismos de los genes cromosómicos *pmrA* y *pmrB* mediante PCR convencional y secuenciación en las cepas resistentes, y se analizó la presencia de genes plasmídicos de resistencia a colistina (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* y *mcr-4*) en aquellas cepas con CMI $>$ 1mg/l por PCR convencional.

Ocho cepas, *Salmonella* 4,5,12:i:- (4), *S. Typhimurium* (2), *S. Enteritidis* y *S. 9,12:-:-*, resultaron resistentes, y en 4 (50%) se detectó el gen *mcr-1*. En una cepa (*Salmonella* 9,12:-:-) se detectaron polimorfismos que producían variantes proteicas (1 en *pmrA* y 5 en *pmrB*). Ninguna presentó el gen *mcr-2*. Los resultados para los genes *mcr-3* y *mcr-4* están pendientes de realización. Las 8 cepas resistentes procedían de 5 explotaciones distribuidas en las tres provincias aragonesas.

De forma preliminar podemos concluir que la prevalencia de resistencia a colistina en cepas de *Salmonella* procedentes de ganado porcino era baja (1,3%) cuando la colistina se utilizaba masivamente. Sin embargo, casi todas las cepas resistentes tenían un carácter netamente zoonótico y al menos la mitad de ellas presentaron resistencia plasmídica. Todo ello sugiere un mayor riesgo de transmisión de esta resistencia a personas.



Detección de los genes *cfr* y *optrA* de resistencia a linezolid en *Enterococcus* y *Staphylococcus* de origen clínico y de granjas porcinas

Laura Ruiz-Ripa¹, Susana Sanz¹, Carmen Olarte¹, Carla Andrea Alonso¹, José Manuel Azcona-Gutiérrez², Carmen Aspiroz³, Mar Olga Pérez-Moreno⁴, Cristina Seral⁵, Juan-Ignacio Alós⁵, Luis Torres⁷, Rosa Fernández-Fernández¹, Javier Castillo⁵, Carmen Torres¹.

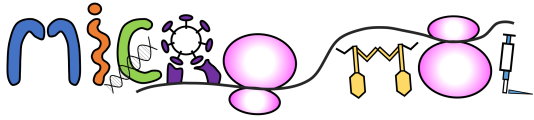
¹Universidad de La Rioja, Logroño; ²Hospital San Pedro, Logroño; ³Hospital Royo Villanova, Zaragoza; ⁴Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa; ⁵Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Universidad de Zaragoza; ⁶Hospital Universitario de Getafe, Getafe; ⁷Hospital San Jorge, Huesca

Introducción: La resistencia a linezolid (RL) es un problema emergente y el mecanismo más frecuente es por mutaciones en 23S rDNA-dominio-V (especialmente G2576T), pero los genes *cfr* y *optrA* son mecanismos-RL emergentes. **Objetivo:** Caracterizar mecanismos-RL en *Staphylococcus* y *Enterococcus* de muestras clínicas-humanas y ambientales.

Materiales y métodos: Se estudiaron 25 aislados (8 *E. faecalis*, 8 *E. faecium*, 2 *S. aureus*, 5 *S. epidermidis*, 1 *S. equorum*, y 1 *S. arlettae*) de 7 hospitales (n=21) y de aire de granjas porcinas (n=4). Se determinó la Concentración- Mínima Inhibitoria (CMI) de antibióticos por microdilución y la RL por E-test (EUCAST). Se estudió la presencia de genes de resistencia a linezolid (*optrA* y *cfr*), cloranfenicol (*fexA*, *fexB*, *catpc194*, *catpc221* y *catpc223*) y meticilina (*mecA*), y los cambios-aminoacídicos en 23S-rDNA-dominio-V y en proteínas ribosomales L3, L4 y L22, por PCR-secuenciación. Tipado por *spa*-typing (*S. aureus*) y multilocus-sequence-typing (MLST, *S. aureus*/*S. epidermidis*/*E. faecalis*/*E. faecium*).

Resultados: Los 25 aislados presentaron fenotipo de multiresistencia, 23 fueron RL y 17 resistentes a cloranfenicol (*fexA*, *fexB*, *catpc221* y *catpc223*). Los 5 *S. epidermidis* y 1 *S. aureus* fueron resistentes a meticilina (*mecA*). El rango de CMI a linezolid de los aislados-LR fue 4->256 µg/ml. Los dos *E. faecium* ambientales, tipados como ST437 y ST28, portaban los genes *optrA* y *fexB*, y uno de ellos también *fexA*. Siete *E. faecalis* clínicos (ST585, ST480, ST35, ST21 y ST16) contenían el gen *optrA* (dos de ellos con el cambio Thr481Pro) y *fexA*. Una cepa *S. aureus* (*spa*-tipo-t2220) y un *S. epidermidis* (ST22) portaban los genes *cfr* y *fexA*. El gen *cfr* fue detectado en 2 *S. equorum*/*S. arlettae* sensibles- linezolid (SL) ambientales. El cambio G2576T o C2534T en 23S-rDNA fue detectado en 14 aislados-RL clínicos *E. faecium*/*E. faecalis*/*S. epidermidis*. Los aislados *S. epidermidis* poseían todos los alelos 23S-rDNA mutados (G2576T o C2534T) (CMI-linezolid >256 µg/ml). Se detectaron múltiples mutaciones en proteínas ribosomales L3 y/o L4 en estafilococos-RL.

Conclusiones: *optrA* se detecta frecuentemente en enterococos de origen clínico y ambiental, asociado a *fexA* (en *E. faecalis*) y a *fexB* (en *E. faecium*), ambos genes implicados en la resistencia a cloranfenicol. Se detecta el gen *cfr* en aislados RL/SL *Staphylococcus* de origen clínico y de aire de granja-porcina



Análisis genómico del flujo de metiltransferasas del ARNr 16S en *E. coli* resistentes a plazomicina procedentes de aguas residuales y naturales

¹ Jose Francisco Delgado-Blas, ¹ Cristina M. Ovejero, ² William Calero-Cáceres, ³ Sara Monzón, ³ Isabel Cuesta de la Plaza, ⁴ Fernando de la Cruz, ⁴ María Pilar Garcillán, ² Maite Muniesa, ¹ Bruno Gonzalez-Zorn

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; ² Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona; ³ Unidad de Bioinformática, Instituto de Salud Carlos III; ⁴ Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria y Universidad de Cantabria

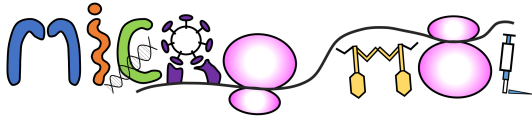
Introducción: El ambiente juega un papel fundamental en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Este fenómeno ocurre de forma natural o influenciado por la actividad antropogénica. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la estructura genómica de *E. coli* productores de metiltransferasas del ARNr 16S, los cuales presentan una alta resistencia a aminoglucósidos, incluyendo la plazomicina, procedentes de aguas residuales y naturales, empleando el análisis de secuenciación masiva.

Materiales y métodos: Un total de 47 *E. coli* resistentes a aminoglucósidos (25 procedentes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales, 18 de dos ríos y 4 de dos explotaciones porcinas en la región de Barcelona) fueron secuenciadas por tecnología Illumina (MiSeq). Los aislados fueron caracterizados de acuerdo a su secuenciotipo (ST), serotipo, perfil genético de resistencia y grupos de incompatibilidad plasmídicos. La composición plasmídica, la distribución del resistoma y la relación epidemiológica está siendo analizada por secuenciación con Nanopore (MinION).

Resultados: Dos secuenciotipos de *E. coli* fueron ampliamente identificados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, ST632 y ST479. El gen de metiltransferasa predominante ecosistema fue *rmtB*. Un plásmido IncFII fue el portador de este gen, pero el contenido genético de dicho plásmido fue altamente variable dependiendo del secuenciotipo. Además, el gen de resistencia a colistina *mcr-1* estuvo ampliamente diseminado en los *E. coli* pertenecientes al ST632.

En los aislados procedentes de los ríos la variedad de secuenciotipos fue mucho más elevada. El gen de metiltransferasa presente en todos ellos fue *armA*. Este gen estuvo mayoritariamente asociado a un plásmido IncHI2 con una estructura genética similar en los distintos secuenciotipos. Curiosamente, los aislados obtenidos de explotaciones porcinas también portaban *armA* en un plásmido similar al encontrado en ríos.

Conclusiones: *E. coli* altamente resistentes a plazomicina se encuentran diseminados en ríos y aguas residuales. La estructura del resistoma y plasmidoma está más conservada entre secuenciotipos diferentes en ríos. Por lo tanto, la actividad antropogénica genera el flujo dinámico de genes de resistencia específicos asociados a ciertos plásmidos y su mantenimiento en clones altamente diseminados.



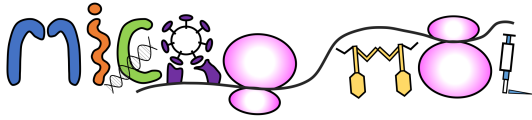
Evolución experimental de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de ceftazidima y ceftazidima/avibactam

Fernando Sanz-García, Sara Hernando-Amado, José Luis Martínez

Ceftazidima/avibactam es una combinación de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasas de relativamente reciente aparición, cuyo uso ha sido restringido a casos clínicos muy específicos. Entre éstos se incluyen los pacientes de fibrosis quística infectados con *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, en las que las mutaciones son la principal causa de la resistencia. Así, nuestro trabajo aspira a predecir posibles mecanismos de resistencia adquirida que son seleccionados cuando este patógeno es tratado con ceftazidima o ceftazidima/avibactam. Para ello, se sometió a *P. aeruginosa* PA14 a una evolución experimental en ausencia de antibióticos y en presencia de concentraciones crecientes de ceftazidima y ceftazidima/avibactam, a lo largo de un periodo de 30 días. Posteriormente, las poblaciones finales obtenidas fueron analizadas mediante secuenciación masiva.

Todas las poblaciones bacterianas evolucionadas alcanzaron niveles similares de resistencia a ceftazidima; asimismo, todas adquirieron una mayor sensibilidad a amikacina y producían el pigmento piomelanina. A tenor de sus modificaciones genéticas, uno de los primeros eventos acaecidos en todas las poblaciones fue la selección de grandes deleciones cromosómicas que contenían *hmgA* (enzima implicada en la producción de piomelanina), *galU* (relacionado con la resistencia a β -lactámicos) y *mexXY-oprM* (involucrado en la resistencia a aminoglicósidos). Por otra parte, además de mutaciones en *mpl* y *dacB*, que regulan la expresión de β -lactamasas, las mutaciones vinculadas a la sobre-expresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM imperaron. Respecto a la evolución con ceftazidima/avibactam, se seleccionaron mutantes en la bomba de eflujo hipotética *PA14_45890-45910* y en el sistema de dos componentes (*PA14_45870-45880*) que presumiblemente regula su expresión.

En definitiva, se ha identificado un conjunto de mutaciones, incluyendo las grandes deleciones cromosómicas, que pueden contribuir a la resistencia a ceftazidima y ceftazidima/avibactam en *P. aeruginosa*. Además, dado que los mutantes hiper-productores de piomelanina, poseedores de similares deleciones, son habitualmente hallados en infecciones, las potenciales hipersensibilidad a aminoglicósidos y mayor resistencia a β -lactámicos de estas *P. aeruginosa* productoras de piomelanina deberían ser tenidas en consideración a la hora de tratar las infecciones en las que están involucradas.



Evolución de la resistencia a antibióticos generada por inestabilidad genética en micobacterias

Alfredo Castañeda García, Isabel Martínez Blecua, Jesús Blázquez

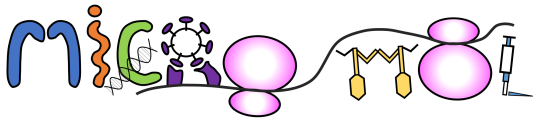
Departamento de Biotecnología Microbiana. Centro Nacional de Biotecnología
Madrid

La principal ruta de reparación de ADN que mantiene la estabilidad genómica en todos los organismos vivos es la ruta de reparación de emparejamientos erróneos o mismatch repair pathway (MMR). Este mecanismo de reparación basado en las proteínas MutS y MutL es capaz de corregir y reparar mutaciones puntuales, generadas por un mal apareamiento de bases en el ADN. Por tanto, es clave para que los organismos vivos mantengan tasas de mutación muy bajas, evitando la adquisición y fijación de mutaciones en su material genético.

Sorprendentemente, el grupo de las micobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, carece de sistema MMR canónico (sin MutS ni MutL), pero mantiene una elevada estabilidad genómica con tasas de mutación espontánea muy bajas. En este sentido, nuestro trabajo ha permitido identificar un nuevo componente de reparación del ADN, la endonucleasa NucS/EndoMS que actúa como guardián del genoma en micobacterias desempeñando funciones de reparación de tipo MMR, actuando como un novedoso sistema MMR alternativo.

El estudio de la respuesta de una cepa deficiente en *nucS* frente a diferentes antibióticos de uso clínico (incluyendo rifampicina, estreptomina, ciprofloxacino y linezolid) indica que la pérdida de NucS se asocia con la aparición de un elevado número de mutaciones de resistencia a antibióticos. La concentración de antibiótico preventiva de aparición de mutantes es igualmente mucho más alta en una cepa deficiente en *nucS*.

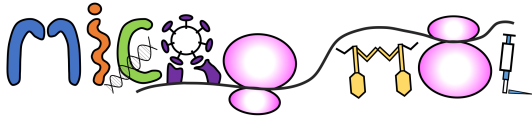
NucS parece por tanto capaz de reconocer y corregir bases mal apareadas, evitando la aparición de mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a antibióticos. Hemos desarrollado un nuevo sistema reportero basado en un casete de resistencia insertado en el cromosoma bacteriano para así poder medir la tasa de mutación así como el espectro mutacional reconocido por NucS en vivo. Además, hemos llevado a cabo una evolución de diferentes líneas independientes de la cepa carente de *nucS* en comparación con la cepa silvestre en un experimento de acumulación de mutaciones (MA), para evaluar cómo una cepa hipermutadora en micobacterias es capaz de responder a lo largo de un experimento de evolución a largo plazo durante un periodo total de 50 semanas en evolución continua.



Biolog phenotype microarray: a tool for the identification of multidrug resistance efflux pumps inducers

Paula Blanco, Fernando Corona, José Luis Martínez

Overexpression of multidrug resistance efflux pumps is a relevant mechanism of antibiotic resistance for bacterial pathogens. These systems use to present low levels of basal expression. However, they can be induced by environmental signals or stresses which can lead to situations of phenotypic induced resistance. In contrast to efflux pumps substrates, inducers of these systems have not been thoroughly studied. In this work, we have applied a novel high-throughput methodology in order to identify inducer molecules of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeVWX and SmeYZ efflux pumps. Bioreporters in which the expression of the yellow fluorescent protein is linked to the activity of either the *smeVWX* or the *smeYZ* promoters were developed and used for the screening of potential inducers of the expression of these efflux pumps using Biolog phenotype microarrays. Confirmation of induction was carried out measuring YFP production along the bacterial growth and by flow cytometry; mRNA levels of *smeV* and *smeY* were also determined by real-time RT-PCR after exposure to the selected compounds. Among the 144 tested compounds, iodoacetate, clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) and sodium selenite were found to be *smeVWX* inducers, while boric acid, erythromycin, chloramphenicol and lincomycin are able to trigger the expression of *smeYZ*. The presence of the inducers allowed a decrease in the susceptibility to antibiotics that are known substrates of the efflux pumps. However, our results indicate that these efflux pumps did not contribute to *S. maltophilia* resistance to the analyzed inducers. Herein we present a methodology amenable for the high-throughput screening of efflux pumps inducers. The use of phenotype microarrays linked to fluorescence reporters have allowed to identify a set of different inducers for *smeVWX* and *smeYZ*. Notably, induction seems to be uncoupled from the detoxification of the inducers by the corresponding efflux pumps. The mechanism of action of each of the inducers for inhibiting bacterial growth allowed us to propose that *smeVWX* is likely induced as a response to compounds presenting thiol-reactivity, while *smeYZ* is induced by ribosome-targeting antimicrobials. Since the presence of the inducer changes antibiotics susceptibility, the identification of these molecules is of clinical relevance.



USING ATTENUATED MYCOBACTERIA AS EXPERIMENTAL TREATMENT FOR ASTHMA IN MICE MODELS

Raquel Tarancón^{1, 2}; Santiago Uranga^{1, 2}; Carlos Martín^{1, 2, 3}; Nacho Aguiló^{1, 2}.

1. Grupo de Genética de Micobacterias, Departamento de Microbiología y Medicina Preventiva. Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, IIS Aragón, Zaragoza, Spain
2. CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain,
3. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain.

The aim of this project is evaluating the impact of the potential treatment of asthma with BCG and other attenuated mycobacteria. This idea arose from the fact that mycobacteria triggers strong Th1 response that opposes the predominant Th2 response elicited in allergy.

This hypothesis has been tested in animal models [1, 2] and in humans [3] using the BCG vaccine, with positive results.

We developed two models for acute asthma induction in mice, using ovalbumin (OVA) or *house dust mites* (HDM) sensitization and challenge. We also developed a model for chronic asthma in mouse induced by OVA.

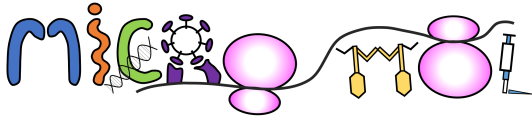
We created a protocol to quantify eosinophils in the bronchoalveolar fluid (BAL) and in lung by flux cytometry. In addition, we analyzed Th1 and Th2 cytokines in BAL, in lymph nodes and in lung explants with the ELISA technique. We also studied the production of mucosubstances in lung by the periodic Acid-Schiff staining and we quantified the expression levels of different genes related to the Th1 and Th2 responses by qPCR.

In the acute model, the analysis of BAL from mice treated with the allergen OVA or HDM reflects a clear eosinophilic and interleukin-5 (IL-5) infiltration with respect to negative controls. The intranasal treatment with BCG after allergen sensitization decreases eosinophilic and IL-5 concentration in BAL and in lung and reduces the production of mucosubstances. This treatment also decreases the interleukin-4 concentration and increases the interferon- γ concentration in lung explants and in lymph nodes compared to untreated animals. The expression of Th2 response genes decreases with the treatment. In addition, we demonstrate that the vaccine has a long-term protection against asthma.

In the chronic model, mice treated with OVA show a clear eosinophilic and IL-5 infiltration with respect to negative controls. The intranasal treatment with BCG after OVA sensitization decreases eosinophilic and IL-5 concentration in BAL and in lung reflecting the therapeutic effect of BCG in asthma.

These results are encouraging and suggest that BCG and other attenuated mycobacteria could be potential candidates for treatment of allergic asthma.

- [1] Gouvêla A.C. et al. Th2 Responses in OVA-sensitized BALB/c Mice Are Down-Modulated by Mycobacterium bovis BCG Treatment
- [2] Klaus Josef Erb. et al. Infection of Mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guérin Suppresses Allergen- induced Airway Eosinophilia.
- [3] Inseon S. Choi et al. Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: a randomized, controlled trial.



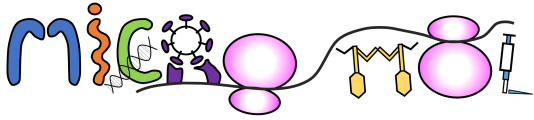
Role of conjugative relaxases in DNA transfer and integration. Development of biotechnological tools

Dolores L. Guzmán-Herrador¹, Samuel Steiner², Anabel Alperi¹, Coral González-Prieto¹, Craig R. Roy² and Matxalen Llosa¹

¹Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria (UC), Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Santander, España. ²Department of Microbial Pathogenesis, Boyer Center of Molecular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, United States

Bacterial conjugation is a mechanism of horizontal DNA transfer through a Type IV Secretion System (T4SS). The relaxase cleaves and binds covalently to one strand of the transferred DNA, and the nucleoprotein complex is transferred to the recipient cell. We explore the possibility of using T4SS-mediated DNA transfer as a genomic modification tool in mammalian cells. In previous works, we showed that the T4SS of *Bartonella henselae*, involved in translocation of effectors during infection, can be used to transfer DNA to human cells [1]. Moreover, we found that TrwC (the relaxase of the conjugative plasmid R388) promotes random integration of the incoming DNA in the human genome [2]. We wanted to determine if this activity is conserved in other relaxases and T4SS. We found that MobA (the relaxase from plasmid RSF1010) is able to deliver DNA into target cells with higher efficiency than TrwC, and it also promotes integration of the DNA, although at lower rates than TrwC. In addition, we found that DNA can be transferred through the T4SS of two intracellular human pathogens, *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*, which encode for Type B T4SS [3]. These data suggest that DNA transfer could be an intrinsic feature of T4SS, which encourages us to develop T4SS-based DNA transfer and integration tools able to reach different human target cells. This kind of tool could be combined with site-specific nucleases, to obtain an *in vivo* DNA delivery system for site specific modification of the human genome.

1. Fernandez-Gonzalez, E., et al., *Transfer of R388 derivatives by a pathogenesis-associated type IV secretion system into both bacteria and human cells*. J Bacteriol, 2011. **193**(22): p. 6257-65.
2. Gonzalez-Prieto, C., et al., *The Conjugative Relaxase TrwC Promotes Integration of Foreign DNA in the Human Genome*. Appl Environ Microbiol, 2017. **83**(12).
3. Guzmán-Herrador, D.L., et al., *DNA Delivery and genomic Integration into Mammalian Target Cells through Type IV A and B Secretion Systems of Human Pathogens*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**: p. 1503.



Influence of human fecal bacteria's secretome in the maturation of the neonatal liver and hepatic regeneration in the adult.

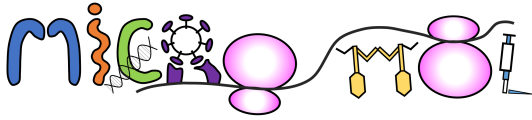
Joana I. Almeida¹, Laurens Verscheijden¹, Pilar Sainz-Arnal¹, Borja Sánchez²,
David Bernardo³, Pedro Baptista¹

1 Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón), Zaragoza

2 Instituto de Productos Lácteos de Asturias IPLA-CSIC, Asturias

3 Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa, Madrid

Highly homogeneous and functional human stem cell-derived hepatocyte-like cells are considered a promising option in the cell-based therapy of liver disease and the development of effective *in vitro* toxicity screening tools. However, the current protocols for generating hepatocytes *in vitro* are not yet successfully established resulting in low yields of cells, large cellular heterogeneity and immature phenotypes. It is well described that the functional level of hepatocytes present in the liver at birth is usually deemed as quite low and this level improves drastically after birth, due to the rapidly changing environment that the baby is exposed outside of the womb (e.g. diet, gut colonization, etc). Additionally, it was recently discovered that germ-free mice have lower expression levels of cytochrome P450 and a delayed or depressed liver regeneration after partial hepatectomy when compared with wild-type mice. These findings suggest a relationship between liver maturation/regeneration during the postnatal period and gut microbiota. Here we aim to generate highly functional/mature hepatocytes derived from hPSC by studying the influence of the microbiome's secretome. To approach this, hPSC-derived hepatocytes were generated with the Duncan protocol, which was followed by a screening of 21 bioactive peptides secreted by the human intestinal microbiome. After this initial screening, the most active peptides in the induction of hepatic mature genes were then retested for longer exposure times (7 and 11 days). Preliminary results showed a genetic overexpression of important mature hepatic markers (CYP3A4, CYP2C9, FOXA2, HNF4 α) with 4 of these bacterial peptides. In addition, these cells were also shown to express some toll-like receptors (-4, -2, -6) as well as some of their intracellular targets and mediators (TIRAP, Myd88, NF- κ B, TNF- α) of their signaling pathways, fact that has never been documented before and is absent in the early stages of hPSC differentiation into hepatic lineage. The identification of the mechanism of activation of these peptides derived from microbiome's bacteria in hepatocytes may not only have a profound impact on the generation of functional and mature hPSC-derived hepatocytes, but also in the increase of hepatic function in case of liver disease, an important unmet clinical need in many pathologies.



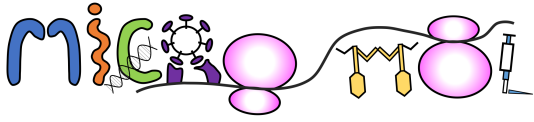
Development of *E. coli* synthetic adhesins targeting human tumor cells

Eva Pico Sánchez, Carmen Mañas Torres, Luis Ángel Fernández

Anaerobic bacteria, such as *Escherichia coli*, are able to colonize and grow preferentially in solid tumors (1). In order to improve the tumor colonization and tumor specificity of *E. coli*, we developed synthetic adhesins (SAs) that can be expressed constitutively on their bacterial surface, allowing *E. coli* to adhere specifically to antigens expressed on the surface of tumor cells (2). SAs are based on single domain antibodies (VHH or nanobodies) fused to the outer membrane-anchoring domain of Intimin. In previous studies we showed that engineered *E. coli* bacteria expressing SAs targeting GFP as a model antigen adhered specifically to HeLa cells expressing GFP on the plasma membrane and colonize more efficiently solid tumors generated by HeLa-GFP tumor cells implanted subcutaneously in immunodeficient Nude mice (2). In this work, we report the generation of engineered *E. coli* strains expressing SAs targeting actual tumor-associated cell surface antigens expressed in human tumors, such as the human epidermal growth factor receptors EGFR (ErbB1) and HER2 (ErbB2). These membrane proteins are upregulated in many human cancers, including melanomas, breast, colon and bladder carcinomas. We demonstrate surface display of these SAs from single-copy chromosomal expression and specific adhesion of the engineered *E. coli* strains to human tumor cell lines of different origins. These results set the basis for the preclinical evaluation *in vivo* of engineered bacteria expressing SAs against different human tumors.

References:

1. Piñero-Lambea C, Ruano-Gallego D, & Fernández LÁ (2015) Engineered bacteria as therapeutic agents. *Curr Opin Biotechnol* 35:94-102.
2. Piñero-Lambea C, *et al.* (2015) Programming Controlled Adhesion of *E. coli* to Target Surfaces, Cells, and Tumors with Synthetic Adhesins. *ACS synthetic biology* 4(4):463-473.



Engineering the translocation of protein effectors and nanobodies into tumor cells by the Synthetic Injector *E. coli* (SIEC) strain

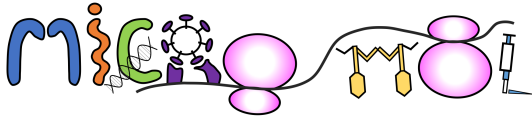
Alejandro Asensio, Beatriz Álvarez, David Ruano-Gallego, Luis Ángel Fernández

Type III secretion systems (T3SS) encoded by many bacterial pathogens assemble supramolecular needle-like protein complexes, named injectisomes, able to translocate specific bacterial proteins, called effectors, into host mammalian cells. One attractive application of T3SS is the specific translocation of therapeutic proteins, such as antibody fragments, into human cells (e.g. tumor cells) [1]. To avoid the use of pathogenic strains carrying T3SS, we have previously engineered the commensal *Escherichia coli* K-12 strain to express injectisomes from the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strain. The resulting engineered strain, named Synthetic Injector *E. coli* (SIEC), assembled functional injectisomes and was shown to translocate the effector Tir (translocated intimin receptor) into HeLa cells in vitro, triggering actin-pedestal formation underneath attached SIEC bacteria [2].

In this work we test the capacity of SIEC strain for translocation into mammalian cell lines (e.g. HeLa, 3T3 fibroblast) of: 1) EPEC effectors having various activities in the host cells (e.g. inducing apoptosis, inhibiting NF- κ B signalling); 2) single domain antibody fragments (nanobodies). We first developed an inducible gene cassette based on the L- arabinose promoter (PBAD) of *E. coli* for the controlled expression in SIEC of effectors and nanobodies fused to various T3-secretion signals and coexpressing T3SS-chaperones. We evaluated and quantified the translocation levels of these gene constructs into mammalian cell lines using fusions to β -lactamase as a reporter, both from high-copy plasmid vectors and single-copy gene integrations in SIEC chromosome. These experiments allowed us to select an optimal promoter, T3-signal and chaperone for controlled and efficient effector and nanobody translocation. Our results demonstrate that the engineered SIEC strain is able to deliver a broad range of natural T3SS effectors, and also heterologous proteins with high biomedical interest, such as nanobodies, into the cytosol of tumor cells in a controlled manner both from plasmid and single-copy chromosomal expression.

References

1. Blanco-Toribio, A., *et al.*, PLoS ONE, 2010. **5**:e15227.
2. Ruano-Gallego, D., *et al.* ACS Synthetic Biology, 2015. **4**:1030-1041.



Engineering biofilm formation to enhance dibenzothiophene biodegradation in *Rhodococcus erythropolis*

Pedro Dorado-Morales¹, Igor Martínez², Eduardo Díaz², Iñigo Lasa¹ & Cristina Solano¹

¹ Laboratory of Microbial Pathogenesis. Navarrabiomed. Dpto de Salud-Universidad Pública de Navarra. Pamplona. ² Laboratory of environmental microbiology. Biological Research Center (CIB). CSIC. Madrid

Background: Biofilms are structured communities of microorganisms that grow adhered to inert or living surfaces due to a self-produced exopolymetric matrix in which they are encased. Inside the biofilm, bacteria exhibit a superior tolerance to physicochemical insults and harsh reaction conditions. These properties that might have deleterious consequences in clinical settings, are of great interest in industrial and environmental biotechnology, such as in the field of biocatalysis of toxic compounds.

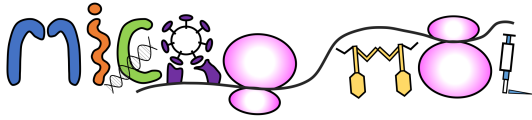
Objectives: The aim of this study is to evaluate whether genetically engineered bacteria forced to grow as biofilm communities, through either the production of a heterologous protein or polysaccharide, or the overproduction of their own exopolysaccharides, show improved metabolic capabilities. As a proof of concept, we have used the gram-positive bacterium *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 that harbors the *dszABCD* genes, through which the model compound dibenzothiophene (DBT) is transformed into the sulfur-free 2-hydroxybiphenyl (2HBP) molecule. On the other hand, incorporation of *Pseudomonas azelaica* HBPI to the culture allows complete biodegradation since it is able to use 2HBP as a carbon source. *Rhodococcus erythropolis* engineered bacteria that grow inside a biofilm might provide an improved biotechnological strategy for the removal of the recalcitrant sulfur of aromatic heterocycles present in fuels.

Methods: The transition between planktonic and biofilm lifestyles in *Rhodococcus erythropolis* was carried out through the expression of an operon whose products are responsible for the synthesis of a universal biofilm polysaccharide, the expression of an heterologous protein involved in the production of a proteinaceous biofilm matrix, or by modulating the levels of the trigger signaling molecule, cyclic di-GMP. Further, to avoid bottlenecks in the conversion of DBT into 2HBP, increased gene dosage and genetic engineering of *dsz* cassettes was performed.

The workflow to analyse DBT desulfurization efficiency was composed by resting cells assays followed by HPLC quantification.

Conclusions: The results obtained so far show that genetic programming of *Rhodococcus* bacteria to form a biofilm through the overproduction of own exopolysaccharides leads to an increase in the bioconversion of DBT into 2HBP.

In the future and in order to achieve complete degradation of the species derived from *dsz* activity and to improve the process by unbalancing the reaction to 2HBP production, we will construct microbial artificial consortia biofilms with *Pseudomonas* as second main player.



Comparación de seis métodos de procesamiento de muestras fecales para facilitar la identificación de cepas hipervirulentas de *Clostridium difficile* mediante qPCR.

Eva Machetti-Mareca^{1,2}, Fabio César Blasco-Cerqueira¹, Ángela Sanz², Silvia Blanco², Francisco Javier Castillo³, Cristina Seral³

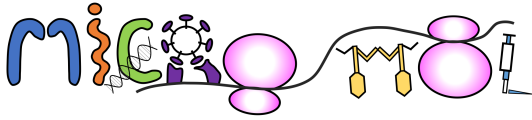
¹Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. ²CerTest Biotec S.L., San Mateo de Gállego, Zaragoza, España. ³Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, IIS Aragón, Departamento de Microbiología, Zaragoza, España.

Introducción/Objetivos: En los últimos años la infección por *Clostridium difficile* (ICD) es cada vez más frecuente y grave, en parte debido a la aparición de cepas hipervirulentas como los ribotipos 078 y 027. Un método rápido de diagnóstico es esencial para la identificación de la infección en el menor tiempo posible y así llevar a cabo el tratamiento más eficaz. Por ello se evalúan seis métodos de aislamiento de ácidos nucleicos en muestras fecales en combinación con la técnica qPCR. Se comparan los resultados con los obtenidos por un test qPCR comercial.

Material y Métodos: Este estudio se llevó a cabo en 56 muestras fecales procedentes de pacientes con sospecha de ICD e identificadas por qPCR como *Clostridium difficile* toxigénico. Los seis métodos a comparar fueron los siguientes: dos automáticos, disponibles comercialmente, basados en partículas magnéticas (Maxwell® RSC Blood DNA de Promega y Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B de Zinexts), uno manual comercial basado en columnas de sílica (VIASURE RNA-DNA Extraction Kit de Certest), y tres manuales rápidos y sencillos (Lysis Buffer de Certest, Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT de Quidel y MSwab™ de Copan). Para evaluarlos se utilizó VIASURE Fluoroquinolone, Binary toxin & Hypervirulent strains (027/078) Real Time Detection Kit (VIASURE *HyperTox*) de Certest. Además, 16 extraídos por VIASURE Extraction Kit fueron testados con el kit comercial de qPCR RIDA®GENE *Clostridium difficile* *HyperTox* real-time PCR de R-Biopharm®.

Resultados: El número de muestras identificadas como hipervirulentas en VIASURE *HyperTox* fue: 12/56 en Magpurix y VIASURE Extraction Kit; 11/56 en Maxwell y Lysis Buffer; 8/56 en Lyra y 5/56 en MSwab™. También se identificaron como solo resistentes a fluoroquinolonas (no hipervirulentas): 4/56 en Magpurix, VIASURE Extraction Kit y Maxwell; 3/56 en Lysis Buffer y MSwab™ y 1/56 en Lyra. Además fueron detectadas 11/56 muestras hipervirulentas con R- Biopharm® (10/11 ribotipo 078 y 1/11 ribotipos 027&078).

Conclusiones: 1)El 21% de las muestras toxigénicas fueron identificadas como cepas hipervirulentas. 2)VIASURE *HyperTox* específica resistencia a fluoroquinolonas (7%) aunque no haya hipervirulencia. 3)La combinación Lysis Buffer & VIASURE *HyperTox* puede ser una gran alternativa en el diagnóstico rápido de ICD hipervirulento.



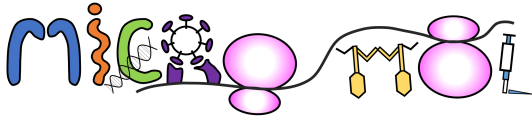
Achieving optogenetic control on bacterial amyloidogenesis

Rafael Giraldo

Department of Cellular & Molecular Biology, CIB-CSIC. C/ Ramiro de Maeztu, 9.
28040 Madrid

RepA-WH1 is a manifold domain from a plasmid-encoded bacterial protein that undergoes conformational changes that capacitate it either as a transcriptional repressor, as a DNA replication initiator or, through the formation of amyloid oligomers, to hinder premature replication rounds. Being very stable in solution, RepA-WH1 dimers attain metastability, leading to amyloidogenesis, upon binding to dsDNA, both *in vitro* and *in vivo*, and can be further modulated by the Hsp70 chaperone DnaK. The conformational transformation of RepA-WH1 can be elicited, besides dsDNA, by other natural ligands, such as acidic phospholipids, but also by gold nanoparticles. Engineered RepA-WH1 constructs cause a unique amyloid proteinopathy in *Escherichia coli* that mimics the mitochondrial route in human amyloid neurodegenerative diseases.

In this communication a new synthetic switch will be presented as the first opto(epi)genetic device that achieves control on protein amyloidosis. Such switch is based on chimeras between the plant photoreceptor LOV2 and RepA-WH1. These chimeras enable blue light/darkness regulation of RepA-WH1 amyloidogenesis and liquid-hydrogel transitions *in vitro*. In *E. coli* cultures, expression of the LOV2-RepA-WH1 chimeras reduce growth under blue light illumination, opening a novel way to physically control engineered bacterial populations.



The characterization of Gpm, a new phosphatase, supports the existence of a new gluconeogenic pathway in *Brucella suis* biovar 5

Leticia Lázaro-Antón¹, M^a Jesús de Miguel², Francesca Baldin³, Emile Van Schaftingen³, Raquel Conde-Álvarez¹, Pilar M. Muñoz², Maite Iriarte¹, Jean-Jacques Letesson⁴, Amaia Zúñiga-Ripa¹ and Ignacio Moriyón¹

¹Departamento de Microbiología e Instituto de Salud Tropical, Universidad de Navarra, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona, Spain. ²Unidad de Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA). ³Welbio and de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

⁴Research Unit in Biology of Microorganisms Biology, UNAmur, Namur, Belgium.

Bacteria of the genus *Brucella* are facultative intracellular parasites of mammals causing brucellosis, a worldwide- extended zoonosis. The pathogenicity of these bacteria resides largely in their ability to escape early detection by the innate immune system, to control intracellular trafficking and to adjust their metabolism to the nutrients available in the intracellular niche. However, the latter adaptation is imperfectly understood.

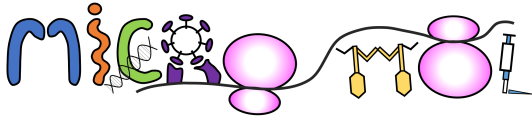
Recently, we showed that a *Brucella suis* biovar 5 double mutant in phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pckA*) and pyruvate phosphate dikinase (*ppdK*), two anabolic enzymes bridging the TCA cycle and the gluconeogenic pathway, is attenuated¹. Moreover, since glycolysis is not present in these bacteria, the attenuation of a fructose-bisphosphate aldolase (*fba*) mutant strongly suggests a limited supply of 6C and 5C sugars in the replicative niche. To further confirm that gluconeogenesis is the main route *in vivo*, we obtained a double mutant in the two genes encoding a fructose-1,6- bisphosphatase (FBPase) in *B. suis* biovar 5 (*fbp* and *glpX*).

We observed that both genes are dispensable for growth under gluconeogenic conditions¹. Since FBPases are essential for gluconeogenesis, this observation was intriguing.

In this work, we show that *B. suis* biovar 5 genome encodes a previously unidentified phosphatase (Gpm, BAB1_0448) that can maintain gluconeogenesis. Also, we demonstrate that both Fbp and Gpm can restore gluconeogenesis in an *E. coli* mutant unable to grow under gluconeogenic conditions. In contrast, GlpX cannot restore gluconeogenesis due to the substitution of an arginine for a proline at position 316 that renders this enzyme inactive. Finally, characterization of Gpm and Fbp confirms that i), they have a dual-function fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; ii), Gpm does not require a metal cofactor and iii), Gpm does not belong to any of the described types of FBPases.

Since erythritol is converted into erythrose-4P and feeds the Pentose Phosphate shunt likely forming sedoheptulose- 1,7P, we propose the existence of a new amphibolic pathway serving both to gluconeogenesis and to the catabolism of erythritol, a preferential substrate of most *Brucella* spp.

¹ Zúñiga-Ripa A, Barbier T, Lázaro-Antón L, et al (2018) The fast-growing *Brucella suis* biovar 5 depends on phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate phosphate dikinase but not on Fbp and GlpX fructose-1,6- bisphosphatases or isocitrate lyase for full virulence in laboratory models. Front Microbiol 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00641.

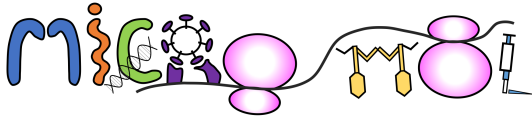


Caracterización de las FBPasas en *Synechocystis* sp PCC 6803

Luis López Maury, Raquel M^a García-Cañas, María José Huertas, Francisco J. Florencio

IBVF- Universidad de Sevilla-CSIC. Av/ Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla y
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Avenida Reina Mercedes
s/n, 41012 Sevilla

Todas las cianobacterias presentan una proteína con actividad sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa (SBP/FBPasa) que es esencial para la fijación fotosintética de CO₂. Estas dos actividades son necesarias para la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato en el ciclo de Calvin-Benson. Algunas cianobacterias presentan un gen adicional que codifica una enzima que presenta solo actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y cuyo papel no está definido en el metabolismo de estos organismos. Hemos generado mutantes de pérdida de función y sobreexpresión de los distintos genes en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, siendo el gen (*slr2094*) que codifica la SBP/FBPasa esencial para el crecimiento autotrófico mientras que el que codifica la FBPasa (*slr0952*) es indistinguible del silvestre. Los mutantes de sobreexpresión del gen *slr2094*, al igual que ocurre en otros organismos fotosintéticos, presentan una mayor tasa de crecimiento, tasa fotosintética y acumulación de carbohidratos especialmente a alta irradiancia. Estas dos enzimas son dos puntos de regulación mediada por tiorredoxinas en el cloroplasto aunque su regulación redox en cianobacterias no está totalmente definida. Con objeto de dilucidar su regulación redox hemos llevado a cabo una caracterización bioquímica de su interacción con las distintas tiorredoxinas presentes en *Synechocystis*. Complementariamente estamos estudiando el estado redox de estas proteínas *in vivo* en distintas condiciones de iluminación. Finalmente hemos introducido los genes que codifican las actividades SBPasa y FBPasa de plantas con objeto de comparar dicho sistema con el de las cianobacterias. Además, el efecto de la sobreexpresión de los genes de plantas en distintos fondos mutantes permitirá dilucidar cuál de las dos actividades que presenta la SBP/FBPasa de cianobacterias es esencial para el crecimiento fotoautotrófico.



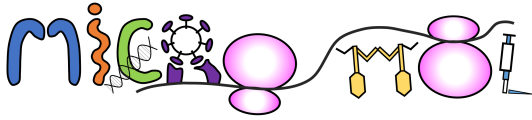
Cerrando el ciclo de Krebs en cianobacterias. Introducción de los genes que codifican el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803.

María J. Huertas, Luis López-Maury y Francisco J. Florencio.

IBVF- Universidad de Sevilla-CSIC. Av/ Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla y Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Avenida Reina Mercedes s/n, 41012 Sevilla

Las cianobacterias representan un grupo de organismos procariotas fotosintéticos del que poseemos una amplia información tanto por el número de especies cuyo genoma está secuenciado, como por el interés ambiental y biotecnológico que poseen estos microorganismos (1). Cabe destacar el uso de las cianobacterias como organismos modelo, tanto del proceso fotosintético como de sistemas para la producción de distintos compuestos de alto valor añadido. Durante mucho tiempo se ha pensado que las cianobacterias presentaban un ciclo de Krebs incompleto debido que carecían del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH). Recientemente, se han descrito dos rutas alternativas que cierran este ciclo en cianobacterias la ruta que implica la acción de la enzima: 2-oxoglutarato decarboxilasa (OGDC) y la ruta del GABA, pero el flujo metabólico a través de estas rutas alternativas parece mínimo (2). Este trabajo tiene como objetivo cerrar el ciclo de Krebs en cianobacterias mediante la introducción de los genes que codifican el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esta modificación supone un cambio radical en el metabolismo de estos organismos de tal forma que permitiría un aumento de la tasa metabólica. Para ello se han clonado los genes *sucA* (codifica la enzima E1 del complejo o 2-oxoglutarato deshidrogenasa), *sucB* (codifica la enzima E2 del complejo o dihidrolipoil succiniltransferasa) y *ldpA* (codifica la enzima E3 del complejo o dihidrolipoil deshidrogenasa) de *E. coli*. Estos genes se han clonado bajo diferentes promotores (inducibles o constitutivos) y las construcciones se han transformado en *Synechocystis* generándose las diferentes estirpes recombinantes. Se presentarán los resultados obtenidos tras la validación y la caracterización de las estirpes generadas.

1. Matson, M.M. and S. Atsumi, 2018. Curr. Opin. Biotech. 2018. p. 65-71.
2. Wei, X., B. Daniel, and V.W.F. J., 2014. Mol. Microbiol. p. 786-796.

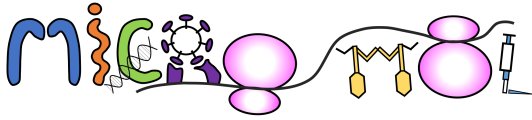


Membrane protein HgIK is involved in intercellular communication and nanopore formation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena*

Sergio Arévalo¹, Rafael Pernil², Roman Ladig², Enrico Schleiff² and E. Flores¹

¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC and Universidad de Sevilla, Américo Vespucio 49, E-41092 Seville, Spain; ²Institute for Molecular Biosciences, Goethe University Frankfurt, Max von Laue Str. 9, 60438 Frankfurt am Main, Germany.

Some cyanobacteria such as *Anabaena* sp. PCC 7120 grow as filaments that can be hundreds of cells long. Under nitrogen deprivation, two cell types contribute to the growth of these filaments: vegetative cells that make oxygenic photosynthesis fixing CO₂ and N₂-fixing heterocysts. The two types of cells exchange regulators and nutrients through proteinaceous septal junctions. Putative septal junction proteins include SepJ, FraC and FraD. *Anabaena* mutants of the genes encoding these proteins show filament fragmentation, a decreased number of septal peptidoglycan perforations (nanopores) and impaired intercellular transfer of fluorescent markers. A mutant with the three genes inactivated still shows, however, a small number of nanopores and appreciable levels of intercellular molecular exchange, suggesting that additional proteins are involved in the formation of septal junctions. The *hgIK* gene encodes a protein that is required for deposition of the glycolipid layer of the heterocyst envelope and, hence, needed for diazotrophic growth (Black et al., J. Bacteriol. 177:6440-6448, 1995). A salient feature of the phenotype of an *hgIK* mutant is that the septa between vegetative cells and between heterocysts and vegetative cells are wider than in the wild type. We have investigated a possible role of HgIK as an additional septal junction protein in *Anabaena*. HgIK is an integral membrane protein with a long extra-membrane section that is predicted to reside in the periplasm and to contain a pentapeptide repeat domain. *Anabaena* strains producing HgIK-sfGFP or HgIK-His6 fusions were used in confocal microscopy and immunofluorescence analyses, respectively, showing increased expression in heterocysts and preferential localization at the intercellular septa. *Anabaena* mutants of *hgIK* showed filament fragmentation, a decreased number of nanopores (50% of those in the wild type), and impaired transfer between vegetative cells of the fluorescent marker calcein. These results identify HgIK as a possible septal junction-related protein. We have prepared *Anabaena* strains producing Strep II-tagged HgIK and, to date, have been able to isolate the extra-membrane section of the protein. By using cross-linking, we are currently trying to identify accompanying proteins as possible HgIK partners in the septal junctions.



El desbalance del metabolismo de glucosa por inactivación génica condiciona la interacción hospedador-patógeno durante la infección respiratoria por *Haemophilus influenzae*

Nahikari López-López¹, Begoña Euba^{1,2}, Lucía Caballero¹, Sergio Cuesta-Ferre¹, Irene Rodríguez-Arce¹, Goiezeder Almagro¹, Sara Martí^{2,3}, José Ramos-Vivas^{4,5}, Roberto Díez-Martínez⁶, Ulrike Kappler⁷, Junkal Garmendia^{1,2}

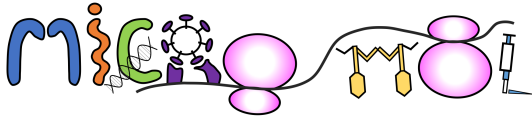
¹ Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), CSIC-Universidad Pública Navarra-Gobierno de Navarra;

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES); ³ Departamento de Microbiología, Hospital Universitari Bellvitge, University of Barcelona, IDIBELL, Barcelona, Spain; ⁴ Servicio Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla and Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain; ⁵ Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), ISCIII, Madrid, Spain; ⁶ Ikan Biotech SL, The Zebrafish Lab, Centro Europeo de Empresas e Innovación de Navarra (CEIN); ⁷ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland, St. Lucia, QLD, Australia

E-mail: nahikari.lopez@unavarra.es

La acumulación de metabolitos puede causar condiciones intracelulares adversas, aliviadas por cambios compensatorios en el *pool* de metabolitos, y cambios a nivel transcripcional. Así, cambios en la concentración de intermediarios metabólicos en una bacteria pueden jugar un papel crítico en las redes de regulación génica responsables de la homeostasis metabólica. Es previsible que el mantenimiento de la homeostasis metabólica juegue un papel determinante en procesos infecciosos. En este trabajo, exploramos las consecuencias del desbalance provocado por inactivación génica en la acumulación de metabolitos críticos en el metabolismo de la glucosa de *Haemophilus influenzae*.

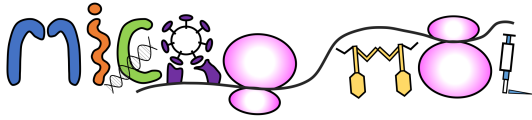
H. influenzae es una bacteria Gram negativa, integrante de la microbiota nasofaríngea humana, y un patógeno oportunista causante de infecciones óticas y respiratorias. La adaptación de *H. influenzae* a diferentes nichos -pulmón, nasofaringe, oído medio-, entre los que hay variaciones en la disponibilidad de oxígeno y el pH, facilita la ocurrencia de estas infecciones. *H. influenzae* es anaerobio facultativo y presenta un ciclo de Krebs incompleto, lo que determina un tipo de metabolismo especializado denominado "fermentación asistida por respiración", cuyos productos principales son acetato en aerobiosis, y formato o succinato en anaerobiosis. En este trabajo, propusimos que un desbalance por inactivación de genes clave en la generación de los productos finales del metabolismo de glucosa en *H. influenzae* puede provocar efectos compensatorios en el *pool* de metabolitos, con impacto en la capacidad infecciosa de este patógeno. Se generaron mutantes en los genes *ackA*, *pflA* y *frdA*, que codifican las enzimas acetato quinasa, formato liasa y fumarato reductasa, implicadas en la producción de acetato, formato y succinato, respectivamente. Se emplearon las cepas RdKW20 (productora de acetato-formato) y NTHi411 (productora de acetato-succinato), y se caracterizaron en un medio químicamente definido, con aporte de glucosa y disponibilidad de oxígeno controlados. Se monitorizaron la morfología bacteriana, composición de ácidos grasos, crecimiento, metabolitos principales, perfil de expresión génica e infección *in vivo*. El mayor impacto fue provocado por la inactivación de *ackA*, lo que sugiere que el balance de producción de acetato es determinante en la homeostasis del metabolismo de glucosa y en el *fitness* global de *H. influenzae* durante la infección.



Genome analysis of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* isolates from human infections reveals a cargo of virulence genes in lineage ST1256

Joaquín Giner-Lamia, Pablo Vinuesa, Laura Betancor, Claudia Silva, Julieta Bisio, Lorena Soleto, José A. Chabalgoity, José Luis Puente, the Salmolber CYTED Network, and Francisco García-del Portillo

Salmonella enterica subsp. *diarizonae* (*diarizonae*) is frequently isolated from diverse environmental sources and in association with sheep and cold-blooded reptiles. A few studies however describe the isolation of this subspecies from human patients. The factors contributing to this unusual behavior are currently unknown. We report here the genome features of two *diarizonae* strains SBO13 and SBO27 (belonged to sequence type (ST) ST1256) that were isolated from two different human patients in the city of Santa Cruz, Bolivia. A prominent feature of these genomes is the presence of 24 genomic islands (GIs) in addition to 10 complete *Salmonella* pathogenicity islands (SPI) and a partial SPI-7, first reported in the human-adapted serovar Typhi. In addition, the comparative genomic study of both isolates has provided evidence for the presence of a large number of virulence-related genes including a defined set of type-III secretion system effectors, a transport-related gene cluster and the SPI-7 *pil*-locus that may have contributed to the capacity of these isolates to infect human hosts. Furthermore, most of these genomic features are mostly present in genomes of other ST1256 strains that were isolated mainly from human hosts, suggesting that they may define an important genomic set for human infection not only in SBO13 and SBO27 but in this ST of *diarizonae*.



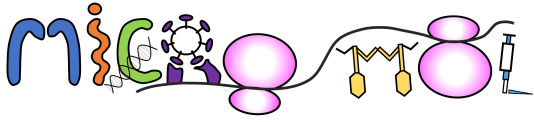
Origen y evolución de los sistemas flagelares en *Bradyrhizobium* y *Rhizobiales*

Daniel Garrido-Sanz¹, Miguel Redondo-Nieto¹, David Durán¹, Esther Blanco-Romero¹, Elias Mongiardini², Juan I. Quelas², Marta Martín¹, Anibal Lodeiro², Rafael Rivilla¹ y Julia Althabegoiti².

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, c/Darwin 2, Madrid, 280249, Spain. ²Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET, La Plata, Argentina.
Email: daniel.garrido@uam.es

Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110^T posee dos sistemas flagelares: subpolar y lateral. Mientras que los genes que codifican el flagelo subpolar están distribuidos en varios clústeres a lo largo de todo el cromosoma, los genes del flagelo lateral se encuentran presentes en una única región en forma de isla genética. Los estudios realizados con anterioridad no han demostrado una función clara del flagelo lateral en movilidad o simbiosis, así como su posible adquisición por transferencia génica horizontal (HGT). Sin embargo, el flagelo lateral es el único que poseen otras rizobacterias como *Rhizobium* y *Agrobacterium*. En este trabajo, hemos analizado la filogenia del género *Bradyrhizobium* mediante GBDP y ANIb de 128 genomas y hemos dividido el género en 13 grupos filogenómicos (PGs). Mientras que todos los genomas del género *Bradyrhizobium* poseen el flagelo subpolar, solo los genomas dentro del PG *B. japonicum* poseen ambos flagelos, lo que podría concordar con un único evento de HGT, que también se observa al analizar la sintenia y en análisis multilocus (MLSA) de este flagelo. Atendiendo a la sintenia y homología de secuencia, el origen del flagelo lateral se encuentra en el ancestro de *Rhodopseudomonas* y *Tardiphaga*, pero también está presente en otros géneros del orden *Rhizobiales*. El MLSA de 150 genomas pertenecientes al orden *Rhizobiales*, el de los flagelos subpolar y lateral, así como el patrón de presencia/ausencia de ambos sistemas flagelares, nos han permitido reconstruir los eventos evolutivos de HGT que han ocurrido durante la evolución de la clase *Alphaproteobacteria*. El flagelo lateral se adquirió de forma muy temprana en la evolución del orden *Rhizobiales* y posteriormente sufrió 3 eventos de HGT recurrentes. Fuera de los *Rhizobiales*, los parientes más cercanos se encuentran en el orden *Rhodobacterales*, donde también coexisten dos sistemas flagelares. La promiscuidad de este flagelo lateral para transferirse entre géneros filogenéticamente distantes puede ser atribuida a su estructura en forma de isla genética.

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO/FEDER EU (BIO2015-64480R), proyecto de cooperación interuniversitaria UAM-SANTANDER con América Latina 2017-2018 y el CONICET (ANPCyT y Secyt-UNLP, Argentina). DGS es receptor de un contrato predoctoral FPU (FPU14/03965) del MECD. EBR es receptora de un contrato predoctoral FPU (FPU16/05513).



ICEth1 & ICEth2, two mobile genetic elements coordinated in *Thermus thermophilus* transjugation

I. Baquedano, A. Blesa, M. Mencía, J. Berenguer.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Universidad Autónoma de Madrid-
CSIC). Madrid

In the thermophilic bacteria *Thermus thermophilus*, transjugation (transformation dependent conjugation) plays a major role in HGT. In this cell-to-cell DNA transfer mechanism the donor cell pushes DNA thanks to an ATP-dependent translocase (TdtA) and the recipient cell pulls the DNA inside the cell using the transformation machinery. The TdtA protein is cotranscribed along with a restrictase and a nuclease which also play a role in DNA transference. This operon is encoded within an Integrative and Conjugative Element (ICEth1) in the strain HB27 (1). ICEs are conjugative plasmids integrated in a specific sequence of the chromosome (att site) which are able to excise under specific conditions, replicate and transfer to a recipient cell, where they integrate using its specific att. These elements are formed by different functional modules. Particularly, ICEth1 is integrated within an ileu tRNA and contains transference, regulation and recombination modules. Even though this element is not able to replicate under normal conditions, UV stress induces a strong increase of the excised circular form.

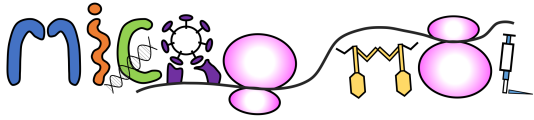
Another ICE (ICEth2) is present in the same strain integrated within a val tRNA. This new element contains replication and recombination/excision modules. As ICEth1 no replication replication is detected under normal conditions but stress treatment increases excision of the element.

Experiments reveal that on the one hand ICEth1 transference module is necessary for the transference of both elements and on the other hand that ICEth2 recombination/excision module is necessary for the excision and recombination of both elements. Replication and regulation modules are still being studied.

This data suggests that both elements are working coordinated as one Integrative and Conjugative Element in *Thermus thermophilus*.

1. Blesa *et al.* (2017) Plos Genetics 13(3): e1006669

This work has been funded by Spanish national project BIO2016-77031-R. IB is the holder of a fellowship from the MINECO



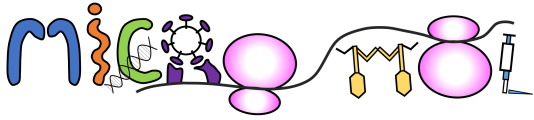
Regulación de la transposición de la secuencia de inserción ISPpu9 de *Pseudomonas putida* por RNAs pequeños

Guillermo Gómez-García, Fernando Rojo y Renata Moreno Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

Las secuencias de inserción (IS) son elementos génicos móviles de pequeño tamaño que no poseen más funciones que las propias de la transposición, y que pueden insertarse en múltiples sitios del genoma. Estos elementos móviles aportan plasticidad al genoma. *Pseudomonas putida* KT2440, una bacteria que tiene una gran versatilidad metabólica y es un modelo importante en biotecnología, tiene 7 copias casi idénticas de una IS llamada ISPpu9. ISPpu9 pertenece a la familia de IS110 y su diana de inserción son las secuencias repetidas conocidas como elementos palindrómicos extragénicos (REP).

En un ensayo de RNA-seq direccional vimos que los niveles de RNA del gen que codifica la transposasa de ISPpu9 son muy bajos, y que este gen está flanqueado por dos RNAs pequeños muy abundantes que hemos llamado sRNA- IS9s (sRNA sense) y sRNA-IS9as (sRNA antisense), respectivamente. Hemos comprobado que la transcripción del gen de la transposasa se inicia 243 nts por encima del codón de inicio de traducción. Por tanto, este mRNA tiene una región 5' no traducida (5'-UTR) larga y estructurada. El sRNA-IS9as se transcribe a partir de la cadena complementaria y su secuencia solapa con gran parte de la región 5'-UTR mencionada. Por su parte, la transcripción del sRNA-IS9s, localizado en la misma cadena que la transposasa, comienza 183 nts después del codón de terminación de la transposasa. Curiosamente, la secuencia de gran parte del sRNA-IS9s es complementaria al sRNA-IS9as. Todo esto sugiere que la expresión de la transposasa está fuertemente regulada por estos dos RNAs pequeños.

Para estudiar cómo ocurre este proceso regulador hemos estudiado la expresión de los dos RNAs pequeños en distintas situaciones y fondos genéticos, incluyendo un mutante en *hfq* y la cepa de *P. putida* llamada F1, que no posee ninguna copia de ISPpu9. Además, para estudiar su influencia en la regulación de la eficiencia de transposición de esta IS, hemos creado varias construcciones que nos permiten medir la tasa de transposición en presencia o ausencia de estos RNAs pequeños. Se presentarán los resultados obtenidos hasta la fecha.

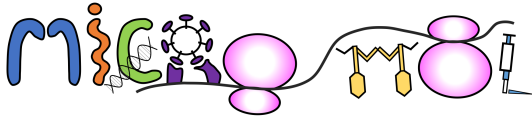


Multicopy plasmids facilitate evolutionary innovation in bacteria

Jerónimo Rodríguez-Beltrán¹, Craig MacLean², Rafael Peña-Miller³, Alvaro San Millán¹

¹ Hospital Universitario Ramon y Cajal-IRYCIS, Madrid, Spain; ² Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK; ³ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, Mexico.

Bacterial plasmids are circular DNA molecules that replicate and segregate independently from the chromosome. Plasmids play a key role in prokaryotic evolution because they are able to transfer horizontally between bacteria by conjugation, disseminating adaptive genes across microbial populations. For example, large conjugative plasmids (>20 kb) are responsible for the spread of antibiotic resistance among bacterial pathogens, one of the most important problems in modern medicine. However, approximately half of the plasmids in bacteria are non-conjugative, small (<20kb), multicopy plasmids (MCP), which usually present between 10 and 30 copies per cell. Interestingly, these small MCP provide an island of polyploidy in an otherwise haploid bacterial genome. Intrigued by this neglected but fascinating feature, we explored the evolutionary advantages associated with carrying a beneficial gene on a MCP. To this end, we constructed an experimental model system using *Escherichia coli* MG1655 and the β -lactamase gene *bla*TEM-1 encoded either on a MCP or in the chromosome, and we challenged these strains with increasing concentrations of ceftazidime. Using this system we were able to show that MCP accelerated resistance evolution by increasing the rate of appearance of novel TEM-1 mutations conferring resistance to ceftazidime first, and then by amplifying the effect of TEM-1 mutations due to increased gene dosage. Moreover, we also showed that MCP promoted the coexistence of ancestral and novel *bla*TEM alleles in bacterial cells, leading to heterozygosity. Interestingly, we could show that MCP-mediated heterozygosity allowed bacteria to escape from the trade-offs between ampicillin and ceftazidime resistance classically associated with different *bla*TEM alleles. Therefore, MCP helped bacteria to evolve ceftazidime resistance while maintaining high-level ampicillin resistance. In summary, our results suggest that multicopy plasmids are excellent platforms for the creation and maintenance of evolutionary innovations in bacteria, contributing to explain their extreme abundance in nature.



Análisis global de las respuestas transcripcionales a la carencia de nitrógeno en la cianobacteria *Nostoc* sp. mediante la construcción de una red de co-expresión

Manuel Brenes-Álvarez¹, Ana Sousa-Ortega¹, Jens Georg², Wolfgang R. Hess², Agustín Vioque¹, Alicia M. Muro- Pastor¹

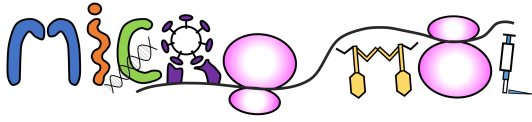
¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla), Sevilla, España

²University of Freiburg, Genetics and Experimental Bioinformatics, Freiburg, Alemania

Las cianobacterias pueden utilizar distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo amonio, nitrato o nitrógeno atmosférico. El uso de nitrógeno atmosférico está restringido a aquellas cianobacterias capaces de separar, temporal o espacialmente, los procesos de fotosíntesis oxigénica y fijación de nitrógeno por parte de la enzima nitrogenasa (extremadamente sensible al oxígeno). En el caso de *Nostoc* sp. PCC 7120, nuestra cianobacteria modelo, la carencia de nitrógeno combinado promueve la diferenciación de células especializadas, los heterocistos, que proporcionan un ambiente microaerobio apropiado para la fijación de nitrógeno.

Hemos analizado los cambios transcripcionales que ocurren en *Nostoc* sp. PCC 7120 en respuesta a la carencia de nitrógeno mediante el uso de microarrays diseñados para cubrir todo el transcriptoma, tanto codificante como no codificante, que habíamos definido previamente mediante un experimento de RNA-Seq diferencial. La comparación de las respuestas en la adaptación a la carencia de nitrógeno de la estirpe silvestre y una estirpe mutante que no diferencia heterocistos nos permite discriminar aquellos cambios transcripcionales relacionados con la respuesta general a la carencia de nitrógeno (uso de fuentes alternativas, reciclado de nitrógeno en forma de aminoácidos, etc), de aquellos cambios que están específicamente vinculados con la diferenciación de heterocistos y el establecimiento de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en estas células. Se han hibridado microarrays con un total de 20 muestras de RNA obtenidas a partir de células cultivadas en presencia de amonio o tras diferentes tiempos de cultivo en ausencia de fuente combinada de nitrógeno, lo que permite hacer una disección temporal de los cambios transcripcionales que ocurren. Con estos datos hemos construido una red de co-expresión que define una serie de grupos de transcritos con perfiles comunes de expresión. En cada uno de estos grupos aparecen genes ya conocidos vinculados con la respuesta a la carencia de nitrógeno y al desarrollo de los heterocistos y también genes no caracterizados que podrían representar nuevos elementos de esta respuesta, incluyendo transcritos no codificantes potencialmente reguladores, tanto RNAs pequeños como RNAs antisentido.

BFU2013-48282, BFU2016-74943 (Agencia Estatal de Investigación/FEDER);
Contrato predoctoral FPU014/05123

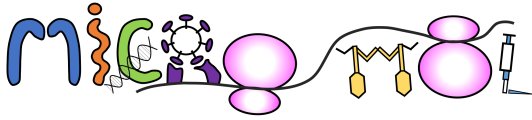


Nuevas implicaciones de FurC (PerR) en la modulación de la actividad de sus parálogos FurA y FurB en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

Cristina Sarasa, Isabel Valero, María Luisa Peleato, Adrián Velázquez-Campoy,
María F. Fillat y Emma Sevilla

Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular e Instituto de Biocomputación y física de sistemas complejos (BIFI). Facultad de ciencias, Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009-Zaragoza, España.

Las proteínas FUR (Ferric Uptake Regulator) pertenecen a una superfamilia de reguladores transcripcionales metalodependientes que juegan un papel central en el control del metabolismo de procariontes. La cianobacteria *Anabaena* PCC7120 contiene tres parálogos FUR, *all1691* (*furA*), *all2473* (*furB* (*zur*)) y *alr0957* (*furC*/*perR*). FurA es un regulador global que integra el control de la homeostasis del hierro con el metabolismo del nitrógeno y el estado redox de la célula. FurB (*Zur*) presenta una doble función controlando genes relacionados con el estrés oxidativo y el metabolismo del zinc e incrementando la tolerancia al estrés oxidativo, uniéndose de manera inespecífica al DNA y protegiéndolo. En *Anabaena*, FurA y FurB son capaces de autorregular su transcripción, al contrario que FurC. Sin embargo, FurC sí parece regular la actividad transcripcional de sus parálogos de manera indirecta modulando la unión de FurA y FurB a sus propios promotores. Además de esta función, recientemente se ha descrito que FurC actuaría como regulador PerR de *Anabaena*. Con el fin de investigar la capacidad de estas proteínas para modular de forma coordinada la transcripción génica en la cianobacteria, se realizaron experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) que corroboraron la interacción proteína-proteína de FurC tanto con FurA como FurB. Estos experimentos se combinaron con ensayos de retardo (EMSA) para comprobar si esta interacción alteraba la actividad de unión al ADN de FurA y FurB. Con el fin de analizar si estas interacciones observadas *in vitro* también se producían *in vivo* se llevaron a cabo experimentos de Doble Híbrido con diferentes combinaciones de FurA, FurB y FurC. Posteriormente se realizaron análisis transcripcionales de una cepa de *Anabaena* que sobreexpresaba FurC para evaluar la alteración en la expresión de genes que forman parte del regulón de FurA y FurB. Notablemente, la presencia de FurC también alteró la protección del ADN ejercida por FurB. Nuestros datos muestran que la influencia de FurC en la actividad reguladora de FurA y FurB va más allá de su autorregulación, y se amplía a la modulación de las dianas principales y regulación de otras funciones.



Un polimorfismo en *soxR* en una cepa de *Escherichia coli* resistente al carvacrol causa expresión diferencial en genes relacionados con el estrés oxidativo

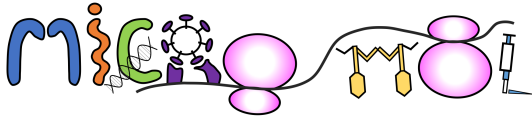
Elisa Pagán, Diana Sancho, Daniel Berdejo, Rafael Pagán, Diego García-Gonzalo

Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA)

Los aceites esenciales y sus compuestos individuales se han propuesto como una alternativa a los conservantes alimentarios de síntesis química. El carvacrol es un monoterpeno que se encuentra en gran variedad de aceites esenciales y cuya actividad antimicrobiana ha sido estudiada en profundidad. Sin embargo, hasta la fecha, el mecanismo de actuación del carvacrol no se conoce completamente.

Estudios previos han descrito la obtención de una cepa de *Escherichia coli* MG1655 resistente a carvacrol (CAR) mediante la exposición repetida a concentraciones subletales de este compuesto. Esta cepa contaba con una delección de 95030 pb en el genoma y un polimorfismo puntual en *soxR* (*superoxide response regulator*) que produciría el cambio de aminoácido D137Y en la secuencia de la proteína, poniéndose de manifiesto el papel de *soxR* en la resistencia a carvacrol. *soxR* codifica para un factor de transcripción que actúa como un sensor de estrés oxidativo y monóxido de nitrógeno. La proteína SoxR activa la transcripción del gen *soxS*, y a su vez, el aumento en el nivel de proteína SoxS induce la transcripción de más de 100 genes relacionados con la defensa antioxidante (regulón *soxRS*).

El objetivo de este estudio es elucidar el papel de *soxR* mutado en condiciones fisiológicas. Para ello, se obtuvo una cepa (CAR2) a partir de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 a la que se le introdujo mediante transducción con bacteriófagos el polimorfismo citado en *soxR*. Posteriormente, se realizó un estudio de transcriptómica mediante RNA-seq de cultivos en fase estacionaria de las cepas CAR2 y parental. Este estudio puso de manifiesto la expresión diferencial de 358 genes, entre ellos genes incluidos en el regulón de *soxRS*. Por ejemplo, la expresión de *soxS* y *fpr* (*ferredoxin-NADP reductase*) fue de ca. 10 veces mayor en CAR2 que en la cepa parental. Estos resultados confirman la influencia del polimorfismo en el gen *soxR* en la regulación de la expresión de numerosos genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, indicando el papel de este estrés en el mecanismo de inactivación del carvacrol.



Regulation of dNTP synthesis under changing oxygenation conditions: a network perspective

Lucas Pedraz López* (lpedraz@ibebarcelona.eu) Eduard Torrents Serra*
(etorrents@ibebarcelona.eu)

*: “Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies” lab (BIAT), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Baldiri I Reixac 10-12, 08028 BARCELONA

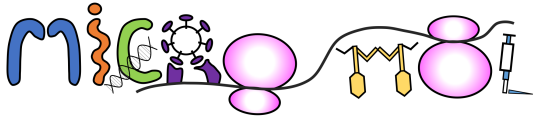
Oxygen availability is one of the main factors conditioning an ecological niche. **The presence of oxygen affects nearly all bacterial metabolism.** For a species to be adapted to different oxygenation conditions it has to codify not only multiple redundant metabolic pathways, but also a whole array of regulation factors that will coordinate the metabolic shift.

Among the oxygen-regulated pathways, we find **ribonucleotide reduction**. This is the last step in the synthesis of the dNTPs, the building blocks of DNA. The enzymes behind this essential activity are the ribonucleotide reductases (RNR). There are three classes of RNR, differing in their cofactor and metal requirements, as well as in their dependence on oxygen. Different bacteria codify different combinations of RNR, in a way that reflects their specific needs in the environments they can colonize.

There are numerous studies addressing the regulation of the different RNR, demonstrating the presence of dozens of individual regulative events that adapt ribonucleotide reduction activity to metal or nutrients deprivation, different growth speeds, oxidative stress or changing oxygenation conditions. In this work, we take a different approach to solve this puzzle.

We have developed a bioreactor to **expose a bacterial culture to gradients of oxygen concentration** as they would happen in a gradually depleted free-water environment, during the progressive colonization of a patient’s organ or in the fully formed 3D-structure of a biofilm. The system we have named **AnaeroTrans** is a sealed chemostat-like bioreactor coupled to a controlled oxygenation circuit and an optical oxygen sensor system.

Using this device, we have explored the **differential oxygen-dependent regulation of the RNR network as a whole**. The study comprises different species, such as *Escherichia coli*, a facultative aerobe prepared for a quick shift to anaerobiosis, and *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen more adapted to free-living environments. We can see how this differences fully define the nature of the anaerobic regulation of the RNR pathways, the role of each specific transcription factor, and the way in which individual regulative events on an RNR operon affect the whole network. *Supported by grants from “Ministerio de Economía y Competitividad” (BIO2015-63557-R), “Generalitat de Catalunya” (2017-SGR01079, 2015-FI-B-00817) and “La Caixa Foundation”.*



Nuevos aspectos en la distribución y la regulación por variación de fase de los genes *wlaN* y *cgtB* en *Campylobacter jejuni*

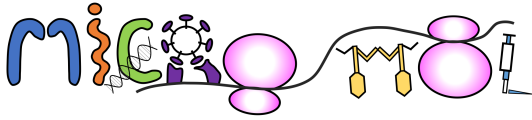
Pedro Guirado¹, Sonia Paytubi¹, Yaidelys Iglesias², Elisenda Miró², Ferran Navarro², Carlos Balsalobre¹, Cristina Madrid¹

¹ Departament Genètica, Microbiologia i Estadística, Universitat de Barcelona

² Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Campylobacter jejuni es la mayor causa de enfermedad entérica bacteriana transmitida por alimentos, causando una enteritis autolimitante. Además se ha establecido una relación entre infecciones previas por *C. jejuni* y dos desórdenes neurológicos autoinmunes, los síndromes de Guillain-Barré i Miller-Fisher. Estos síndromes se desencadenan por el mimetismo molecular existente entre el lipooligosacárido bacteriano (LOS) de *C. jejuni* y los gangliosidos humanos. Los genes *wlaN* y *cgtB* de *Campylobacter* codifican para enzimas que transforman la estructura de LOS tipo GM2 en GM1. Los gangliosidos GM1 se encuentran en la terminal del axón de las neuronas y en las células de Schwann. Los anticuerpos que se pueden generar contra los residuos de LOS de tipo GM1 de *C. jejuni* durante la infección pueden tener una reacción cruzada con los gangliosidos GM1 del tejido nervioso. Se ha sugerido que el producto funcional de *cgtB* y *wlaN* también está relacionado con la invasión de *Campylobacter jejuni* en células Caco-2.

El gen *wlaN* presenta una secuencia intragénica homopolimérica de residuos de guanina. La presencia de esta secuencia provoca que *wlaN* se exprese con variación de fase. La presencia de ocho residuos resulta en la expresión de una proteína completa (ON), mientras que 9 residuos generan una proteína truncada (OFF). El cambio entre fases es a través de un mecanismo de deslizamiento de hebras durante la replicación del ADN. Por otra parte, se conoce poco sobre la regulación de la expresión de *cgtB* y no se ha descrito la existencia de una regulación por variación de fase. En este trabajo se ha determinado la prevalencia genotípica y fenotípica de los genes *wlaN* y *cgtB* en una colección de 150 aislados de *Campylobacter jejuni* pertenecientes a 3 poblaciones diferentes: aislados clínicos, pollos de granja y aves salvajes. También se han descrito nuevos aspectos sobre la regulación de la expresión de estos genes. Por un lado, se han identificado dos nuevas variantes homopoliméricas de guanina en *wlaN* con 5 y 10/11 residuos. Por otra parte, *cgtB* también contiene una secuencia de residuos de guanina que permite una regulación por variación de fase similar a la descrita en el gen *wlaN*.



Análisis genómico del regulón directo de FleQ en *Pseudomonas fluorescens* F113 y *Pseudomonas putida* KT2440

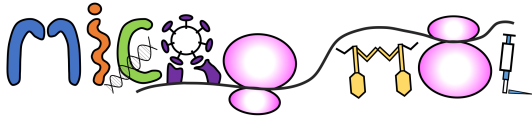
Esther Blanco-Romero¹, Miguel Redondo-Nieto¹, Francisco Martínez-Granero¹, Daniel Garrido-Sanz¹, Maria Isabel Ramos-González², Marta Martín¹ and Rafael Rivilla¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Darwin, 2. 28049. Madrid, Spain.

²Departamento de Protección Ambiental. Grupo de Microbiología Ambiental y Biodegradación. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Profesor Albareda, 1. 18008. Granada, Spain.

La rizosfera es un nicho ecológico que alberga comunidades microbianas que proliferan utilizando los exudados producidos por la planta. Muchas de las bacterias capaces de colonizar el ambiente rizosférico pueden tener un efecto positivo sobre el desarrollo de la planta, resultando de especial interés en aplicaciones como inoculantes agrícolas. Para que un inoculante se desarrolle en la rizosfera y pueda llevar a cabo su función, ha de ser competitivo. Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que la movilidad bacteriana es fundamental en el proceso de colonización competitiva de la rizosfera y que su regulación viene determinada por una compleja red de señalización en respuesta al ambiente. La proteína FleQ es un regulador transcripcional de los genes de biosíntesis del flagelo y algunos exopolisacáridos relacionados con la formación de biopelículas. Sabiendo que las proteínas FleQ de *Pseudomonas fluorescens* F113 y de *Pseudomonas putida* KT2440 están muy conservadas y son funcionalmente equivalentes, hemos llevado a cabo un análisis ChIP-Seq de los posibles sitios de unión al ADN de FleQ en ambas especies. Este análisis ha revelado la existencia de 121 y 103 sitios de unión de FleQ en los genomas de *P. fluorescens* F113 y *P. putida* K2440 respectivamente; por tanto, esta proteína actúa en ambas cepas como un regulador global. Los grupos de genes que potencialmente está regulados por FleQ incluyen, como era de esperar, genes de movilidad y biosíntesis del flagelo y de adhesión y producción de exopolisacáridos. Además, sorprendentemente, hemos observado que FleQ podría regular positivamente genes relacionados con la homeostasis de hierro. El análisis también ha revelado que hay 41 genes comunes regulados por FleQ en ambas cepas, estando la mitad de ellos relacionados con la movilidad, el mantenimiento de la pared celular y la homeostasis de hierro. Finalmente, los resultados de este trabajo también muestran que FleQ comparte una fracción importante de su regulón directo con el regulador global AmrZ en *P. fluorescens* F113 y que el solapamiento ocurre mayoritariamente en los genes relacionados con la homeostasis de hierro.

Financiado por MINECO-BIO2015-64480R, BFU2013-43469-P, BFU2016-80122-P. EB-R: Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, FPU-(FPU16/05513)-MECD. DG-S: FPU-(FPU14/03965)-MECD.



Análisis funcional del metiloma Dam en *Salmonella*

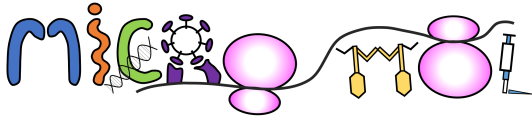
María Antonia Sánchez-Romero, David R. Olivenza, Ignacio Cota, Gabriel Gutiérrez
& Josep Casadesús.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Apartado
1095, Sevilla, 41080, España

La metilación del DNA es una señal epigenética que tiene diversas funciones biológicas en bacterias. En *Salmonella enterica*, la metilación de la adenina en sitios GATC por la metilasa Dam regula la transcripción de genes implicados en la interacción patógeno-hospedador y es esencial para la virulencia. La aparición de una nueva tecnología de secuenciación de DNA ("single molecule real-time sequencing" o "SMRT sequencing") permite determinar el "metiloma", es decir, la detección de N⁶-metil-adenina en la totalidad del genoma.

La secuenciación SMRT del cromosoma de *S. enterica* identificó 46 sitios GATC hipometilados (hemimetilados o no metilados). El análisis de la distribución de dichos sitios GATC indicó que la mayoría (96%) formaban parte de grupos que incluían 2, 3, 4 ó 5 sitios GATC y estaban localizados en promotores y/o regiones reguladoras. La hipometilación en sitios GATC en ese tipo de regiones suele ser indicativa de control transcripcional; por tanto, el análisis del metiloma permite detectar genes presuntamente regulados por metilación Dam.

Con objeto de determinar los patrones de regulación transcripcional por metilación Dam se construyeron fusiones transcripcionales con GFP en el extremo 3' de genes que contenían sitios GATC hipometilados localizados en presuntas regiones reguladoras. El análisis de células individuales por citometría de flujo reveló que 16 loci presentaban una expresión heterogénea, con formación de subpoblaciones bacterianas en algunos casos. El análisis bioinformático de las presuntas regiones reguladoras identificó sitios de unión para los factores de transcripción OxyR, Crp, LexA, Lrp y Fur. Al analizar la expresión de las fusiones GFP en mutantes carentes del correspondiente factor de transcripción, se confirmó que la formación de subpoblaciones estaba controlada por uno o más de dichos factores. Por tanto, este estudio amplía la lista de loci de *S. enterica* con control transcripcional por metilación Dam y resalta la contribución del metiloma GATC a la heterogeneidad fenotípica en una población bacteriana isogénica.



A portable epigenetic switch for subpopulation formation in bacteria

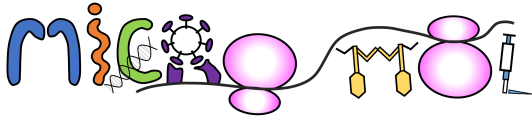
David R. Olivenza, Ignacio Cota, and Josep Casadesús

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla david.dolivenza@gmail.com

The *Salmonella enterica* *ovpAB* operon undergoes phase variation under transcriptional control by DNA methylation and transcription factor OxyR (1, 2). A ~700 bp DNA fragment containing the *ovpAB* promoter and the upstream control region was used to drive transcription of the *lacZY* operon, and LacZY^{OFF} and LacZY^{ON} subpopulations were formed. Use of *ovpAB* mutant variants yielded LacZY^{OFF} and LacZY^{ON} subpopulations with different sizes. Phase-variable *ovpAB::lacZY* expression was reproduced in *E. coli*, indicating that the construct can be used as a portable toggle switch in heterologous hosts. Cloning of the *ovpAB* cassette upstream of *acc6* and *ctxM* yielded antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive subpopulations, thereby confirming that the *ovpAB* toggle switch may have versatile utility.

The OvpAB phase variation system can be used to construct artificial toggle switches with a variety of potential uses. An example is the use of OvpAB as a sensor of the presence of bacteriophages. OvpAB^{OFF} cells are sensitive to bacteriophages that target the O-antigen while OvpAB^{ON} cells are resistant. Because the OvpAB^{OFF} subpopulation is predominant (in LB, 99.8%), a *Salmonella* strain carrying an *ovpAB::gfp* fusion shows very low fluorescence. In the presence of a bacteriophage, only the OvpAB^{ON} subpopulation survives, and the presence of a bacteriophage can be detected by an increase in fluorescence. Sensors of this kind can be useful to assist in bacteriophage isolation trials, and to monitor the presence of bacteriophages (and hence of host bacteria) in food, water, environmental samples, phage therapy, etc.

1. Cota I, Sánchez-Romero MA, Hernández SB, Pucciarelli MG, García-Del Portillo F, Casadesús J. PLOS Genetics 11:e1005667, 2016
2. Cota I, Bunk B, Spröer C, Overmann J, König C, Casadesús J. Nucleic Acids Research 44: 3595-3609, 2016
3. Cota I, Blanc-Potard AB, Casadesús J. PLoS One 7:e36863, 2012



Characterization of the regulon of Two-component systems of *Staphylococcus aureus*

Beatriz Rapún¹, Andreas Haag³, Begoña García¹, Joaquín Fernández-Irigoyen²,
Cristina Solano¹ e Iñigo Lasa¹

¹ Laboratory of Microbial Pathogenesis. Navarrabiomed. Dpto de Salud-Universidad Pública de Navarra. Pamplona

² Unidad de Proteómica. Navarrabiomed. Dpto de Salud-Universidad Pública de Navarra. Pamplona

³ Institut of Infection, Immunity and Inflammation. University of Glasgow. Glasgow. Pamplona

Backgrounds:

Bacteria use two-component systems (TCSs) to sense and respond to environmental changes. Each TCS senses an array of environmental stimuli and the number of TCSs in a bacterial genome seems to be proportional to the amount of environments bacteria encounter during their life cycle. Current knowledge about TCSs has been inferred from the analysis of recombinant bacteria that lack individual members of the network, and thus, we mainly have information about the genes and proteins regulated by each individual TCS. However, we know very little about the level of overlapping between the regulons of different TCSs, and whether epistatic relationships between TCSs regulatory networks exist.

Objective:

Our goal is to identify the regulon that specifically depends on each TCS of *S. aureus*. Here, we use a collection of *S. aureus* strains containing either an individual TCS or a constitutively active version of each Response Regulator (RR) generated in the laboratory in a previous study (1).

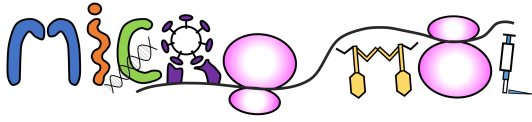
Methods:

Protein extracts from *S. aureus* strains containing an individual TCS or the active version of each RR were prepared under the same growing conditions (TSB; 37°C; OD600 0.8), and label-free differential proteomic assays were carried out. For transcriptomic assays, RNA was prepared from bacteria containing the active version of the RR grown in TSB, at 37°C up to an OD600 equal to 0.8. RNA-Seq using the Illumina platform was performed in the genomics unit of Glasgow University. Bioinformatics analysis identified the group of genes and proteins differentially regulated by each TCS and specific regulons were validated using reporter systems.

Conclusion:

We have identified and validated the regulon of each TCS using a multi-omic approach. Our results indicate that the number of genes and proteins specifically regulated by each TCS in a condition is low, with little overlapping between different regulons. These results support the hypothesis that the TCS network is organized as self-sufficient modules, each of them conferring the capacity to adapt to different environmental conditions.

(1) Villanueva M, *et al.* Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nature Communications*. 2018



Regulación post-transcripcional mediada por 3'UTRs en bacterias

Pilar Menendez-Gil y Alejandro Toledo-Arana

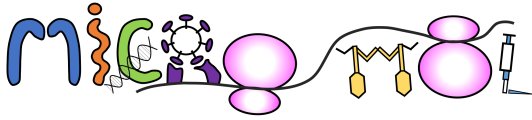
Laboratorio de Regulación Génica Bacteriana, Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gob. de Navarra. Avda. Pamplona 123, 31192 Mutilva, Navarra, Spain.

Un RNA mensajero típico (mRNA) está formado por una secuencia codificante (CDS) flanqueada en 5' y 3' por dos secuencias no traducidas (5'UTR y 3'UTR, respectivamente). En eucariotas, las 3'UTRs son esenciales para modular la expresión proteica mediante la interacción con diversas proteínas de unión a RNA y microRNAs. La desregulación de ciertos genes asociados con enfermedades como el cáncer está causada por un acortamiento de sus 3'UTRs, lo que demuestra su relevancia reguladora. Por el contrario, en bacterias su función es prácticamente desconocida porque la mayoría de los estudios se han centrado en sRNAs y 5'UTRs. Sin embargo, nuestro grupo y otros han demostrado que las 3'UTRs también pueden modular procesos bacterianos importantes, como la formación de biofilms y la virulencia.

Para demostrar que la regulación mediada por 3'UTRs (RMx3'UTRs) puede estar extendida entre los mRNA bacterianos, hemos realizado una clasificación de genes basados en su relevancia funcional y el largo de sus 3'UTRs, utilizando *Staphylococcus aureus* como modelo, uno de los patógenos más importantes a nivel mundial. Los 12 genes mejor clasificados fueron marcados con la secuencia 3xFLAG y clonados con o sin su respectiva 3'UTR. Encontramos que la delección de la 3'UTR afectaba la expresión de varios de los genes en función de la curva de crecimiento o del medio de cultivo, lo que indicaba que la RMx3'UTRs es específica de ciertos cambios ambientales.

Para profundizar en los mecanismos moleculares, nos centramos en el gen *rpiRc*, un regulador transcripcional que conecta el metabolismo de azúcares con la patogénesis mediante la represión de RNAlII, uno de los reguladores clave para la virulencia de *S. aureus*. Demostramos que la delección de la 3'UTR-*rpiRc* producía un aumento tanto de los niveles de su mRNA como de la proteína, probablemente debido a la eliminación del sitio de procesamiento reconocido por RNasa III. Como consecuencia, el mutante $\Delta 3'UTR$ disminuía su capacidad hemolítica por una menor expresión de RNAlII.

En conjunto, estos resultados confirman que las 3'UTRs participan en la correcta expresión de su mRNA y que la RMx3'UTRs debería considerarse como un nuevo nivel de regulación en bacterias equiparable al de eucariotas.



Regulación especie-especifica dependiente de σ^B de la síntesis del exopolisacárido PIA/PNAG en estafilococos

Maite Echeverz¹, Saioa Burgui¹, Iñigo Lasa¹, Jaione Valle¹

¹ Laboratory of Microbial Pathogenesis. Navarrabiomed. Dpto de Salud-Universidad Pública de Navarra. Pamplona

Antecedentes:

El exopolisacárido PIA/PNAG/Pga es utilizado por numerosas bacterias para producir la matriz del biofilm. La síntesis de este exopolisacárido es energéticamente costosa para la bacteria y por tanto su síntesis está altamente regulada. En estafilococos la síntesis de PIA/PNAG es responsabilidad del operón *icaADBC* y está regulada negativamente a través de un represor transcripcional denominado IcaR. El factor σ^B es responsable de regular la expresión génica en condiciones de estrés. Estudios previos han puesto de manifiesto que la síntesis de PIA/PNAG se incrementa en ausencia del factor σ^B en *Staphylococcus aureus* y, sin embargo, en *S. epidermidis*, no se produce síntesis de PIA/PNAG en ausencia de σ^B

Objetivo:

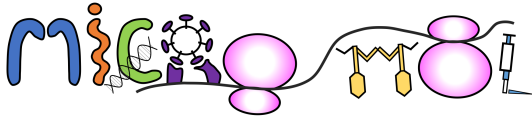
Teniendo en cuenta las diferencias de expresión del exopolisacárido PIA/PNAG en *S. aureus* y *S. epidermidis*, en este trabajo nos hemos planteado analizar las diferencias de regulación que motivan un comportamiento antagonista en la regulación del exopolisacárido PIA/PNAG por el factor de transcripción σ^B entre ambas bacterias.

Metodología:

Debido a las dificultades existentes para manipular genéticamente *S. epidermidis*, hemos transferido a *S. aureus* la región *icaADBCR* de *S. epidermidis* y analizado su expresión en presencia y ausencia del factor σ^B mediante la utilización de genes reporteros. Se han realizado construcciones para delimitar la región mínima de dicho operón responsable de la distinta regulación y validado dicha regulación a nivel de RNAm (Northern-blot) y proteína (western-blot).

Conclusión:

Hemos identificado que el diferente comportamiento en la expresión del operón *icaADBC* en *S. aureus* y *S. epidermidis* depende de elementos que se encuentran en la secuencia del propio operón *icaADBC*. Esta conclusión se basa en el hecho de que la regulación de la expresión del operón *icaADBC* de *S. epidermidis* sigue requiriendo de la presencia de σ^B cuando se introduce en *S. aureus*. Mediante un proceso de delección progresivo en el que regiones del operón *icaADBC* de *S. epidermidis* se han ido sustituyendo por la región equivalente del operón *icaADBC* de *S. aureus*, hemos sido capaces de identificar la región mínima del operón *icaADBC* que es responsable de que su expresión dependa del factor σ^B en *S. epidermidis*.



Comparative study of *M. tuberculosis* vs *M. bovis* *in vivo* infection and the possible role of the serine/threonine kinase pknH in the regulation of their virulence phenotype

Elena Mata^{1,2}, Santiago Uranga^{1,2}, Carlos Martín^{1,2,3}, Nacho Aguiló^{1,2}.

¹Grupo de Genética de Micobacterias, Depto. de Microbiología, Med. Prev., y Salud Pública

²CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III

³ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, ISS Aragón

Bovine tuberculosis disease, caused by *Mycobacterium bovis*, represents a big problem for cattle industry in some countries in Europe and mainly in Africa. The understanding of its pathogenesis is crucial to develop an effective vaccine against this disease.

It has been observed that *M. bovis* is more virulent than *Mycobacterium tuberculosis* in different animal models^{1,2}. Despite they share more than 99.95 % of genome homology³, the genomic differences that drive to such a strong disparity in their infection phenotypes remain unknown.

The aim of this work is to study the virulence of *M. bovis* vs *M. tuberculosis* *in vivo* and to explore the genomic and molecular basis responsible of the differences in their infection phenotypes.

We have compared virulence and dissemination of different *M. tuberculosis* and *M. bovis* strains in mice infected intranasally with 200 CFUs of each strain at two times post-infection, and we have observed that *M. bovis* strains have more ability to cause lung pathology and disseminate to other organs than *M. tuberculosis* strains.

Looking at the genomic differences between these species that may have a role in the phenotypes observed *in vivo*, we focused on the serine/threonine kinase pknH. The gene encoding this protein has a deletion of 200 bp in *M. bovis* in contrast with *M. tuberculosis* strains⁴, which have a complete version of this gene, and it has been described that a *M. tuberculosis* pknH knock-out is hypervirulent in mice⁵.

To study whether pknH deletion may have an impact in *M. bovis* virulence, we constructed two different *M. bovis* knock-in strains in which we cloned the complete pknH gene from *M. tuberculosis* under the control of its own promoter. We have studied the virulence phenotype of the *M. bovis* pknH knock-in strains compared to *M. bovis* wild-type strains in mice infected intranasally with 200 CFUs, and we have observed a reduction in lung damage and bacterial replication in lungs, spleen and liver of the pknH knock-in strains compared to the WT strains at one month-post infection, suggesting a possible role of this protein in the regulation of *M. bovis* virulence.

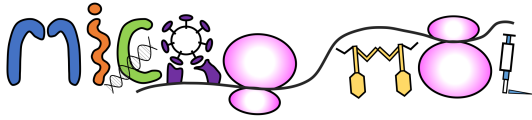
¹ Dunn PL, et al.. Infect Immun. 1995 Sep;63(9):3428-37.

² Nedeltchev GG, et al. Infect Immun. 2009 Feb;77(2):598-603.

³ Garnier T, et al.. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7877-82.

⁴ Malone et al., Genome announc; 2017

⁵ Papavinasasundaram KG, et al.. J Bacteriol. 2005 Aug;187(16):5751-60.



Una aproximación global basada en dual RNA-seq *in vivo* revela el papel de la competencia natural bacteriana durante la infección pulmonar por *Haemophilus influenzae*

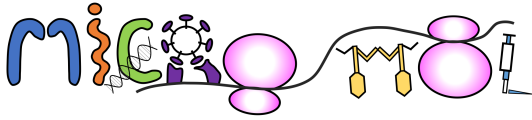
Begoña Euba^{1,2}, Nahikari López-López¹, Lucía Caballero¹, Celia Gil-Campillo¹, Roberto Díez-Martínez³, Mariette Barbier⁴, Junkal Garmendia^{1,2}

¹ Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), CSIC-Universidad Pública Navarra-Gobierno de Navarra; ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES); ³ Ikan Biotech SL, The Zebrafish Lab, Centro Europeo de Empresas e Innovación de Navarra (CEIN); ⁴ Department of Microbiology, Immunology and Cell Biology, West Virginia University School of Medicine, Morgantown WV 26505, USA.
E-mail: beuba@alumni.unav.es

Determinar el perfil de expresión génica de un patógeno durante un proceso infeccioso es esencial para entender su patogénesis. En este trabajo, empleamos dual RNA-seq para analizar simultáneamente el perfil de expresión génica del patógeno oportunista *Haemophilus influenzae* y un hospedador murino en respuesta a la infección respiratoria. Analizamos el perfil de expresión de *H. influenzae* cepa 375 *in vivo*, mediante comparación del transcriptoma bacteriano tras crecimiento exponencial en medio sBHI, condiciones de administración intranasal a ratones CD1, y el transcriptoma de la carga bacteriana recogida en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) tras 12 h de infección. Asimismo, comparamos el perfil expresión génica pulmonar en ratones no infectados e infectados por *H. influenzae* en las condiciones descritas.

El principal reto técnico fue obtener ARN bacteriano en cantidad suficiente a partir de muestras pulmonares, para lo que se generaron *pools* de muestras de LBA de múltiples animales infectados simultáneamente. Se purificó ARN total a partir de muestras de pulmón y LBA. Se generaron y secuenciaron tres librerías de cDNA por tipo de muestra mediante la plataforma Illumina MiSeq. Las lecturas obtenidas en cada grupo se alinearon independientemente con los genomas de *H. influenzae* o *Mus musculus* mediante CLC Genomics. El número de lecturas obtenido por grupo, y el porcentaje de lecturas alineadas frente a patógeno o a hospedador murino, indicaron que la metodología utilizada proporcionó ARN de calidad y en cantidad suficientes para permitir el análisis transcriptómico de patógeno y huésped durante la infección respiratoria *in vivo*.

La práctica totalidad de los genes que codifican la maquinaria de transformación natural de *H. influenzae*, responsable de la captación de ADN lineal exógeno y pertenecientes al regulón CRP, mostraron una sobre-expresión significativa *in vivo*, al igual que los genes que codifican la ruta de biosíntesis de purinas, cuya implicación en la regulación de la competencia natural de *H. influenzae* es conocida. En el ratón, observamos una clara respuesta inmune a la infección. En conjunto, esta visión transcriptómica global y dual identifica nuevos aspectos de la interacción hospedador-patógeno durante la infección respiratoria por *H. influenzae* que serán objeto de futuros análisis.



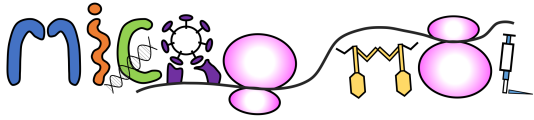
Regulation of the cell division gene *zapB* by bile salts in *Salmonella enterica*

Rocío Fernández-Fernández, Verónica Urdaneta and Josep Casadesús

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla
E-mail: rocio-ff@us.es Telephone number: +34 954553822

The concentrations of bile salts that inhibit *Salmonella* growth are not absolute, and the bile resistance level of wild type *Salmonella* can be increased over the customary minimal inhibitory concentration by growth in the presence of sublethal concentrations of bile. This phenomenon, known as adaptation, is accompanied by dramatic changes in gene expression. The complexity of the adaptation process is illustrated by the fact that a sublethal concentration of sodium deoxycholate (DOC), an archetypal bile salt, modifies the expression of over 200 *Salmonella* loci. A locus whose expression increases in the presence of bile salts is *zapB*, a gene that encodes a non-essential cell division factor involved in Z-ring assembly. In *Salmonella*, null *zapB* mutants are bile sensitive. Upregulation of *zapB* by bile is postranscriptional: the stability of *zapB* mRNA increases when *Salmonella* is exposed to sublethal concentration of DOC. This increase is lost in an *hfq* mutant, suggesting the involvement of a sRNA in the control of *zapB* mRNA stability in the presence of DOC.

Deletion analysis of *zapB* identified a mRNA region as the possible target of postranscriptional control. This region comprises the 5'UTR, the promoter, and the upstream 18 nucleotides of the *zapB* coding region. Bioinformatic analysis predicted three small regulatory RNAs that might bind this sequence: MicA, IsrI and InvR. Overexpression of both MicA and InvR increased *zapB* expression in the presence of DOC. The increase was lost when point mutations were introduced by site-directed mutagenesis altering the predicted sRNA-mRNA interaction. These experiments provide evidence that MicA and InvR may control *zapB* mRNA stability.



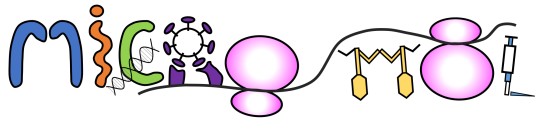
Patterns of bistable expression among SOS genes

A. Mérida-Floriano; J. Casadesús

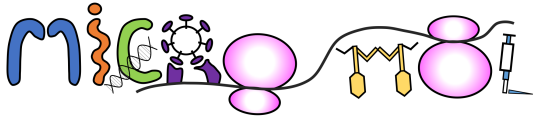
Departamento de Genética, Universidad de Sevilla amerida1@us.es

Exposure of bacteria to DNA damaging agents elicit a pleiotropic stress response, named 'SOS response', that modulates DNA replication and DNA repair functions and controls cell division. Of all the genes induced by DNA damage, only a small fraction is regulated by the canonical RecA-LexA system. In this study we combine transcriptomic and bioinformatic analysis to identify what we have named the 'core SOS response', formed by genes that meet three criteria: upregulation in the presence of DNA damaging agents, possession of a SOS box in the promoter region, and repression by LexA.

Analysis of core SOS response genes at the single cell level reveals that they can be classified into three different categories according to their bistable expression pattern. This work illustrates the occurrence of unsuspected heterogeneity in the SOS response.



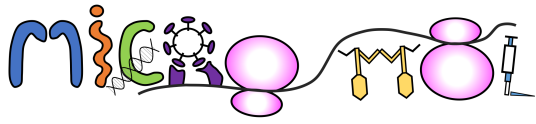
XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018



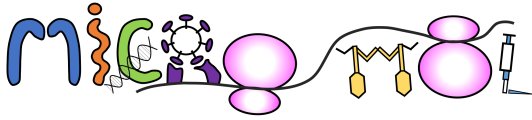
XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

(póster)



XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018



Further insights into synergy between ethambutol and the circular bacteriocin AS-48 as a strategy for fighting *M. tuberculosis* infection.

Clara Aguilar-Pérez^{a,b}, Begoña Gracia^{a,b,c}, Rubén Cebrián^d, Nathalie Deboosère^e,
Ok-ryul Song^e, Priscille Brodin^e, Mercedes Maqueda^d, José A. Aínsa^{a,b,c}.

^aDept. Microbiología, and BIFI, Universidad de Zaragoza. ^bInstituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS-Aragón).

^cCIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). ^dDept. Microbiología, Universidad de Granada. ^eINSERM-Institut Pasteur (Lille, France).

The increasing incidence of multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and the very few drugs available for treatment are promoting the development of a new line of drugs that try to solve these problems. Following this idea, we explored the antibacterial peptide AS-48, produced by *E. faecalis*, which is targeting the bacterial membrane, and it is active against several Gram-positive bacteria. We demonstrated that AS-48 has a bactericidal action against *M. tuberculosis* including H37Rv and other clinical and reference strains, and also against some non-tuberculous clinical mycobacterial species. We highlight the synergistic effect of the combination of AS-48 with either lysozyme or ethambutol (commonly used in the treatment of tuberculosis), two compounds that increase antimicrobial action of AS-

48. Under these conditions, AS-48 kills *M. tuberculosis* at a lower dose, and exhibits a MIC (Minimal Inhibitory Concentration) close to some of the first line anti-TB agents. In addition, we assayed cytotoxicity of AS-48 against THP-1, MHS and J774 macrophage cell lines, and found that at concentrations close to the MIC of AS-48 we could not detect any cytotoxic effect. The activity of AS-48 for inhibiting *M. tuberculosis* growth was also observed within the infected macrophages; in this model, synergy was also observed for combinations of AS-48 and ethambutol.

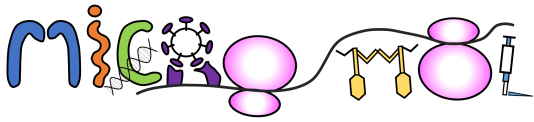
On the one hand, *in vivo* toxicity studies, in both sexes of mice, have been performed showing not significant changes in the behaviour and histology of different organs. On the other hand, AS-48 alone and in combination with ethambutol was shown not to reduce bacterial burden in *M. tuberculosis* infected mice.

We are currently exploring the mechanism of action of bacteriocin AS-48 by transcriptional approaches.

In summary, we consider that combination of ethambutol and the bacteriocin AS-48 has an interesting potential in antituberculosis therapy, due to its activity against mycobacterial species and its low cytotoxicity against cell lines.

REFERENCES:

1. Sanchez-Hidalgo M *et al.* AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(17):2845-57.
2. World Health Organization. 2017. Global tuberculosis report 2017. World Health Organization, BY-NCSA LC, IGO, Geneva.
3. Aguilar-Pérez *et al.* Circular bacteriocin AS-48 is active against *M. tuberculosis* and shows synergy with first-line antituberculosis drug ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*, in press.



Caracterización biológica de una nueva serie de compuestos químicos con actividad antimicrobiana

Raquel Alonso-Román¹, Ainhoa Lucía^{1,2,3}, José Antonio Aínsa^{1,2,3}, Santiago Franco^{4,5}, Santiago Ramón-García^{1,2,3,6}.

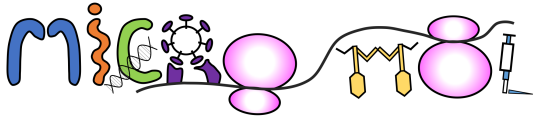
1. Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, España.
2. CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, España.
3. Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, España.
4. Grupo Materiales Moleculares electro y fotoactivos. Dpto. Química Orgánica, Universidad de Zaragoza. España.
5. Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA), Universidad de Zaragoza – CSIC. España
6. Research & Development Agency of Aragon (ARAID) Foundation, España.

La resistencia a los antimicrobianos supone un gran problema de salud global, no solo porque las bacterias resistentes causan millones de muertes en todo el mundo, sino también porque cada vez se aprueban menos antibióticos para tratar las infecciones que producen. Es por esto que actualmente existe una gran necesidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos eficaces contra cepas multirresistentes.

En este proyecto hemos caracterizado la actividad antimicrobiana de una librería de 39 compuestos químicos con características estructurales relacionadas nunca antes ensayados en procesos biológicos. Para ello se siguió una estrategia de descubrimiento de fármacos, con el objetivo de seleccionar aquellos que mostraran actividad *in vitro* y no fueran citotóxicos

Primero se realizó un ensayo de a concentración única (*single shot*) contra 17 cepas bacterianas (incluyendo Gram- positivas, Gram-negativas y micobacterias), seleccionando 13 compuestos que mostraron actividad a 50 μM en al menos una de las cepas. A continuación, se llevaron a cabo experimentos de dosis-respuesta y cinéticas de muerte, seleccionando 5 con actividad bactericida contra bacterias Gram-positivas a concentraciones entre 0,78 y 50 μM . Posteriormente, se realizaron ensayos de citotoxicidad en células hepáticas, determinando índices de selectividad entre 4 y 64. Además, se determinó mediante el Test de Ames que a la concentración máxima ensayada de 2,5 μM los compuestos no eran mutagénicos. Finalmente se llevaron a cabo estudios de relación estructura-actividad (SAR) definiendo características estructurales químicas determinantes para la actividad de los compuestos.

En resumen, se han seleccionado compuestos activos contra bacterias Gram-positivas con índices de selectividad aceptables que abren una nueva línea de investigación con potencial de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos. Ensayos futuros pueden incluir estudios más en detalle de la actividad *in vitro* e *in vivo*, toxicidad, mecanismo molecular de acción y de química médica para optimización de los compuestos.



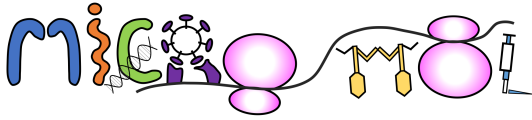
Improving the current brucellosis vaccine Rev1: reversion of its resistance to streptomycin.

Beatriz Aragón Aranda, Ignacio Moriyón Uría, and Raquel Conde Álvarez

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra

The gram-negative bacteria of the genus *Brucella* cause a world wide-distributed zoonotic disease. Animal vaccination is essential to control brucellosis. The commonly used live attenuated vaccine in ovine brucellosis prophylaxis is *Brucella melitensis* Rev.1. However, this vaccine is pathogenic to humans and streptomycin (Strp) resistant, being this drug one of the antibiotics of choice for the treatment of brucellosis. Strp resistance has been associated with mutations in 16S rRNA, in *rpsL* (encoding the 30S ribosomal protein S12) or in *rsmG* (encoding a rRNA methyltransferase acting on the N7 position of the purine ring at 16S rRNA G527). The sequences of these genes in *B. melitensis* strain 16M (Strp sensitive) and vaccine Rev.1 were compared. These analyzes revealed the absence of changes in 16S rRNA, a point mutation in Rev.1 *rpsL* at codon 91 leading to a Pro- to-Leu change, and a point mutation in Rev.1 *rsmG* at codon 81 leading to a Pro-to-Arg change. Recent reports indicate that high-level streptomycin resistance is often linked to mutations in *rpsL*, whereas mutation in *rsmG* confers low-level streptomycin resistance. Interestingly, several studies have observed a synergy between mutations in *rsmG* and *rpsL* to induce streptomycin resistance. Thus, we hypothesized that analogous mutations might be responsible for Rev.1 Strp resistance. Accordingly, the objective of this work was to apply point mutation-dependent strategy to study the involvement of *rsmG* in aminoglycoside resistance in *B. melitensis* and to revert the Strp resistance of Rev.1.

We demonstrated that loss of the m7G modification in *B. melitensis* 16M 16S rRNA due to deletion of *rsmG* confers low-level streptomycin resistance. Moreover, after performing a selection assay to recover the *rsmG* mutants are able to grow on high streptomycin concentrations, we observed the emergence of a high proportion of spontaneous high- level streptomycin resistance mutations being the most frequent a K88Q change in *rpsL*. This result strongly suggests a role for *rsmG* in the emergence of Strp resistance in *B. melitensis* and, accordingly, that reversion of Strp resistance in vaccine Rev 1 needs to repair the mutations detected in both *rsmG* and *rpsL*.



**Interacciones proteína-proteína *in vivo* en la bacteria halófila
Chromohalobacter salexigens: confirmación de una red de regulación cruzada
entre sistemas de dos componentes.**

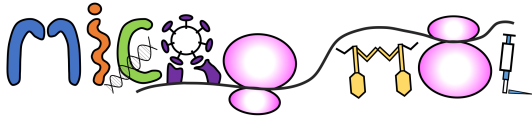
Rosa García-Valero, Joaquín J. Nieto, Carmen Vargas y Montserrat Argandoña

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

Chromohalobacter salexigens es una bacteria halófila capaz de crecer en un muy amplio rango de salinidades, siendo su principal estrategia de osmoadaptación la acumulación citoplasmática de las ectoínas, dos solutos compatibles que se acumulan en respuesta a diferentes tipos de estrés y con gran interés industrial y biomédico. Para coordinar estos procesos, las células están equipadas con diferentes sistemas y mecanismos de osmodetección y transducción de señales. Sin embargo, estos mecanismos de transducción de señales no se han estudiado en profundidad en bacterias halófilas. Nuestros estudios previos evidencian que el sistema de dos componentes EupK/EupR es un sistema clave en *C. salexigens* ya que parece controlar tanto los genes de síntesis, degradación y transporte de ectoínas, como del catabolismo de la glucosa. Sin embargo, dependiendo de condiciones externas de salinidad y fuente de carbono, en ocasiones, EupK, no está fenotípicamente vinculado con EupR, por lo que podría estar relacionado con otros sistemas de dos componentes formando parte así de una compleja red de regulación cruzada. En la búsqueda de las posibles histidinas quinasa que podrían estar implicadas en dicho circuito, nos hemos centrado en aquellas que tienen características similares a EupK, como la de poseer un dominio REC, típico de las histidinas quinasa híbridas. Por todo ello, hemos seleccionado a Csal_1062, que es una de las cuatro histidinas quinasa híbridas presentes en el genoma de *C. salexigens*.

En el presente estudio pretendemos confirmar *in vivo* la interacción proteína-proteína entre el sistema EupK/EupR y la mencionada histidina quinasa híbrida. Para ello se han realizado experimentos de BACTH (Bacterial Two Hybrid) para determinar las posibles interacciones proteína-proteína en un sistema heterólogo (*E. coli*) y en distintas condiciones de salinidad y fuente de carbono. Nuestros resultados demuestran la interacción entre EupK, EupR y Csal_1062, dependiendo de las condiciones ensayadas. Además, se han iniciado estudios de interacción *in vivo* mediante las técnicas de “Membrane-SPINE”, coimmunoprecipitación y “Western-Blot” a fin de corroborar estos resultados en *C. salexigens*.

Financiación: BIO2015-63949-R (MINECO/FEDER, UE) y Junta de Andalucía (BIO-320).



LOS PLÁSMIDOS ColE1 COMO PLATAFORMAS DE CAPTURA GENÉTICAS: AUMENTANDO LA PLASTICIDAD BACTERIANA

Manuel Ares-Arroyo, Cristina Bernabe-Balas, Jose Francisco Delgado-Blas, Gabriel Moyano, Bosco R. Matamoros, Natalia Montero y Bruno Gonzalez-Zorn

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, España

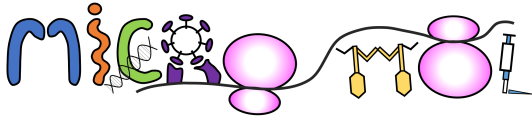
Los plásmidos y otros elementos genéticos móviles desempeñan un papel clave en la evolución bacteriana. Entre ellos destacan los pequeños plásmidos multicopia, como los tipo-ColE1, al aportar ventajas adaptativas únicas a las poblaciones bacterianas que los portan. En este trabajo estudiamos la plasticidad genética que ofrecen los replicones ColE1 resaltando la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos, analizando muestras de origen humano, animal y ambiental con una perspectiva “One Health”.

Para el estudio de los plásmidos ColE1 utilizamos una PCR universal específica de estos replicones¹. Primero, realizamos la PCR *in silico*, usando tres colecciones previamente secuenciadas de Enterobacteriaceae: 47 aislados de origen ambiental provenientes de España, 55 aislados clínicos de India y 56 aislados de origen humano, animal y ambiental de Venezuela. Además, en el estudio incluimos cuatro muestras de heces de diferente origen (pollo, pavo, cerdo y humano, respectivamente), llevando a cabo la PCR *in vitro* directamente de la extracción total de ADN de dichas heces y secuenciando el producto amplificado por Illumina.

En los aislados secuenciados describimos 65 nuevos plásmidos ColE1 demostrando la extraordinaria prevalencia de estos replicones: 70,21%, 83,64% y 96,43% en los aislados de España, India y Venezuela, respectivamente, mientras que en las muestras fecales obtuvimos una larga lista de genes codificados por los plásmidos ColE1 presentes en la microbiota de las especies analizadas. Tanto en los aislados, como en las muestras fecales, destaca la variedad de genes accesorios que estos replicones son capaces de codificar. Además de importantes genes de resistencia frente a quinolonas, β -lactámicos, aminoglucósidos y sulfamidas, encontramos una amplia diversidad de funciones, como proteínas de choque térmico, producción de exopolisacáridos, resistencia frente a bacteriófagos, etc. Destaca la elevada prevalencia de plásmidos crípticos, “vacíos”, que junto a la gran variedad genética de los replicones ColE1 y la frecuente presencia de transposones, sugieren la capacidad de estos plásmidos para actuar como plataformas de captura genética, acelerando la evolución bacteriana en las poblaciones en las que se encuentran.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra la enorme plasticidad genética que ofrecen los plásmidos ColE1, destacando su papel en la evolución de las poblaciones bacterianas.

¹Ares-Arroyo, M., Bernabe-Balas, C., Santos-Lopez, A., Baquero, M.R., Prasad, K.N., Cid, D., Martin-Espada, C., San Millan, A. and Gonzalez-Zorn, B. (2018). PCR-Based Analysis of ColE1 Plasmids in Clinical Isolates and Metagenomic Samples Reveals Their Importance as Gene Capture Platforms. *Front. Microbiol.* 9:469. doi: 10.3389/fmicb.2018.00469



From the understanding to the treatment of biofilm wound infections

Aida Baelo, Marija Vukomanovic and Eduard Torrents (abaelo@ibecbarcelona.eu)

“Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies” lab (BIAT), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldiri I Reixac 10-12, 08028 BARCELONA

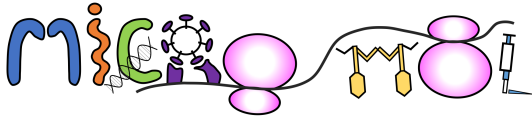
Wounds represent a very common and serious health problem worldwide. The exposure of host tissue to the external environment allows the proliferation of a broad variety of pathogenic microorganisms, causing severe infections that are difficult to eradicate, such as diabetic foot ulcers, burn and surgery wounds. Bacteria infecting wounds arrange themselves in polymicrobial communities known as biofilms. The features displayed by the biofilm hinder and delay the healing processes, as such bacterial communities exhibit higher resistance to antibiotics and higher ability to evade the immune response. The understanding of the interaction between the components of this microbial community within the host is essential in order to develop new healing strategies that target bacteria growing in wounds.

However, classic culture methods do not allow the simultaneous co-culture of different bacterial species, or the study in a more-realistic infection site environment, where several host factors are presented. We use a novel *in vitro* culture approach, optimizing a method to assess bacterial viability in a wound biofilm model. This *in vitro* multispecies biofilm model resembles the natural conditions present in wounds and allows us to study a *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* co-culture, which are the predominant bacteria found in wounds.

We show that *P. aeruginosa* and *S. aureus* reach an equilibrium in the wound-like environment, with both microorganisms replicating under these conditions. we use a set of biofilm-degrading enzymes targeting the wound biofilm so as to improve the antibiotic delivery in the local area of the infection site.

As replication is a crucial step to initiate an infection, we have first focused on the study of the differential role of the different *P. aeruginosa* Ribonucleotide Reductase (RNR) enzymes in bacterial growth within the wound biofilm model, as RNR are essential enzymes in DNA replication. Also, we use a set of biofilm-degrading enzymes targeting the wound biofilm so as to improve the antibiotic delivery in the local area of the infection site.

This work was supported in part through grants to ET from the Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-24066 and BIO2015-63557-R), Generalitat de Catalunya (2014 SGR01260), Catalan and Spanish Cystic Fibrosis foundations and from fundació La Caixa y CAIXAIMPULSE. AB is thankful to the Ministerio de Educación Cultura y Deporte for its financial support through the FPU programme (FPU13/06083).



Biogénesis de centros Fe-S, daño al DNA y mecanismos de respuesta en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

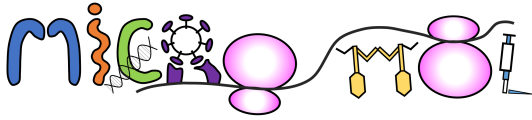
Jordi Pijuan, Enrique Herrero y Gemma Bellí.

Grupo Biología Molecular de Levaduras. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Universidad de Lleida. Edificio Biomedicina I. Avda. Alcalde Rovira Roure, 80. 25198 Lleida

jordipijuan@cmb.udl.cat
gemma.belli@cmb.udl.cat
enric.herrero@cmb.udl.cat

La biogénesis mitocondrial de centros Fe-S por la maquinaria ISC y la citosólica por la maquinaria CIA son necesarias en múltiples procesos celulares, como son la respiración, la biosíntesis de cofactores, la regulación de la expresión génica, y el metabolismo del DNA. En este estudio demostramos que defectos en diferentes etapas de la biosíntesis mitocondrial y citosólica de centros Fe-S causan un incremento en la mutagénesis espontánea e hipersensibilidad a agentes genotóxicos, acompañado de un aumento en la formación de foci asociados a Rad52, siendo todos hechos indicativos de la presencia de lesiones en el DNA y de inestabilidad genómica. Además, defectos en la síntesis de centros Fe-S provocan la activación constitutiva del *checkpoint* de daño al DNA, estimulando el aumento de la actividad ribonucleótido reductasa mediante la disminución de los niveles del inhibidor Sml1 y la restricción citosólica de las subunidades enzimáticas Rnr2/4. Dependiendo de la etapa dañada de la maquinaria ISC se activan diferentes mediadores de señalización para regular el *checkpoint*, convergiendo en la quinasa Dun1. Así las células carentes de la glutaredoxina Grx5 muestran una activación de Dun1 independiente de Mec1 y Rad53. No obstante, cuando está afectada una vía secundaria de la biogénesis de centros Fe-S en mitocondria por falta de Iba57, la activación de Dun1 depende de Mec1.

En paralelo a la inestabilidad genómica observada, se observa una pérdida constitutiva del DNA mitocondrial, y consecuentemente, defectos en la respiración y otras disfunciones mitocondriales. Exclusivamente en el caso de las células carentes de Iba57, el incremento de la actividad de la ribonucleótido reductasa permite el mantenimiento del DNA mitocondrial, así como el rescate de la capacidad respiratoria y de otras actividades mitocondriales.



Las secuencias de inserción como mecanismo evolutivo de adaptación plasmídica a nuevas familias bacterianas

Cristina Bernabe-Balas, Manuel Ares-Arroyo, Alfonso Santos-Lopez, Andreas Hoefler, Gabriel Moyano, Jose F. Delgado-Blas, Bosco R. Matamoros, Carlos Serna-Bernaldo, Natalia Montero, Didier Mazel y Bruno Gonzalez-Zorn.

Introducción

Las secuencias de inserción (ISs) tienen un papel fundamental en la evolución y modificación genética de poblaciones bacterianas, ya sea interrumpiendo genes al insertarse, aumentando la expresión génica o movilizándolo contenido genético entre bacterias. En este trabajo, describimos la adaptación de un plásmido a una nueva familia bacteriana gracias a la adquisición de ISs cromosómicas en un ensayo de evolución adaptativa, y profundizamos en el mecanismo por el cual el plásmido es capaz de adaptarse.

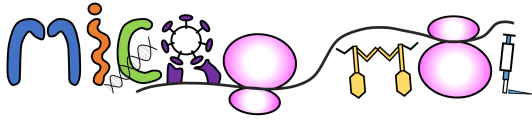
Materiales y Métodos

Realizamos tres evoluciones experimentales de *E. coli* DH5 α con el plásmido tipo ColE1 pB1000, descrito en la familia Pasteurellaceae. Tras extraer y secuenciar los plásmidos evolucionados, los transformamos en *E. coli* no adaptadas y analizamos la estabilidad, número de copias (PCN) y coste biológico de dichos plásmidos. Una vez localizada la región del plásmido responsable de la adaptación, la clonamos en un vector de expresión y estudiamos la presencia de un posible péptido en la secuencia mediante ensayos de estabilidad y análisis fenotípico de las construcciones.

Resultados y conclusiones

El plásmido pB1000 es altamente inestable en *E. coli* en ausencia de presión selectiva. Sin embargo, tras evolucionar en presencia de ampicilina, todos los plásmidos fueron 100% estables, incluso al introducirlos en *E. coli* no adaptadas. Al analizar su secuencia, vimos que la mayoría había adquirido una IS (IS1 o IS10) en la misma región plasmídica, localizada entre las relaxasas y el gen de resistencia. El PCN de los plásmidos con IS no aumentó, sino que el aumento de estabilidad se debió a la reducción del coste biológico. Tras analizar la región donde se insertaban las ISs, descubrimos la presencia de dos ORFs, ORF3 y ORF40, que quedaban interrumpidos por las ISs. Clonamos ambos ORFs por separado en el vector de expresión pBAD43 y vimos que la expresión del ORF40 provocaba la pérdida del vector en la población, afectando también al crecimiento de las colonias que los expresaban.

Por tanto, en este trabajo describimos cómo las secuencias de inserción permiten la adaptación de un plásmido a una nueva familia bacteriana al impedir la expresión de un péptido responsable de la inestabilidad plasmídica.



Impacto de la aerobiosis en la actividad de Fur (Ferric uptake regulator) del patógeno anaerobio estricto *Clostridium difficile*

Ángela Fernández-Otal^{1,2}, Andrés González², M^a Luisa Peleato¹, María F. Fillat¹,
Ángel Lanas², M^a Teresa Bes¹

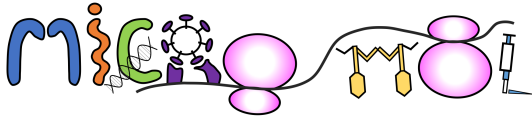
¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular e Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI). Universidad de Zaragoza.

²Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS)

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia estricta y formadora de esporas, que constituye la principal causa de diarrea nosocomial. Para sobrevivir y causar infección necesita hierro, cuya adquisición está controlada por el regulador transcripcional Fur. En *C. difficile*, Fur muestra autorregulación y controla la expresión de sistemas de transporte de hierro ferroso (Fe^{2+}) como el operon *feo1* (*feoA* y *feoB*). En condiciones anaeróbicas, si *C. difficile* se expone a exceso de Fe^{2+} , este ion se asocia a Fur que dimeriza sobre su promotor y sobre el del gen *feoA* impidiendo su transcripción. En general, Fur evita la incorporación excesiva de hierro intracelular, fuente de daño oxidativo en atmósfera oxigénica. Aunque *C. difficile* es anaerobia estricta, durante la exposición a O_2 atmosférico induce varios transportadores de electrones, sugiriendo que cuenta con mecanismos de tolerancia a condiciones oxidantes. En estas circunstancias, el gen *feoA* se induce de forma significativa.

Este trabajo presenta una caracterización bioquímica y funcional del homólogo Fur de *C. difficile* en condiciones aeróbicas. La proteína sobrepresada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) se muestra mayoritariamente como monómero con dos isoformas, una isoforma reducida capaz de unirse al DNA y otra isoforma oxidada inactiva. A diferencia de su comportamiento en condiciones anaeróbicas, la proteína reducida muestra máxima capacidad de unión al DNA sólo en ausencia de metal correpresor. Análisis de contenido en metales indican que Fur coordina un átomo de zinc por monómero, independientemente de su estado de oxidación. Tras exposición a condiciones oxidantes, el Zn^{2+} se disocia de Fur provocando la oligomerización y pérdida de actividad de la proteína. El proceso resulta aparentemente reversible tras tratamiento con un agente reductor.

Los resultados muestran propiedades de Fur de *C. difficile* con posible relevancia fisiológica en la regulación redox de genes diana en aerobiosis. Aunque la transmisión de *C. difficile* se asocia a la resistencia de sus esporas al O_2 , la existencia de esta forma activa de Fur en condiciones aeróbicas contribuiría a facilitar la supervivencia de las células vegetativas en presencia de O_2 durante la transmisión fecal-oral, proporcionando una oportunidad adicional al patógeno para su propagación.



Development of a new TB-HIV combined vaccine through the expression of HIV epitopes in the live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* MTBVAC

Esther Broset^{1, 2, 3}, Narcís Saubi⁴, Nacho Aguiló^{1, 2}, Carlos Martín^{1, 2, 5}, Joan Joseph Munné⁴, Jesús Gonzalo-Asensio^{1, 2, 3}

¹ Grupo de Genética de Micobacterias, Departamento de Microbiología y Medicina Preventiva, Universidad de Zaragoza

² CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid

³ Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Zaragoza

⁴ Hospital Clínic de Barcelona (IDIBAPS), Barcelona

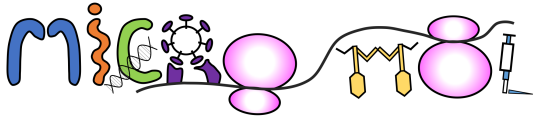
⁵ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragón, Zaragoza

Today, BCG remains the only licensed vaccine against tuberculosis (TB). BCG is considered to afford protection against disseminated forms of TB but lacks efficacy against pulmonary TB, the most common form of the disease responsible for transmission. MTBVAC is the first and only live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-based vaccine to enter clinical trials, and up today, three clinical trials have been completed or being conducted (NCT02013245, NCT02729571 and NCT02933281). MTBVAC aims to confer a better protection against respiratory TB than the present vaccine BCG, developed as a BCG replacement vaccine in newborns.

In order to use MTBVAC as a vector for antigen delivery, we constructed a lysine auxotrophic strain interrupting the *lysA* gene of MTBVAC. This deletion can be functionally complemented by an expression plasmid carrying a functional copy of the *lysA* gene. The parental auxotrophic strain MTBVAC Δ *lys* was phenotypically validated by its absence of growth in medium without lysine supplementation and vice-versa.

The combined TB-HIV vaccine candidate named MTBVAC.HIVA was constructed by introduction of the episomal mycobacterial vector p2auxo.HIVA, expressing epitopes from HIV and containing the *lysA* complementing gene, in the MTBVAC Δ *lys* strain. Proper expression of HIVA immunogen by MTBVAC.HIVA was confirmed by Western blot and the maintenance of the p2auxo.HIVA episomal vector *in vivo* was confirmed after 100 days of infection. The MTBVAC.HIVA vaccine in combination with modified vaccinia virus Ankara (MVA) expressing HIV antigens was able to induce HIV-1 and *Mtb*-specific interferon- γ -producing T-cells in BALB/c mice. MTBVAC.HIVA was safer than BCG in SCID mice, which are deficient in functional B and T lymphocytes and in consequence, they are more immunodeficient than HIV patients who have a reduced number of CD4⁺ T-cells. Additionally, MTBVAC.HIVA efficacy against *Mtb* challenge in mice was similar to that conferred by the parental MTBVAC vaccine.

In conclusion, MTBVAC.HIVA strain has shown to be safe and immunogenic, and paves the way to use MTBVAC as a new platform to express novel HIV immunogens and also antigenic proteins from major pathogens.



Myco-MIGE: Optimization of a new powerful tool for Mycobacterial genome engineering

Calvet, Juan¹ *; Campos-Pardos, Elena¹; Ainsa, Jose A.^{1,2,3}; Martín, Carlos^{1,2};
Gonzalo-Asensio, Jesús^{1,2,3} **

Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain
2. CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain. For more info: * jcalvetseral@gmail.com or ** jagonzal@unizar.es

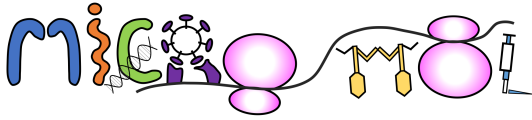
In 2009, Multiplex Automated Genome Engineering (MAGE) was described as a new powerful tool to introduce multiple mutations in *Escherichia coli*, using a cyclic automated system. MAGE uses the recombineering machinery to introduce ssDNA oligonucleotides (oligos) with the desired mutations¹. More recently, this technique has been improved following a co-selection strategy, in which, an oligo carrying an antibiotic resistant genotype is added together with the oligos carrying the desired mutations².

With the objective to implement this technique in mycobacteria, we propose the project *Myco-MIGE*. Unlike MAGE, in this project we manually performed the automation process in an iterative manner following several transformation cycles. *Mycobacterium smegmatis* mc²155 carrying the recombineering system in the plasmid pJV53 is used as a reliable surrogate host to demonstrate proof-of-concept of this methodology.

In a first step of *Myco-MIGE*, we optimized the length and concentration of the mutagenic oligos. Oligos carrying a SNP that confers streptomycin resistance were designed to replace the wild type allele of the *rpsL* gene (which confer sensibility to streptomycin), thus providing a selectable phenotype. In a next step, we designed oligos to inactivate fourteen efflux pumps in *M. smegmatis*, by placing two consecutive STOP codons (missense mutations) in frame with the corresponding gene in the 5' end of the coding sequence. All these oligos were transformed in *M. smegmatis* together with the oligo conferring streptomycin resistance in a 100:1 ratio, in order to allow isolation of resistant bacteria and follow a co-selection strategy.

Using the Mismatch Amplification Mutation Assay PCR and Real Time MAMA PCR, we have demonstrated that higher percentages of the desired mutations accumulate in the bacterial population throughout the *Myco-MIGE* cycles and these mutations are more abundant in the streptomycin resistant population. Altogether, this tool hold promise to improve and accelerate multiplex genome engineering in the *Mycobacterium* genus opening new research avenues.

1. Wang *et al.* Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* (2009).
2. Carr PA, *et al.* Enhanced Multiplex Genome Engineering through Cooperative Oligonucleotide Co-selection. *Nucleic Acids* (2012)



Towards genome remodelling in *Mycobacterium* by optimization of a minimalistic CRISPR system.

Campos-Pardos, Elena^{1*}; Pérez, Irene^{1,2}; Calvet, Juan¹; Martín, Carlos^{1,2};
Gonzalo-Asensio, Jesús^{1,2,3*}

Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y
Salud Pública, Universidad de Zaragoza, IIS Aragón, Zaragoza, Spain

5. CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

6. Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Universidad de
Zaragoza, Zaragoza, Spain.

*For more information: elecampar@gmail.com jagonzal@unizar.es

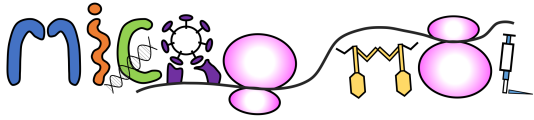
The *Mycobacterium* genus is known because of its fastidious genetic manipulation. With the aim of developing new and more effective genetic tools in *Mycobacterium*, we propose to implement the CRISPR technique using the most minimalist CRISPR system described to date: the Cpf1 protein of *Francisella novicida*. Cpf1 has demonstrated intrinsic ability to process pre-crRNA on mature crRNA and, to generate a double-stranded break after recognizing a PAM sequence in a ssDNA strand, [1, 2]. Using *Mycobacterium smegmatis* as a model bacterium (a non-pathogenic species characterized by its rapid growth and high transformation efficiency), in a first step, we optimized codons of the coding sequence of *F. novicida* Cpf1 for its use in mycobacteria. Optimized protein Cpf1 was cloned under a strong promoter in the pMV261 replicative plasmid for mycobacteria.

In a next step, we verified by qRT-PCR the correct transcription of the Cpf1 gene in *M. smegmatis*. The proper expression of Cpf1 was confirmed by Western Blot using a Cpf1 variant in frame with a 3xFLAG epitope located in the C-terminal end of the protein constructed by In-fusion® technology.

Finally, DNAs coding for the desired crRNAs will be expressed from the pMV261-Cpf1 plasmid previously constructed. The functionality of the CRISPR/Cpf1 system will be analyzed by enumerating c.f.u. grown from bacteria transformed with a control plasmid (without crRNA) relative to bacteria transformed with plasmids bearing crRNA. Genomic editing and Knock-Out construction in selected genes will be evaluated by sequencing and phenotypic characterization respectively.

As a long-term goal of this project, we propose to make this technology extensible to the remaining species of the *Mycobacterium* genus to edit their genomes “à la carte”.

- 1 I. Fonfara, H. Richter, M. Bratovič, A. Le Rhun, and E. Charpentier, “The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA,” *Nature*, vol. 532, no. 7600, pp. 517–521, 2016.
- 2 B. Zetsche *et al.*, “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System,” *Cell*, vol. 163, no. 3, pp. 759–771, 2015.



Elucidating the different behavior of clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains during lung infection.

Maria del Mar Cendra* and Eduard Torrents (mcendra@ibecbarcelona.eu)

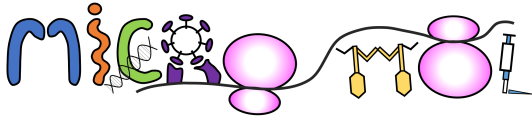
*: “Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies” lab (BIAT), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldiri I Reixac 10-12, 08028 BARCELONA

Bacterial infections remain a common health problem in today’s society. Many bacteria can infect the human host and persist overtime while inducing serious health problems. During the infective process, bacterial replication is indispensable to establish the infection and therefore is the requirement of the deoxyribonucleotides (dNTP), the building blocks needed for the DNA synthesis and repair. The ribonucleotide reductase (RNR) is the key enzyme responsible for providing the dNTP in all living organisms. Three different classes of the enzyme have been described up to date, which are encoded in different operons expressed during different environmental conditions but depending, all of them, from a tight regulation.

The lung is one of the organs with the highest susceptibility to being colonized by pathogens. Diseases such as chronic obstructive pulmonary disease or cystic fibrosis, change the pulmonary physiology into the perfect niche for bacterial growth. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are two major pathogens associated with lung infections, which can infect the organ independently but also together thus complicating the treatment and aggravating the outcomes of the infection. The capacity of the pathogens to invade and persist within the pulmonary cells difficult the complete clearance of the infection and increases the chances of its recurrence since it can be used as a strategy to evade the antimicrobial treatment and the host immune response.

Herein we have used different *P. aeruginosa* strains (clinical isolates and the two reference strains PAO1 and PA14) to infect an *in vitro* model of lung infections based on different lung cells, independently and together with *S. aureus*, to elucidate the differential behavior of bacterial clinical isolates from the laboratory strains towards our pulmonary cell model. We have investigated the differential capacity of cell invasion, persistence and intracellular replication of the different pathogens and analyzed the differential expression of the different RNR classes during all the infective process.

This work was supported through grants to ET from the Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2015-63557-R), Generalitat de Catalunya (2017 SGR01079) and La Caixa Foundation



Variaciones nucleotídicas en la secuencia de los terminadores de transcripción generan RNA antisentidos funcionales

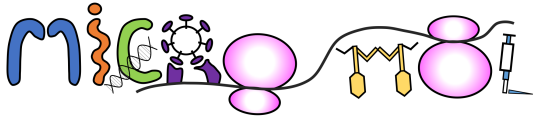
Laurène Bastet¹, Carlos J. Caballero¹, Sergio Cuesta-Ferre¹, Leticia Matilla¹, Maite Villanueva¹, Iñigo Lasa^{1,2} y Alejandro Toledo-Arana¹

¹Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gob. de Navarra. 31192-Mutilva, Navarra, España. ²Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra (UPNA)-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), IDISNA. 31008-Pamplona, Navarra, España

En los organismos superiores, sólo el 1% del genoma codifica para proteínas y 99% restante era considerado DNA basura. Sin embargo, el descubrimiento de la transcripción masiva ha cambiado por completo esta idea. Ahora sabemos que existen miles de regiones no-codificantes que son esenciales para la regulación génica. Aunque las bacterias tienen genomas compactos, también se transcriben masivamente. Anteriormente descubrimos que alrededor del 75% del genoma de *Staphylococcus aureus* se transcribe desde ambas cadenas, ya sea por la presencia de promotores situados en la cadena contraria a las regiones codificantes (CDSs) ó por la deficiencia en la parada de transcripción (TTRT) entre genes convergentes. En cualquier caso, se generan numerosos RNAs antisentidos (asRNAs), cuyas funciones son aún desconocidas.

En este trabajo hemos estudiado el asRNA del gen *lexA*, que codifica para el principal regulador de la respuesta SOS. Demostramos que este asRNA se genera por un evento de TTRT que ocurre en el terminador del gen *sbrB* (TT^{sbrB}), el cual es convergente a *lexA* y cuya transcripción depende de SigB. Como el codón *stop* de *sbrB* está próximo al TT^{sbrB}, pensamos que la traducción podía ser la causa de TTRT a través de un mecanismo de atenuación. Sin embargo, mutaciones en el mRNA, que evitaban la traducción, no modificaron los niveles de asRNA-*lexA*. Luego, analizando en profundidad la secuencia del TT^{sbrB}, encontramos que existían variaciones nucleotídicas en diversas cepas de *S. aureus* que eran responsables de generar distintos niveles de asRNA-*lexA*. Mediante *reporters*-fluorescentes duales demostramos que estas variaciones afectaban a la expresión de LexA. Además, el reemplazo del promotor SigB de *sbrB* por uno constitutivo, en una cepa que presenta una de las variaciones del TT^{sbrB} que produce niveles de asRNA-*lexA* comparables a un mutante deletado en dicho TT, alteraba la expresión de RecA. Esto confirmaba que el asRNA-*lexA* afecta la respuesta SOS. Esta misma cepa era capaz de desplazar a la WT en experimentos de competición.

Resumiendo, estos resultados muestran que las variaciones nucleotídicas que ocurren naturalmente en los TTs pueden generar asRNAs funcionales y que, eventualmente, podrían ser beneficiosas para ciertas estirpes cuando compiten por un nicho particular.



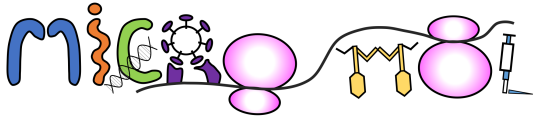
Identificación del papel de los distintos Sistemas de Secreción de Tipo VI (T6SSs) presentes en *Pseudomonas fluorescens* F113.

David Durán, Rafael Rivilla, Marta Martín

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid,
Madrid, España

Dentro de la gran diversidad de bacterias presentes en la rizosfera, *Pseudomonas fluorescens* F113, bacteria Gram negativa aislada de la rizosfera de la remolacha, es capaz de colonizar diversas plantas de interés agrícola, siendo empleada como agente de control biológico gracias a la producción de DAPG, potente antifúngico de amplio espectro. Las bacterias Gram negativas cuentan con una gran variedad de sistemas de secreción para interactuar e influir en su entorno de desarrollo mediante la translocación de proteínas específicas o ADN dentro de las células vecinas o el medio extracelular, clasificándose estos sistemas en al menos ocho tipos, algunos con diversas sub-clasificaciones. Uno de ellos, el Sistema de Secreción tipo VI, ha sido implicado en una amplia red de interacciones bacteria-bacteria, así como en virulencia con animales y plantas. Los aproximadamente 15 genes que codifican para el T6SS suelen agruparse en un mismo locus genómico, siendo clasificados en siete clústeres filogenéticos diferentes, pudiendo encontrarse en cepas de *P. fluorescens* entre 1 y cuatro de ellos. *P. fluorescens* F113 presenta tres de estos T6SS, denominados **H**cp **S**ecretion Islands; HSI-I (clúster 3), -II (clúster 1.1) y -III (clúster 4A). Nuestros experimentos nos han permitido observar que HSI-I y HSI-III, están implicados en la interacción bacteria-bacteria, sabiendo que HSI-II y III podrían estar ligados a la virulencia con animales y plantas. Adicionalmente a las proteínas VgrGs (esenciales para el T6SS) codificados en los tres clústeres de T6SSs, otras cinco *vgrGs* han sido localizadas dispersas por el genoma. Una de ellas, *vgrG2c* es codificada junto a una serie de genes con los que podría formar una isla de virulencia no asociada a un T6SS en particular. Así mismo, se ha observado que *P. fluorescens* F113 impide el crecimiento y desarrollo de nematodos y protozoos (*Caenorhabditis elegans* y *Acanthamoeba polyphaga*) y es capaz de matar insectos, por ejemplo, *Galleria mellonella*, a las 48h post infección. Todas estas interacciones podrían estar mediadas, al menos parcialmente, por el T6SS mediante el empleo de diversas toxinas insecticidas, factores de virulencia y otras toxinas asociadas a los clústeres de T6SS presentes en el genoma de *P. fluorescens* F113.

Financiado por MINECO/FEDER EU-BIO 2015-64480-R



Estudios iniciales para la caracterización del modo de acción molecular de las avermectinas como agentes anti-tuberculosos

Ezquerro, José Manuel¹; Millán, Ana Cristina¹; Lucía, Ainhoa^{1,2}; Aínsa, José Antonio^{1,2}; Ramón-García, Santiago^{1,2,3}

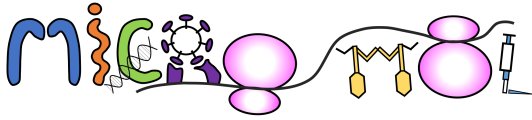
1. Departamento de Microbiología, Medicina y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España
2. CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España
3. Fundación ARAID, Diputación General de Aragón, Zaragoza, España

Introducción. Debido a la creciente incidencia de las cepas multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y a la escasez de fármacos para su tratamiento, surge la necesidad de buscar nuevos compuestos activos. Una de las alternativas al largo y costoso proceso de desarrollo de nuevos antimicrobianos es el reposicionamiento de fármacos ya aprobados para uso en la clínica. En una campaña previa de descubrimiento de nuevos fármacos contra la TB se observó que las avermectinas, una familia de macrólidos con actividad antihelmíntica de amplio espectro, eran activos frente a *M. tuberculosis*, incluyendo cepas multiresistentes. Esta actividad fue inesperada ya que las avermectinas no son activas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo específicas contra las micobacterias. Hoy en día se desconoce el mecanismo de acción de las avermectinas contra las micobacterias.

Objetivo. Identificar el modo de acción de selamectina (avermectina seleccionada como modelo para este estudio) en *Mycobacterium smegmatis*.

Metodología. Se realizó una serie de ensayos en *M. smegmatis* para establecer las condiciones adecuadas para la selección y posterior caracterización de mutantes resistentes a selamectina. Se determinó la CIM (*Concentración Inhibitoria Mínima*) de selamectina bajo diferentes condiciones, observándose una clara dependencia entre la actividad del compuesto y el inóculo inicial. También se realizaron estudios de la actividad de la selamectina en combinación con concentraciones subinhibitorias de etambutol, una combinación que potencia la actividad antibacteriana de la selamectina.

Resultados. Tras la caracterización del compuesto, estamos optimizando las condiciones experimentales para aislar mutantes en medio sólido usando una colección de mutantes por transposición de *M. smegmatis*. Los mutantes aislados hasta la fecha presentan una sensibilidad similar a la cepa *wild-type* en medio líquido y sólido tras cultivarlos en ausencia de selamectina. Esto sugiere que la presencia del antimicrobiano induce un fenotipo tolerante en *M. smegmatis* que complica la selección de genotipos resistentes.



Explorando la capacidad de las proteínas FUR (ferric uptake regulator) de la cyanobacteria *Anabaena* para aumentar la tolerancia de levaduras a estreses abióticos

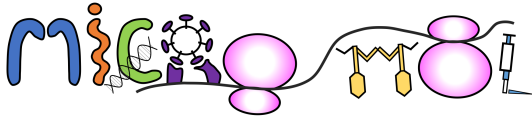
Violeta C. Sein-Echaluce⁽¹⁾, María Luisa Peleato⁽¹⁾, M. Teresa Bes⁽¹⁾, María V. Barja⁽²⁾, José Miguel Mulet⁽²⁾ y María F. Fillat⁽¹⁾.

⁽¹⁾Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular e Instituto de Biocomputación y Física de sistemas complejos (BIFI). Facultad de ciencias, Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009-Zaragoza, España. ⁽²⁾Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Camino de Vera, 46022 Valencia, España.

⁽²⁾Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Camino de Vera, 46022 Valencia, Spain

Las proteínas FUR son reguladores transcripcionales ubicuos en procariontes. La cyanobacteria *Anabaena* PCC 7120 contiene tres parálogos FUR: FurA, FurB y FurC. FurA es un regulador global que coordina el control de la homeostasis de hierro con el metabolismo nitrogenado y la regulación de los principales genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo. Asimismo, FurA muestra actividad disulfuro reductasa *in vitro*, sugiriendo que juega un importante papel en el control del metabolismo redox de *Anabaena*. FurB (Zur) controla la homeostasis de zinc y su regulón incluye también genes implicados en la defensa a estrés oxidativo. Por otra parte, FurB es capaz de unirse inespecíficamente al DNA protegiéndolo de la acción de las DNAsas y los radicales libres. En estudios previos demostramos que cepas de *Escherichia coli* sobreexpresando FurA o FurB eran más tolerantes al estrés oxidativo, por lo que nos planteamos la hipótesis de que la expresión heteróloga de estas proteínas podría usarse como herramienta para obtener otros microorganismos de interés biotecnológico más tolerantes a estreses abióticos.

Para comprobar si FurA y FurB de *Anabaena* pueden ejercer esta protección en levaduras, analizamos los efectos de su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* clonando los genes *furA* y *furB* en el vector para levadura pYPGE, que permite la expresión de proteína recombinante bajo el control del promotor PGK (fosfoglicerato quinasa), fuerte y constitutivo. Se testó la tolerancia de las cepas de levadura que expresan los genes de FurA y FurB contra estreses abióticos comunes, como el tratamiento con metales divalentes, inductores de estrés oxidativo, reactivos que dañan la membrana y sal. Ambas cepas exhibieron el mismo o menor crecimiento que el control en la mayoría de las condiciones probadas. Sin embargo, la cepa derivada de FurA mostró un mejor crecimiento bajo estrés oxidativo inducido con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno e hidropéroxido de t-butilo. El derivado de FurB creció mejor que el control en un rango más amplio de condiciones oxidativas. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que demuestra que las proteínas FUR pueden aumentar la tolerancia al estrés oxidativo cuando se expresan heterológamente en un organismo eucariótico.



FleQ de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, un regulador multifuncional

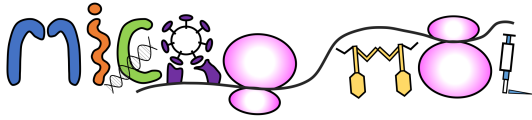
M^a Trini Gallegos, Antonia Felipe, M^a Dolores Ferreiro, Harold A. Prada-Ramírez y Daniel Pérez-Mendoza

FleQ es el regulador maestro de la biogénesis flagelar en *Pseudomonas*. La mutación de *fleQ* en *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Pto) DC3000 provoca la pérdida de los flagelos y de la motilidad tipo *swimming*¹, pero también altera la motilidad en superficie y la producción de biosurfactante. Hemos demostrado que FleQ activa la síntesis del flagelo y regula negativamente la producción de siringafactina, lo que ha permitido el descubrimiento de un nuevo tipo de motilidad de Pto en superficies semisólidas². Pero FleQ interviene también en otro proceso diferente: la regulación de la producción de celulosa en esta cepa. Previamente³, habíamos establecido que el regulador transcripcional AmrZ estaba implicado en la represión del operón de síntesis de celulosa acetilada (*wssABCDEFGHI*) al unirse a una secuencia que solapa con la región promotora y con el punto de iniciación de la transcripción. Recientemente hemos observado que FleQ no solo está involucrado en la regulación de la síntesis de celulosa en Pto, sino que también es necesario para su producción máxima bajo altos niveles de c-di-GMP. Al caracterizar los fenotipos del mutante *fleQ* bajo diferentes niveles intracelulares c-di-GMP observamos que en bajo c-di-GMP y en rojo Congo, *fleQ* produce colonias similares a las del tipo silvestre, pero en alto c-di-GMP, las colonias son menos rojas. Al cuantificar la producción de celulosa no se detectaron diferencias significativas entre *fleQ* y la cepa silvestre a niveles fisiológicos de c-di-GMP. Sin embargo, la producción de celulosa aumentó ligeramente en condiciones de alto c-di-GMP en el mutante *fleQ*, pero estos niveles fueron significativamente más bajos que los medidos en la cepa silvestre en las mismas condiciones. Para estudiar cómo ocurre esta regulación, hemos purificado FleQ, hemos corroborado *in vitro* su unión al promotor del operón *wss* y estamos investigando su modo de acción, tanto en ausencia como en presencia de c-di-GMP.

¹Vargas, P., Farias, G.A., Nogales, J., *et al.* 2013. *Environ. Microbiol. Rep.* 5:841-850.

²Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., *et al.* 2015. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7533-

7545. ³Prada-Ramírez, H. A., Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., *et al.* 2016. *Mol. Microbiol.* 99, 960-977.



Estudio genómico comparativo del plásmido pMUM001 de *Mycobacterium ulcerans*.

Airam Pedro Benitez¹, Fernando Lázaro², Carmelo Benítez³ y María Jesús García¹

1, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, IdiPAZ, Universidad Autónoma de Madrid 2, Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid

3, OCEOMIC Marine Bio and Technology S.L.

La Úlcera de Buruli, enmarcada dentro de la lista de “Enfermedades Tropicales Olvidadas” por la OMS, es una enfermedad de origen bacteriano causada por *Mycobacterium ulcerans* con alta incidencia en regiones tropicales y subtropicales, y caracterizada por producir grandes ulceraciones con necrosis en el tejido celular subcutáneo.

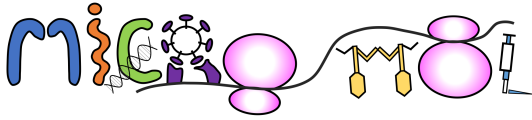
El origen de la enfermedad radica en la actividad de la toxina micolactona, con acción necrotizante e inmunosupresora. La toxina, una excepción dentro del género, se sintetiza en genes codificados por el megaplásmido pMUM001.

En base a la comparación de genomas, se considera que las especies productoras de micolactona pertenecen a la especie *M. ulcerans* y comparten un ancestro común con *Mycobacterium marinum*, especie no productora de micolactona. La presencia del plásmido es el hecho más diferencial entre ambas especies. En micobacterias no se ha descrito una relación entre transferencia génica horizontal y adquisición de factores de virulencia, siendo de interés analizar las similitudes del plásmido pMUM001 con pII, plásmido de *M. marinum*.

Dada la singularidad de pMUM001, nos planteamos como **objetivo** determinar si se trata de un verdadero plásmido o podría tratarse de un crómido o un segundo cromosoma. Con este fin se ha llevado a cabo un análisis bioinformático comparativo de pMUM001 con otros plásmidos de micobacterias, así como con segundos cromosomas y con crómidos de otros géneros y especies.

Se compararon un total de 81 secuencias: 17 plásmidos de micobacterias, 40 segundos cromosomas y 34 crómidos. En el análisis se han utilizado los siguientes programas de comparación de secuencias, que permiten identificar las características del pangenoma: Mauve, PGAP-X y Roary.

La comparación de pMUM001 con segundos cromosomas y crómidos no ha posibilitado la detección de genes ortólogos entre los mismos. Únicamente se ha podido identificar un “core genome” cuando se compara pMUM001 con plásmidos de micobacterias productoras de micolactona, esto es, plásmidos de la misma especie. El hecho de que pMUM001 presente características tales como la presencia de genes de virulencia o sistemas de replicación plasmídicos, sugiere que podría encuadrarse bajo la definición de “crómido”, a pesar de los datos indicados anteriormente. Se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis.



Caracterización del genoma de una posible nueva especie del género *Mycobacterium*.

Carolina Cárdenas¹, Ana Vicente¹, María del Carmen Menéndez¹, Jesús Mingorance² y María Jesús García¹

1, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, IdiPAZ, Universidad Autónoma de Madrid 2, Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid

El género *Mycobacterium* es de gran importancia debido a características fenotípicas únicas en comparación con otros géneros bacterianos, así como por su importancia médica.

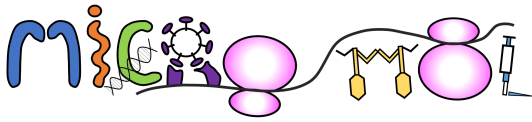
Su estudio y clasificación no son algo sencillo y en este campo se ha avanzado mucho en los últimos años gracias a la disponibilidad de secuencias completas de genomas y al desarrollo de procedimientos de análisis con aplicación taxonómica.

En el presente estudio hemos analizado una micobacteria de crecimiento rápido que no pudo ser identificada por los métodos microbiológicos convencionales. Esta cepa se aisló de un paciente diagnosticado de SIDA y se identificó como una micobacteria de crecimiento rápido escotocromógena (estas micobacterias se aíslan raramente como causantes de enfermedad en humanos) no pudiéndose identificar al nivel de especie. Mediante los procedimientos moleculares al uso, así como utilizando la hibridación ADN-ADN, tampoco fue posible su identificación. Por esta razón se llevó a cabo la secuenciación completa del genoma, con el **objetivo** de realizar una caracterización taxonómica en base a dicha secuencia.

Se comparó el genoma completo de la cepa problema con genomas de *Mycobacterium* sp y de especies de crecimiento rápido, descargados de la base de datos de NCBI. Para el análisis se han utilizado varios procedimientos de comparación de genomas completos bacterianos: Identidad Media de Nucleótidos (ANI) y Distancia Genómica (GGD). Paralelamente, se ha estudiado anotación del genoma para identificar genes de interés.

Los resultados obtenidos sitúan la cepa, como era de esperar, en la rama de micobacterias de crecimiento rápido, pero no muestra similitud a nivel de especie con ninguno de los genomas comparados. Los valores de ANI y GGD indican que puede tratarse de una nueva especie en el género. La especie más cercana es *Mycobacterium chubuense*. Con esta especie se obtienen un valor de ANI del 91,01% y un valor de GGD del 47,2% (DDH) y 0,0784 (distancia). La caracterización del genoma ha identificado genes de interés como son los codificantes para sistemas de transporte de membrana y de invasión celular.

La información derivada de los genomas completos permite una correcta caracterización e identificación de bacterias más rápida y fiable que usando métodos tradicionales.



DEVELOPMENT OF A HIGH-THROUGHPUT METHOD FOR SYNERGISTIC DRUG COMBINATIONS SCREENING

Gómara, Marta^{1*}; Aínsa, José A.^{2,3}; and Ramón-García, Santiago^{1, 2, 3, 4}

1) Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain. 2) CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. 3) Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain. 4) Research & Development Agency of Aragón (ARAID) Foundation, Spain

*mgomara@unizar.es

Introduction. Infections caused by antibiotic resistant pathogens are alarmingly increasing worldwide, with fewer therapeutic options available in the clinic than a decade ago. Programs focusing on the discovery of new antimicrobials are not currently seeing by pharmaceutical companies as a profitable investment. As such, the number of new antibiotics approved by the FDA or the EMA has been not enough to counteract the current rise of antimicrobial resistance. Combinatorial treatment focused on the search of synergistic drug combinations of current clinically approved drugs is considered to be a hopeful approach to face this problem; i.e., the effect of the combination is more effective than that of individual drugs alone. Drug repurposing is another promising alternative to discover antimicrobial properties in compounds not commercialized as antibiotic drugs. This approach has the potential to achieve a successful therapy and decrease the emergence of resistance.

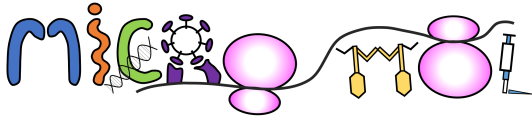
Synergy screens typically rely on the checkerboard assays characterizing pairwise drug interactions; however, this approach remains tedious and time consuming, leading to an absence of systematic studies of large-scale interactions.

Objectives. Our goal is to develop an efficient high-throughput screening protocol in strains with different susceptibility profiles to efficiently triage novel synergistic drug interactions, with the aim to facilitate its implementation as a potential tool in synergy screening programs.

Methodology. Preliminary optimization was performed using *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* ATCC reference strains. We used two in-house libraries in order to optimize the methodology: first, a synergy matrix of clinically used antibiotics (n=50) representative from different families and molecular targets and, second, the chemical FDA-library, which contains most of clinically approved drugs, including non-antibiotic compounds (n=1443). Chemicals were transferred, using a pin replicator, from 96-well plates onto agar plates containing sub-inhibitory concentrations of each compound of interest (previously defined in optimization experiments). After incubation at the temperature and time required for each strain, synergy was determined by measuring the growth inhibition zones (comparative difference between plates with and without compound of interest).

Results. Modifications of the experimental conditions such as inoculum, culture media, stock and sub-inhibitory compound concentrations are critical for the optimization and standardization of the assay. Several synergistic combinations have been identified and will be further validated by secondary (checkerboard assays) and tertiary (time-kill kinetics) studies; and its translational potential evaluated against clinical isolates.

Conclusions. This technique is expected to be more efficient than current approaches to identify potential synergistic combinations from large chemical libraries leading to further pre-clinical studies.

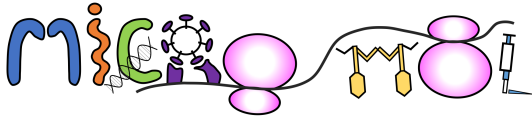


Profiling 16S rRNA of microbial components of visible colonies that grow in Altamira Cave

Candela González-Riancho, Mónica Molina, M^a Cruz Rodríguez González and Juan M^a García Lobo

Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria
Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC). UC-CSIC-SODERCAN

Palaeolithic cave art dating back to thousands of years stands for a priceless cultural heritage in our society. Caves are naturally colonized by microbes whose numbers are kept rather constant in a delicate equilibrium ruled by harsh ambient conditions and a severe oligotrophic medium. Altamira cave contains one of the best examples of parietal art known to date. Since its discovery, cave equilibrium has been disrupted by archeological excavation, constructions, and a strong regime of touristic visits. Today, some areas of the cave are heavily colonized by visible “colonies” (VC) of different colours (grey, yellow and white). A big effort is being made to reduce human impact on the cave, but microbial mats are considered the main risk for paintings conservation. The deepest characterization of these colonies is the key to develop countermeasures that may be applied to control overgrowth without promoting unwanted side effects observed in other caves when antimicrobial control was applied. Previous analysis have been done by culturing and cloning of 16S amplicons from the colonies. In this work we have systematically amplified v3-v4 regions of 16S rDNA from VC with primers specific for bacteria and archaea, and sequenced the amplicons in the MiSeq system. Sequence data suggests that each colony consist in not more than 10-12 individual components. Each colony contains a principal component which concentrates > 50% of the reads while the remaining reads distribute equally in 8-10 different components. The main component of the colonies belongs in all cases to the *phylum Actinobacteria*. It classifies within the *Pseudonocardiaceae* in the case of yellow and grey colonies. For white colonies, we may observe two different principal components belonging to *Pseudonocardiaceae* and *Euzebyaceae* family, depicting two possible types of white colonies. Identified minor components of VC include *Proteobacteria* (α , γ and β), *Acidobacteria*, *Nitrospirae* and *Actinobacteria* representing each between 1-8% of the total. We also found *archaea* among VC minor components, namely *Woesearchaeota* and *Thaumarchaeota*. Amplicon sequence comparison indicated that any of the bacteria so far cultivated from the cave was a component of the VC. In other words components of VC are not easily cultivable.

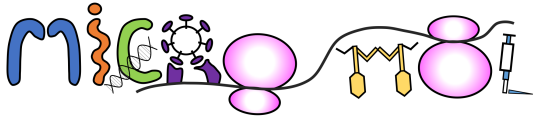


Biodegradación de isómeros del hexaclorociclohexano por la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

Jorge Guío, Sara Abizanda, María F. Fillat, Emma Sevilla and María Luisa Peleato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular e Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza-CSIC, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain.

El hexaclorociclohexano (HCH) fue ampliamente utilizado como pesticida en el periodo comprendido entre 1930 y 1990. Inicialmente el HCH se aplicó fundamentalmente en dos formas diferentes, como isómero γ -HCH (también conocido como lindano) o como mezcla técnica de todos los isómeros. La mezcla técnica del HCH consistía en una mezcla de α -HCH (60-70%), β -HCH (5- 12%), γ -HCH (10-15%) y δ -HCH (6-10%). Además el HCH se sintetizaba por clorinación fotoquímica del benceno, proceso en el cual se formaban los distintos isómeros del HCH (α -, β -, γ -, δ -HCH) aunque posteriormente solamente el γ -HCH (lindano) se comercializó, por ser el más efectivo y biodegradable. Dado que este isómero constituía solo un 10-15% del total de isómeros que se producían, el resto de isómeros eran enterrados o acumulados en vertederos. Tanto la aplicación de la mezcla técnica de HCH como la acumulación en vertederos de los isómeros del HCH han generado zonas altamente contaminadas con los distintos isómeros del HCH en distintos puntos del planeta. Aunque el HCH es persistente y difícil de degradar, se han aislado algunos microorganismos que son capaces de degradar uno o más isómeros del HCH bajo condiciones aeróbicas. Dentro de estos microorganismos se ha descrito una cepa *Sphingomonas paucimobilis* B90A que es capaz de biodegradar los cuatro isómeros (α -, β -, γ -, δ -HCH) aunque con diferente eficiencia. La ruta de degradación del γ -HCH se ha descrito en *S. paucimobilis* UT26 y los enzimas necesarios para llevar a cabo dicho proceso están codificados en los llamados genes *lin*. Por otro lado, *S. paucimobilis* no es el único microorganismo capaz de biodegradar lindano sino que algunas cianobacterias como es el caso de *Anabaena* PCC7120 son también capaces de llevar a cabo este proceso. En cianobacterias la biodegradación de lindano no se conoce en profundidad, ya que se ha descrito que *Anabaena* PCC7120 degrada lindano pero se desconoce si es capaz de biodegradar otros isómeros y además las rutas de degradación no están bien caracterizadas. En este trabajo se ha analizado la tolerancia de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 a la presencia de los isómeros α -, β -, γ - y δ -HCH. Por otro lado se ha evaluado la capacidad degradativa de *Anabaena* PCC7120 analizando la desaparición en el tiempo de los distintos isómeros en muestras de agua dopadas con cada uno de los isómeros e inoculadas posteriormente con *Anabaena* PCC7120. Finalmente se han llevado a cabo estudios *in silico* con el fin de encontrar ortólogos de genes *lin* en el genoma de *Anabaena* y se ha estudiado la expresión génica de dichos genes en cultivos de la cianobacteria en presencia de lindano.



Global analysis of the gene expression mediated by AHL and DSF quorum sensing signals in *Stenotrophomonas maltophilia* reveal key components involved in DSF turnover

Pol Huedo¹, Xavier Coves¹, Daniel Yero¹, Xavier Daura^{1,2}, Isidre Gibert¹

¹Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) and Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain. ²Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), 08010 Barcelona, Spain. (Pol.Huedo@uab.cat)

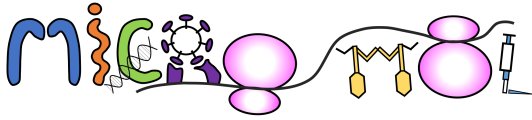
Stenotrophomonas maltophilia is a ubiquitous gram-negative bacterium that has emerged as an opportunistic multidrug-resistant pathogen and is frequently isolated from lungs of cystic fibrosis patients where it can cohabit with other pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*. *S. maltophilia* uses the endogenous DSF quorum sensing system to regulate virulence processes but can also respond to exogenous AHL signals produced by neighbouring bacteria (i.e., *P. aeruginosa*). However, the effect of such QS signals on the global gene expression of *S. maltophilia* remains elusive.

To this end, a whole-transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis was applied to exponential cultures of *S. maltophilia* strain K279a treated with DSF or AHLs (both at 10 μ M) or the same volume of DMSO. Three biological replicates per condition were treated for 4 h before RNA extraction. cDNA synthesis and sequencing was done at CNAG facilities using Illumina HiSeq2000.

51 genes were found up-regulated (>2-fold) and 16 down-regulated (<2-fold) in the presence of AHLs. Addition of DSF gave rise to an inducing effect in 28 genes (>2-fold). Remarkably, 21 genes were induced by both QS molecules, representing 75% of DSF-overexpressed genes and 41% of AHL-overexpressed genes. Gene functions regulated by both QS systems included, among others, lipid metabolism, membrane homeostasis, nitrogen and iron metabolism and bacterial motility.

Among the deregulated genes, a predicted β -oxidation operon, composed of genes *smlt0264-smlt0268*, was selected for functional characterizations. Deletion of this operon resulted in an alteration of biofilm formation and an attenuation of virulence in the *Galleria mellonella* model. Further experiments on M9 minimal medium supplemented with DSF signals as sole carbon source revealed the inability of this mutant to grow under these conditions. These results suggest that the operon *smlt0264 to 0268* could be involved in DSF turnover, an essential cellular process that would allow the bacteria to recycle DSF molecules and to avoid its toxicity at high concentrations.

Overall, our findings offer an integrated picture of the modulation of the global gene expression mediated by QS signals and provide a new list of alternative candidates regulated by cell-to-cell signalling including virulence and antimicrobial targets, as well as key components involved in DSF turnover.



Efficacy of chitosan-based nanoformulation of daptomycin against *Staphylococcus aureus*

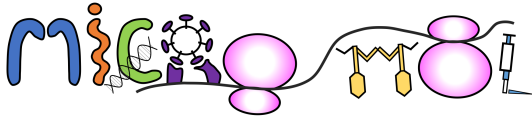
Ainhoa Lucía^{1,2,3}, Laura De Matteis^{4, 10}, Joanna Empel⁵, Sonia García-Embid⁴,
Abdessalem Rekiki⁶, Aurore Gaudin⁶, Daniel Pérez⁷, Waleria Hryniewicz⁵, Andrea
Tamellini⁶, Jesús Martínez de la Fuente^{8, 10}, Jose Antonio Aínsa^{1,2,3,9}

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, ² CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, ³ Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS-Aragón), ⁴ Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), Universidad de Zaragoza, ⁵ Department of Epidemiology and Clinical Microbiology, Narodowy Instytut Leków, Warsaw, Poland, ⁶ Technology Research Institute Bioaster, 28 rue du Docteur Roux, 75015, Paris, France, ⁷ NANOIMMUNOTECH, Edificio CITEXVI, 36310 Vigo, España
⁸ Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA), Universidad de Zaragoza-CSIC
⁹ Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos, BIFI, Universidad de Zaragoza
¹⁰ CIBER Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Instituto Salud Carlos III.

Staphylococcus aureus is a major cause of hospital-acquired infection worldwide, being responsible for complicated skin and metastatic infections, especially catheter-associated blood stream infections and ventilator-associated pneumonia. The emergence of strains resistant to methicillin (MRSA) and other antimicrobial agents has increased the cost and length of treatment resulting in growing concern among medical professionals. The World Health Organization has endorsed a global action plan to tackle antimicrobial resistance because of the observed increase in antibiotic resistance over the last decades. Due to present difficulty in finding new active drugs, there is an increasing interest on the development of new formulations of existing drugs that could provide a more efficient and less harmful treatment. Nanotechnology represents an important strategy in the discovery of new approaches for safe and efficient formulations for drug delivery. In fact, the association of a drug with a nanocarrier offers several benefits such as an increase of drug solubility, protection and preservation of drug stability, targeted biodistribution, controlled release or improved circulation time. The consequent decrease in the dose required would widen the spectrum of candidate drugs to be safely used for infections treatment.

In this work, we proposed the encapsulation of daptomycin in a delivery system suitable for treatment *S. aureus* infections. The system is composed of a nanoemulsion core coated with chitosan. The nanoemulsion core would encapsulate daptomycin through the interaction with its lipid side chain and a chitosan stabilizing shell would possibly enhance its interaction with bacterial cell membrane. Nanocapsules have been obtained through a nanoemulsion process followed by a polymeric coating by ionotropic gelation for nanocapsule stabilization, resulting in a nanocarrier that consist in an oily core surrounded by a nanogel polysaccharidic shell.

The developed nanocarrier was extensively characterized in terms of its physicochemical properties, and the antimicrobial activity of the encapsulated daptomycin was analyzed *in vitro* against MSSA and MRSA reference and clinical strains, resulting to be fully active. After determining the safety of the developed system *in vitro*, the biodistribution profile was determined and the *in vivo* efficacy was demonstrated with murine MRSA septicemia and thigh infections models.



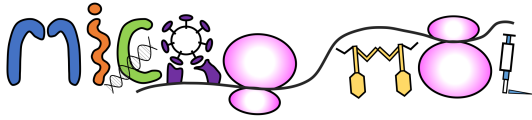
RedR1 and RedR2 belonging to the NtrC family are 97% identical but are controlled by opposed mechanisms to activated transcription from three σ^{54} -dependent promoters.

Daniel Pacheco-Sánchez, Patricia Marín and Silvia Marqués.

Department of Environmental Microbiology and Biodegradation, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain.
silvia@eez.csic.es

In the strict anaerobe *Azoarcus anaerobius*, three σ^{54} -dependent promoters drive transcription of the operons coding for 1,3-dihydroxybenzene degradation pathway. Expression of the pathway is controlled by RedR1 and RedR2, two regulators belonging to the NtrC family (bacterial Enhancer Binding Proteins, bEBPs), which show 97% sequence identity. The N-terminal domain (NTD) of the two proteins shows tandem GAF-PAS domains connected by a linker helix. All bEBPs must assemble into hexamers to trigger their ATPase activity to promote transcription from their target σ^{54} -dependent promoters. In previous studies we showed that RedR1 and RedR2 must form hetero-oligomers to obtain maximum expression levels of the pathway¹. Despite the high sequence identity between the two regulators, a different mechanism controls their activity: whilst RedR1 responds to the classical NTD-mediated negative regulation that characterizes the family, RedR2 is constitutive and controlled through interaction with BtdS, an integral membrane subunit of hydroxyhydroquinone dehydrogenase, which sequesters RedR2 to the membrane. In this work we have analyzed the protein determinants responsible for RedR2-BtdS interaction, we have determined the effector molecule responsible for activation and the different behavior of the three regulated promoters. We have established that the N-terminal end of RedR2, which presents a different sequence to RedR1 in its N-terminal tail, probably interacts with one of the cytoplasmic loops predicted in BtdS structure model. In different protein interaction assays, no self-interaction of either bEBP could be detected, contradicting the fact that an NTD-truncated version of RedR1 and full-length RedR2 were capable of promoter activation on their own, which implies that they were able to assemble into homo-hexamers. We suggest that the promoter target DNA sequence is necessary to stabilize *in vivo* the homodimers of the active forms of the two regulators, whilst heterohexamers are readily formed in solution with high affinity and able to promote maximum transcription levels. We have also defined the minimum promoter sequence required for activation with the NTD-truncated version of RedR1. A model for the coordinated activation of the pathway in response to the presence of the substrate, which must be metabolized to hydroxybenzoquinone, is proposed.

¹Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017, *App. Environ Microbiol* **83**:e03042-16



AmrZ regula los niveles de di-GMPc en respuesta a las condiciones ambientales en *Pseudomonas fluorescens* F113

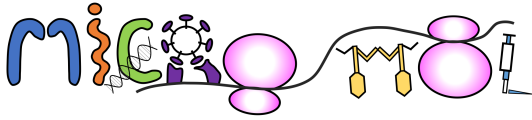
C. Muriel¹, E. Arrebola¹, M. Redondo-Nieto¹, F. Martínez-Granero¹, B. Jalvo¹, S. Pfeilmeier², E. Blanco-Romero¹, I. Baena¹, J. G. Malone², R. Rivilla¹, M. Martín¹

¹ Dpto. Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

² John Innes Centre. Norwich. UK

Pseudomonas fluorescens F113 es una rizobacteria que promueve el crecimiento vegetal y puede ser utilizada como inoculante natural agrícola. La persistencia en un nicho ecológico cambiante como es el rizosférico es necesaria para que pueda llevar a cabo su función. En el laboratorio estamos estudiando cómo responde esta rizobacteria a los cambios en las condiciones que le rodean. AmrZ es un regulador global descrito en *Pseudomonas* que regula genes que intervienen en la respuesta bacteriana en la adaptación a cambios ambientales. Esta proteína actúa como activador o represor de la expresión de genes que intervienen en la regulación del movimiento, la homeostasis del hierro, la producción de exopolisacáridos y la formación de biopelículas. El mutante en *amrZ* de *P. fluorescens* F113 presenta un fenotipo pleiotrópico que conlleva una mayor capacidad de movimiento y menor de formación de biopelículas; es desplazado por la estirpe silvestre en análisis de competitividad por la colonización de la rizosfera; las colonias son diferentes a las de la estirpe silvestre y presenta una tinción diferencial con Rojo Congo. Por último, cabe destacar que este mutante presenta niveles muy reducidos del metabolito señal di-GMPc estando en concordancia con su mayor movilidad y menor capacidad para formar biopelículas. El análisis por RNA seq del mutante en *amrZ* respecto de F113 ha revelado que AmrZ regula la mayoría de las fosfodiesterasas y diguanilato ciclasas encargadas del mantenimiento de los niveles de di-GMPc. Se han construido 8 mutantes en genes que codifican para estas enzimas y que son regulados por AmrZ y se ha observado que 7 de ellos presentan un fenotipo de movimiento y/o formación de biopelículas. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que AmrZ determina los niveles del di-GMPc a través de la regulación de una compleja red de genes que codifican diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas.

Financiado por MINECO/FEDER EU- BIO 2015-64480-R. E. Blanco-Romero FPU16/05513



Análisis integrativo de datos ómicos para el estudio de la adaptación metabólica en respuesta a la salinidad y temperatura de la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*

Lourdes Martínez-Martínez¹, Francine Piubeli¹, Montserrat Argandoña¹, Manuel Salvador^{1,2}, Carmen Vargas¹ y Joaquín. J. Nieto¹

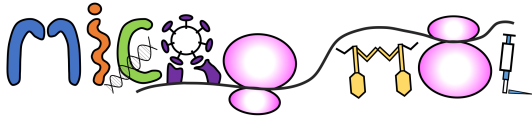
¹*Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla.*

²*Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK*

La generación de datos masivos derivados de la utilización de las diferentes tecnologías “ómicas”, principalmente para su aplicación con fines biomédicos e industriales, se ha incrementado notablemente en los últimos años. En el caso de la Ingeniería metabólica de Sistemas, esta información se puede utilizar para realizar modificaciones genéticas que conduzcan a la sobreproducción de productos biotecnológicos de interés. La bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens* es un productor natural de ectoínas, compuestos de interés biotecnológico dadas sus propiedades protectoras y estabilizadoras. Esta bacteria las sintetiza en respuesta al estrés osmótico y térmico, adaptando su metabolismo, por lo que es esencial obtener una visión global e integrada del mismo, con el fin de obtener cepas superproductoras. Así, hemos realizado un primer análisis integrativo de los datos provenientes de dos tecnologías ómicas diferentes, la transcriptómica diferencial (RNAseq) y la metabolómica (metaboloma dirigido), a partir de cultivos en condiciones de mínima y máxima producción de ectoínas: baja (0,6 M NaCl, 37°C) y alta salinidad (2,5 M NaCl, 37°C) y a elevada salinidad y temperatura (2,5 M NaCl, a 45°C), respectivamente.

En primer lugar, se realizó el análisis de los datos ómicos de manera individual, a fin de estudiar las diferencias en la expresión génica en cada una de las diferentes condiciones ensayadas, así como una variación en la concentración de metabolitos. En segundo lugar, se realizó un análisis integrado de ambas, mediante técnicas multivariantes y utilizando el lenguaje de programación R, en concreto, un análisis de componentes principales (PCA) y posterior regresión por mínimos cuadrados parciales (sPLS). Nuestros resultados indican numerosas correlaciones encontradas entre los niveles de expresión génica de determinadas rutas metabólicas y los niveles de concentración de los diversos metabolitos, lo que nos facilitará el diseño de nuevas estrategias de obtención de cepas superproductoras de ectoínas.

Financiación: Proyecto BIO2015-63949-R (MINECO/FEDER, UE) y Junta de Andalucía (BIO-320)



RIBOSOME PROFILING REVELA ASOCIACIÓN ENTRE LAS METILTRANSFERASAS DEL ARNr 16S ADQUIRIDAS Y LA MOTILIDAD BACTERIANA

Bosco R. Matamoros¹, Andreas Hoefler¹, Dorota Klepacki², Nora Vázquez-Laslop²,
Alexander S. Mankin², Bruno Gonzalez-Zorn¹

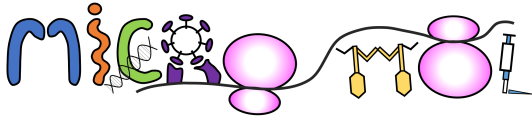
¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y VISAVET,
Universidad Complutense de Madrid, España. ² Center for Biomolecular Sciences,
University of Illinois Chicago, United States

Introducción: Las metiltransferasas del ARNr 16S han emergido en las bacterias Gram-negativas como un mecanismo adquirido que confiere altos niveles de resistencia frente a todos los aminoglucósidos clínicamente relevantes. Esta resistencia es conseguida mediante la metilación de la posición m7G1405 del sitio A del ribosoma, el cuál es la diana de este grupo antibiótico. Esta modificación provoca el desplazamiento de metilaciones “housekeeping” adyacentes, como es la metilación m4C1402 mediada por RsmI. Modificaciones en una estructura tan conservada como es el ribosoma conllevan una amplia variedad de efectos en la traducción que esta lleva a cabo. Por ello, el objetivo de este trabajo es determinar qué efectos producidos en la traducción normal de *E. coli* son debidos a la acción directa de ArmA y cuáles son debidos al desplazamiento de la metiltransferasa RsmI.

Material y métodos: El tractoma de *E. coli* BW25113 conteniendo el plásmido pACYC184, *armA* en pACYC184 o una deleción del gen *rsmI* fue evaluado mediante la técnica “Ribosome Profiling”. Estas construcciones fueron sometidas a pruebas para evaluar su motilidad en placa, además de ser observada la motilidad al microscopio. La presencia de flagelos en las distintas construcciones fue evaluada mediante microscopía electrónica por tinción negativa.

Resultados: El análisis preliminar del tractoma revela que la cepa conteniendo *armA* presenta una disminución drástica en la expresión de genes relacionados con la motilidad en comparación con BW25113. La cepa de deleción de *rsmI* comparte el mismo perfil de expresión de estos genes con la cepa con *armA*. El análisis fenotípico de las construcciones demuestra que las construcciones con ArmA o ausencia de RsmI no son móviles, siendo BW25113 muy móvil. Este resultado se confirma mediante microscopía óptica. El uso de microscopía electrónica pone en evidencia la presencia de flagelos en BW2511 con pACYC184, mientras que el resto de construcciones son aflagelares.

Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de ArmA, al desplazar la metilación de m4C1402, conlleva la pérdida de expresión de flagelos y, por tanto, de la motilidad bacteriana. Es la primera vez que un gen de resistencia adquirido se relaciona con un fenotipo no asociado a la resistencia.



Estudio de las propiedades amiloides de la familia de proteína BAP

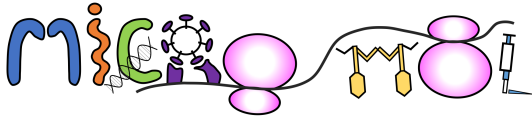
Leticia Matilla¹, Agustina Taglialegna¹, Iñigo Lasa¹ and Jaione Valle¹

¹ Unidad de Patogénesis Microbiana. Navarrabiomed. Dpto de Salud-Universidad Pública de Navarra. Pamplona

Los biofilms bacterianos representan la forma de vida habitual de las bacterias en el medio ambiente. Esta forma de vida bacteriana tiene una gran repercusión a nivel de salud pública, ya que las infecciones causadas por biofilms microbianos tienden a cronificar y a ser extremadamente resistentes a los tratamientos antibióticos y a la acción del sistema inmune. La matriz extracelular es un elemento imprescindible del biofilm. Tradicionalmente, se ha considerado que la matriz del biofilm está formada por exopolisacáridos, pero diversos estudios han puesto de manifiesto que determinadas proteínas pueden inducir la formación de biofilms en ausencia de exopolisacáridos. El ejemplo más conocido de proteínas capaces de inducir la formación de biofilm es la familia de proteínas BAP (Biofilm-Associated Proteins), cuya presencia está ampliamente extendida entre diversas especies bacterianas. Resultados obtenidos recientemente con la proteína Bap de *Staphylococcus aureus* muestran que esta proteína es capaz de ensamblarse en estructuras fibrilares de tipo amiloide para formar la matriz del biofilm.

En base a los resultados obtenidos con la proteína Bap de *S. aureus*, proponemos estudiar las propiedades amiloidogénicas de otros miembros de las proteínas BAP. Específicamente, hemos analizado la capacidad de la proteína Esp de *Enterococcus faecalis* para autoensamblarse en fibras amiloides.

La expresión de una proteína quimérica que contiene el dominio N-terminal de Esp mostró que esta región es suficiente para conferir un comportamiento multicelular. Utilizando técnicas biofísicas, unión a colorantes específicos y el sistema C-DAG (curli-dependent amyloid generator) demostramos que la región N-terminal de Esp tiene propiedades amiloides similares a las observadas con la proteína Bap de *S. aureus*. Estos resultados sugieren que el mecanismo de agregación de tipo amiloide mostrado para las proteínas de tipo BAP podría ser un mecanismo generalizado para construir la matriz de biofilm de diferentes especies bacterianas.



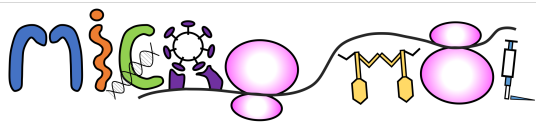
Molecular characterization of a ferredoxin-NADP⁺ reductase from the *Brucella ovis* pathogen

Marta Martínez-Júlvez^{1,2}, Víctor Taleb¹, Daniel Pérez-Amigot¹, Ernesto Anoz-Carbonel^{1,2}, María Sebastián^{1,2}, Sergio Boneta¹, Víctor Polo¹ and Milagros Medina^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Spain. ² Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) and GBsC-CSIC and BIFI-CSIC Joint Units, UniUniversidad de Zaragoza, Spain.

Brucella ovis is a gram-negative coccobacillus that causes ovine brucellosis, a clinical or subclinical disease characterized by genital lesions in rams and placentitis in female sheep. The infection is transmitted congenitally to their offspring, resulting in fertility loss and an increase in perinatal mortality [1]. The *Brucella ovis* proteome contains a FAD containing Ferredoxin-NADP(H) reductase (FPR) that belongs to the bacterial subclass 1 FPR family, (*BoFPR*). By similarity with family members *BoFPR* is expected to deliver electrons from NADPH, or low potential one-electron donors, to the redox-based metabolism. Due to its potentially relevant role for the pathogen survival upon infection conditions, it might be a potential drug target. We have overproduced *BoFPR*, presenting here its first biochemical and structural characterization, including resolution of its three dimensional structure at 1.69 Å and kinetic characterization of its reduction by the NADPH coenzyme. Moreover, all-atom molecular dynamics simulations are also used to evaluate protein dynamics and to predict the location of the nicotinamide moiety of NADPH in a catalytically competent conformation.

[1] S.J. Cutler, et al. Journal of Applied Microbiology. 2005, 98, 1270–1281



Preliminary studies to elucidate the mode of action of a new chemical series with antimicrobial activity

Millán, Ana Cristina¹; Ezquerro, José Manuel¹; Quintana, Ainhoa Lucía^{1, 3}; Aínsa, José Antonio^{1, 2, 3}; Ramón-García, Santiago^{1, 2, 3, 4}

- 1) Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain
- 2) CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
- 3) Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain.
- 4) Research & Development Agency of Aragon (ARAID) Foundation, Spain

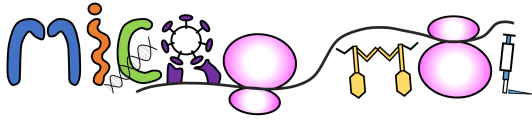
Introduction. The incidence of antibiotic-resistant infections is rising worldwide and becoming increasingly difficult to treat. A recent report estimates that, by 2050, 10 million people will die every year due to antimicrobial resistance (AMR) unless a global response to the problem of AMR is taken. Since the 1980s, the number of new antibiotics developed and approved by regulatory agencies has fallen significantly, leaving fewer options to treat resistant bacteria. For this reason, there is an urgent need to identify and characterize new small molecules with the potential to become antibiotic therapies able to treat these infectious diseases.

Objectives. A new chemical series with potent antimicrobial activity was identified in a high-throughput screening and a chemical medicine program was initiated to produce new more potent compounds with less toxicity. The aim of this work is to elucidate the antibacterial mode of action of this new chemical family of compounds.

Methods. Two complementary approaches were used to isolate mutants resistant to the compounds: first, standard mutant isolation assays at inhibitory concentrations using the wild-type strain; second, a transposon library of *Mycobacterium smegmatis* HS42 mutants previously generated in the Group of Mycobacterium Genetics (University of Zaragoza). Previously, several assays were performed to characterize the activity of the compounds and to establish optimal conditions for mutant isolation assays.

Results. Compounds were effective against mycobacteria and Gram-positive bacteria, with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values in the range of 2-8 µg/mL. They had bactericidal and sterilizing activity against *Staphylococcus aureus* MSSA (methicillin susceptible strains) and *M. smegmatis*. *S. aureus* mutants were not detected (frequency $<10^{-8}$) after selection with the compounds at 16 or 40 µg/mL, suggesting these compounds could alter essential cellular processes. Kill kinetic assays revealed strong bactericidal AUC/MIC dependent activities. Moreover, the combination of these compounds with sub-inhibitory concentrations of phenylalanine arginyl β-naphthylamide (PAβN), an efflux pump inhibitor (EPI), was effective against Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*), indicating that EPIs might allow the use of this chemical series to also treat Gram-negative infections.

Conclusions. Elucidation of the mode of action of these compounds might reveal promising new targets to treat infectious diseases.



Detección y caracterización de *S. aureus* del linaje CC398 en muestras cárnicas de La Rioja. Genotipos de resistencia, virulencia y marcadores de adaptación al huésped.

Liliana Morales, Olouwafemi Mistourath Mama, Laura Ruiz-Ripa, Sara Ceballos, Rosa Fernández-Fernández, Carmen Torres

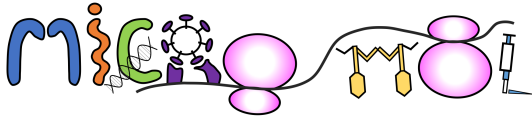
Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño

Introducción/Objetivos: *Staphylococcus aureus* es un microorganismo comensal de humanos y animales e importante patógeno oportunista. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) del linaje CC398 se asocia a animales de producción, principalmente cerdo, y su transferencia por alimentos es un riesgo de seguridad alimentaria. **Objetivo:** Determinar la frecuencia y diversidad de *S. aureus* en muestras cárnicas de La Rioja.

Materiales y métodos: 63 muestras derivadas de cerdo, pollo y pavo de 17 carnicerías de Logroño (Marzo-Junio 2018) fueron inoculadas en agar manitol salado y ORSAB (con oxacilina 2mg/L) para el aislamiento de *S. aureus* y SARM respectivamente. La identificación se realizó por MALDI-TOF y la sensibilidad a ocho antibióticos por difusión en disco (CLSI). Se identificaron por PCR 14 genes de resistencia, 4 de virulencia (*luk-PV*, *eta*, *etb* y *tst*) y los genes del clúster de evasión-sistema-inmune (IEC). Se realizó PCR-específica del CC398 y *spa*-tipo por PCR/secuenciación.

Resultados: Se detectó *S. aureus* en 27 de 63 muestras analizadas (43%), 26 de estas correspondían a carne de cerdo. Se estudiaron máximo dos cepas/muestra positiva, obteniendo 32 aislados. La resistencia a antibióticos detectada fue: penicilina (84%), tetraciclina (75%), cefoxitina (63%), clindamicina (59%), eritromicina (44%), cloranfenicol (16%), gentamicina y tobramicina (13%). Se detectó 14 genes de resistencia diferentes, asociados a los fenotipos, algunos de ellos infrecuentes (*Inu(A)*, *Inu(B)*, *vga(A)*, *erm(T)*, entre otros). De las 32 cepas analizadas, 25 pertenecían al linaje CC398 (78%), 18 de estas SARM y 7 SASM, en su mayoría resistentes a tetraciclina y asociadas a diferentes *spa*-tipos, siendo t011 el más frecuente. Dos cepas SARM-No-CC398-*spa*-t8151 fueron *luk-PV*-positivas. Se detectó el gen *eta* en dos cepas (SASM-No CC398 y SARM-CC398) y *tst* en una cepa (SARM-CC398). Dos cepas, una SASM-CC398 y otra SASM-No CC398 (sensibles a tetraciclina), fueron positivas para el sistema IEC (tipos B y C).

Conclusiones: Se evidencia un alto nivel de contaminación por *S. aureus* en muestras cárnicas derivadas de cerdo, muy especialmente SARM del linaje CC398. La detección de cepas SARM/SASM-CC398 con variabilidad en la resistencia a tetraciclina y en la presencia/ausencia del sistema IEC hace pensar en diferentes estadios evolutivos del linaje CC398 en la interfaz animal-hombre.



Nuevas aproximaciones para la lucha contra la resistencia a antibióticos: del gen al animal.

Gabriel Moyano, Bosco R. Matamoros, Natalia Montero y Bruno Gonzalez-Zorn.

Departamento de Sanidad Animal y VISAVET, Universidad Complutense de Madrid,
Madrid, España.

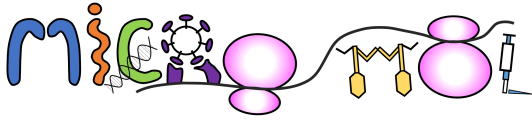
La resistencia a antibióticos se ha convertido en una amenaza para la salud pública mundial. Durante los últimos años se han desarrollado e implementado multitud de planes y programas tanto nacionales como internacionales para reducir el impacto de este fenómeno en la salud de las personas y los animales. Por otro lado, desde hace más de 50 años, los modelos animales han sido fundamentales en la lucha contra las enfermedades infecciosas tanto para comprenderlas como para desarrollar herramientas terapéuticas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar tres modelos animales para estudiar la colonización por bacterias resistentes antibióticos, la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y sus determinantes de resistencia y testar una molécula inhibidora de la conjugación bacteriana.

Para ello se buscaron entre los diferentes proveedores ratones endogámicos de la estirpe C57BL6 que fueran libres de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resistente a cloranfenicol, rifampicina y ácido nalidíxico y se acordó con el suministrador que todos los ratones empleados provendrían del mismo origen. Posteriormente se seleccionaron dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas, con perfiles de multiresistencia y asociadas a brotes epidémicos en hospitales para los modelos de colonización y transmisión. Por último, para el modelo de inhibición de la conjugación se emplearon cepas laboratoriales de *E. coli* (MDS42) de genoma reducido y el plásmido pOXA38.

Los tres modelos desarrollados permiten reproducir de manera exitosa los fenómenos estudiados. El modelo de colonización presenta una larga persistencia de la cepa inoculada sin necesidad de presión antibiótica. El modelo de transmisión permite caracterizar los contactos orales necesarios para la transmisión de la cepa estudiada y la importancia de los antibióticos en la transmisión. Por último, la prueba de eficiencia realizada en el modelo presenta resultados esperanzadores en la lucha contra la diseminación de resistencias a antibióticos.

Los tres modelos desarrollados han permitido reforzar y ampliar los conocimientos actuales sobre tres factores determinantes en la lucha contra la resistencia a antibióticos. El empleo de estos modelos es el complemento perfecto para los descubrimientos obtenidos en *in vitro* el laboratorio.



RNAs reguladores que se expresan específicamente en heterocistos

Elvira Olmedo-Verd, Manuel Brenes-Álvarez, Marina Minguet, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor

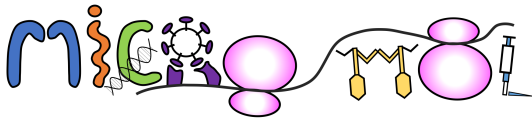
Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla), Sevilla,
España

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, similar a la que realizan las plantas superiores. En respuesta a la carencia de nitrógeno combinado, algunas cianobacterias son capaces de diferenciar unas células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico, los heterocistos, de manera que coexisten en los filamentos dos tipos celulares funcionalmente complementarios, las células vegetativas y los heterocistos. En condiciones de fijación de nitrógeno estos filamentos se comportan como organismos multicelulares con división de tareas.

El programa transcripcional que conduce a la diferenciación de heterocistos funcionales depende en primera instancia del regulador global de la asimilación de nitrógeno (NtcA), pero también de HetR, un regulador específico de diferenciación celular. La diferenciación de heterocistos pasa por el establecimiento de patrones transcripcionales exclusivos de las células que se están diferenciando, en contraste con el resto de las células vegetativas del filamento.

En base a un análisis global de los cambios transcripcionales que dependen específicamente del regulador HetR, podemos identificar todas aquellas respuestas que estarían específicamente vinculadas con la diferenciación de heterocistos. Hemos identificado varios RNAs antisentido que se inducen específicamente en los heterocistos. Nuestra hipótesis es que podrían estar implicados en la regulación post-transcripcional de la expresión génica diferencial que conduce a la transformación de algunas células vegetativas en heterocistos. Así, por ejemplo, estamos analizando el posible papel de un RNA antisentido que se transcribe específicamente en (pro)heterocistos y que regularía negativamente la producción de fructosa-1,6-bisfosfatasa/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, una enzima esencial para la asimilación fotosintética del CO₂ en el Ciclo de Calvin, que no opera en los heterocistos. Por otro lado, analizamos también los posibles efectos reguladores de un pequeño RNA, NsiR1 (nitrogen stress inducible RNA 1), que también se expresa en estadios tempranos de diferenciación en disposición antisentido a la región 5'-UTR del gen *hetF*, necesario para la diferenciación de heterocistos.

BFU2013-48282, BFU2016-74943 (Agencia Estatal de Investigación/FEDER);
Contrato predoctoral FPU014/05123



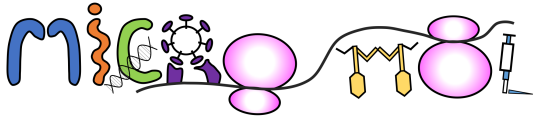
**Homeostasis del hierro y síntesis de ectoínas en la bacteria halófila
Chromohalobacter salexigens: determinación de los regulones de los
reguladores globales Fur1 y Fur2 mediante ChIP-seq**

Emilia Naranjo^{1,2}, Joaquín J. Nieto¹, Alberto Danielli², Carmen Vargas¹ y
Montserrat Argandoña¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla ², Dipartimento di
Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, Italia eminaranjo@us.es

Chromohalobacter salexigens es un microorganismo extremófilo modelo de interés en estudios de osmoadaptación procariótica, al poseer un rango salino de crecimiento muy amplio (0.1- 4M NaCl), y en Biotecnología, ya que sintetiza los solutos compatibles ectoína e hidroxiectoína, compuestos bioestabilizadores usados en Dermofarmacia y con potenciales aplicaciones en Biomedicina. Nuestros estudios previos sobre la síntesis de ectoínas y su regulación indican que el hierro juega un papel importante en dicha síntesis y en la osmoadaptación de esta bacteria. Así, el regulador global Fur es el encargado de mantener un control preciso de los niveles de hierro intracelulares, existiendo dos parálogos pertenecientes a la superfamilia Fur, Fur1 y Fur2. Ambos están implicados en la homeostasis del Fe, en la osmoadaptación y en el control transcripcional de la síntesis de ectoínas, pudiendo actuar como activadores o inhibidores según la salinidad y la concentración de hierro intracelular. Para dilucidar los mecanismos moleculares de regulación por hierro de la síntesis de ectoínas y también en la osmoadaptación se ha optimizado un protocolo para realizar un ensayo de ChIP-seq específico para esta bacteria, así como para las metaloproteínas Fur, y así determinar los regulones directos de los reguladores globales Fur1 y Fur2. En primer lugar, se obtuvieron las construcciones génicas necesarias para expresar ambos reguladores en *C. salexigens*, amplificándose las regiones codificantes de los genes *fur1* y *fur2* por PCR, fusionadas a una etiqueta de "Strep-Tactin", junto con la región promotora de cada regulador, e insertándose posteriormente en el plásmido pMP92. A continuación, los plásmidos se introdujeron por conjugación en cepas mutantes de *C. salexigens* (*fur1*⁻ y *fur2*⁻) para conseguir la expresión de dichas proteínas. Las cepas recombinantes se cultivaron en medio mínimo M63 en diferentes condiciones de salinidad y se trataron con formaldehído para fijar las interacciones proteína reguladora-ADN (*cross-linking*). Posteriormente, se fragmentó el ADN mediante sonicación y los fragmentos unidos de las proteínas reguladoras (muestras IP) se purificaron utilizando una resina. Finalmente, los fragmentos de ADN se separaron de la proteína reguladora y se construyeron las librerías para su secuenciación por Illumina.

Financiación: Proyecto BIO2015-63949-R (MINECO/FEDER, UE), Junta de Andalucía (BIO-320), VI PPIT-US.



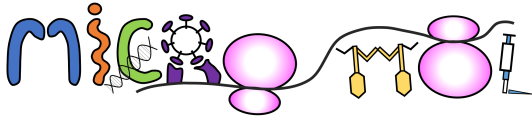
Flavivirus as probes to study *Brucella* effector proteins

Yelina Ortiz Pérez and Félix J. Sangari García.

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) / Universidad de Cantabria.

Brucella spp. are facultative intracellular pathogens that are able regulate the inflammatory response and manipulate vesicular trafficking of cells, establishing a favorable growth niche for themselves. This process is accomplished through its Type 4 Secretion System (T4SS) and in the host side involves the endocytic pathway (early and late endosomes and lysosomes), the endoplasmic reticulum (ER) and autophagic vesicles. It is very likely that all these pathways are regulated by the action of several effector proteins secreted by *Brucella* T4SS. However, there are few effector proteins identify so far and all of them by different strategies and methods. So, it is reasonable to think that new strategies to detect *Brucella* effector proteins can identify new subsets of real effector proteins.

Flaviviridae are enveloped viruses that use specialized machinery to fuse viral and host cell membranes after internalization through the endosomal pathway. After internalization, their replicate and exit from the cell manipulating host membranes, mainly ER, Golgi and autophagic vesicles. This similarity in the ecological niche among *Brucella* y *Flaviviridae* made us hypothesize the presence in *Brucella* of bacterial effector proteins with the potential of interfering with the virus replication cycle. And therefore, the use of a new screening method based on this interference could reveal new *Brucella* effector proteins. We are using a novel interference system, in which the ectopic expression of putative *Brucella* effector proteins take place simultaneously to the infection of a flavivirus in the same cell. This interaction is tracked by flow cytometry, measuring the expression of the putative effector protein on one hand, and the fluorescence associated with the viral replication on the other. Changes in the virus fluorescent levels may identify new effector proteins that will be studied to determine their role in *Brucella* pathogenicity.



Rational construction of attenuated vaccines against TB based in *phoP/fadD26* gene deletions.

Irene Pérez^{1,2}, Santiago Uranga^{1,2}, Nacho Aguiló^{1,2}, Carlos Martín^{1,2,3} and Jesús Gonzalo-Asensio^{1,2,4}

1 Grupo de Genética de Micobacterias, Departamento de Microbiología y Medicina Preventiva. Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, IIS Aragón, Zaragoza, Spain

2 CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain 3 Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

4 Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Zaragoza, Spain

Tuberculosis (TB) –caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*- is one of the main causes of mortality caused by an infectious disease despite the existence of a vaccine (BCG). BCG is a live attenuated vaccine obtained after the subcultivation of *M. bovis*, the causative agent of TB in cattle. To improve its variable efficacy against pulmonary TB in adults it is an urgent need to develop new vaccines against TB.

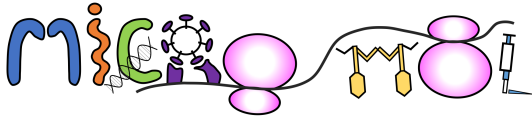
Mycobacteria adapted to infect humans are classified in six lineages. Lineages 2, 3 and 4 of *M. tuberculosis* are called “modern lineages” and lineage 1 of *M. tuberculosis* and lineages 5 and 6 of *M. africanum* are called “ancient lineages”. Modern lineages are considered “generalists” in term of geographic distribution and represent the majority of circulating TB strains [1].

One of the most promising TB vaccine candidate is MTBVAC [2], a live attenuated vaccine based a double gene deletion of *phoP* and *fadD26* genes in a clinical isolate of lineage 4 (Euro-American lineage). Both, *phoP* and *fadD26* are key virulence factors of the bacillus.

We have constructed two new double mutants of *phoP* and *fadD26* in two clinical isolates of lineages 2 (East-Asian lineage) and 3 (East African-Indian lineage), named MTBVAC-L2 and MTBVAC-L3 respectively. These gene deletions were obtained by suicide plasmids [2] or Bac-recombineering [3]. This latter technique has substantially accelerated knock-out construction in the *Mycobacterium* genus.

We have characterized these new vaccine candidates using our previous knowledge of the MTBVAC vaccine: 1) downregulation of PhoP-regulated genes (*pks2*, *pks3*, *espA*...) by qRT-PCR [4], 2) inability to secrete ESAT-6 and 3) increase of Ag85 secretion by Western-blot. Experiments in SCID mice to confirm attenuation of the new constructions and protection studies to uncover a possible lineage-dependent protection are ongoing.

1. Comas, I. and S. Gagneux,. Trends Microbiol, 2011. **19**(10): p. 492-500.
2. Arbues, A., et al.,. Vaccine, 2013. **31**(42): p. 4867-73.
3. Aguiló, N., et al.,. Nat Commun, 2017. **8**: p. 16085.
4. Gonzalo-Asensio, J., et al.,. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3496.



Establecimiento de la huella genética de variedades de *Agaricus bisporus* mediante AFLP

Estela Pérez- Lago., Olga Zafra, Raquel Francisco-Álvarez, Daniel García, Cruz Santos

Instituto de Investigaciones Biosanitarias, Facultad de Ciencias Experimentales,
Universidad Francisco de Vitoria, Ctra. M-515, Pozuelo-Majadahonda, km 1,800

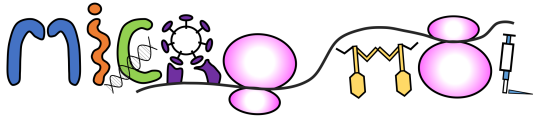
Agaricus bisporus es una de las especies de champiñón más cultivadas a nivel mundial, habiendo diferentes variedades en el mercado. La empresa Gurelan (Navarra), se dedica a la producción de micelio de hongos comestibles, principalmente de variedades de *Agaricus*.

El grupo de investigación en biotecnología microbiana de la UFV está desarrollando un proyecto de investigación con el objetivo de obtener la huella molecular de las diferentes variedades de hongos que comercializa la empresa Gurelan y que les permita una fácil diferenciación y certificación de la estabilidad genética de dichas variedades.

Para ello se está usando la técnica de AFLP (amplified fragment length polymorphisms) desarrollada por Vos et al., 1995.

La tecnología AFLP, permite hacer un rastreo de todo el genoma con diferentes pares de oligonucleótidos con el fin de seleccionar perfiles de alelos que permitan identificar especies y diferenciar variedades. Esta tecnología ya ha sido aplicada con anterioridad en estudios realizados para analizar la diversidad genética de *Pleurotus ostreatus* (Pawlik et al., 2012), con lo que es una técnica útil para ser utilizada para *Agaricus*.

En el proyecto realizado se han analizado cinco variedades *A. bisporus* y una de *A. bitorquis* como control. Hasta el momento se han analizado 8 combinaciones de cebadores diferentes y los resultados obtenidos han permitido agrupar las variedades analizadas en dos grupos diferentes. Actualmente se están analizando nuevas combinaciones de cebadores con el fin de seleccionar alelos AFLP específicos que permitan diferenciar las cinco variedades de *A. bisporus* analizadas. Estos datos serían de gran valía para el control de la estabilidad genética de las diferentes variedades y para certificar la comercialización de variedades concretas de *Agaricus*.



Construcción de un modelo transcripcional y traduccional a escala genómica de la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens* para optimizar la producción de ectoínas.

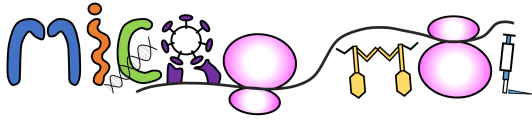
Francine Piubeli, Lourdes Martínez-Martínez, Joaquín J. Nieto, Montserrat Argandoña y Carmen Vargas

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

Chromohalobacter salexigens es una bacteria halófila con un amplio rango salino de crecimiento que sintetiza ectoínas en respuesta al estrés osmótico y/o térmico, compuestos bioestabilizadores con gran potencial biotecnológico. Dada la gran complejidad metabólica y regulatoria de la síntesis de ectoínas en esta bacteria, una de las estrategias que hemos abordado recientemente para la obtención de cepas superproductoras es la obtención de modelos metabólicos a escala genómica (Modelos M). Estos permiten realizar simulaciones en diferentes condiciones y así predecir aquellas mutaciones que faciliten el diseño racional de dichas cepas. Debido a las numerosas aplicaciones de estos modelos, actualmente se está aumentando la complejidad de los mismos, desarrollándose los “Modelos de Nueva Generación”, que se construyen de forma modular y pueden ser utilizados para simular, tanto de forma individual como acoplados a un Modelo M. Un ejemplo son los modelos de transcripción y traducción (Modelo E), que tienen en cuenta el gasto energético necesario para la síntesis de las macromoléculas (ARN y proteínas) a través de la maquinaria macromolecular. Posteriormente este modelo es conectado al modelo metabólico (Modelo M) para generar un modelo ME, de mayor capacidad predictiva. En este estudio mostramos nuestros avances en el desarrollo de un Modelo E en *C. salexigens*, que posteriormente será conectado al Modelo metabólico *i*FP764 (Modelo M), desarrollado por nuestro Grupo, y así generar posteriormente un Modelo ME. En una primera fase se han identificado y seleccionado más de 100 genes implicados en la síntesis de macromoléculas (ARN y proteínas) mediante un análisis del genoma, asociándolos a diferentes subsistemas (transcripción, plegamiento de proteínas, etc.). Además, se ha realizado un análisis *in silico* de operones y regiones promotoras para definir las unidades transcripcionales (UTs) en las que están localizados dichos genes y el/los factor/es sigma que controla/n la expresión de cada UT. En una segunda fase, se formularán, para cada subsistema, las correspondientes reacciones estequiométricas para poder obtener así una matriz matemática de alto grado de complejidad, que constituirá el Modelo E. Financiación: Proyecto BIO2015-63949-R (MINECO/FEDER, UE) y Junta de Andalucía (BIO-320).

Financiación: BIO2015-63949-R (MINECO/FEDER, UE)

Financiación: BIO2015-63949-R (MINECO/FEDER, UE), Junta de Andalucía.



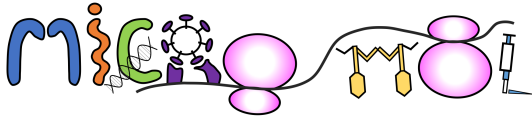
Expression of a novel class of bacterial Ig-like proteins by IncHI resistance plasmids

Hüttener¹, M., Prieto¹, A., Bernabeu¹, M., Aznar¹, S., Glaria², E., Valledor², A., and Juárez¹, A.

¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Antimicrobial resistance (AMR) is nowadays a major threat to public health. Dissemination of AMR among different bacterial populations occurs mainly due to the presence of plasmids that harbor the AMR determinants. The incompatibility group (Inc) IncHI is one of the groups of bacterial plasmids that confer AMR to several enterobacteria. IncHI plasmids confer resistance to several antimicrobial drugs. In addition, they play a relevant role in the recent spread of the resistance to one of the last resort antibiotics for some multidrug-resistant infections (colistins). In the last two years, colistin resistance is spreading very rapidly. IncHI plasmids represent 20% of all plasmids transmitting colistin resistance all over the world, and 40% in Europe. We present in this report the characterization of a large molecular mass protein (termed RSP) that contains an Ig-like domain and that is exported to the external surfaces of the bacterial cells that harbor IncHI plasmids. Expression of this protein by cells harboring IncHI plasmids had been hitherto unnoticed. We detected it in the secretome of *Salmonella* cells harboring the IncHI plasmid R27. The gene encoding the protein is widespread in plasmids from this Inc group. The protein is exported to the external medium by using the plasmid-encoded type IV secretion system that is also used for its transmission to new cells. Expression of the protein reduces cell motility and enables conjugation. Bacterial proteins containing Ig-like domains and showing a significant degree of similarity to RSP play relevant roles in adherence. Most likely, the protein must facilitate cell-to-cell contact previous to conjugation. Opsonization of bacterial cells with RSP-specific antibodies results in increased phagocytosis by macrophages. When proven to be antigenic, targeting of the RSP protein could be a means of controlling IncHI plasmids conjugation in natural environments, or of combatting infections caused by AMR enterobacteria that harbor IncHI plasmids.



ANTHELMINTIC AVERMECTINS FOR THE TREATMENT OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA INFECTIONS IN CYSTIC FIBROSIS

Lara Muñoz Muñoz^{1,2}, and Santiago Ramón-García^{2,3}

¹ Clinical University Hospital *Lozano Blesa*, Zaragoza, Spain; ² Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Spain; ³ Research & Development Agency of Aragon (ARAID) Foundation, Spain. Email: santiramon@unizar.es

Introduction. Pulmonary disease caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM) has emerged as a major threat to the health of individuals with cystic fibrosis (CF). The NTM most commonly identified in individuals with CF belong to the *Mycobacterium abscessus* (MABSC) and *Mycobacterium avium* (MAC) complexes. CF patients infected with NTM require prolonged multidrug treatment courses but, nevertheless, the probabilities of being cured are low. New therapeutic options are needed to improve therapy outcomes.

Avermectins are a family of macrocyclic lactone compounds usually used as anthelmintic drugs for clinical and veterinary uses. Although inactive against Gram-positive and Gram-negative bacteria, they have demonstrated *in vitro* activity against mycobacterial species, including *Mycobacterium tuberculosis* (PMID: 23165468), *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* (PMID: 26270480).

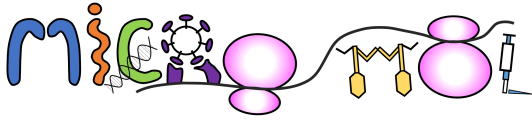
Objectives. The aim of this study is to evaluate the *in vitro* activity of the avermectins against MABSC and MAC.

Methods. Four bacterial strains were analyzed: *M. avium* ATCC 25291, *M. abscessus* sb. *abscessus* ATCC 19977, *M. abscessus* sb. *bolletii* CCUG 50184 and *M. abscessus* sb. *massiliense* CCUG 48898. Avermectins tested, both veterinary and clinically used, included: abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, milbemycin oxime, moxidectin, and selamectin. Antimicrobial susceptibility testing was carried out by broth microdilution MIC and time-kill assays in 7H9-based medium (PMDI: 27678056).

Results. Ivermectin, doramectin, selamectin, emamectin and milbemycin oxime were active against the NTM tested. Milbemycin oxime had relatively low MIC values (MIC = 8 µg/mL) against all the strains, while ivermectin and doramectin showed potent activity only against *M. abscessus* sb. *abscessus* (MIC= 1-2 µg/mL) and selamectin was active only against *M. avium* (MIC= 2 µg/mL). There were no differences in the MIC values of milbemycin oxime when measured at three and fourteen days of incubation; this is an improvement over the first-line drug clarithromycin that also contains a macrocyclic ring, for which induction of resistance through the *erm* gene compromised its clinical effectiveness.

To answer the question of whether avermectins were bactericidal or bacteriostatic, kill kinetic experiments were performed for the most active compounds, ivermectin and milbemycin oxime. Ivermectin showed inhibitory activity against *M. abscessus* sb. *abscessus*, but after 3 days of incubation the strain did resume growth, while no inhibition was observed against any of the other strains tested. Milbemycin oxime displayed inhibitory activities against all strains tested and bactericidal activity against *M. abscessus* sb. *massiliense*.

Conclusions. Milbemycin oxime was the most active avermectin against MABSC and MAC strains, although its bactericidal activity was only confirmed against *M. abscessus* sb. *massiliense*; this could be related to the fact that this strain carries deletions in the *erm* gene. The avermectins are clinically approved drugs. Many of them are for veterinary used (i.e. milbemycin oxime), however, extensive packages of pharmacological and toxicity data are readily available. Although more studies are needed to assess their clinical potential, they could form the basis of new therapeutic approaches (alone or in combination) against NTM infections.



Una vacuna viva de *Salmonella* que inyecta el antígeno PcrV a través de un sistema de secreción tipo III protege contra *Pseudomonas aeruginosa*

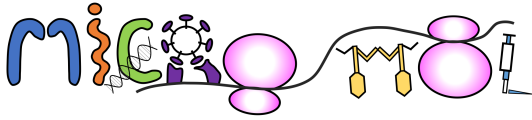
Julia Aguilera Herce^a, Meritxell García Quintanilla^b, Rocío Romero Flores^a, Michael J. McConnell^b, Francisco Ramos Morales^a

^a Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

^b Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno humano oportunista que resiste de manera natural una amplia gama de antibióticos, de ahí la importancia de desarrollar una vacuna eficaz contra las infecciones por esta bacteria Gram negativa. En este trabajo se ha usado una estirpe atenuada de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium como vehículo para expresar antígenos de *P. aeruginosa*. De entre las combinaciones ensayadas, la fusión entre la proteína efectora SseJ de *S. enterica* y el antígeno PcrV de *P. aeruginosa* se translocó correctamente a través de un sistema de secreción tipo III de *Salmonella* a células hospedadoras en un ensayo *in vitro* y fue capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos anti-PcrV en ratones. Los ratones inmunizados con una estirpe atenuada de *Salmonella* que expresaba esta fusión presentaron una reducción significativa de la carga bacteriana en el hígado y los pulmones, así como menores niveles séricos de citoquinas proinflamatorias en comparación con ratones control después de una infección con *P. aeruginosa*. Además, los ratones inmunizados mejoraron significativamente su supervivencia en este modelo de infección. Estos resultados sugieren que los efectores de los sistemas de secreción tipo III de *S. enterica* son vehículos apropiados para el diseño de vacunas vivas que protejan contra las infecciones por *P. aeruginosa*.

Financiación: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, SAF2013-46229-R y SAF2016-75365-R.



Estudio del transcriptoma de *Pseudomonas fluorescens* F113. Relevancia de factores externos e internos en el mapa transcripcional.

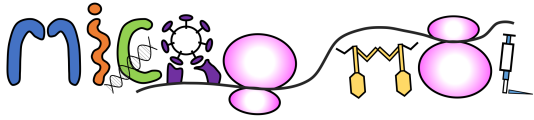
Miguel Redondo-Nieto, Francisco Martínez-Granero, Rafael Rivilla, Marta Martín

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

Pseudomonas fluorescens F113 es una γ -proteobacteria que coloniza la rizosfera y promueve el crecimiento vegetal. Estudios previos realizados en el laboratorio han mostrado que AmrZ es un regulador global de respuesta a las condiciones ambientales estando implicada en la regulación del movimiento, la formación de biopelículas, la producción de exopolisacáridos y la homeostasis de hierro. En este trabajo presentamos el estudio transcriptómico llevado a cabo mediante RNA-Seq de F113 en su forma silvestre y mutada en el gen *amrZ*. El análisis se ha llevado tanto en fase exponencial como en fase estacionaria con baja y alta dosis de hierro en cada caso.

P. fluorescens F113 tiene 6041 regiones de transcripción/genes organizados en 1185 operones. Los resultados de PCA y de agrupamiento jerarquizado han mostrado que la adición de hierro presenta mayor influencia sobre la expresión génica; seguido de la fase de crecimiento y por último de la mutación en el gen *amrZ*. Los cultivos en fase exponencial con mayor contenido de hierro, presentan un incremento en la transcripción de genes implicados en la formación de proteínas o estructuras que requieren tal cofactor y en procesos de oxido reducción mientras que los cultivos sin ese suplemento priorizan como era de esperar, los genes implicados en la homeostasis y el transporte de hierro y otros metales bivalentes. Además, durante la fase exponencial predominan las rutas de activación de transcripción, crecimiento, generación de pared celular, metabolismo y almacenamiento de sustancias de reserva, mientras que en fase estacionaria abundan los genes ligados al movimiento quimiotáctico, control poblacional, procesos fermentativos y metabolismo de sustancias de reserva. Por último, los resultados de expresión en mutantes *amrZ* nos ratifican que esta proteína está implicada en el cambio del modo de vida de la bacteria reprimiendo toda aquella actividad que tenga que ver con la movilidad, búsqueda de nutrientes y movilización de los mismos y promueve la estabilización y proliferación de la bacteria en el sitio colonizado induciendo la formación de biopelículas.

Trabajo financiado por MINECO/FEDER EU- BIO 2015-64480-R



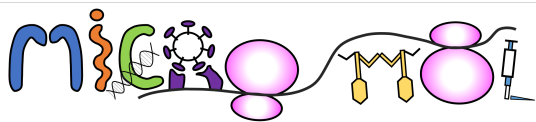
Metagenomic analysis of a soil PCB-degrading microbial consortium

Garrido-Sanz D., Manzano J., Martín M., Redondo-Nieto M., Rivilla R

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are widespread persistent organic pollutants that cause a number of health effects. Aerobic bioremediation of PCBs can be performed by individual microorganisms or more frequently by microbial consortia to ensure that neither PCBs nor their derivatives (including chlorobenzoates) persist in the environment. The use of bacterial consortia can also enhance the range of PCB congeners to be co-metabolized as different PCB-degrading microorganisms exhibit diverse substrate specificity. We have obtained a microbial consortium by enrichment culture from the rhizospheric soil beside a petrol station by using a defined mineral medium supplemented with biphenyl (analogue of PCBs) as the sole carbon and energy source. Samples of the cultures during growth were deep-frozen to be used as reference. Metagenomic DNA from an exponentially growing culture was used to analyze the biodiversity (by 16S rDNA amplicons library) and to identify key genes implicated in bioremediation of PCBs. The bacterial consortium is composed by 24 OTUs at the genus level (97% identity) and is dominated by beta and gamma proteobacteria (56.05% and 37.55% respectively). Among betaproteobacteria, the dominant genera are *Pigmentiphaga* (20.54%), *Bordetella* (21.28%) and *Achromobacter* (12.67%), while the dominant genera from gammaproteobacteria are *Pseudomonas* (28.97%) and *Stenotrophomonas* (8.57%). Members from most of these genera are known for their ability to degrade PCBs. Another PCB-degrading genus, *Rhodococcus*, was also detected at a significant level (2.16%). Our first results using shotgun metagenomics sequencing shows the presence of biphenyl dioxygenases from the *Rhodococcus* family, biphenyl degradation pathway enzymes from pseudomonads and a great number of enzymes implicated in the degradation of benzoate. The presence of complete pathways relevant for the bioremediation of PCBs and their OTUs assignment is being evaluated in order to reconstruct the relevant pathways present in the consortium.

DGS was granted by FPU fellowship program (FPU14/03965) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain. Funded by BIO 2015-64480-R (MINECO/FEDER EU).



The essential response regulator ArsR from *Helicobacter pylori* as target for novel potential antimicrobial drugs

Andrés González^{1,2}, Sandra Salillas^{2,3*}, Adrián Velázquez-Campoy^{2,7,8}, José A. Aínsa^{2,4,6}, María F. Fillat^{2,3}, Javier Sancho^{2,3}, Ángel Lanás^{1,5,7}

¹Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón). ²Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza.

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular & Celular, Universidad de Zaragoza. ⁴Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza. ⁵Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa". ⁶CIBER Enfermedades Respiratorias. ⁷CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas. ⁸Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), Zaragoza, Spain

* Correspondence: sandrasb @unizar.es

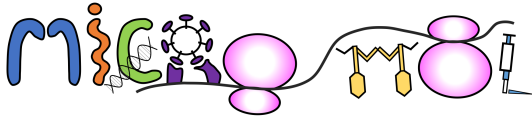
Helicobacter pylori infection is the principal trigger of gastric carcinogenesis and gastric cancer, and remains the third leading cause of cancer-related death in both sexes worldwide. A standard triple therapy consisting of a proton pump inhibitor and two antibiotics (clarithromycin and amoxicillin/ metronidazole) is widely used as the first-line regimen for treatment of infection by this microorganism. However, the efficacy of this standard regimen has progressively declined, mainly due to widespread development of antibiotic resistance [1]. A major challenge in the search of novel effective antimicrobial drugs is the identification of new microbial targets, essential for *in vivo* growth and/or pathogenicity, whose inhibitors can overcome the currently circulating resistome of human pathogens [2]. The regulator ArsR is part of the acidic-responsive ArsS-ArsR two-component signal transduction system, comprised of the sensor histidine kinase ArsS and the response regulator ArsR [3]. While ArsS null mutants are viable, ArsR appears essential for *H. pylori* viability, becoming promising therapeutic target against *H. pylori* infection. In the present work, we screened the Prestwick Chemical Library[®], a collection of 1120 FDA-approved small molecules, for compounds that specifically bind to ArsR and potentially inhibit its function. Compound binding was assessed by a fluorescence-based thermal shift assay [4]. By using this approach, ten active molecules belonging to different pharmacological classes were identified as potential ArsR inhibitors. Four of these bioactive compounds sensibly inhibited the biological function of the *H. pylori* essential regulator according to electrophoretic mobility shift assays.

[1]Backert S., et al. *Helicobacter* 2016; 21: 19-25.

[2]González A., et al. *Future Medicinal Chemistry* 2018; 10: 541-60.

[3]Pflock M., et al. *Journal of Bacteriology* 2006: 188: 3449-62.

[4]Cremades N., et al. *ACS Chemical Biology* 2009; 20: 928-38.



WadD, a new *Brucella* lipopolysaccharide core glycosyltransferase identified by genomic search and phenotypic characterization.

Miriam Salvador-Bescós¹, Yolanda Gil-Ramírez¹, Amaia Zúñiga-Ripa¹, Estrella Martínez-Gómez¹, María J. de Miguel², Pilar M. Muñoz², Axel Cloeckert³, Michel S. Zygmunt³, Ignacio Moriyón¹, Maite Iriarte¹, Raquel Conde-Álvarez¹.

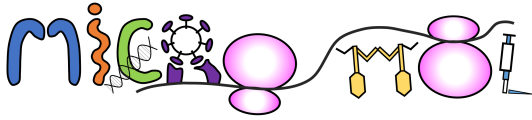
¹Instituto de Salud Tropical, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, and Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra, c/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain.

²Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Unidad de Producción y Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)- Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain.

³Institut National de la Recherche Agronomique, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, Nouzilly, France.

Brucellosis, an infectious disease caused by *Brucella*, is one of the most extended bacterial zoonosis in the world and an important cause of economic losses and human suffering. The lipopolysaccharide (LPS) of *Brucella* plays a major role in virulence as it impairs normal recognition by the innate immune system and delays the immune response. The LPS core is a branched structure involved in resistance to complement and polycationic peptides, and mutants in glycosyltransferases required for the synthesis of the lateral branch not linked to the O-polysaccharide (O-PS) are attenuated and have been proposed as vaccine candidates. For this reason, the complete understanding of the genes involved in the synthesis of this LPS section is of particular interest. The chemical structure of the *Brucella* LPS core suggests that, in addition to the already identified WadB and WadC glycosyltransferases, others could be implicated in the synthesis of this lateral branch. To clarify this point, we identified and constructed mutants in 11 ORFs encoding putative glycosyltransferases in *B. abortus*.

Four of these ORFs, regulated by the virulence regulator MucR (involved in LPS synthesis) or the BvrR/BvrS system (implicated in the synthesis of surface components), were not required for the synthesis of a complete LPS neither for virulence or interaction with polycationic peptides and/or complement. Among the other seven ORFs, six seemed not to be required for the synthesis of the core LPS since the corresponding mutants kept the O-PS and reacted as the wild type with polyclonal sera. Interestingly, mutant in ORF BAB1_0953 (renamed *wadD*) lost reactivity against antibodies that recognize the core section while kept the O-PS. This suggests that WadD is a new glycosyltransferase adding one or more sugars to the core lateral branch. WadD mutants were more sensitive than the parental strain to components of the innate immune system and played a role in chronic stages of infection. These results corroborate and extend previous work indicating that the *Brucella* LPS core is a branched structure that constitutes a steric impairment preventing the elements of the innate immune system to fight against *Brucella*.



**Tuberculosis debida a *Mycobacterium africanum* en Aragón en los últimos 12 años
¿Hay transmisión en nuestra población?**

Isabel Otaí, María Luisa Monforte, Daniel Ibarz, Alberto Cebollada, María Asunción Vitoria, Luis Torres, María José Iglesias, Sofía Samper* por la Red de Estudio Molecular de la Tuberculosis en Aragón.

Universidad de Zaragoza, Hospital Universitario Miguel Servet, Hospital Universitario Lozano Blesa, Hospital San Jorge (Huesca) e Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, CIBER de Enfermedades Respiratorias, IIS Aragón.

La secuenciación genómica de *M. tuberculosis* complex se centra en los linajes 1 a 4 por su mayor relevancia global. Los linajes 5 y 6, endémicos en África occidental, presentan una menor diseminación global. En Aragón, desde 2004, la vigilancia de la tuberculosis se apoya en los estudios moleculares para realizar un mejor seguimiento y control de los casos. Debido al aumento de la inmigración se están detectando casos de tuberculosis producida por *M. africanum*, en países no endémicos, aquí, revisamos los casos producidos en Aragón entre los años 2004-2016.

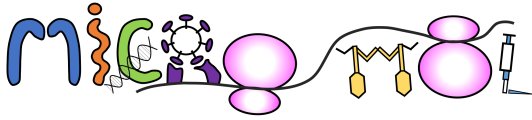
Se identificaron y caracterizaron mediante el análisis de las regiones diferenciales: RD9, TBD1, RD 702, RD711. Se emplearon métodos moleculares de spoligotyping, RFLP-IS6110, y estudio de genes de resistencia y localización de IS6110.

En el período de estudio se diagnosticaron 2293 aislados de *M. tuberculosis* complex. Del total de los casos cuyo linaje pudo ser estudiado, el 95% pertenecían al linaje 4, siendo por lo tanto el más frecuente en nuestro medio; de los 28

M. africanum, 6 correspondían al linaje 5 y 22 al linaje 6. Entre los casos de *M. africanum*, el 43% presentaron un idéntico genotipo mediante RFLP-IS6110 y Spoligotyping. El estudio de estas 28 cepas permitió detectar la existencia de 4 patrones compartidos por 12 aislados; también se localizaron las secuencias de inserción en sus genomas. Al comparar los polimorfismos obtenidos de estas cepas, con los presentes en los genomas disponibles en NCBI, confirmamos para el linaje MAF2 varios polimorfismos que serían marcas evolutivas y distintivas y que podrían resultar útiles para su identificación rápida.

El aislamiento de *M. africanum* es un hallazgo raro en Aragón. Se observó un claro predominio del linaje 6 (MAF2) frente al linaje 5 (MAF1). Sorprende la detección de un 43% de los casos compartiendo patrones genéticos, dada la baja transmisibilidad considerada de estas cepas. Los polimorfismos genómicos encontrados en los linajes 5 y 6 frente a otros linajes del complejo tuberculosis podrían representar una marca evolutiva y/o estar relacionados con su peor adaptación a nuestra población. La secuenciación genómica podría ser de gran utilidad para su mejor caracterización.

REFERENCIAS: Int J Tuberc Lung Dis 2012; 16:1400–1404 / PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10, e0004332 / SCIENTIFIC RePorTS 2018; 8:160 / J Clin Microbiol, 2004; 42:3594–3599.



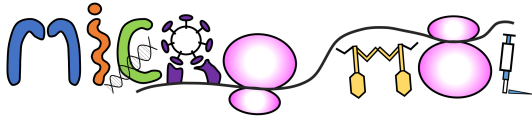
Avances en la caracterización de los factores que modulan la síntesis de exopolisacáridos en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

Andrés Sandoval, Cristina Sarasa, María Luisa Peleato, María F. Fillat, Emma Sevilla and Andrés González

Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology and Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza-CSIC, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain.

Las biopelículas o biofilms son matrices poliméricas extracelulares que favorecen la formación de asociaciones microbianas facilitando su proliferando en ambientes hostiles. Estructuralmente esta matriz está formada por un conglomerado de DNA, proteínas, diversos polisacáridos y otras compuestos extracelulares no siempre bien caracterizados. Trabajo preliminar de nuestro grupo sugiere que las proteínas de la familia de reguladores FUR (ferric uptake regulation) podrían controlar algunos de los factores que influyen en la producción de biopelículas. En *Anabaena* PCC 7120, esta familia consta de tres parálogos denominados FurA, FurB y FurC.

En este trabajo se pretende conocer mejor la maquinaria que interviene en la formación de biopelículas en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120, así como algunos de los factores que afectan a la producción de exopolisacáridos, tales como la desregulación de las proteínas FUR y su efecto sobre la expresión de las glicosiltransferasas de la cianobacteria. Partiendo de la información disponible en la cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/CyanoBase>) se han identificado y clasificado las diferentes glicosiltransferasas presentes en *Anabaena* PCC7120, realizando un análisis bioinformático detallado de las mismas. Por otra parte, se ha puesto a punto metodología para determinar la cantidad de exopolisacárido presente en los sobrenadantes de cultivos de *Anabaena* y se ha estudiado como afecta la deficiencia de nitrógeno a la producción de dichos exopolisacáridos. Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio transcriptómico de *Anabaena* PCC7120 y una variante de esta cianobacteria que sobreexpresa la proteína FurC. La comparación de ambos transcriptomas ha permitido identificar el efecto de la sobreexpresión de FurC sobre la expresión de diferentes proteínas potencialmente implicadas en la formación de biopelículas.

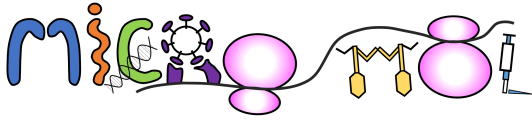


**Impacto global de la sobreexpresión de la proteína FurC (PerR) en la
cianobacteria *Anabaena*
PCC7120**

Emma Sevilla, Cristina Sarasa, Andrés González, María Luisa Peleato and María F.
Fillat

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular e Instituto de
Biocomputación y Física de Sistemas Complejos. Facultad de Ciencias, Universidad
de Zaragoza-CSIC, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain.

La familia de proteínas Fur de *Anabaena* PCC7120 está compuesta por tres metaloproteínas denominadas FurA, FurB y FurC. Las proteínas FurA y FurB son reguladores transcripcionales con una fuerte implicación en la regulación del metabolismo del hierro y el zinc aunque también se ha descrito que están involucradas en la regulación global de otros importantes procesos celulares en *Anabaena* PCC7120. FurC es la proteína más desconocida dentro de la familia de proteínas Fur de *Anabaena*. Resultados previos indicaban que esta proteína podía actuar como un modulador de la unión de los otros dos miembros de la familia Fur a sus propios promotores regulando así su transcripción. Por otro lado, FurC había sido descrita como un posible ortólogo de la proteína PerR ya que su expresión se inducía considerablemente en condiciones de estrés oxidativo y además regulaba transcripcionalmente la expresión de genes de adaptación a estrés oxidativo como son la peroxirredoxina (*prxA*) y la sulfirredoxina (*srxA*). Con el fin de estudiar en detalle los procesos moleculares y celulares en los cuales está involucrada la proteína FurC, en este trabajo se ha caracterizado una cepa que sobreexpresa dicha proteína en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 (cepa EB2770). La sobreexpresión de FurC produce importantes alteraciones fisiológicas en *Anabaena*, tales como cambios en el tamaño, la forma e incluso en la composición en pigmentos. Asimismo se produce un descenso de la actividad fotosintética y un aumento en la respiración. Por otro lado la cepa EB2770 presenta una menor supervivencia cuando se incuba con agentes causantes de estrés oxidativo. Finalmente se llevó a cabo un estudio de transcriptómica mediante RNAseq en el cual se compararon los transcriptomas de la cepa de sobreexpresión de FurC con la cepa wild type de *Anabaena*. Los resultados indican que esta proteína no está sólo involucrada en la respuesta a estrés oxidativo sino que participa en la regulación de otros procesos celulares de suma importancia para la cianobacteria, tales como la fotosíntesis, el metabolismo del hierro o el metabolismo del nitrógeno.



La expresión de dos de las tres CSPs de *Staphylococcus aureus* está regulada por 5'UTRs- termosensoras

Arancha Catalán-Moreno y Alejandro Toledo-Arana

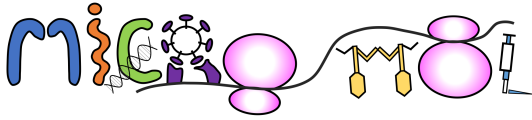
Laboratorio de Regulación Génica Bacteriana, Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gob. de Navarra.

Avda. Pamplona 123, 31192 Mutilva, Navarra, España. E-mail:
alejandro.toledo@unavarra.es

Las *Cold Shock Proteins* (CSPs) son un grupo de chaperonas de RNA fundamentales para la regulación post- transcripcional de genes de prácticamente cualquier organismo. A pesar de su nombre, no todas las CSPs inducen su expresión a bajas temperaturas. De las tres CSPs presentes en *Staphylococcus aureus*, se ha descrito que sólo los niveles del mRNA de *cspB* aumentan en esta condición. Sin embargo, no se ha corroborado si ocurre lo mismo a nivel de proteína. Nuestro grupo confirmó recientemente que CspA no responde a la temperatura, pero es necesaria para responder al estrés oxidativo.

Con el fin de profundizar en los mecanismos que coordinan la expresión de las CSPs de *S. aureus*, hemos marcado cada una de ellas con 3xFLAG. Observamos que tanto CspB como CspC inducen su expresión a temperatura ambiente (22-28°C) en comparación con 37°C. Curiosamente, no encontramos diferencias en el crecimiento de los mutantes a esas temperaturas, lo que indicaba una posible redundancia funcional, como se había demostrado en *Escherichia coli*. Por ello, realizamos dobles y triples mutantes de las CSPs. Descubrimos que el mutante doble *cspBC* tiene dificultades para crecer a temperaturas inferiores a 22°C, mientras que el triple mutante *cspABC* se ve afectado a partir de los 28°C. La sola presencia de CspB o CspC permite el crecimiento a 22°C.

El control de la expresión mediado por temperatura normalmente se lleva a cabo mediante estructuras de RNA localizadas en las 5'UTRs conocidas como termosensores. Sin embargo, hasta ahora no se había descrito ninguno en *S. aureus*. Analizando las 5'UTRs de *cspB* y *cspC*, encontramos que ambas pueden formar dos estructuras alternativas similares. La fusión 5'UTR^{*cspC*}-GFP confirmó que esta región actúa como termosensora, activando la traducción del *reporter* a baja temperatura. Esto sugiere que una de las estructuras alternativas bloquearía el acceso del ribosoma. Así, según en qué temperatura se encuentra la bacteria, se formaría una u otra, regulando la expresión de estas dos CSPs. Conjuntamente, estos resultados muestran la importancia que la termorregulación puede tener para la supervivencia de *S. aureus* cuando se encuentra fuera del hospedador y, por lo tanto, para su transmisibilidad.



Endolisinas procedentes de bacteriófagos de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*: una posible alternativa al tratamiento antibiótico.

Patricia Bernabe-Quispe¹, Mercedes Cervera-Alamar¹, Leticia Ortí², Katerina Guzman-Markevich¹, Antonio Pineda-Lucena² y María Ángeles Tormo-Mas¹

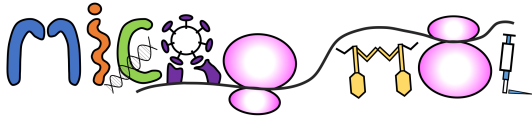
¹ Grupo acreditado de Infección Grave, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia.

² Unidad de Descubrimiento de Fármacos, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia.

En los últimos años, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial cada vez mayor. Se estima que, si no se toman medidas, en el año 2050 morirán 10 millones de personas por infecciones resistentes a los antibióticos. La aparición de cepas multirresistentes provoca el fracaso de los tratamientos antimicrobianos convencionales, aumentando la morbimortalidad y el tiempo de hospitalización al igual que un incremento de las complicaciones asociadas. Las infecciones producidas por *S. aureus* representan una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales, siendo especialmente relevantes las cepas multirresistentes, como las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y a la vancomicina, las cuales son clasificadas según la OMS como de prioridad elevada referente a la necesidad de obtener nuevos tratamientos.

En este trabajo planteamos el uso de endolisinas para el tratamiento de las infecciones. Las endolisinas de los bacteriófagos actúan como enzimas antimicrobianas, ya que hidrolizan el peptidoglicano. Cuando se aplican exógenamente en forma de proteínas recombinantes purificadas, pueden inducir la lisis de bacterias Gram-positivas, por tanto, estas enzimas representan un uso potencial para tratar bacterias patógenas específicas, sin influir en la microbiota.

Para desarrollar este trabajo partimos de una colección de 200 cepas de *S. aureus*, de las cuales, estudiamos la presencia de bacteriófagos mediante PCR y southern-blot de sus integrasas y analizamos la capacidad de lisis bacteriana tras la inducción con mitomicina C. El 100% de las cepas contenían al menos un bacteriófago y el 58,3% más de uno. El 85% de las cepas fueron lisadas total o parcialmente tras la inducción de sus bacteriófagos. Por otro lado, secuenciamos el genoma de 27 cepas mediante secuenciación masiva y alineamos las secuencias de los diferentes bacteriófagos para finalmente clasificar sus endolisinas según su estructura. Encontramos 4 familias de endolisinas según los dominios estructurales que presentaban y seleccionamos una endolisina por familia para purificarlas y estudiar su actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con el fin de buscar nuevas endolisinas que sirvan como tratamiento frente a las infecciones bien como alternativa o en combinación al tratamiento antibiótico.



Mecanismo de movilización de las islas de patogenicidad por fagos endógenos en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Mercedes Cervera-Alamar¹, Katerina Guzman-Markevich¹, Migle Ziemyte¹, Javier Pemán^{1,2} y María Ángeles Tormo-Mas¹

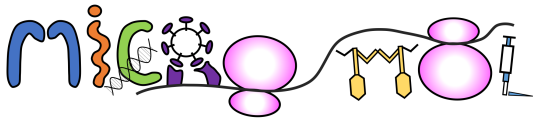
¹ Grupo acreditado de Infección Grave, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia.

² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) son Elementos Genéticos Móviles (MGE) que juegan un papel significativo en la patogénesis y virulencia de este microorganismo. Las SaPIs están integrados en el cromosoma bajo el control del represor StI pero pueden ser transferidos horizontalmente con alta frecuencia gracias a ciertos bacteriófagos. Así, una proteína fágica se une al StI de la SaPI e induce su ciclo de escisión, replicación y empaquetamiento, permitiendo así la diseminación de importantes factores de virulencia codificados por SaPI, principalmente toxina, a otras poblaciones bacterianas (Tormo-Mas, *Nature*, 2010; Tormo-Mas, *Mol Cell* 2013).

En este trabajo, determinamos que la inducción de las SaPIs por bacteriófagos endógenos ocurre de manera natural en cepas clínicas de *S. aureus* con una frecuencia mucho mayor de la esperada, como demostramos en las cepas MW2, USA300, COL, N315, A, C y D. Asimismo, estudiamos en detalle este mecanismo en la MW2, una cepa clínica relevante de *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA), que contiene dos bacteriófagos (ϕ Sa2mw y ϕ Sa3mw) y un SaPI (SaPImw2) que codifica para tres enterotoxinas (*sec*, *sel* y *ear*). Demostramos que ϕ Sa2mw es responsable de la inducción de SaPImw2 y determinamos que DUF3113 es la proteína específica del fago que actúa como antirepresor de la SaPI. Igualmente, comprobamos la interacción de las proteínas StISaPImw2 y DUF3113 y la existencia de variantes de esta proteína en los fagos de *S. aureus* con diferente capacidad para inducir a la SaPI. Además, sugerimos que las SaPIs utilizan una nueva estrategia para su movilización en la que coordinan a más de un fago para asegurar su diseminación. Por último, tanto StISaPImw2 como DUF3113 están presentes en otras especies de *Staphylococcus*, lo que indica que se trata de un mecanismo generalizado.

- Tormo-Más MA, Mir I, Shrestha A, Tallent SM, Campoy S, Lasa I, Barbé J, Novick RP, Christie GE, Penadés JR., 2010, Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands., *Nature*, 465:779-782.
- Tormo-Más MA, Donderis J, García-Caballer M, Alt A, Mir I, Marina A, Penadés JR., 2013, Phage dUTPases control transfer of virulence genes by a proto-oncogenic G protein-like mechanism, *Molecular Cell*, 49:947-958.



Artificial analogues of antimicrobial peptides: synergetic activity of nano-gold simultaneously functionalized with different amino acids

Marija Vukomanovic^{1,2} and Eduard Torrents^{*}
(mvukomanovic@ibebarcelona.eu/etorrents@ibebarcelona.eu)

¹ Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies” lab (BIAT), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldiri I Reixac 10-12, 08028 BARCELONA. ²Advanced Materials Department, Institute Jozef Stefan, Slovenia.

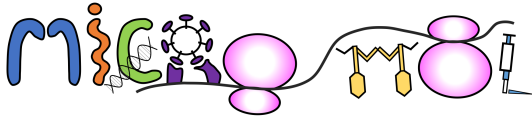
Antimicrobial peptides are characterized by a range of properties which rank them very high on the list of potential alternatives to currently available antibiotics. There is, however, a list of their limitations which significantly affect their usage. A considerable effort has been paid to improve their bioavailability and stability identified as the primary obstacles for their practical applications. Aside from designing new synthetic antimicrobial peptides, there is a high effort in developing innovative nanotechnological approaches that combine well-known antimicrobial peptides with nanoparticles to increase their stability and boost their bioavailability on the way to the more efficient therapeutic outcome. Gold nanoparticles (Au-NPs) functionalized with cationic arginine molecules enable more stable structures with the potential to provide better bioavailability. In this work we investigated whether it is possible to use a mixture of charged amino acids to functionalize Au NPs to combine better stability with stronger antimicrobial activity induced by synergy.

AuNPs were synthesized using sonochemical method and tested for their antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

Chemistry at the surface of Au NPs was regularly tailored using the process of functionalized with different, cationic amino acids providing morphologically similar, 20-nm sized particles. The antimicrobial activity of the different AuNPs, illustrated for *P. aeruginosa*, confirmed surface chemistry dependence: for functionalization with single amino acid (Au(his (100wt%))) MIC₁₀₀ was higher than 0.1 mg/ml; mixture of two cationic amino acids (Au(his-arg (50:50wt%))) decreased MIC₁₀₀ value to the range of 0.04-0.05 mg/ml while three amino acids (Au(his-arg-lys 33:33:33wt%)) provided further MIC₁₀₀ decrease to 0.03-0.04 mg/ml increasing their antimicrobial activity. The same trend of decreasing the MIC values was observed for *E. coli* and *S. aureus*.

As a conclusion, bonding various amino acids to the bioinert AuNPs give them the possibility for specific interactions with bacterial membranes that enable increased antimicrobial activity, provides synergy and boosts efficiency.

This work was supported through grants to ET from the Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2015-63557-R), Generalitat de Catalunya (2017SGR01079) and La Caixa Foundation. This work is a part of BEST Postdoctoral Programme (funded by the European Commission (Grant Agreement no. 712754) and by the Spanish Ministry of Science and Competitiveness (Grant SEV-2014-0425 (2015-2019)) and by the La Caixa Foundation



Aerobic vitamin B12 biosynthesis is essential for *Pseudomonas aeruginosa* class II ribonucleotide reductase activity during planktonic and biofilm growth

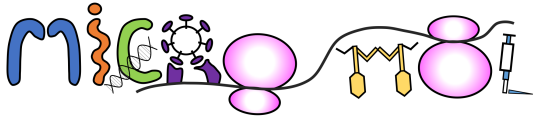
Anna Crespo, Núria Blanco-Cabra and Eduard Torrents^{*}
(etorrents@ibecbarcelona.eu)

*: “Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies” lab (BIAT), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldiri I Reixac 10-12, 08028 BARCELONA

P. aeruginosa is a major pathogenic bacterium in chronic infections and is a model organism for studying biofilms. *P. aeruginosa* is considered an aerobic bacterium, but in the presence of nitrate, it also grows in anaerobic conditions. Oxygen diffusion through the biofilm generates metabolic and genetic diversity in *P. aeruginosa* growth, such as in ribonucleotide reductase activity. These essential enzymes are necessary for DNA synthesis and repair. Oxygen availability determines the activity of the three-ribonucleotide reductase (RNR) classes. Class II and III RNRs are active in the absence of oxygen; however, class II RNRs, which are important in *P. aeruginosa* biofilm growth, require a vitamin B12 cofactor for their enzymatic activity.

In this work, we elucidated the conditions in which class II RNRs are active due to vitamin B12 concentration constraints (biosynthesis or environmental availability). We demonstrated that increased vitamin B12 levels during aerobic, stationary and biofilm growth activate class II RNR activity. We also established that the *cobN* gene is essentially responsible for B12 biosynthesis under planktonic and biofilm growth. Our results unravel the mechanisms of dNTP synthesis by *P. aeruginosa* during biofilm growth, which appear to depend on the bacterial strain (laboratory-type or clinical isolate).

This work was supported through grants to ET from the Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2015-63557-R), Generalitat de Catalunya (2017 SGR01079) and La Caixa Foundation. LP is thankful to the Generalitat de Catalunya



Genómica comparativa de aislados de *S. aureus* CC398 (MRSA y MSSA) que colonizan simultáneamente personal con contacto profesional con ganado porcino ¿Distintos estadios evolutivos del linaje CC398?

Paula Gómez¹, Carmen Aspiroz², Nazreen F. Hadjirin³, Daniel Benito¹, Myriam Zarazaga¹, Mark A. Holmes,³ Carmen Torres¹

¹Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España.

²Departamento de Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, España.

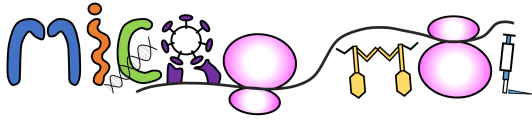
³Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de Cambridge, Cambridge, UK.

Introducción. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) ST398 es una línea genética asociada al ganado (AG), aunque también se detecta en humanos. El contacto con animales de granja (especialmente cerdos) es un factor de riesgo de colonización/infección. La ausencia de genes del sistema de evasión inmune humano (IEC) son marcadores de AG- SARM-ST398. Existe un clado-humano de ST398, generalmente sensible a meticilina (MSSA), portador de IEC. Durante un programa de vigilancia de colonización-hospitalaria por SARM se obtuvieron dos cepas *S. aureus* ST398 (SARM y SASM), de la misma muestra nasal de paciente que trabajaba en transporte de cerdos-vivos. **Objetivo** estudio genómico comparativo de las cepas SASM/SARM-ST398 por secuenciación completa de sus genomas.

Material/Métodos. Susceptibilidad a antimicrobianos por disco-placa. Secuenciación completa de ambos genomas mediante Illumina HiSeq 2000 (100pb extremos pareados), y análisis mediante distintos programas bioinformáticos.

Resultados. Las dos cepas *S. aureus*-t011/ST398 mostraron el mismo fenotipo de resistencia, con la excepción de β - lactámicos (SARM *mecA*-positivo y SASM *mecA*-negativo). SCC*mecV* fue detectado en SARM y SASM poseía secuencias remanentes de SCC*mec* por recombinación entre dos primasas putativas que supuso una delección (17342pb). Ambas cepas mostraron los siguientes genes de resistencia/virulencia: *blaZ*, *tet(M)*, *norA*, *lnu(B)*, *dfcK*, *aadE*, *aac(6')-aph(2'')*, *aadD*, *hlyB*, *hlyGAB*, *hlyGCB*, *aur* y *tet(L)*. Ambas cepas carecía del sistema IEC, y de acuerdo con los 3 polimorfismos canónicos de nucleótido único (PCNU) descritos por Stegger, estas cepas pertenecían al clado- AG. La alineación del genoma central mostró una similitud del 99,6% y 2615 genes en común. Se detectaron 162 PCNU y 20 inserciones-delecciones de secuencias de ADN codificante (45 no-sinónimos); destacando las diferencias encontradas en factores de adhesión (*clfB* y *sdrD*). Cuarenta genes fueron únicos, 11 en SASM y 29 en SARM (18 localizados en SCC*mecV*). La cepa SASM albergaba un gen *sdrE*, no presente en SARM, y cuyo producto se une al factor H del regulador del complemento. Ambas poseen dos fagos intactos que muestran similitud con StauST398-3 y phiSA2, dos plásmidos (*rep* genes *rep22* y *rep21*) y dos islas patógenas (vSA α y vSay). Genomas registrados (ERS659527 y ERS659528).

Conclusiones. Las cepas SASM/SARM-ST398 del paciente con contacto profesional con cerdos corresponden al clado-AG y podrían representar diferentes etapas evolutivas de esta línea situada en la interface animal-hombre; la cepa SASM parece ser el resultado de la pérdida del gen *mecA* de la línea ancestral AG-SARM.



Design of thermosensitive promoters for the expression of toxic proteins at high temperatures

C. Verdú, J. Berenguer, M. Mencía.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Universidad Autónoma de Madrid-
CSIC). Madrid

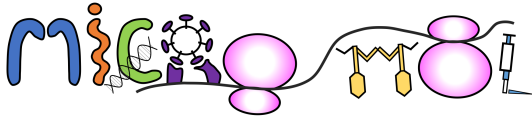
Extremophiles are represented throughout the three domains of life described by Carl Woese. Of all extreme life styles, thermophiles have fascinated the scientific community since its discovery, not only for unravel the mechanism used for survival at high temperature, but also as a source of thermostable enzymes with great interest in biotechnology.

However, the diversity of thermophilic enzymes does not satisfy all needs. For this reason, new strategies based on artificial evolution have been developed to obtain or improve certain characteristics. The RNA polymerase of bacteriophage T7 (T7 RNAP) has been evolved to increase its thermostability, though only a moderate increase in its maximum temperature of activity has been achieved.

In order to obtain new thermostable variants, in this work we propose the design of a live expression system for the selection by antibiotic and temperature of thermostable variants of the T7 RNAP (TT7), using *Thermus thermophilus* as selection host. However, the use of promoters with enough activity in *Thermus* has the limitation of transcriptional escape and toxicity in *E. coli*, and likely in the thermophile, with the subsequent toxic effect.

To solve this, different expression vectors with the *superfolder* GFP protein (sGFP) were constructed and assayed to allow us to obtain information on i) the most appropriate codon usage, ii) the effect of the relative position of the genes within a messenger and iii) the regulation of expression through the use of a collection of RNA thermosensors.

This work has been funded by Spanish national project BIO2016-77031-R. CV is the holder of a FPI fellowship from the MINECO



Genotipado y caracterización molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemos

Olga Zafra, Manuel Palacios, Alba Blesa, Estela Pérez-Lago, Cruz Santos,

Instituto de Investigaciones Biosanitarias, Facultad de Ciencias Experimentales,
Universidad Francisco de Vitoria, Ctra. M-515, Pozuelo-Majadahonda, km 1,800
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)

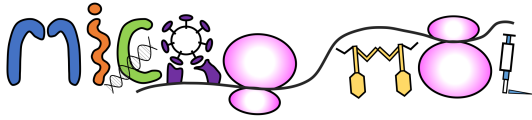
En la última década se ha incrementado el número de infecciones producidas por bacterias multirresistentes a antibióticos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Muchas de estas infecciones se producen por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Para su tratamiento, la opción favorita es el uso de carbapenemos pero desde hace unos años se están diseminando cepas con resistencia a los mismos, lo que supone un problema clínico importante.

En la actualidad se sabe que el problema global de resistencia a antibióticos no depende únicamente de la presencia de genes de resistencia sino que hay otros factores directamente implicados como son la presencia de bombas de eflujo, la capacidad de formación de biopelículas, etc., ...).

Este estudio, financiado por la Universidad Francisco de Vitoria, persigue hacer una caracterización molecular y fenotípica de bacterias resistentes a antibióticos procedentes de muestras hospitalarias de la Comunidad de Madrid (Hospital de Móstoles), con el fin de asociar características genéticas y/o fenotípicas específicas con datos epidemiológicos.

Los estudios se han iniciado con once aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemos. La amplificación mediante PCR de genes concretos de resistencia nos confirma que en algunos casos el análisis fenotípico de resistencia a antibióticos realizado en el Hospital (VITEK) es de ayuda para el tratamiento pero no aporta información fidedigna del fondo genético. También se ha analizado la capacidad de crecimiento de las cepas en diferentes medios de cultivo, la formación de biopelícula, su resistencia a luz UV, capacidad de swarming,... factores ecológicos que tienen importancia a la hora de evaluar su riesgo clínico. Además, se ha realizado un genotipado molecular mediante AFLP con el fin de analizar la filogenia entre los diferentes aislados. Se pretende relacionar las características fenotípicas con marcadores moleculares específicos (AFLP) con el fin de poder hacer una rápida y eficiente identificación de cepas y de este modo facilitar la evaluación del riesgo y la adecuación de los tratamientos ante las distintas infecciones.

El análisis quiere ampliar a cepas de *E.coli* aisladas de hemocultivo y resistentes a carbapenemos, así como con cepas clínicas de otras especies.



The fast-growing *Brucella suis* 513 depends on the gluconeogenic synthesis of phosphoenolpyruvate but not on the catabolism of 6C and 5C substrates for virulence

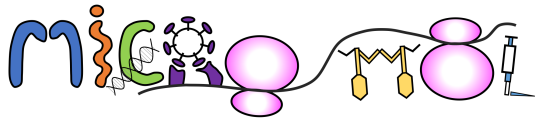
Amaia Zúñiga-Ripa¹, Leticia Lázaro-Antón¹, Thibault Barbier², M^a Jesús de Miguel³, Raquel Conde-Álvarez¹, Pilar M. Muñoz³, Jean J. Letesson², Maite Iriarte¹ and Ignacio Moriyón¹

¹ Departamento de Microbiología e Instituto de Salud Tropical, Universidad de Navarra, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona, Spain. ² Research Unit in Biology of Microorganisms Biology, UNAmur, Namur, Belgium. ³ Unidad de Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)

Pathogenesis is clearly not only a matter of virulence determinants, metabolism allows virulence too. In order to multiply, any pathogen has to feed and adapt its metabolism to the conditions encountered in the host, a simple concept already considered by Louis Pasteur in the 19th century. Although as an intracellular pathogen *Brucella* spp. must adapt their metabolism to the nutrients available in the niche, this aspect of *Brucella* virulence is imperfectly known. In addition, most work has been conducted with “classical” *Brucella* spp. (*B. abortus* and *B. melitensis*) that, like most brucellae, grow slowly. Since the brucellae are highly clonal, it is essential to bear in mind that research focused only on these species could conduct to a misunderstanding on the metabolism of the genus.

In order to have a global view of the metabolism of *Brucella*, we started working with *B. suis* 513, a strain described in the 80's as displaying “luxurious” growth and broad amino acid oxidative abilities. In this work, we confirm that *B. suis* 513 shows growth characteristics departing from those of the classical *Brucella* spp. and uses a larger number of C substrates with faster growth rates *in vitro*. Concerning the characteristics of the central C metabolism, we show that disruption of the hypothetical isocitrate lyase has no effect suggesting that the glyoxylate cycle is not essential. In addition, *B. suis* 513 depends on phosphoenolpyruvate synthesis for virulence but not on the classical gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatases Fbp-GlpX. Although these results suggest that *B. suis* 513 grows intracellularly using gluconeogenic substrates, the role of the catabolism of 6C and 5C substrates remained unknown.

Therefore, to further study whether during the infectious process *B. suis* 513 virulence may require the use of 6C and/or 5C sugars available in the replicative niche, we constructed a mutant unable to grow on these substrates by blocking the synthesis of pyruvate. Interestingly, although the simultaneous deletion of *pyk*, *ppdK* and *edd* inhibits growth on 6C and 5C sugars, this triple mutant is not attenuated in the mouse model, confirming that the use of these substrates is dispensable for *B. suis* 513 multiplication *in vivo*.



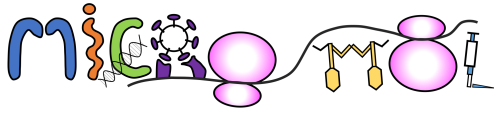
XII Reunión del Grupo Microbiología Molecular
Zaragoza, 5-7 de Septiembre de 2018

Colaboraciones:



**Departamento de
Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública**
Universidad Zaragoza





**Grupo Especializado de
Microbiología Molecular**
<http://micromolecular.es>



**Sociedad Española de
Microbiología**
<https://www.semicrobiologia.org>

