



Sociedad  
Española de  
Microbiología



UCA  
Universidad  
de Cádiz

# VII Reunión de Microbiología Molecular



16 - 18 de Septiembre de 2008  
Facultades de Ciencias  
Universidad de Cádiz  
Puerto Real. Cádiz

## **VII Reunión de Microbiología Molecular**

**16 - 18 de Septiembre de 2008**

**Universidad de Cádiz / Sociedad Española de  
Microbiología**

**Campus Universitario de Puerto Real (Cádiz)**

**Encuadernaciones Martínez**

**Puerto Real (Cádiz), Septiembre 2008**

**Foto de Portada: Castillo de San Sebastián. Cádiz (C. Garrido)**

# VII Reunión de Microbiología Molecular

16 - 18 de Septiembre de 2008. Puerto Real (Cádiz)

COLABORAN:



## **BIENVENIDA AL CONGRESO**

Estimados congresistas, queridos amigos y amigas:

Desde estas líneas os doy mi más calurosa bienvenida a la **VII Reunión de Microbiología Molecular** de la SEM que se celebrará en el Campus de Puerto Real de la Universidad de Cádiz del 16 al 18 de Septiembre de 2008.

Tengo la seguridad de que serán unos días de reencuentro entre viejos amigos y de encuentro con otros nuevos, para compartir experiencias, resultados, inquietudes y por qué no, de disfrutar de la rica y variada gastronomía gaditana así como de sus bien afamados vinos de Jerez.

Os doy la bienvenida a la Universidad de Cádiz, Universidad joven pero dinámica y llena de retos e ilusiones para el futuro, la cual, sin duda alguna, se enriquece estos días del Congreso con vuestra experiencia y aportaciones en el apasionado mundo de la Microbiología Molecular. Deseo que vuestra estancia en esta ciudad trimilenaria, Cádiz, “Tacita de Plata”, que se prepara para celebrar en el año 2012 el bicentenario de la primera Constitución Española, sea muy agradable y fructífera.

Que disfrutéis de este bello rincón andaluz lleno de historia, de luz y de mar y que vuestra estancia entre nosotros sea tal que os deje un recuerdo imborrable de vuestra VII Reunión. Deseando veros de nuevo por aquí, recibid mi cordial saludo, en nombre de ésta, vuestra Universidad.

**Prof. Dr. Diego Sales Márquez**  
**Rector de la Universidad de Cádiz**

## **Comité Organizador**

**Jesús Manuel Cantoral Fernández**

Universidad de Cádiz

**Josep Casadesús Pursals**

Universidad de Sevilla

**Francisco Javier Fernández Acero**

Universidad de Cádiz

**Rosario Solera del Río**

Universidad de Cádiz

## **Colaboradores**

**María Carbú Espinosa de los Monteros**

Universidad de Cádiz

**Carlos Garrido Crespo**

Universidad de Cádiz

**Lourdes Jiménez Taracido**

Universidad de Cádiz

**Blanca Montero Córdón**

Universidad de Cádiz

**Víctor Riau Arenas**

Universidad de Cádiz

**Manuel Antonio Rodríguez Iglesias**

Universidad de Cádiz

**María Esther Rodríguez Jiménez**

Universidad de Cádiz

**Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera**

Universidad de Cádiz

**Soraya Zahedi Díaz**

Universidad de Cádiz

## **Comité Científico**

**Francisco García del Portillo**

CNB, CSIC, Cantoblanco

**Juan M. García Lobo**

Universidad de Cantabria

**Francisco Ramos-Morales**

Universidad de Sevilla

**Antonio Ventosa Uceró**

Universidad de Sevilla

## ÍNDICE

- 1. PROGRAMA.....17
- 2. COMUNICACIONES ORALES.....25

**Conferencia Plenaria I:** Francisco J. Murillo, Universidad de Murcia  
**Un poco de luz sobre regulación génica global y específica en la bacteria *Myxococcus xanthus***

Sesión I: **Genómica y proteómica:**

O.I.1. D. Viana, L. Selva, J. M. Corpa, I. Lasa, J. R. Penadés

**Secuenciación y caracterización de una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de conejo**

O.I.2. F. J. Fernández-Acero, M. Carbú, C. Garrido, I. Vallejo, J. M. Cantoral  
**La proteómica como herramienta molecular para el estudio del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea***

O.I.3. G. Eydallin, M. Sesma, G. Almagro, M. Montero, A. M. Viale, F. J. Muñoz, E. Baroja-Fernández, J. Pozueta-Romero

**Genome-wide screening of over-expressing genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12**

O.I.4. Begoña García, Cristina Solano, Cristina Latasa, Alejandro Toledo-Arana, Violeta Zorraquino, Jaione Valle, Joan Casals, Enrique Pedroso, Iñigo Lasa. **Análisis transcriptómico de la ruta de señalización del mensajero secundario c-di-GMP**

O.I.5. Ana María Blanco

**SOLiD Platform: next-generation technology for genome analysis**

Sesión II: **Replicación, recombinación y reparación del DNA**

O.II.1. E. Botello, R. González-Soltero, B. Mendoza-Chamizo, A. Jiménez-Sánchez

**Inducción térmica de la replicación en plásmidos de *Escherichia coli*: cuantificación por fluorimetría de GFP**

O.II.2. S. Ayora, C. Cañas, B. Carrasco, J. C. Alonso

**Papel de la resolvasa RecU en etapas tempranas de la recombinación homóloga**

O.II.3. de la Viuda, B. Michel, J. Blázquez, E. Viguera

**Papel de las DNA polimerasas de translesión de *Escherichia coli* en la inestabilidad de microsatélites**

O.II.4. M. C. Turrientes, F. Baquero, A. Ripoll, M. Rodríguez-Dominguez, M. Rodríguez-Alcayna, M. R. Baquero, J. L. Martínez, R. Cantón, J. C. Galán

**Evolución y diversificación *in vitro* de una población de *Escherichia coli* mutadora, hacia menores valores de frecuencia de mutación**

O.II.5. S. Campoy, I. Erill, M. Llagostera, P. Cortés, J. Barbé

**Hacia un nuevo paradigma del sistema de reparación SOS**

O.II.6. María Moreno-del Álamo, Alicia Sánchez-Gorostiaga, Ana Serrano, Alicia Prieto y Rafael Giraldo

**Chaperonas Hsp70 en el ensamblaje de ORC, el complejo iniciador de la replicación del ADN en *Saccharomyces cerevisiae***

Sesión III: **Biotecnología**

O.III.1. A. Blanco Toribio, L. A. Fernández-Herrero

**Potencial del uso de *E. coli* para la inyección de anticuerpos recombinantes a células de mamífero**

O.III.2. M. L. Moreno, E. Mellado, M. T. García, A. Ventosa

**Caracterización de la lipasa LipL producida por la bacteria halófila extrema *Salicola* sp. IC10**

O.III.3. J. Rodríguez-Moya, M. Argandoña, C. Vargas, J. J. Nieto

**Caracterización de sistemas implicados en el transporte de ectoínas en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens***

O.III.4. M. Fiuza, A. F. Villadangos, M. Letek, E. Ordóñez, V. Mollek, L. M. Mateos, J. A. Gil

**Caracterización de las cuatro serin-treonin kinasas de *Corynebacterium glutamicu***

O.III.5. L. J. Taracido, R. Solera, J. M. González, F. J. Casanueva, E. Nebot, C. Pendón

**Análisis molecular del efecto de biocidas sobre la formación y el desarrollo del biofouling**

O.III.6. G. Galán Sánchez, M. Rodríguez Iglesias

**Detección de papilomavirus humano por sondas "invader" en muestras previamente analizadas por hibridación y que resultaron negativas o muy cercanas a la zona umbral de positividad**

O.III.7. M. Martínez Martínez, P. Marques Alves, M. Ortiz Rivera, L. Benítez Rico

**Optimización de la expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto y purificación de VLPs**

O.III.8. G. Piñar, C. Jiménez-López, K. Sterflinger, J. Ettenauer, J. D. Bueno, F. Jroundi, A. Fernández-Vivas, M. T. González-Muñoz

**Consolidación de piedra ornamental mediante aplicación de un cultivo de *Myxococcus xanthus*: estudio de la comunidad bacteriana**

**Conferencia plenaria II:**

Juan González, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Sevilla  
**Métodos moleculares para el estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales**

#### Sesión IV: Regulación génica

O.IV.1. F. García-Heras, S. Padmanabhan, F. J. Murillo, M. Elías-Arnanz

##### **Un singular complejo regulador de la transcripción en la bacteria *Myxococcus xanthus***

O.IV.2. A. Valderrama, G. Durante-Rodríguez, J. L. García, M. Carmona, E. Díaz

##### **Estudios moleculares de la regulación cruzada de las rutas de degradación aeróbica y anaeróbica de benzoato en *Azoarcus sp.* CIB**

O.IV.3. J. Fernández, J. D. Cabrer, A. Juárez, C. Balsalobre

##### **Implicación del (p)ppGpp en la uropatogenia de *Escherichia coli***

O.IV.4. O. Porrúa, E. Santero, V. Shingler, F. Govantes

##### **Represión de un promotor dependiente de $\sigma^{54}$ : AtzR lo hace a su manera**

O.IV.5. A. Benítez-Páez, M. E. Armengod

##### **Análisis de expresión del operón *gid* implicado en la modificación de RNA en *Escherichia coli***

O.IV.6. I. Grinberg, B. M. Sjöberg, I. Borovok, Y. Ahanowitz, G. Cohen, E. Torrents

##### **NrdR, un nuevo regulador transcripcional para los genes que codifican para las ribonucleotidil reductasas**

O.IV.7. C. Palomino, S. Gullón, D. Rozas, R. P. Mellado

##### **Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*: La imprescindible integración de mecanismos complejos para la obtención de un resultado aparentemente sencillo**

O.IV. 8. E. J. Bedmar, E. Robles, M. J. Delgado

##### **Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*: genes estructurales y regulación**

#### Sesión V: Patogénesis molecular I

O.V.1. M. B. Sánchez, A. Hernández, J. M. Rodríguez-Martínez, L. Martínez-Martínez, J. L. Martínez

##### **Identificación de un nuevo gen *qnr* cromosómico en *Stenotrophomonas maltophilia*, *Smqnr*, implicado en resistencia a quinolonas**

O.V.2. C. B. García-Calderón, J. Casadesús, F. Ramos-Morales

##### **Caracterización del gen *igaA* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

O.V.3. F. García-Quintanilla, M. A. de Pedro, F. García-del Portillo

##### **Caracterización funcional de la proteína represora del sistema RcsCDB**

O.V.4. P. Fernández-Piñar, A. Alemán, R. Rotger, M. Molina, H. Martín

##### ***Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para la caracterización de la proteína efectora SteC de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium**

O.V.5. J. Gonzalo-Asensio, C. Y. Soto, A. Arbués, M. C. Menéndez, M. J.



García, C. Martín

**El sistema de dos componentes PhoPR de *Mycobacterium tuberculosis* está positivamente autorregulado en la cepa virulenta H37Rv**

O.V.6. H. Alonso, C. Martín, S. Samper, I. Otal

**Implicación de la secuencia de inserción IS6110 en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis***

O.V.7. V. D'Orazio, C. Sánchez-Monforte, F. García-del Portillo, M. G. Pucciarelli

**Caracterización funcional de Lmo1413, una proteína LPXTG de superficie de *L. monocytogenes***

O.V.8. N. Merino, G. Gallo, M. Vergara, J. Valle, C. Solano, C. Latasa, A. Toledo-Arana, J. R. Penadés, I. Lasa

**Estudio del transcriptoma de las proteínas GGDEF de *Staphylococcus aureus***

#### Sesión VI: **Patogénesis molecular II**

O.VI.1. J. A. Bengoechea

**Subversión del sistema inmune innato por *Klebsiella pneumoniae***

O.VI.2. J. Garmendia

**Estudio de los mecanismos de virulencia del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipable: persistiendo en un ambiente estéril?**

O.VI.3. A. Zúñiga-Ripa, O. Iglesias-García, I. Moriyón, M. Iriarte

**Virulencia de *Brucella*: genes potencialmente implicados en el control del tráfico intracelular**

O.VI.4. F. J. Sangari, A. M. Cayón, A. Seoane, J. M. García-Lobo

**Identificación de un transportador funcional de urea y de un sistema de transporte de níquel en la región ureasa 2 de *Brucella***

O.VI.5. J. A. Escudero, A. San Millán, B. Gutiérrez, L. Hidalgo, A. G. de la Campa, B. González-Zorn

**SmrA, una nueva bomba de resistencia a fluoroquinolonas en *Streptococcus suis***

O.VI.6. Jesús Blázquez, Elena López, Alejandro Couce

**Drogas, sexo y R&R: Los antibióticos como promotores de variación genética en bacterias**

#### **Conferencia plenaria III:**

Ricardo Amils, Universidad Autónoma, Madrid

**Geomicrobiología del subsuelo, vida en el lado oscuro**

- 3. COMUNICACIONES COMO PÓSTER.....73

1. Nekane Merino, Alejandro Toledo-Arana, Marta Vergara, Jaione Valle, Cristina Solano, Enrique Calvo, Juan Antonio Lopez, José R. Penadés, Iñigo Lasa. **Proteína A promueve la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus***
2. Catalina M. Llompарт, Camino Pérez-Gutiérrez, José A. Bengoechea. **Análisis molecular del regulón compuesto por la cadena O, H-NS, invasin y *flhDC* en *Yersinia enterocolitica* O:8**
3. Marcello Jakomin, Josep Casadesús. **Regulation of the *std* fimbrial operon of *Salmonella enterica* by DNA adenine methylation, SeqA and YifA**
4. Alicia Fajardo, Nadia Martínez-Martín, José L. Martínez. **Análisis de una nueva betalactamasa de *P. aeruginosa* implicada en la virulencia de esta bacteria**
5. Felipe Cava, Zahra Chalafi, Laura Alvarez, Carlos Bricio y José Berenguer. **La desnitrificación en *Thermus thermophilus*: El doble papel de la nitrato reductasa**
6. Catalina March, Enrique Llobet, Paloma Giménez, José A. Bengoechea. **La proteína OmpA de *Klebsiella pneumoniae* media resistencia frente a péptidos antimicrobianos y modula la respuesta inflamatoria**
7. Verónica Regueiro, Christian G. Frank, David Moranta, Junkal Garmendia, José Antonio Bengoechea. **Modulation of inflammatory host cell response by *Klebsiella pneumoniae***
8. Ignacio Cota, Josep Casadesús. **STM2208/2209: un nuevo locus de *Salmonella enterica* regulado por metilación Dam**
9. P. Cárdenas, B. Carrasco, J. C. Alonso. **La enzima polinucleótido fosforilasa de *Bacillus subtilis* es un componente de la maquinaria de recombinación homóloga**
10. Javier Fernando Mariscotti, Francisco García-del Portillo, María Graciela Pucciarelli. **Caracterización en *Listeria monocytogenes* del motivo de anclaje a peptidoglicano reconocido por la sortasa SrtB en las proteínas de superficie Lmo2185 y Lmo2186**
11. Manuel Rodríguez-Alcayna, María Rosario Baquero, Rafael Cantón, Helène Marchandin, Fernando Baquero, Juan-Carlos Galán. **Caracterización del entorno genético del determinante de**

**resistencia a tetraciclina *tet(32)*: similitudes con *tet(W)* e implicaciones evolutivas**

12. Meritxell García-Quintanilla, Kai Papenfort, Francisco Ramos-Morales, Jörg Vogel, Josep Casadesús. **Regulación de genes cromosómicos por el RNA plasmídico FinP**
13. J. Bernal-Bayard, F. Ramos-Morales. **Análisis funcional de la interacción de la proteína SlrP de *Salmonella enterica* con proteínas eucarióticas**
14. Aida Ripoll, M. Rodríguez-Domínguez, A. Novais, T. M. Coque, R. Cantón, F. Baquero, M. C. Turrientes, J. C. Galán. **Diferencias en el coste relativo entre plásmidos relacionados con la diseminación mundial de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15**
15. A. Bosh Martínez, M. Martínez Martínez, T. Soto Esteras, L. Benítez Rico. **Eficiente producción y capacidad de ensamblaje de la proteína L1 deletada de VPH16**
16. D. Pérez, S. Martín, E. Mellado y A. Ventosa. **Clonación de una lipasa producida por la bacteria halófila moderada *Marinobacter lipolyticus***
17. Esther Fernández-González, Hector D. de Paz, Félix J. Sangari, Matxalen Llosa. **Análisis de las interacciones funcionales entre los componentes de Sistemas de Secreción Tipo IV implicados en conjugación y virulencia**
18. I. Mir, R. Martínez, J. Blanco, I. Lasa, J. R. Penadés. **Caracterización de los genes encargados de la escisión-circularización-integración de SaPIs durante la transferencia mediada por fagos**
19. Gema Val, Silvia Marín, Nuria Antón, Rafael P. Mellado. **Paisaje genómico de comunidades rizobacterianas: Monitorización de bacterias relacionadas con *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* en la rizosfera de maíz transgénico**
20. Pau Morey, Victoria Cano, J.Pau Martí, Silvia Mauro, José Antonio Bengoechea, Junkal Garmendia. **Dissección molecular y celular de la interacción del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* No Tipable (HiNT) con el epitelio respiratorio humano**
21. L. Pedró, R. C. Baños, J. García, M. Pons, A. Juárez. **Relación entre la subunidad  $\alpha$  de la DNA polimerasa III y proteínas del tipo H-NS**

22. A. Herrero-Gil, A. Bartolomé, S. Martínez Pulgarín, J. A. Orden, R. de la Fuente, G. Dominguez-Bernal. **Bactofección mediante *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis**
23. Roberto Balbontín, Nara Figueroa-Bossi, Josep Casadesús, Lionello Bossi. **Análisis funcional de RybB, un ARN pequeño de *Salmonella enterica* dependiente de  $\sigma^E$ , mediante técnicas genéticas**
24. Silvia Prado, Magda Villarroya, Elvira Cebolla, M<sup>a</sup> Eugenia Armengod. **Hidrólisis de GTP y función modificadora de tRNAs de la proteína MnME de *Escherichia coli***
25. Sonia Gullón, Carmen Palomino, Rafael P. Mellado. **Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*: EPTS, estrés celular por deficiencia en la translocación de proteínas extracelulares**
26. P. Gavín, M.J. Iglesias, L. Herrera, M.S. Jimenez, C. Lafoz, A. Cebollada, M.A. Lezcano, M.J. Revillo, C. Martín, S. Samper. **Tuberculosis multirresistente en España: análisis filogenético de los casos importados**
27. Álvaro San Millán, José Antonio Escudero, Laura Hidalgo, Belén Gutiérrez, Bruno González-Zorn. **La multirresistencia en *P. multocida* está mediada por la cohabitación de pequeños replicones**
28. Ana I. Platero, Eduardo Santero, Fernando Govantes. **El regulador tipo LysR AtzR impide la activación del promotor dependiente de  $\square^{54}$  porf98 de *Pseudomonas* sp. ADP**
29. Belén Gutiérrez, Silvia Herrera-Leon, José Antonio Escudero, Laura Hidalgo, Rubén González-Sanz, Margarita Arroyo, Álvaro San Millán, M. Aurora Echeita, Bruno González-Zorn. **qnrB2 en España**
30. A. Hernández, P. Sánchez. F. Rojo, J. L. Martínez. **Mecanismo de represión del sistema de bombeo múltiple de drogas SmeDEF de *Stenotrophomonas maltophilia* por el represor transcripcional SmeT**
31. J. Blanco, E. Maiques, C. Úbeda, I. Lasa, J. R. Penadés. **Las islas de patogenicidad son las responsables de la adaptación al hospedador de *Staphylococcus aureus***

32. L. Selva, D. Viana, J. M. Corpa, I. Lasa, J. R. Penadés. **Eliminación de competidores por inducción de fagos residentes: el ejemplo de la lucha entre *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus***
33. M. D. Ferrer, N. Quiles, M. A. Tormo, I. Lasa, J. R. Penadés. **RinA controla el empaquetamiento y la transferencia de fagos e islas de patogenicidad en *Staphylococcus aureus***
34. R. Martínez, I. Mir, M. A. Tormo, I. Lasa, J. R. Penadés. **En las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*: ¿Quién controla al controlador?**
35. M. Martí, M. P. Trotonda, M. A. Tormo, A. Toledo-Arana, I. Lasa, J. R. Penadés.  **$\sigma^B$  controla la formación de biofilm dependiente de Bap en *Staphylococcus aureus***
36. N. Quiles, M. D. Ferrer, M. A. Tormo, I. Lasa, J. R. Penadés. **Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* se empaquetan y transfieren utilizando proteínas codificadas por el fago**
37. M. Reina Bueno, M. Argandoña, J. J. Nieto, C. Vargas. **Caracterización molecular de los sistemas implicados en la producción de hidroxiectoína en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens***
38. M. A. Tormo, V. Donat, M. D. Ferrer, N. Quiles, I. Mir, M. Martí, R. Martínez, J. Blanco, I. Lasa, J. R. Penadés. **Presencia de elementos similares a las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* en bacterias Gram-positivas**
39. Y. Gil-Ramírez, L. Palacios-Chaves, R. Conde-Alvarez, I. Moriyón, M. Iriarte. **El gen BAB1\_0351 de *Brucella abortus* 2308 codifica una glicosiltransferasa involucrada en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido**
40. Blanca Montero, José L. García, Diego Sales, Rosario Solera. **Problemática de la aplicación de técnicas de cuantificación microbiana al seguimiento de un reactor anaerobio termofílico seco**
41. S. B. Hernández-Piñero, I. Cota, J. López-Garrido, A. I. Prieto, F. Ramos-Morales, J. Casadesús. **Supresión de la sensibilidad a bilis en mutantes Dam<sup>-</sup> de *Salmonella enterica*: activación de bombas de vertido por carencia de AsmA**

42. David Moranta, Junkal Garmendia, José A. Bengoechea. ***Klebsiella pneumoniae* no estimula la expresión de péptidos antimicrobianos en células epiteliales pulmonares**
43. Cristina Cañas, Begoña Carrasco, Esther García Tirado, Silvia Ayora, Juan C. Alonso. **Mapeo de residuos esenciales para la actividad de corte de la resolvasa RecU de *Bacillus subtilis***
44. Esther García, Carmen Palomino, Belén Illana, Rafael P. Mellado. **Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*: Especificidad y ambigüedad de las rutas de secreción**
45. J. M. Sánchez-Calvo, M. García-Castillo, M. Rodríguez-Baños, F. Baquero, C. Vázquez. R. Cantón, R. del Campo. **Herramientas moleculares en el estudio de la microbiota intestinal**
46. J. A. Christie-Oleza, B. Nogales, J. Lalucat, R. Bosch. **Implicaciones genómicas de la movilización de ISPst9 en *Pseudomonas stutzeri* AN10**
47. Dorota Korsak, Gabriel O. Gutkind, Juan A. Ayala, **Identification of the whole set of PBPs of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* by binding of fluorescent antibiotics**
48. Enrique Llobet Brossa, Paloma Giménez, José A. Bengoechea. ***Klebsiella pneumoniae* coordina la expresión del polisacárido capsular y las modificaciones en el lípido A como respuesta frente a los péptidos antimicrobianos**
49. J. Abellón, M. Abellán, F. J. Murillo, M. Fontes, M. Elías-Arnanz. **Identificación de factores sigma-ECF en *Myxococcus xanthus* y estudio de su dependencia del complejo regulador CarD-CarG**
50. Cristina Latasa, Begoña García, Cristina Solano, Jaione Valle, Josep Casadesus, José R. Penadés, Iñigo Lasa. **La proteína Ytl2 inhibe la formación de biofilm y activa la respuesta SOS en ausencia de ParAB en *Salmonella* Enteritidis**
51. M. Mar Reinés, Camino Pérez-Gutiérrez, Catalina M. Llompарт, José A. Bengoechea. **Análisis molecular de los mecanismos de resistencia de *Yersinia enterocolitica* frente los péptidos antimicrobianos**
52. J. Pau Martí, Pau Morey, Verónica Regueiro, Jose A. Bengoechea, Junkal Garmendia. **Análisis de la dinámica de interacción del**

**patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipable con macrófagos alveolares**

53. F. J. Roig, C. Amaro. **Mutantes espontáneos resistentes a quinolonas en *Vibrio vulnificus***
54. A. Seoane, F. Sangari, J. M. García Lobo. **Análisis de la diversidad de cassettes génicos en el superintegrón de *Listonella anguillarum***
55. V. Donat, M. A. Tormo, M. D. Ferrer, N. Quiles, I. Mir, M. Martí, R. Martínez, J. Blanco, I. Lasa, J. R. Penadés. **Caracterización genética del fago  $\phi 11$  y papel en la patogenicidad de *Staphylococcus aureus***
56. M. E. Rodríguez, L. Rebordinos, M. Molina, J.M. Cantoral. **Las técnicas moleculares en Enología. Aplicación de PFGE y PFLP-ADNmt para la caracterización genética, selección y control de cepas de levaduras vinicas en la elaboración de distintos tipos de vinos**
57. Laura Hidalgo, Álvaro San Millán, Belén Gutiérrez, José Antonio Escudero, Bruno González-Zorn. **Identificación y caracterización de un nuevo determinante de resistencia a aminoglucósidos, *aac(3)-IIId*, que confiere alto nivel de resistencia a gentamicina**
58. L. Palacios-Chaves, R. Conde-Alvarez, Y. Gil-Ramírez, A. Zuñiga-Ripa, I. Moriyón, M. Iriarte. **Virulencia y transporte de colina en *Brucella abortus* 2308**
59. C. Freyre, G. Jiménez, F. Galán, M. A. Rodríguez-Iglesias. **Análisis de los cambios mutacionales del gen de la girasa de *Escherichia coli* y la relación con su grupo filogenético**
60. N. Erquínigo, M. J. Castro, L. García-Agudo, C. Román, I. Jesús de la Calle, M. A. Rodríguez-Iglesias. **Detección molecular de *Gardnerella vaginalis* en mujeres con descarga vaginal anormal y su coinfección con *Candida***
61. M. Roman-Enri, I. Jesús de la Calle, M. A. Rodríguez-Iglesias. **Identificación molecular de *Streptococcus agalactiae* mediante PCR en tiempo real y comparación con cultivo convencional**
62. Verónica Regueiro, David Moranta, Junkal Garmendia, José A. Bengoechea. ***Klebsiella pneumoniae* incrementa los niveles de los receptores Toll-like 2 y 4 en las células epiteliales pulmonares humanas**

63. Isabel Rodríguez-Escudero, Cristina Molero, María Molina, Rafael Rotger, Víctor J. Cid. **Levaduras modelo y “arrays” de lisados en Microbiología Celular: Investigando la modulación de la señalización celular en la célula eucariótica por el factor de virulencia de *Salmonella* SigD**
64. Violeta Zorraquino, Begoña García, Cristina Latasa, Iñigo Lasa, Cristina Solano. **Estudio del papel de las proteínas GGDEF en la virulencia de *Salmonella***
65. J. López-Garrido, N. Cheng, A. I. Prieto, F. García-Quintanilla, F. García del Portillo, J. Casadesús. **Implicación de la proteína DamX en la resistencia de *Salmonella enterica* a la bilis**
66. C. Garrido, M. Carbú, F.J. Fernández-Acero, I. Vallejo y J. M. Cantoral. **Estudio de la relación filogenética existente entre cepas de *Colletotrichum acutatum* causantes de la antracnosis en fresa**
67. A. Lucía, C. Martín, J. A. Aínsa. **Aproximaciones genéticas para el descubrimiento de nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos en micobacterias**
68. Daniel Rozas, Sonia Gullón y Rafael P. Mellado. **Secreción de proteínas en *Streptomyces coelicolor*: Regulación pleiotrópica del metabolismo secundario por el sistema de dos componentes *degS-degU*.**
69. Mario Rodríguez-Domínguez, Ripoll, A., Turrientes MC., Cantón, R., Baquero F y Galán JC. **Diseño de un control interno de amplificación para ensayos de RT-PCR**
70. P. Horcajo, G. Dominguez-Bernal, R. de la Fuente, S. Martinez Pulgarín, J. A. Ruiz Santa Quiteria, J. A. Orden. **Estudio de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* productoras de la lesión de adhesión y borrado aisladas de rumiantes**
71. A.Díaz, J.Marrero, R. Fernandez, G.Espinosa, J.M Gómez, O.Coto. **Caracterización molecular de enterobacterias resistentes a níquel y cobalto aislada del yacimiento laterítico de Moa, Cuba**
- 4. LISTADO DE PARTICIPANTES y e.mail.....148



# 1. PROGRAMA

## Martes 16 de Septiembre de 2008

**12.00 H.** Recogida de documentación (Hotel Puerto Bahía, Valdelagrana)

**14.00 H.** Comida: Restaurante San José, Valdelagrana (junto al Hotel)

**16.00 H.** Salida de autobuses desde el Hotel

### **16.15 ACTO DE INAUGURACIÓN**

**16.30 H.** Conferencia plenaria I:

**“Un poco de luz sobre regulación génica global y específica en la bacteria *Myxococcus xanthus*”**

Francisco J. Murillo, Universidad de Murcia

**17.30 H.** Colocación de paneles y café

### **18.00 H. SESIÓN I: GENÓMICA Y PROTEÓMICA**

Moderador: María Molina, Universidad Complutense, Madrid

**18:00 H.** D. Viana, L. Selva, J. M. Corpa, I. Lasa, J. R. Penadés  
**Secuenciación y caracterización de una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de conejo**

**18:15 H.** F. J. Fernández-Acero, M. Carbú, C. Garrido, I. Vallejo, J. M. Cantoral

**La proteómica como herramienta molecular para el estudio del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea***

**18:30 H.** G. Eydallin, M. Sesma, G. Almagro, M. Montero, A. M. Viale, F. J. Muñoz, E. Baroja-Fernández, J. Pozueta-Romero

**Genome-wide screening of over-expressing genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12**

**18.45 H.** Begoña García, Cristina Solano, Cristina Latasa, Alejandro Toledo-Arana, Violeta Zorraquino, Jaione Valle, Joan Casals, Enrique Pedroso, Iñigo Lasa.

**Análisis transcriptómico de la ruta de señalización del mensajero secundario c-di-GMP**

19:00 H. Ana María Blanco

**Presentación de la plataforma SOLID de Sistemas Genómicos**

19.30 H. Visita a las Bodegas González Byass (Jerez de la Frontera). Cena

## Miércoles 17 de Septiembre de 2008

08.45 H. Salida de autobuses desde el Hotel

### 09.00 H. **SESIÓN II: REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA**

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

09:00 H. E. Botello, R. González-Soltero, B. Mendoza-Chamizo, A. Jiménez-Sánchez

**Inducción térmica de la replicación en plásmidos de *Escherichia coli*: cuantificación por fluorimetría de GFP**

09:15 H. S. Ayora, C. Cañas, B. Carrasco, J. C. Alonso

**Papel de la resolvasa RecU en etapas tempranas de la recombinación homóloga**

09:30 H. I. de la Viuda, B. Michel, J. Blázquez, E. Viguera

**Papel de las DNA polimerasas de translesión de *Escherichia coli* en la inestabilidad de microsatélites**

09:45 H. M. C. Turrientes, F. Baquero, A. Ripoll, M. Rodríguez-Dominguez, M. Rodríguez-Alcayna, M. R. Baquero, J. L. Martínez, R. Cantón, J. C. Galán

**Evolución y diversificación in vitro de una población de *Escherichia coli* mutadora, hacia menores valores de frecuencia de mutación**

10.00 H. S. Campoy, I. Erill, M. Llagostera, P. Cortés, J. Barbé

**Hacia un nuevo paradigma del sistema de reparación SOS**

10.15 H. María Moreno-del Álamo, Alicia Sánchez-Gorostiaga, Ana Serrano, Alicia Prieto y Rafael Giraldo

**Chaperonas Hsp70 en el ensamblaje de ORC, el complejo iniciador de la replicación del ADN en *Saccharomyces cerevisiae***

10.30 – 11.00 H. Café

## 11.00 H. SESIÓN III: BIOTECNOLOGÍA

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

- 11:00 H. A. Blanco Toribio, L. A. Fernández-Herrero  
**Potencial del uso de *E. coli* para la inyección de anticuerpos recombinantes a células de mamífero**
- 11:15 H. M. L. Moreno, E. Mellado, M. T. García, A. Ventosa  
**Caracterización de la lipasa LipL producida por la bacteria halófila extrema *Salicola* sp. IC10**
- 11:30 H. J. Rodríguez-Moya, M. Argandoña, C. Vargas, J. J. Nieto  
**Caracterización de sistemas implicados en el transporte de ectoínas en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens***
- 11:45 H. M. Fiuza, A. F. Villadangos, M. Letek, E. Ordóñez, V. Mollek, L. M. Mateos, J. A. Gil  
**Caracterización de las cuatro serin-treonin kinasas de *Corynebacterium glutamicum***
- 12:00 H. L. J. Taracido, R. Solera, J. M. González, F. J. Casanueva, E. Nebot, C. Pendón  
**Análisis molecular del efecto de biocidas sobre la formación y el desarrollo del biofouling**
- 12:15 H. G. Galán Sánchez, M. Rodríguez Iglesias  
**Detección de papilomavirus humano por sondas "invader" en muestras previamente analizadas por hibridación y que resultaron negativas o muy cercanas a la zona umbral de positividad**
- 12:30 H. M. Martínez Martínez, P. Marques Alves, M. Ortiz Rivera, L. Benítez Rico  
**Optimización de la expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto y purificación de VLPs**
- 12:45 H. G. Piñar, C. Jiménez-López, K. Sterflinger, J. Ettenauer, J. D. Bueno, F. Jroundi, A. Fernández-Vivas, M. T. González-Muñoz  
**Consolidación de piedra ornamental mediante aplicación de un cultivo de *Myxococcus xanthus*: estudio de la comunidad bacteriana**

13.00 H. Conferencia plenaria II:

**“Métodos moleculares para el estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales”**

Juan González, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología,  
CSIC, Sevilla

14.00 – 16.00 H. Comida: Restaurante Campus

16.00 – 17.30 H. Sesión de paneles y café

## 17.30 H. **SESIÓN IV: REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

- 17.30 H. F. García-Heras, S. Padmanabhan, F. J. Murillo, M. Elías-Arnanz  
**Un singular complejo regulador de la transcripción en la bacteria *Myxococcus xanthus***
- 17.45 H. A. Valderrama, G. Durante-Rodríguez, J. L. García, M. Carmona, E. Díaz  
**Estudios moleculares de la regulación cruzada de las rutas de degradación aeróbica y anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB**
- 18.00 H. J. Fernández, J. D. Cabrer, A. Juárez, C. Balsalobre  
**Implicación del (p)ppGpp en la uropatogenia de *Escherichia coli***
- 18.15 H. O. Porrúa, E. Santero, V. Shingler, F. Govantes  
**Represión de un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ : AtzR lo hace a su manera**
- 18.30 H. A. Benítez-Páez, M. E. Armengod  
**Análisis de expresión del operón gid implicado en la modificación de RNA en *Escherichia coli***
- 18.45 H. I. Grinberg, B. M. Sjöberg, I. Borovok, Y. Ahanowitz, G. Cohen, E. Torrents  
**NrdR, un nuevo regulador transcripcional para los genes que codifican para las ribonucleotidil reductasas**
- 19.00 H. C. Palomino, S. Gullón, D. Rozas, R. P. Mellado  
**Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*: La imprescindible integración de mecanismos complejos para la obtención de un resultado aparentemente sencillo**
- 19.15 H. E. J. Bedmar, E. Robles, M. J. Delgado  
**Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*: genes estructurales y regulación**

19.30 H. Visita al centro histórico de la ciudad de Cádiz

21.00 H. Baluarte de los Mártires. Aperitivo servido por el Faro de Cádiz

Jueves 18 de Septiembre de 2008

08.45 H. Salida de autobuses desde el Hotel

### 09.00 H. **SESIÓN V: PATOGÉNESIS MOLECULAR I**

Moderador: Jose Antonio Bengoechea,  
Fundación Caubet-Cimera, Palma de Mallorca

- 09:00 H. M. B. Sánchez, A. Hernández, J. M. Rodríguez-Martínez,  
L. Martínez-Martínez, J. L. Martínez  
**Identificación de un nuevo gen qnr cromosómico en *Stenotrophomonas maltophilia*, Smqnr, implicado en resistencia a quinolonas**
- 09:15 H. C. B. García-Calderón, J. Casadesús, F. Ramos-Morales  
**Caracterización del gen igaA de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**
- 09:30 H. F. García-Quintanilla, M. A. de Pedro, F. García-del Portillo  
**Caracterización funcional de la proteína represora del sistema RcsCDB**
- 09:45 H. P. Fernández-Piñar, A. Alemán, R. Rotger, M. Molina, H. Martín  
**Saccharomyces cerevisiae como organismo modelo para la caracterización de la proteína efectora SteC de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium**
- 10.00 H. J. Gonzalo-Asensio, C. Y. Soto, A. Arbués, M. C. Menéndez, M. J. García, C. Martín  
**El sistema de dos componentes PhoPR de *Mycobacterium tuberculosis* está positivamente autorregulado en la cepa virulenta H37Rv**
- 10.15 H. H. Alonso, C. Martín, S. Samper, I. Otaí  
**Implicación de la secuencia de inserción IS6110 en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis***
- 10.30 H. V. D'Orazio, C. Sánchez-Monforte, F. García-del Portillo, M. G. Pucciarelli  
**Caracterización funcional de Lmo1413, una proteína LPXTG de superficie de *L. monocytogenes***

**10.45 H.** N. Merino, G. Gallo, M. Vergara, J. Valle, C. Solano, C. Latasa, A. Toledo-Arana, J. R. Penadés, I. Lasa  
**Estudio del transcriptoma de las proteínas GGDEF de *Staphylococcus aureus***

**11.00 H.** Café

### **11.30 H. SESIÓN VI: PATOGÉNESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**11.30 H.** J. A. Bengoechea

**Subversión del sistema inmune innato por *Klebsiella pneumoniae***

**11.45 H.** J. Garmendia

**Estudio de los mecanismos de virulencia del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipable: persistiendo en un ambiente estéril?**

**12.00 H.** A. Zúñiga-Ripa, O. Iglesias-García, I. Moriyón, M. Iriarte

**Virulencia de *Brucella*: genes potencialmente implicados en el control del tráfico intracelular**

**12.15 H.** F. J. Sangari, A. M. Cayón, A. Seoane, J. M. García-Lobo

**Identificación de un transportador funcional de urea y de un sistema de transporte de níquel en la región ureasa 2 de *Brucella***

**12.30 H.** J. A. Escudero, A. San Millán, B. Gutiérrez, L. Hidalgo, A. G. de la Campa, B. González-Zorn

**SmrA, una nueva bomba de resistencia a fluoroquinolonas en *Streptococcus suis***

**12.45 H.** Jesús Blázquez, Elena López, Alejandro Couce

**Drogas, sexo y R&R: Los antibióticos como promotores de variación genética en bacterias**

**13.00 H.** Conoce la UCA: Visita al planetario y a las instalaciones del CASEM (planta de cultivos marinos).

**14.00 – 16.00H.** Comida: Restaurante Campus

**16.00 – 17.30H.** Sesión de paneles y café

**17.30 – 18.30H.** Reunión del Grupo de Microbiología Molecular de la SEM.

18.30 H. Conferencia plenaria III:  
**“Geomicrobiología del subsuelo, vida en el lado oscuro”**  
Ricardo Amils, Universidad Autónoma, Madrid

19.30 H. **ACTO DE CLAUSURA**

21.30 H. **CENA DE CLAUSURA.** Restaurante San José (Valdelagrana)

---

- **Los Actos de Inauguración y Clausura se celebrarán en el Salón de Actos de la Facultad de Ciencias**

- **Las Sesiones serán en el Aula N° 11 del CASEM**



## **2. COMUNICACIONES ORALES**

Martes 16 de Septiembre de 2008  
16,30 H

Conferencia plenaria I:

## **“Un poco de luz sobre regulación génica global y específica en la bacteria *Myxococcus xanthus*”**

D. Francisco J. Murillo,  
Departamento de Genética y Microbiología  
Facultad de Biología - Universidad de Murcia.

Las myxobacterias son únicas entre las bacterias por su capacidad para formar, en condiciones de ayuno, cuerpos fructíferos multicelulares en los que las células vegetativas se diferencian en esporas. Tal proceso implica un programa de desarrollo guiado por varias señales difusibles o unidas a membrana y que provoca cambios progresivos en el patrón de movimientos de las células así como en la expresión de un buen número de genes. También característico de las myxobacterias es el gran tamaño del genoma de muchas de sus especies. La más estudiada, *Myxococcus xanthus*, posee un genoma de 9,14 Mb, bastante mayor que el de otras especies de su grupo ( $\delta$ -proteobacterias). El análisis del genoma sugiere la ocurrencia a lo largo de la evolución de numerosos casos de duplicación génica, en especial de genes posiblemente implicados en señalización celular o en la regulación integrada de la transcripción.

*M. xanthus* responde a la luz azul sintetizando carotenoides, fenómeno que nuestro grupo ha venido estudiando desde hace años. El análisis genético y molecular de la citada respuesta, además de permitir identificar los genes estructurales correspondientes, ha puesto de manifiesto una compleja red de interacciones reguladoras que sirve, en última instancia, para activar la transcripción de los genes carotenogénicos. Los elementos de esta red actúan bien como receptores/transductores de la señal luminosa o como activadores/represores transcripcionales. Algunos de ellos resultan ser específicos de la respuesta a la luz, pero otros son reguladores globales que controlan otros procesos celulares, incluido el desarrollo multicelular. Algunos de ellos (o sus dominios) son comunes a otras especies bacterianas, aunque no siempre de función conocida, pero otros son más propios de eucariotas que de procariotas.

Esencial en el mecanismo molecular de la respuesta a la luz es la actuación de una pareja “anti-sigma (CarR) - factor sigma ECF (CarQ)”. En la oscuridad, CarR secuestra en la membrana a CarQ, que es liberado en la luz mediante la acción de una proteína, CarF, que actúa como “anti-anti-sigma”. CarQ es responsable directo de su propia activación y de la de algunos genes carotenogénicos, pero requiere para ello de la acción de otras proteínas. Dos

de estas, denominadas CarD y CarG, forman un complejo regulador que resulta necesario además para la correcta expresión de un buen número de genes de *M. xanthus* (nuestros datos apuntan al 1% de todos ellos), incluidos varios de los genes específicos del proceso de desarrollo multicelular. CarD es el único factor conocido en procariotas con un dominio de unión al DNA (C-terminal) semejante al de las proteínas eucarióticas de la familia HMGA. CarG es una proteína de unión a zinc que interacciona con el dominio N-terminal de CarD y que no se une directamente al DNA, actuando, por tanto, como los conocidos “adaptadores transcripcionales” eucarióticos.

Otros genes carotenogénicos no son activados directamente por el factor sigma CarQ. Es el caso de los genes del operón *carB*, reprimidos en la oscuridad por la acción de dos represores, CarA y CarH, cuya acción, al menos la del primero, es contrarrestada en la luz por el producto de un gen, *carS*, que sí es activado directamente por CarQ. La proteína CarS no interacciona con el promotor del operón *carB*, sino con la proteína CarA, a la que se une por su sitio de unión al DNA. CarS actúa, por tanto, como competidor del operador de CarA. Un aspecto absolutamente novedoso de CarA y CarH es la asociación en ambos de un dominio N-terminal de unión al DNA con un dominio C-terminal de unión a cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>). La unión de la vitamina B<sub>12</sub> a CarA no parece afectar a su acción represora de manera significativa, pero sí su unión a CarH, cuya actividad como represor depende estrictamente de la presencia de la vitamina.

Martes 16 de Septiembre de 2008

## **SESIÓN I: GENÓMICA Y PROTEÓMICA**

Moderador: María Molina, Universidad Complutense, Madrid

**O.I.1. - 18.00 H.**

### **“Secuenciación y caracterización de una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de conejo”**

D. Viana, L. Selva, J. M. Corpa, I. Lasa, J. R. Penadés  
Universidad CEU-Cardenal Herrera, Moncada, Valencia.  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada,  
Valencia. E-mail: [dviana@uch.ceu.es](mailto:dviana@uch.ceu.es)

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* ocasionan cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería mundial. Así, las mamitis estafilocócicas constituyen la principal causa de eliminación de conejas adultas en las explotaciones cunícolas. Las poblaciones naturales de *S. aureus* son muy heterogéneas, aunque en explotaciones cunícolas se ha observado una extensa distribución de un número limitado de genotipos, predominando sobre todo el genotipo A1/II1/δ.

Con el objetivo de estudiar con mayor detalle las características de las cepas cunícolas se ha llevado a cabo la secuenciación completa de una cepa cunícola de *S. aureus*. La cepa se aisló de una mamitis clínica en una explotación de la Comunidad Valenciana con signos de estafilococosis crónica y pertenecía al genotipo aislado con mayor frecuencia en explotaciones cunícolas, A1/II1/δ. La secuenciación se ha llevado a cabo mediante “454 pyrosequencing technology” (454 Life Sciences). Tras ordenar los “contigs” generados por pirosecuenciación se completó la unión de los mismos mediante PCR y posterior secuenciación clásica.

El análisis *in silico* de la secuencia reveló la presencia de un bacteriófago no descrito anteriormente en *S. aureus*, por lo que cabría pensar que dicho fago pueda otorgar una cierta especificidad a estas cepas características de conejo.

Además se analizó el mecanismo de propagación de este fago, pudiendo intervenir en la regulación del mismo una proteína codificada por la bacteria, el regulador global LexA, y un represor codificado por el fago.

Martes 16 de Septiembre de 2008

## **SESIÓN I: GENÓMICA Y PROTEÓMICA**

Moderador: María Molina, Universidad Complutense, Madrid

**O.I.2. - 18.15 H.**

### **“La proteómica como herramienta molecular para el estudio del hongo fitopatógeno *B. cinerea*”**

F.J. Fernández-Acero, M. Carbú, C. Garrido, I. Vallejo y J. M. Cantoral  
Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Pol. Río San Pedro s/n, Puerto Real, 11510, Cádiz, Spain.

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, es responsable de la enfermedad conocida como “podredumbre gris” que causa graves pérdidas económicas en un gran número de cultivos. En un intento de identificar aquellas proteínas implicadas en los mecanismos de patogenicidad del hongo, se ha iniciado el estudio del perfil de proteínas de *B. cinerea* mediante electroforesis bidimensional (2-DE), comparando los perfiles proteicos obtenidos en distintas condiciones de cultivo, así como los proteomas de cepas con diferente fisiología y patogenicidad.

En primer lugar, se optimizó el proceso de obtención y separación de proteínas del hongo, realizando la primera descripción de su proteoma. A continuación, se compararon los proteomas de dos cepas de *B. cinerea* que diferían tanto en virulencia como en la producción de toxinas (Botridial y Dihidrobotridial). Los extractos proteicos fueron obtenidos por precipitación con TCA/Acetona. El análisis de los geles 2-DE reveló la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas entre las cepas analizadas. La identificación de las proteínas se realizó mediante MALDI-TOF/TOF y ESI Ion-trap, dando como resultado la identificación de 27 proteínas. Entre estas proteínas destacan tanto factores de patogenicidad que han sido previamente descritos (Ciclofilina), como otros cuyo papel en el ciclo infeccioso es sospechado (MDH, GADPH). Junto a estas, se encontraron otras proteínas susceptibles de convertirse en dianas terapéuticas, que podrían jugar un papel clave en la lucha “responsable” contra el patógeno en los próximos años.

Martes 16 de Septiembre de 2008

## **SESIÓN I: GENÓMICA Y PROTEÓMICA**

Moderador: María Molina, Universidad Complutense, Madrid

**O.I.3. - 18.30 H.**

### **“Genome-wide screening of over-expressing genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12”**

G. Eydallin\*, M. Sesma, G. Almagro, M. Montero, A. M. Viale, F. J.

Muñoz, E. Baroja-Fernández and J. Pozueta-Romero

Instituto de Agrobiotecnología, Gobierno de Navarra/CSIC/Universidad Pública de Navarra, Mutilva Baja, Navarra

Glycogen is a branched homopolysaccharide of  $\alpha$ -1,4-linked glucose subunits with  $\alpha$ -1,6-linked glucose at the branching points. Synthesized by glycogen synthase using ADPglucose as the sugar donor nucleotide, glycogen accumulation in *Escherichia coli* occurs under limited growth conditions when an excess of carbon source is available. In a previous work <sup>(1)</sup>, we used a systematic and comprehensive gene-disrupted mutant collection of *E. coli* (The Keio collection, <sup>(2)</sup>) to investigate the interconnections existing between glycogen metabolism and other major cellular processes. In this work we used the ASKA library <sup>(3)</sup>, a set of 4123 clones containing all predicted ORFs of *E. coli* expressed under the control of an IPTG-inducible promoter. In order to detect differential glycogen accumulation on ASKA clones, we growth bacteria on Konberg medium supplemented with 1% glucose. After screening and quantification, we found that the accumulation of glycogen was affected by the over-expression of more than 70 genes comprising a wide functional diversity. Interestingly, we detected a group of genes (including *glgC*, *glgA*, *glgS*, *rpoS* and other of unknown function) that displayed a very dark phenotype in Konberg solid medium when exposed to iodine vapors. We think that some of the selected gene of unknown function could be linked to a new source of ADPglucose that we previously described <sup>(4,5)</sup>. The overall data complement and delve our previous works and reinforce the idea that glycogen metabolism is highly interconnected with a wide variety of cellular processes.

1. Eydallin, G., Viale, A. M., Morán-Zorzano, M. T., Muñoz, F. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E. and Pozueta-Romero, J. (2007) Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Letters* Jun 26; 581(16):2947-53.

2. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in frame, single-gene knockout mutants: The Keio Collection. *Mol. Syst. Biol.* Doi; 10.1038/msb4100050 3.

3. Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H. and Mori, H. (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library ( a complete set of *E. coli* ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.*; 12:291-299. 4.

4. Eydallin, G., Morán-Zorzano, M.T., Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Montero, M., Alonso-Casajús, N., Viale, A.M., Pozueta-Romero, J. (2007) An *Escherichia coli* mutant producing a truncated inactive form of GlgC synthesizes glycogen: further evidences for the occurrence of various important sources of ADPglucose in enterobacteria. *FEBS Lett.* Sep 18;581(23):4417-22.

5. Morán-Zorzano, M.T., Alonso-Casajús, N., Muñoz, F.J., Viale, A.M., Baroja-Fernández, E., Eydallin, G., Pozueta-Romero, J. (2007) Occurrence of more than one important source of ADPglucose linked to glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *FEBS Lett.* Sep 18;581(23):4423-9

Martes 16 de Septiembre de 2008

## **SESIÓN I: GENÓMICA Y PROTEÓMICA**

Moderador: María Molina, Universidad Complutense, Madrid

**O.1.4. - 18.30 H.**

### **Análisis transcriptómico de la ruta de señalización del mensajero secundario c-di-GMP**

Begoña García\*, Cristina Solano, Cristina Latasa, Alejandro Toledo-Arana, Violeta Zorraquino, Jaione Valle, Joan Casals, Enrique Pedroso e Iñigo Lasa.

Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, Pamplona-31006, Navarra

[begona.garcia@unavarra.es](mailto:begona.garcia@unavarra.es)

*Salmonella* en particular y las bacterias en general, recurren a una forma de crecimiento sésil en el que las bacterias se multiplican adheridas a superficies y embebidas en una matriz extracelular que ellas mismas sintetizan formando biopelículas o biofilms. Estudios sobre la formación del biofilm de *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis han demostrado que la producción de celulosa, fimbrias de tipo curli y una proteína de superficie, denominada BapA, son necesarias para la formación de biofilm en este microorganismo. La síntesis de la matriz extracelular es un proceso energéticamente costoso y *Salmonella* dispone de un complejo sistema de regulación para controlar el proceso de formación del biofilm. Este sistema de regulación utiliza el mensajero secundario c-di-GMP para transmitir los estímulos externos desde las proteínas sensoras hasta las proteínas efectoras que finalmente adecuarán la formación del biofilm a las condiciones ambientales. El genoma de *S. Enteritidis* presenta 12 proteínas con dominio GGDEF responsables de la síntesis de c-di-GMP de las cuales sólo AdrA y STM1987 se ha demostrado que son necesarias para el proceso de formación del biofilm en condiciones ambientales distintas. En este trabajo hemos querido determinar el regulón transcripcional dependiente de la ruta de señalización del c-di-GMP durante el proceso de formación de biofilm. Para ello hemos realizado ensayos de microarrays utilizando una cepa deficiente en la síntesis de c-di-GMP durante el proceso de formación de biofilm. Los resultados revelaron que la ruta de señalización del c-di-GMP regula transcripcionalmente genes y que su papel es fundamentalmente represor. Además, los genes que resultaron estar regulados no sólo fueron genes implicados en el proceso de formación de biofilm sino también en la regulación de otros procesos, revelando un papel general de esta ruta de señalización en la fisiología bacteriana.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN II:  
REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA**

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

**O.II.1. - 09.00 H.**

**“Inducción térmica de la replicación en plásmidos de *Escherichia coli*: cuantificación por fluorimetría de GFP”**

Botello E; González-Soltero R; Mendoza-Chamizo B; Jiménez-Sánchez A  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. 06071 Badajoz.  
ebotello@unex.es

Un aumento de la temperatura de incubación de un cultivo de *Escherichia coli* induce replications cromosómicas extras. Esta replicación inducida por calor, HIR (heat-induced replication), inicia en *oriC* y presenta requerimientos funcionales diferentes a los de la replicación cíclica (Botello y Jiménez Sánchez, Mol. Microbiol. 1997; González-Soltero *et al*, J. Bacteriol. 2006; González-Soltero *et al*, Process Biochemistry, en prensa). Con el objetivo de determinar si HIR es una respuesta específica de *oriC* o un mecanismo de estrés generalizado entre los replicones bacterianos, en el presente trabajo estudiamos si HIR tiene lugar en minicromosomas y plásmidos de *E. coli*.

La emisión de fluorescencia por la proteína de fluorescencia verde (GFP) puede ser utilizada para la cuantificación del número de copias de plásmido (Lobner-Olesen, EMBO J. 1999). En este trabajo hemos determinado la inducción de HIR en diferentes plásmidos que llevan la construcción *pBAD-GFPmut2*. Hemos analizado diferentes replicones: minicromosomas con *oriC* y *oriC sopABC*; plásmidos con control de la replicación por iterones, como F, P1-*incA* y pSC101; y plásmidos controlados por RNA antisentido, como R1, pBR322 y p15A. Hemos determinado el número de copias de plásmido en cultivos de estirpes portadoras de los diferentes plásmidos creciendo exponencialmente a 30°C y tras el cambio a 41°C. La cuantificación de la fluorescencia de GFP en los cultivos la hemos llevado a cabo mediante espectrofluorimetría (plásmidos/masa) y por citometría de flujo (plásmidos/célula). Los resultados obtenidos por fluorimetría a 30°C se han comparado con medidas del número de copias de los mismos replicones determinadas por ‘Southern blot’.



Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la medida de la fluorescencia de *GFPmut2* es un método eficaz para la determinación de la dosis génica y para el estudio de HIR en plásmidos. El número de copias de los minicromosomas aumenta un 20% tras estrés térmico y presenta así un nivel de HIR análogo al del cromosoma. Los plásmidos con control de la replicación por iterones presentan una inducción de HIR entre un 20%, para los replicones F y P1, y un 50%, para pSC101. En los plásmidos controlados por RNA antisentido, HIR alcanzó el 26% en R1, 54% en p15A y 86% en pBR322. En general, la inducción de HIR es mayor al aumentar el número de copias del plásmido. El perfil de inestabilidad de los orígenes de replicación de los plásmidos analizados localiza sitios de desestabilización inducida por estrés (sitios SIDD) en todos ellos (Bi y Benham, Bioinformatics 2004). Por tanto, parece existir dependencia entre la presencia de un sitio SIDD en un origen de replicación y la inducción de HIR.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

## SESIÓN II:

# REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

O.II.2. - 09.15 H.

## Papel de la resolvasa RecU en etapas tempranas de la recombinación homóloga

Silvia Ayora\*, Cristina Cañas, Begoña Carrasco, y Juan C. Alonso

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, C/ Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. \* sayora@cnb.csic.es

La proteína RecU de *Bacillus subtilis* cataliza la resolución de intermedios de recombinación (Holliday junctions, HJ) en conjunción con RuvAB en las etapas finales de la recombinación homóloga (1). Evidencias bioquímicas sugerían que esta proteína puede actuar también en etapas tempranas, modulando la actividad de RecA (2). En este trabajo aislamos y caracterizamos dos mutantes simples de recU (*recU56* and *recU71*), inactivos en reparación de DNA por recombinación que están afectados únicamente en etapas tempranas de la recombinación. *In vitro* las proteínas mutantes (RecUK56A y RecUR71A) unen HJs y las resuelven en la orientación que no genera cromosomas diméricos, al igual que la proteína silvestre. El corte está estimulado por la presencia de RuvB con la que existe una interacción específica proteína-proteína. RecU interacciona con RecA e inhibe su actividad dATPasa dependiente de ssDNA, mientras que RecUK56A y RecUR71A no inhiben las actividad dATPasa de RecA ni interaccionan con ésta. Este trabajo muestra que las dos actividades de RecU pueden ser genéticamente separadas y da una posible explicación del papel de RecU en transformación plasmídica en competencia.

1. Ayora, S., Carrasco, B., Doncel, E. Lurz, R. y Alonso, J.C. (2004) *Bacillus subtilis* RecU cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 452-457.
2. Carrasco, B., Ayora, S., Lurz, R. y Alonso, J.C. (2005) *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucl. Acids Res.* 33, 3942-3952.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN II:**

**REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA**

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

**O.II.3. - 09.30 H.**

**Papel de las DNA polimerasas de translesión de *Escherichia coli* en la inestabilidad de microsátélites**

I. de la Viuda, Michel, B., Blázquez, J., Viguera, E. Área de Genética. Universidad de Málaga. Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, Francia. Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco. Contact  
E-mail: eviguera@uma.es

El deslizamiento de hebra durante la replicación del DNA es uno de los mecanismos propuestos para explicar la variabilidad de tamaños de secuencias repetidas de tipo microsátélites o repeticiones cortas en tándem. Su estudio es de especial interés dado que la inestabilidad de secuencias repetidas constituye una fuente de variación fenotípica en patógenos bacterianos, está relacionado con enfermedades neurodegenerativas en humanos y constituye una característica principal en ciertos tipos de cáncer. De acuerdo a los modelos propuestos, la inestabilidad se produciría durante la replicación del DNA como consecuencia del bloqueo de la DNA polimerasa replicativa o durante la reparación del DNA tras la formación de una rotura de simple o de doble hebra.

Las repeticiones de los dinucleótidos poli-(AC/TG) insertadas en el gen *lacZ* son altamente inestables en mutantes de *E. coli* en los que la respuesta SOS está inducida constitutivamente. Sin embargo no se conoce qué proteínas son responsables de dicha inestabilidad. Hemos utilizado la bacteria modelo *Escherichia coli* con el objetivo de identificar qué elementos son responsables de la inestabilidad de microsátélites *in vivo*.

Utilizando dicho sistema experimental, hemos determinado la implicación de las DNA polimerasas Pol II, Pol IV y Pol V codificadas por los genes *polB*, *dinB* y *umuDC* respectivamente, en la inestabilidad de dichas repeticiones. Las DNA polimerasas Pol II, Pol IV y Pol V acceden a la horquilla de replicación de una forma jerárquica, compitiendo por la interacción con el  $\beta$ -clamp. Además su acceso es dependiente de la formación de un filamento de RecA. Los datos obtenidos nos permiten plantear un modelo según el cual las DNA polimerasas de translesión acceden a una horquilla de replicación bloqueada, generando la inestabilidad observada.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

## SESIÓN II:

### REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

O.II.4. - 09.45 H.

#### **Evolución y diversificación *in-vitro* de una población de *Escherichia coli* mutadora, hacia menores valores de frecuencia de mutación.**

Turrientes MC<sup>1</sup>, Baquero F<sup>1</sup>, Ripoll A<sup>1</sup>, Rodríguez-Domínguez M<sup>1</sup>, Rodríguez-Alcayna M<sup>1</sup>, Baquero MR<sup>2</sup>, Martínez JL<sup>3</sup>, Cantón R<sup>1</sup>, Galán JC<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. <sup>2</sup> Universidad Alfonso X El Sabio, Madrid. <sup>3</sup>Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid. (mcturrientes@gmail.com ; jgalanm.hrc@salud.madrid.org).

**Introducción:** La mutación es uno de los principales mecanismos de variación genética, necesaria para la adaptación. Aquellas situaciones de estrés que impidan un óptimo crecimiento bacteriano, seleccionarán variantes con tasas de mutación incrementadas. La acumulación de cambios en los mutadores tiende a reducir su tamaño poblacional una vez finalizada la situación de estrés, siendo desplazados por variantes con menores tasas de mutación presentes en la misma comunidad.

**Objetivo:** Determinar la persistencia de una población homogénea con alta frecuencia de mutación ( $f$ ) en ambiente estable a lo largo del tiempo

**Material y Métodos:** La cepa mutadora ECU24 (*mutS*-) se sometió a pases seriados en medio LB durante 180 días ( $\approx 1.500$  generaciones). Dos veces por semana, del último cultivo bacteriano, se plaquearon 100 $\mu$ L de una dilución  $10^{-6}$  y se seleccionaron tres colonias independientes a las que se determinó la  $f$ , definida ésta como la proporción de colonias resistentes a rifampicina (100 $\mu$ g/ml) a las 48 horas respecto al recuento total de células viables.

**Resultados:** La  $f$  de la cepa ECU24 a  $t_0$  reveló una población homogénea ( $5 \times 10^{-7} \geq f \leq 1 \times 10^{-6}$ ) correspondiente a un fenotipo mutador. Esta población permaneció estable hasta la generación 400. A partir de este momento, se produjo una diversificación poblacional, llegando la población mutadora inicial a representar únicamente el 12% del total y apareciendo dos poblaciones mayoritarias con menor  $f$  que representaban el 36% (débil mutador) y 28,6% (no-mutador).

**Conclusiones:** Los experimentos evolutivos descritos en este trabajo indican que, aun en ausencia de sub-poblaciones con  $f$  menores, la densidad de la población mutadora tiende a disminuir evolucionando hacia variantes con  $f$  menores.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN II:**

**REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA**

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

**O.II.5. - 10.00 H.**

**Hacia un nuevo paradigma del sistema de reparación SOS**

Susana Campoy<sup>1</sup>, Ivan Erill<sup>2</sup>, Montserrat Llagostera<sup>1</sup>, Pilar Cortés<sup>1</sup> y Jordi Barbé<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona.

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, University of Maryland, Baltimore, USA.

Desde su descripción a finales de los años 70, el sistema de reparación de emergencia, también conocido como sistema SOS, es un ejemplo clásico de mecanismo de expresión coordinada. En *Escherichia coli*, la respuesta está controlada a nivel transcripcional por el represor LexA el cual reconoce la secuencia CTGTN<sub>8</sub>ACAG (conocida como caja SOS), localizada en la región promotora de los genes que regula. En presencia de lesiones, se produce la hidrólisis del represor y la inducción de este sistema, el cual engloba a más de 40 genes relacionados con los mecanismos de reparación, replicación y recombinación del DNA o con la inhibición de la división celular.

El estudio exhaustivo del sistema SOS en el Dominio Bacteria realizado por nuestro Grupo ha permitido determinar que la secuencia de reconocimiento de LexA es variable entre los distintos *phyla* y que no se conserva ni la composición ni el número de genes implicados en esta respuesta. De hecho, a parte de los genes *lexA* y *recA*, únicamente el casete génico *imuA-imuB-dnaE2* y el gen *recN* están siempre vinculados a la respuesta SOS. Es de resaltar que dicho casete no está presente en *E. coli*. Por otra parte, estudios filogenéticos, usando la proteína *dnaE2*, así como experimentos de evaluación de la capacidad de unión de distintas proteínas LexA a diferentes cajas SOS, nos han permitido trazar la historia evolutiva del sistema SOS, demostrando que la respuesta SOS de *E. coli* no es un modelo válido para muchas de las bacterias pertenecientes al dominio Bacteria.

Así, pese a que el mecanismo de regulación del sistema SOS está siempre conservado, la composición de la red génica controlada por LexA es de gran plasticidad, adaptando la respuesta SOS a las necesidades propias de cada microorganismo y del microambiente en el que habita.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN II:**

**REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA**

Moderador: Juan M. García-Lobo, Universidad de Cantabria

**O.II.6. - 10.15 H.**

**Chaperonas Hsp70 en el ensamblaje de ORC, el complejo iniciador de la replicación del ADN en *Saccharomyces cerevisiae***

María Moreno-del Álamo, Alicia Sánchez-Gorostiaga, Ana Serrano, Alicia Prieto y Rafael Giraldo.

Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid.

El Complejo de Reconocimiento del Origen en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ScORC) es el arquetipo de los iniciadores de la replicación en eucariotas. Está formado por seis subunidades (ScOrc1-6p) que se unen al DNA, dirigiendo el correcto ensamblaje de la maquinaria replicativa<sup>1</sup>. Nuestro trabajo previo demostró que la subunidad ScOrc4p interacciona con chaperonas de la familia Hsp70 o con su homólogo DnaK en *Escherichia coli*<sup>2</sup>. Mediante un análisis proteómico del complejo formado entre ScOrc4p y DnaK, hemos encontrado en la segunda hélice- $\alpha$  del *Initiator Specific Motif* (ISM)<sup>3</sup> de ScOrc4p una secuencia hidrofóbica (IL<sub>4</sub>, residuos 184-188) que es la diana principal de estas chaperonas. La coexpresión en *E. coli* de Orc4p junto a Orc1,2,3,5p y Cdc6p muestra que Orc4p interacciona con Orc1p, Orc2p y Orc5p y más débilmente con Cdc6p. Realizamos mutagénesis dirigida en el motivo IL<sub>4</sub> por cinco alaninas y hemos observado que si bien la mutación no altera la estructura de Orc4p, sí que afecta a su interacción con la subunidad Orc2p. Por otro lado, la sustitución alélica en ORC4 de mutantes en cada residuo del motivo IL<sub>4</sub> muestra que mientras que la mutación L184A es letal para la célula, las mutaciones L185A y L186A dan como resultado un fenotipo termosensible que hace que estas estirpes tengan un defecto en el inicio de replicación. En resumen, estos resultados nos hacen postular que las chaperonas de la familia Hsp70 desempeñan un papel importante en el ensamblaje del complejo ORC.

1. Bell, S.P. (2002). *Genes Dev.* 16, 659-72
2. Giraldo, R. y Díaz-Orejas, R. (2001). *PNAS* 98, 4938-4943
3. Clarey, M.G. y col. (2006). *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 684-90

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.1. - 11.00 H.**

**"Potencial del uso de *E. coli* para la inyección de anticuerpos recombinantes a células de mamífero"**

Ana Blanco Toribio y Luis Ángel Fernández Herrero

Pequeños fragmentos de anticuerpo que mantienen toda la capacidad de unión a antígeno pueden ser producidos en células de *E. coli* y seleccionados frente a un antígeno determinado mediante *phage display*. Hasta ahora, la aplicación de estos anticuerpos se ha limitado a dianas extracelulares ya que la membrana plasmática eucariota impide el acceso a antígenos intracelulares. En este trabajo, hemos utilizado el Sistema de Secreción Tipo III (SST3) de *E. coli* que está presente en las cepas no invasivas enteropatógenicas y enterohemorrágicas (*EPEC* y *EHEC*) como herramienta biotecnológica para inyectar anticuerpos recombinantes directamente desde la bacteria al citoplasma eucariota.

Para analizar la capacidad del SST3 de *EPEC* y *EHEC* para secretar e inyectar anticuerpos en la célula eucariota hemos empleado pequeños anticuerpos monodominio también denominados  $V_{HH}$ . Hemos seleccionado los  $V_{HH}$  por su pequeño tamaño (15kDa), estabilidad, similitud con los dominios  $V_H$  humanos y su potencial para inhibir enzimas e interacciones entre proteínas. Fusionando una señal tipo III (ST3) a los  $V_{HH}$  y expresando construcciones en cepas *EPEC* y *EHEC* se observa la secreción de anticuerpos con capacidad de unión a antígeno. Hemos demostrado la translocación de estas fusiones al citoplasma de células de mamífero gracias a un ensayo enzimático, fusionando la quimera ST3- $V_{HH}$  a la enzima beta-lactamasa.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.2. - 11.15 H.**

**Caracterización de la lipasa LipL producida por la bacteria halófila extrema *Salicola* sp. IC10**

M.L Moreno, E. Mellado, M.T. García y A. Ventosa

Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/. Profesor García González, 2, 41012 Sevilla (lmoreno@us.es)

Existen ambientes en el planeta cuyas características se encuentran cerca de los límites físicos para el desarrollo de los procesos vitales. Éstos presentan valores extremos de parámetros como temperatura, pH, concentración de metales pesados o salinidad. Las salinas además de poseer una elevada concentración de sal, están sometidas a una fuerte irradiación solar y a elevadas temperaturas.

Un screening previo, realizado en salinas situadas en el sur de España, encaminado a determinar la biodiversidad de microorganismos halófilos extremos productores de enzimas hidrolíticas (amilasas, proteasas, lipasas y DNAsas), permitió seleccionar una cepa con actividad lipolítica y proteolítica. Esta cepa ha sido clasificada taxonómicamente como *Salicola* sp. IC10. Las lipasas poseen un enorme potencial biotecnológico, participando en reacciones químicas tanto de síntesis como de hidrólisis además de tener aplicación en la industria de detergentes, en el campo de la alimentación así como en biorremediación.

Las condiciones de crecimiento óptimo de dicha cepa, que coinciden con las de máxima producción de la enzima lipolítica son: medio de cultivo con 15% de NaCl, pH 8,0 y 37°C. Con objeto de cuantificar la actividad lipolítica en las diferentes fracciones celulares, se utilizaron como sustratos ésteres de p-nitrofenol en un ensayo colorimétrico, obteniéndose actividad únicamente en la fracción intracelular. El análisis zimográfico de la cepa IC10 reveló la presencia de al menos una enzima con actividad sobre MUF-butirato que se designó lipasa LipL. Se ha estudiado la influencia de la salinidad en la actividad de dicha cepa observándose actividad lipolítica en todas las concentraciones salinas ensayadas (entre 10 y 25% NaCl).

Actualmente se está procediendo a la clonación del gen responsable de esta actividad lipolítica. Para ello hemos alineado secuencias de lipasas depositadas en las bases de datos y se han diseñado cebadores específicos a partir de dominios conservados. Paralelamente se han iniciado estudios para abordar la purificación de la enzima lipolítica a partir de la fracción intracelular del cultivo de la cepa IC10.



Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.3. - 11.30 H.**

**Caracterización de los sistemas implicados en el transporte de ectoínas en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens***

J. Rodríguez-Moya, M. Argandoña, C. Vargas, J.J. Nieto. *Depto. de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, Sevilla (jrmv@us.es)*

*Chromohalobacter salexigens* es una bacteria halófila cuyo principal mecanismo de osmoadaptación es la síntesis de ectoína e hidroxiectoína (1). Estos solutos compatibles tienen interés industrial como bioestabilizadores de enzimas y anticuerpos, así como en Dermofarmacia. Nuestro objetivo es la obtención de cepas de *C. salexigens* mejoradas en la producción y excreción de estos bioestabilizadores. Como primer paso, este trabajo se centra en la caracterización de los sistemas de transporte implicados en la captación de ectoínas liberadas al medio externo, así como en su regulación.

En bacterias halófilas se han descrito dos tipos de transportadores de ectoínas: un transportador osmorregulado de la familia TRAP con alta afinidad por ectoínas, codificado por los genes *teaABC* en *Halomonas elongata* (2), y el transportador EctM (tipo BCCT) en *Marinococcus halophilus* (3). En el genoma de *C. salexigens* hemos encontrado ortólogos a los dos sistemas. La caracterización de un mutante *teaC* ha demostrado que TeaC es el principal sistema de transporte de ectoínas al citoplasma. En estos momentos estamos cuantificando la producción y recuperación de ectoínas en dicho mutante, en relación con la estirpe silvestre así como en un doble mutante *ectABCteaC*.

Por otro lado, hemos aislado el mutante CHR95 (WT::Tn1732), que presenta tasas de transporte de ectoína superiores a las de la estirpe silvestre a cualquier salinidad y que, a diferencia de la estirpe silvestre, es capaz de utilizar ectoínas como única fuente de carbono a 0.6 M de NaCl. Nuestros resultados indican que el transposón Tn1732 causó la delección de tres genes: *mntR* (que regula el transporte de manganeso), *luxR* (regulador transcripcional), y *acs* (acetil-coA sintetasa). Para determinar el papel de cada uno de ellos en el fenotipo del mutante CHR95, estamos procediendo a inactivarlos individualmente. Como cabría esperar, un mutante *mntR* no reprodujo el fenotipo de CHR95 en relación al uso de ectoínas a baja salinidad, y mostró una mayor sensibilidad al manganeso. Actualmente estamos comprobando el papel de LuxR tanto en el transporte de ectoínas como en la expresión de los genes *teaABC*.

1. Cánovas, D. et al. (1997). *J. Biol. Chem.* 272: 7221-7226.
2. Grammann, K. et al. (2002). *J. Bacteriol.* 184: 3078-3085.
3. Vermeulen, V. and Kunte, H.J. (2004). *Extremophiles* 8: 175-184.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.4. - 11.45 H.**

**Caracterización de las cuatro serín/treonín  
quinasas de *Corynebacterium glutamicum*.**

María Fiuza, Almudena F. Villadangos, Michal Letek, Efrén Ordoñez, Virginie Molle, Luís M. Mateos y José A. Gil. Departamento de Biología Molecular. Área de Microbiología. Universidad de León. 24071 León. E.mail: jose.a.gil@unileon.es

El genoma de *Corynebacterium glutamicum* presenta solamente cuatro genes que codifican para las serín/treonín kinasas (SPTKs) PknA, PknB, PknL y PknG en contraste con las 11 encontradas en *Mycobacterium tuberculosis* o las 33 en *Streptomyces coelicolor* A3(2). PknG es una proteína citosólica, mientras que PknA, PknB y PknL son proteínas transmembrana, con una porción extracelular (extremo carboxilo) en la que aparecen uno o más dominio sensores que captan señales del exterior y una porción citosólica (extremo amino) que incluye el dominio catalítico. La regulación de la actividad de estas kinasas se produce principalmente mediante una actividad autocatalítica que supone su propia autofosforilación y activación. La conversión de forma inactiva a forma activa (fosforilada) produce una serie de cambios conformacionales en la proteína que conducen a la correcta disposición de los grupos catalíticos y permiten el acceso del sustrato al dominio catalítico.

Estudios de fosforilación *in vitro* indican que los dominios citoplásmicos de PknA, PknB y PknL tienen capacidad de autofosforilación. Sin embargo, ni el dominio catalítico de PknG ni la proteína completa tienen capacidad de autofosforilarse, lo que supondría un mecanismo diferente de activación por la acción de alguna de las otras kinasas. Nuestros resultados indican que PknG sólo es capaz de fosforilar uno de sus sustratos (OdhI) una vez que ha sido fosforilada/activada por PknA, estableciéndose así una cascada de fosforilación. Además, usando técnicas de espectrofotometría de masas, hemos identificado los residuos (Thr/Ser) fosforilados en cada una de las cuatro kinasas.

Para completar la caracterización de la función de estas kinasas se realizaron estudios *in vivo*. Los genes *pknG* y *pknL* no son esenciales para el crecimiento de *C. glutamicum*, y su inactivación no produce anomalías morfológicas. Por el contrario los genes *pknA* y *pknB* son esenciales y no pueden ser interrumpidos; no obstante, una bajada de expresión de dichos genes produce un fenotipo filamentosos, mientras que la sobreexpresión de *pknA* y *pknB* produce un fenotipo cocoide. Estas alteraciones morfológicas sugieren un papel regulador de PknA y PknB en los procesos de crecimiento y división de *C. glutamicum*.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.5. - 12.00 H.**

**Análisis molecular del efecto de biocidas sobre la formación y el desarrollo del biofouling**

L. J. Taracido<sup>1</sup>, R. Solera<sup>1</sup>, J.M.González<sup>4</sup>, F.J. Casanueva<sup>2</sup>, E. Nebot<sup>1</sup>, C. Pendón<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz; <sup>2</sup>Dpto. Máquinas y Motores Térmicos de la Universidad de Cádiz. <sup>3</sup>Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cádiz; Av. República Saharaui s/n 11510 Puerto Real. <sup>4</sup>Dpto. de Bioquímica y Dinámica de Contaminantes del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC). \*carlos.pendon@uca.es

En los sistemas industriales que utilizan fluidos como refrigerantes, los circuitos del intercambiador de calor deben trabajar en las condiciones óptimas para que la eficiencia en la transferencia de calor sea la máxima posible. Este tipo de sistemas, especialmente aquellos abiertos que utilizan agua como fluido refrigerante, presentan un problema de reducción en la eficacia del proceso como consecuencia de la formación de depósitos de origen biológico. Este fenómeno recibe el nombre de biofouling. En sus primeros estadios tiene lugar la colonización de la superficie de las conducciones por microorganismos, predominantemente bacterias, dando lugar a una comunidad altamente compleja que se denomina biopelícula o biofilm. La fijación de las mismas promueve el desarrollo de un entorno que favorece el crecimiento de otras comunidades bacterianas, sometidas a un cambio constante, en cuanto a su estructura y evolución temporal. El uso de biocidas, principalmente cloro, es la respuesta habitual para minimizar este problema. Actualmente en el documento “Mejores Tecnologías Disponibles” (MTD’s) se advierte sobre la necesidad de investigar en métodos que reduzcan el impacto de efluentes contaminantes sobre el medio marino. Resulta pues necesario, el diseño de estrategias novedosas dirigidas al control de la formación del biofouling. En este trabajo, hemos abordado el estudio de las comunidades bacterianas formadoras del biofilm, de un intercambiador de calor que utiliza agua marina como refrigerante, a través de la secuenciación del gen de ARNr de 16S de las bacterias de la biopelícula. También hemos utilizado la técnica de la PCR-DGGE para comparar perfiles bacterianos de las diferentes muestras analizadas. Así hemos estudiado los grupos bacterianos predominantes en el biofilms después de 3, 6, 12, 24, 48 y 60 días de circulación del agua de mar. Hemos seguido la misma metodología para estudiar el efecto selectivo de diferentes biocidas (cloro, radiación ultravioleta y Mexel) sobre la composición del biofilm “maduro”. Los resultados que hemos obtenidos hasta ahora, muestran diferentes patrones de diversidad bacteriana, tanto en la evolución temporal como en el estudio de los tratamientos con los biocidas, siendo principalmente proteobacterias y bacteroidetes las más resistentes al efecto de estos.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.6. - 12.15 H.**

**Detección de Papilomavirus humano por sondas “invader” en muestras previamente analizadas por hibridación y que resultaron negativas o muy cercanas a la zona umbral de positividad.**

F Galán-Sánchez, Manuel A. Rodríguez-Iglesias

Laboratorio de Microbiología. Hosp. Univ. de Puerto Real. Universidad de Cádiz. (manuel.rodriguez Iglesias@uca.es)

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus ADN de doble cadena y de pequeño tamaño (aproximadamente 8000 pares de bases). Desde la demostración de que el cáncer de cuello uterino está causado por la infección de ciertos genotipos de VPH, denominados de alto riesgo oncogénico se han introducido programas para su detección. Como técnica de referencia se utiliza la tecnología basada en la captura de híbridos (Hybrid Capture II, Digene), siendo la más utilizada y la única validada por la FDA. Sin embargo, esta técnica puede plantear falta de sensibilidad en comparación a otros métodos en los que se amplifica la diana. El objetivo de este trabajo es evaluar la utilización de sondas “invader” (Invader HPV HR, Third Wave Technologies) en muestras que han sido negativas para captura de híbridos pero en las que se detectaba una señal baja o en “zona gris”, con la intención de recuperar muestras falso negativas de HCII. La tecnología “invader” está basada en el reconocimiento de tres secuencias específicas de sendos grupos filogenéticos de virus (A5/6, A7 y A9). La hibridación genera una estructura tricatenaria que puede ser digerida por la enzima Cleavase®. La lectura se realiza mediante fluorometría al romper sondas “en horquilla” marcadas con un “quencher” y una molécula fluorescente.

Se incluyeron en el estudio 67 muestras de cepillado cervical de mujeres atendidas en la consulta de ginecología del H.U. de Puerto Real que fueron negativas por HCII a VPH de alto riesgo, con valores cercanos al umbral positivo comprendidos entre 0.50 y 0.99 RLU (se consideran positivas las muestras con valores  $\geq 1$ ). El ADN fue extraído y purificado por métodos convencionales y testado con sondas “invader” siguiendo las instrucciones del fabricante.

De las 67 muestras estudiadas, 10 (14,9%) fueron positivas por “invader”. Dos muestras no pudieron ser analizadas por presentar baja cantidad de ADN. Las muestras fueron positivas para A5/6, A7 y A9 en 7, 6 y 6 casos respectivamente. En tres muestras solo se detectó un grupo filogenético. El método demuestra una mayor sensibilidad que la técnica de captura de híbridos. También permite analizar la presencia de determinados grupos filogenéticos con diferente potencial oncogénico.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.7. - 12.30 H.**

**Optimización de la expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto y purificación de VLPs**

Martínez Martínez M.<sup>1</sup>, Marques Alves P.<sup>2</sup>, Ortiz Rivera M.<sup>3</sup>, Benítez Rico L.<sup>1</sup>. (1) Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (monmarti@bio.ucm.es) (2) Laboratorio de Tecnología de células animales. Instituto de Biología experimental e Tecnológica. Oeiras, Portugal. (3) Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

El virus del papiloma humano tipo 18 (VPH18) es el segundo tipo de VPH más frecuentemente encontrado en mujeres afectadas de neoplasia intraepitelial y cáncer de cérvix uterino, y ha sido incluido en las dos vacunas actualmente comercializadas. Con objeto de producir antígenos de la proteína L1 de VPH18 para, desarrollar herramientas con utilidad en el diagnóstico serológico de la población vacunada y/o infectada, se han estudiado las condiciones óptimas para la expresión de dicha proteína en células de insecto (Sf9 y Sf21), mediante el uso de baculovirus recombinantes.

En primer lugar se realizaron estudios de cinética de expresión de la proteína L1 con objeto de establecer las condiciones de infección en las que se obtenían mayores niveles de expresión valorando el efecto de la presencia/ausencia de suero fetal bovino (SFB) en el medio, la línea celular, el Índice de Multiplicidad de la infección (MOI), y tiempo de infección. Los máximos de expresión fueron detectados cuando la línea celular Sf21, era infectada con MOI de 5 ufp/célula, en medio suplementado con SFB, durante 48 horas. Dada la capacidad de la proteína L1 de autoensamblarse en partículas similares al virus (VLPs) se realizaron ensayos para la purificación de VLPs. Tras la ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio, se estableció, mediante análisis por microscopía electrónica y Dispersión Dinámica de Luz (DLS), que las partículas de mejor calidad se obtenían en infecciones con MOI 10 mantenidas durante 48 horas.

Estos ensayos de cinética de expresión de la proteína L1 y de purificación de VLPs en fermentadores a pequeña escala, suponen un primer paso hacia el estudio de las condiciones óptimas de producción, ensamblaje y recuperación de las partículas de VPH18 producidas mediante baculovirus en células de insecto.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN III:  
BIOTECNOLOGÍA**

Moderador: José A. Gil, Universidad de León

**O.III.8. - 12.45 H.**

**Consolidación de piedra ornamental mediante aplicación de un cultivo de *Myxococcus xanthus*: Estudio de la comunidad bacteriana**

Guadalupe Piñar<sup>2</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>1</sup>, Katja Sterflinger<sup>2</sup>, Jörg Ettenauer<sup>2</sup>, Juan de Dios Bueno<sup>3</sup>, Fadwa Jroundi<sup>1</sup>, Antonia Fernandez-Vivas<sup>1</sup>, Maria Teresa Gonzalez-Muñoz<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, <sup>3</sup> CIC, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, 18071 Granada. \*Email: mgonzale@ugr.es.

<sup>2</sup>University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.

La producción de carbonato cálcico inducida por biomineralización bacteriana tiene un importante y significativo potencial para ser aplicada a la protección/consolidación de piedra calcárea ornamental, tanto degradada como de cantera, siendo un método especialmente respetuoso con el material pétreo por la compatibilidad entre la piedra original y el nuevo cemento carbonatado. Nuestro grupo de investigación viene trabajando desde hace años en la aplicación de este proceso a la consolidación de calcarenita, piedra abundantemente utilizada en el Patrimonio Arquitectónico de la cuenca mediterránea, habiendo obtenido resultados excelentes, con notable impacto internacional. Los tratamientos se realizan mediante la aplicación de un cultivo de *Myxococcus xanthus*.

Un aspecto que no hay que descuidar en este tipo de tratamiento es su repercusión sobre la microbiota que habita la piedra a tratar, ya que, si bien la microbiota activada durante el mismo es carbonatogénica, es importante conocer qué puede ocurrir una vez finalizado el tratamiento.

En esta comunicación se presenta un estudio comparativo entre la microbiota presente antes, durante y después del tratamiento, tanto en el caso de piedra de cantera como en el de piedra alterada. Con este propósito se aplicó una estrategia cultivo-independiente que combina la producción de patrones de bandas genéticas en gel de gradiente desnaturante (DGGE) con la secuenciación de los fragmentos del ADN ribosómico 16S, previamente separados en DGGE, a través de la creación de librerías clónicas. Además, se analizó la permanencia de *M. xanthus* mediante amplificación por PCR a tiempo real del ADN de esta bacteria usando primers específicos. Los resultados indican activación de bacterias carbonatogénicas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Brevibacillus*. Y se ha visto que *M. xanthus* es capaz de competir con las bacterias activadas durante los 3-6 primeros días de tratamiento y que, transcurrido este tiempo, su detección sólo es posible mediante PCR a tiempo real.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008  
13.00H

Conferencia plenaria II:

## **Métodos moleculares para el estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales**

Juan M. González Grau

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNAS-CSIC, Avda. Reina Mercedes 10, 41012 – Sevilla. [jmgrau@irnase.csic.es](mailto:jmgrau@irnase.csic.es)

En los últimos años se ha demostrado que la diversidad de microorganismos en nuestro planeta es enorme. Para llegar a estos conocimientos ha sido esencial el empleo de métodos moleculares basados en los ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN. Hoy en día existen distintas opciones para llevar a cabo estudios de comunidades microbianas en ambientes naturales los cuales, en general, se caracterizan por una gran complejidad debido a la gran variedad de microorganismos que los constituyen. En esta ocasión, nos plantearemos distintas posibilidades para iniciar estudios relativamente sencillos de comunidades microbianas naturales y conseguir con ello la información necesaria. Aunque el empleo de métodos moleculares ha dado un impulso enorme al avance de la microbiología ambiental, no hemos de olvidar la importancia del cultivo de microorganismos aunque generalmente no sea una tarea sencilla. Hoy por hoy, los cultivos son necesarios para llegar a conocer la fisiología de la gran mayoría de microorganismos de los que aún se desconoce. Distintos ejemplos concretos nos permitirán introducir problemas, necesidades y conclusiones a obtener a partir de estudios moleculares de comunidades microbianas. Entre estos ejemplos están, por ejemplo, un caso de comunidades microbianas del Parque Nacional de Doñana, microorganismos en ambientes específicos de las Islas Canarias y tapetes microbianos termófilos. La diversidad microbiana es tan elevada que plantea problemas de estudio en sistemas complejos como pueden ser la mayoría de comunidades microbianas naturales.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.1. - 17.30 H.**

**Un singular complejo regulador de la transcripción  
en la bacteria *Myxococcus xanthus***

García-Heras F<sup>1</sup>; Padmanabhan S<sup>2</sup>; Murillo FJ<sup>1</sup>; Elías-Arnanz M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30071 Murcia (fgheras@um.es); <sup>2</sup>Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC, Madrid

CarD y CarG son factores transcripcionales que participan en diferentes procesos celulares de la bacteria *Myxococcus xanthus*, tales como la carotenogénesis inducida por luz azul, el crecimiento vegetativo, o la formación de cuerpos fructíferos. Los genes que determinan la síntesis de ambas proteínas se encuentran formando parte de un operón que se transcribe a partir de un promotor situado aguas arriba de *carD*. La proteína CarD es la única proteína conocida en procariotas que presenta un dominio de unión al DNA (dominio C-terminal) similar física, estructural y funcionalmente a los factores arquitectónicos eucarióticos de la familia HMGA (High Mobility Group A). CarG es una proteína pequeña con un dominio de unión a zinc, rico en histidinas y cisteínas, típico de las metaloproteasas de tipo arqueametzincinas; en CarG, no obstante, dicho dominio carece de un glutámico esencial para la catálisis, que aparece sustituido por una glutamina. CarG une dos átomos de zinc, no muestra actividad proteasa alguna, y para su estabilidad *in vivo* son absolutamente necesarias las cisteínas. Las proteínas CarD y CarG interaccionan físicamente a través del dominio N-terminal de CarD, formando un complejo molecular que se une al DNA a través del dominio C-terminal de CarD, con una especificidad de unión semejante a la de las proteínas HMGA.

Que CarD y CarG son dos elementos de un complejo regulador, ambos esenciales para su función, viene apoyado por la correlación observada en la distribución de dichas proteínas en los distintos grupos taxonómicos. Así, no existen homólogos a ninguna de ellas fuera del grupo de las mixobacterias; y, entre las mixobacterias, aparecen homólogos de ambas en *Stigmatella aurantiaca* y *Anaeromyxobacter dehalogenans*, ambas pertenecientes al mismo subgrupo que *M. xanthus*, pero no en *Sorangium cellulosum*, perteneciente al otro subgrupo de mixobacterias. Como en *M. xanthus*, los genes homólogos a *carD* y *carG* en *S. aurantiaca* y *A. dehalogenans* se encuentran adyacentes. Sorprendentemente, aunque la proteína CarD de *A. dehalogenans* (CarD<sub>Ad</sub>) posee un segmento N-terminal muy parecido al de CarD, su segmento C-terminal carece de los característicos ganchos AT del dominio HMGA. En su lugar, presenta un segmento básico rico en lisinas, muy similar a la cola C-terminal de las histonas H1. Nuestros estudios de complementación en *M. xanthus* con las proteínas de *A. dehalogenans* y con diversas versiones de CarD quiméricas demuestran que, como ocurre en eucariotas, los dominios HMGA y H1 también pueden ser funcionalmente equivalentes en procariotas.



Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.2. - 17.45 H.**

**Estudios moleculares de la regulación cruzada de las rutas de degradación aeróbica y anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.**

Andrés Valderrama, Gonzalo Durante-Rodríguez, José Luis García, Manuel Carmona y Eduardo Díaz.

Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. Ramiro de Maeztu, 9 28040 Madrid. andresv@cib.csic.es

El benzoato es un compuesto aromático abundante en el medio ambiente y un intermediario que se genera frecuentemente durante la degradación de otros compuestos aromáticos. La  $\alpha$ -proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB constituye un sistema modelo ideal para el estudio del catabolismo del benzoato ya que es capaz de mineralizar este compuesto tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (desnitrificando). En ambos casos, la degradación de benzoato comienza con su activación a benzoil-CoA a través de sendas benzoato-CoA ligasas específicas. Mientras que en la ruta aeróbica (ruta *box*) el benzoil-CoA sufre la hidroxilación del anillo aromático por una oxigenasa dependiente de oxígeno que conduce finalmente a la formación de un intermediario de la ruta del  $\alpha$ -cetoadipato, en la ruta anaeróbica (ruta *bzd*) el benzoil-CoA se reduce a un intermediario alicíclico que origina finalmente 3-hidroxipimelil-CoA. Los genes *box* y *bzd* se organizan en dos clusters catabólicos localizados en dos regiones distintas del cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB, y están controlados por dos miembros de la subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales, los reguladores BoxR y BzdR, respectivamente.

Si bien nuestro grupo de investigación ha caracterizado en detalle el operón catabólico *bzd* y su control por el represor específico BzdR y el inductor benzoil-CoA, la regulación transcripcional específica del cluster *box* no se había descrito hasta la fecha en ningún microorganismo. Con el objetivo de estudiar dicha regulación, los promotores *PboxR* y *PboxD* que controlan la expresión de las dos unidades transcripcionales divergentes del cluster *box*, *boxRCBAI* y *boxDEFT1T2T3T4GH*, respectivamente, se han fusionado al gen reportero *lacZ*. La expresión de las correspondientes fusiones traduccionales ha revelado que dichos promotores son activos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno y están inhibidos por el producto del gen *boxR* cuando éste se expresa en *trans* en la misma célula. Experimentos *in vitro* de retardo en gel y footprinting con DNAsa I han

confirmado la interacción del represor BoxR con el promotor *PboxD* y el benzoil CoA como la molécula inductora.

La arquitectura modular similar de los represores BoxR y BzdR junto con el hecho de que ambos reconozcan benzoil-CoA como inductor sugiere la posibilidad de regulación cruzada entre la ruta aeróbica y anaeróbica de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. Para intentar confirmar experimentalmente esta hipótesis, se realizaron experimentos genéticos y bioquímicos intercambiando los elementos reguladores aeróbicos y anaeróbicos con la consiguiente demostración de que el regulador aeróbico BoxR es capaz de controlar al promotor anaeróbico *Pn* y el regulador anaeróbico BzdR hace lo propio con el promotor aeróbico *PboxD*. Estos estudios se confirmaron posteriormente en *Azoarcus* sp. CIB comparando mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de los genes *box* y *bzd* en la cepa parental y en mutantes en los genes reguladores *boxR*, *bzdR* así como en el doble mutante *boxR/bzdR*. Estos resultados constituyen la primera demostración experimental de regulación cruzada entre los elementos reguladores de la transcripción de una ruta aeróbica y otra anaeróbica para la degradación del mismo compuesto aromático.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.3. - 18.00 H.**

**Implicación del (p)ppGpp en la regulación de la uropatogenia de *Escherichia coli***

Jorge Fernández, Juan David Cabrer, Antonio Juárez y Carlos Balsalobre

Universidad de Barcelona, Departamento de Microbiología

Facultad de Biología, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona

e-mail: jorgefernandez@ub.edu

Las bacterias patógenas tienen la capacidad de persistir y replicarse en zonas específicas del organismo hospedador gracias a la expresión de factores de virulencia que les permiten colonizar, eludir la respuesta inmune y adquirir los nutrientes necesarios para sobrevivir. Para que esta colonización sea posible, las bacterias han de expresar dichos factores de virulencia de una manera coordinada y secuencial a lo largo del proceso infeccioso. En nuestro grupo de investigación utilizamos cepas uropatógenas de *E. coli* como modelo de estudio de la patogénesis bacteriana.

El (p)ppGpp es una molécula no proteica, perteneciente al grupo de las alarmonas, que actúa como sensor de alteraciones en la tasa de crecimiento. Los niveles de esta molécula son inducidos rápidamente en respuesta a diferentes parámetros ambientales que provocan una reducción de la tasa de crecimiento. En este trabajo se expone el papel del (p)ppGpp en la regulación de la expresión de la  $\alpha$ -hemolisina, un factor de virulencia importante para la proliferación y supervivencia de las *E. coli* uropatógenas en el interior del tracto urinario del organismo hospedador.

Se han realizado estudios fenotípicos utilizando cepas deficientes para la síntesis de (p)ppGpp derivadas de aislamientos clínicos y comensales. De esta manera, se ha determinado que el fenotipo hemolítico se encuentra claramente reducido en cepas deficientes para la síntesis de (p)ppGpp. La disección de los mecanismos de regulación implicados nos permite concluir que el (p)ppGpp afecta a la expresión transcripcional del operón *hlyII* de la cepa uropatógena J96. La citada regulación tiene lugar en una secuencia promotora identificada que localiza en posición -354 respecto al ATG de *hlyC*, el primer gen del operón hemolítico.

La inducción de los niveles de (p)ppGpp intracelulares puede considerarse como una señal para que se incremente la expresión de determinados genes, como el de la  $\alpha$ -hemolisina, lo que hace que aumente la supervivencia de la bacteria en un ambiente hostil como es el interior del organismo hospedador.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.4. - 18.15 H.**

**Represión de un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ :  
AtzR lo hace a su manera**

Odil Porrúa, Eduardo Santero, Victoria Shingler y Fernando Govantes\*  
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de  
Olavide/CSIC. Carretera de Utrera, Km. 1, 41013, Sevilla. \*Correo  
electrónico: fgovrom@upo.es

Los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  están obligatoriamente sujetos a control positivo debido a la incapacidad de la ARN polimerasa cargada con  $\square^{54}$  ( $E\text{-}\sigma^{54}$ ) de llevar a cabo la isomerización a complejo abierto. La activación de promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  suele ocurrir por un mecanismo conservado que implica la unión del activador a un sitio lejano (>100 pb) y su interacción con  $E\text{-}\sigma^{54}$  mediante la formación de un lazo en el ADN. Un número pequeño de promotores de esta familia están sujetos a control negativo, que en todos los casos conocidos opera impidiendo la interacción productiva del activador con  $E\text{-}\sigma^{54}$  (anti-activación).

El regulador transcripcional tipo LysR AtzR es responsable de la activación del operón *atzDEF* que codifica las enzimas necesarias para la conversión de ácido cianúrico en dióxido de carbono y amonio en *Pseudomonas* sp. ADP. El gen *atzR* es transcrito desde un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ , que es activado por NtrC en condiciones de limitación de nitrógeno y reprimido por su propio producto génico, AtzR. Hemos utilizado una combinación de análisis de la expresión génica *in vivo*, ensayos de unión proteína-ADN y transcripción *in vitro* para caracterizar los mecanismos implicados en la regulación de *PatzR*. Nuestros resultados indican que (i) La región promotora de *atzR* carece de sitios de unión de NtrC; (ii) NtrC activa a *PatzR* sin necesidad de interaccionar de forma específica con la región promotora; (iii) La región promotora de *atzR* presenta un sitio de unión de AtzR que solapa con el promotor *PatzR*, y (iv) AtzR compite con la ARN polimerasa por la unión al ADN, disminuyendo la tasa de ocupación del promotor e impidiendo así la transcripción. Estos resultados subrayan la idea de que AtzR es un regulador versátil, capaz de activar un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  (*PatzDEF*) y de reprimir dos promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  (*PatzR* y *Porf98*) mediante mecanismos completamente diferentes (ver la comunicación presentada por Ana Platero en esta misma reunión)

Miercoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.5. - 18.30 H.**

**Análisis de expresión del operón *gid* implicado en la modificación de RNA en *Escherichia coli***

Autores: Alfonso Benítez-Páez y M<sup>a</sup> Eugenia Armengod‡

**Laboratorio de Genética Molecular. Centro de Investigaciones Príncipe Felipe**

‡ Correspondencia a [armengod@cipf.es](mailto:armengod@cipf.es) o [abenitez@cipf.es](mailto:abenitez@cipf.es)

Los genes *gidA* y *gidB* están dispuestos en forma de operón y son adyacentes al origen de replicación (*oriC*) en un gran número de genomas microbianos. Las proteínas que codifican, GidA (actualmente MnmG) y GidB (actualmente RsmG), están implicadas en la modificación de tRNA y rRNA, respectivamente. Los mutantes *gidA* presentan un fenotipo pleiotrópico que afecta a diversos caracteres (crecimiento celular, resistencia a pH, virulencia, etc), todos ellos dependientes del control traduccional en el cual participa GidA. Por otra parte, en los mutantes nulos para *gidB* no se aprecia un fenotipo que directamente afecte el crecimiento celular pero si un fenotipo de resistencia a estreptomycinina causado por la ausencia de la modificación m<sup>7</sup>G en el rRNA 16S (posición G527 en *Escherichia coli*). El agrupamiento de ambos genes (cuyos productos, si bien actúan sobre RNA, lo hacen sobre substratos diferentes) y su particular localización junto a *oriC* llevan a preguntarse por la razón evolutiva de esta estructura genómica. Aunque estudios previos mostraron la relación entre la transcripción de *oriC* y *gidA* con el proceso de replicación cromosómico, poco se sabe sobre los mecanismos específicos que controlan la síntesis de las proteínas GidA y GidB. A través de la metodología empleada en este estudio hemos podido obtener información relevante sobre la regulación de la expresión de los genes *gid* tanto a nivel transcripcional como traduccional. Nuestros resultados muestran que: i) La expresión transcripcional de *gidB* viene dada, en su gran mayoría, por los mismos elementos reguladores que controlan la expresión de *gidA*; sin embargo, tenemos datos que sugieren un cierto grado de independencia transcripcional a partir de secuencias que actuarían como promotores autónomos; ii) los niveles de mRNA cuantificados para cada gen muestran un mayor número de transcritos de *gidB*. Tal diferencia no pudo ser únicamente explicada por la presencia de un promotor propio para *gidB* dada su debilidad. En consecuencia, proponemos un mecanismo de procesamiento y degradación específico del mRNA de *gidA*; y iii) GidA tiene una vida media que es al menos 2 veces mayor que la de GidB. Este complicado entramado de mecanismos reguladores podría responder a un control específico por parte de la célula para responder a variaciones en las condiciones de crecimiento.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.6. - 18.45 H.**

**NrdR, un nuevo regulador transcripcional para los genes que codifican para las ribonucleotidil reductasas**

Inna Grinberg<sup>1</sup>, Britt-Marie Sjöberg<sup>2</sup>, Ilya Borovok<sup>1</sup>, Yair Ahanowitz<sup>1</sup>, Gerard Cohen<sup>1</sup>, Eduard Torrents<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, 69978, Israel; <sup>2</sup>Department of Molecular Biology & Functional Genomics, Stockholm University, SE-10691 Stockholm, Sweden; <sup>3</sup>Biología Celular. Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC). Edificio Hélix. Parque Científico de Barcelona. Baldiri Reixac 15-21. 08028 Barcelona, Spain. (etorrents@pcb.ub.es).

Durante el ciclo vital de un organismo o durante el proceso de infección una determinada bacteria necesita multiplicarse (proceso de división celular), por lo tanto esta requiere de la síntesis activa del ADN. La enzima principal y única responsable para suministrar los cuatro precursores (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) para la síntesis y reparación del ADN es la RiboNucleotidil Reductasa (RNR). Hasta el momento se conocen tres clases diferentes de RNR (clase I, II y III) clasificándose en función de su estructura, metal, radical y cofactores necesarios para la catálisis. La clase I se subdivide en Ia y Ib. En general las RNR de clase Ia se encuentran en las células eucarióticas, virus y en algunos microorganismos, en cambio las RNR de clase II i III sólo se encuentran en arqueobacterias y eubacterias, y finalmente la clase Ib se restringe al dominio eubacteria.

*Escherichia coli* codifica en su genoma para tres clases distintas de RNR (Ia, Ib y III) codificadas por los genes *nrdAB*, *nrdEF* y *nrdDG* respectivamente. A pesar de la gran cantidad de estudios desarrollados a nivel bioquímico en estas enzimas se desconocen los mecanismos moleculares que gobiernan su expresión. Además la función de la clase Ib en este microorganismo es del todo desconocida.

En este trabajo mostramos por primera vez que un factor transcripcional, denominado en este trabajo NrdR, es capaz de regular diferencialmente y coordinadamente la expresión de los tres genes *nrd*. NrdR es una proteína con dos dominios estructurales, uno de unión al ADN y un dominio sensor "ATP-cone" con capacidad de unir ATP/dATP. Esta proteína se une específicamente a ciertas regiones consenso de los genes *nrd* denominadas "nrdR-box".

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.7. - 19.00 H.**

**Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*:  
La imprescindible integración de mecanismos  
complejos para la obtención de un resultado  
aparentemente sencillo.**

Carmen Palomino, Sonia Gullón, Daniel Rozas y Rafael P. Mellado  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). c/Darwin 3. Campus de la  
Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid. España. E-mail:  
rpmellado@cnb.csic.es.

*Streptomyces lividans* es una bacteria del suelo Gram positiva cuyo genoma tiene un alto contenido en G+C, que es ampliamente utilizada para la producción industrial de enzimas degradativas extracelulares. En nuestro laboratorio hemos identificado en *S. lividans* cuatro genes que determinan la síntesis de cuatro peptidasas señal tipo I funcionales (*sipW-Z*). Análisis proteómico del secretoma de *S. lividans* nos ha permitido establecer que SipY es la peptidasa señal mayoritaria y que su función puede ser complementada por cualquiera de las otras tres peptidasas minoritarias demostrándose así la inexistencia de especificidad de sustrato entre las diferentes peptidasas señal.

La estirpe deficiente en SipY presenta un fenotipo de secreción deficiente como resultado de un bloqueo temporal del complejo translocasa cuando proteínas extracelulares modelo se sobreproducen en *S. lividans*. Este fenómeno nos ha permitido determinar por estudios de coimmunoprecipitación de fracciones de membrana, que, en ausencia de un chaperon equivalente a SecB, la proteína Ffh de la SRP, la proteína receptora de la SRP, FtsY, la ATPasa del sistema de translocación, SecA y la proteína modelo sobreproducida,  $\alpha$ -amylasa, pueden coimmunoprecipitar juntas, de forma que la SRP puede transportar proteínas secretables además de las no secretables a la membrana de *S. lividans*.

Estirpes deficientes en SipY y en la proteína SecG del complejo translocasa comparten los fenotipos de deficiencia en secreción y retraso en la esporulación. Análisis transcripcional usando microarrays de ADN de genoma completo, RT-PCR cuantitativa y electroforesis bidimensional de proteínas extracelulares, han permitido identificar los genes involucrados en la respuesta celular al estrés inducido por la deficiencia en translocación de proteínas extracelulares (EPTS).

Adicionalmente, estudios genómicos han permitido identificar un sistema de dos componentes *degS-degU* e inferir que DegU regula la expresión de genes que determinan la síntesis de proteínas extracelulares, incluyendo la proteasa extracelular mayoritaria, así como de genes involucrados en la producción de antibióticos y de compuestos del metabolismo secundario.

Miércoles 17 de Septiembre de 2008

**SESIÓN IV:  
REGULACIÓN GÉNICA**

Moderador: Manuel A. Rodríguez Iglesias, Universidad de Cádiz

**O.IV.8. - 19.15 H.**

**Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*:  
genes estructurales y regulación**

E.J. Bedmar, E. Robles y M.J. Delgado

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos,  
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado Postal 419, 18080  
Granada. E-mail: ejbedmar@eez.csic.es

La desnitrificación es un proceso alternativo de conservación de la energía por el que, en ausencia de oxígeno, el nitrato o el nitrito se reducen a dinitrógeno molecular mediante la siguiente secuencia de reacciones:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ . La oxidación de los óxidos de nitrógeno está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a las bacterias desnitrificantes vivir en condiciones limitantes de oxígeno. En *Bradyrhizobium japonicum*, el microsimbionte de la soja, la desnitrificación ocurre por la actuación secuencial de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos) codificadas, respectivamente, por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLYX* (Bedmar et al. 2005; Delgado et al. 2007). En *B. japonicum*, la máxima expresión de los genes de la desnitrificación requiere, de forma simultánea, la ausencia de oxígeno y la presencia de nitrato, o de un óxido de nitrógeno derivado de él (NOx). En condiciones limitantes de oxígeno, la expresión de los genes *nap*, *nir* y *nor* está controlada por las proteínas FixLJ-FixK<sub>2</sub>. FixLJ es un sistema regulador de dos componentes en el que FixL es una hemoproteína capaz de reconocer la concentración intracelular de oxígeno y activar el gen *fixJ*, cuyo producto es un regulador de respuesta que activa, a su vez, al gen *fixK<sub>2</sub>*. La proteína FixK<sub>2</sub> es un activador transcripcional de la familia FNR/CRP que se une a las denominadas cajas de anaerobiosis presentes en la región promotora de los genes de la desnitrificación y activa su transcripción. Por otra parte, en presencia de nitrato, el regulador transcripcional NnrR (Mesa et al. 2003) es necesario para la máxima expresión de los genes *norC*, pero no interviene en la de los genes *nap* y *nir*. En conjunto, nuestros datos sugieren la existencia en *B. japonicum* de dos circuitos de regulación, uno mediado por NO y otro por nitrato/nitrito.

S. Mesa, EJ Bedmar, A. Chanfon, H. Hennecke y HM Fischer. 2003. J. Bact. 185

EJ Bedmar, EF Robles y MJ. Delgado. 2005. Biochem. Soc. Transac. 35: 11-16

MJ. Delgado, S. Casella y E.J. Bedmar: 2007. Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. En: Biology of the Nitrogen Cycle. Eds. H. Bothe, S.J. Ferguson and W.E. Newton. Elsevier. pp. 83-91.

Este trabajo se ha subvencionado con fondos del Proyecto CGL2006-06870/BOS del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). También se agradece la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación BIO-275.



Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.1. - 09.00 H.**

**Identificación de un nuevo gen *qnr* cromosómico en *Stenotrophomonas maltophilia*, *Smqnr*, implicado en resistencia a quinolonas**

M. B. Sánchez<sup>1</sup>, A. Hernández<sup>1</sup>, J. M. Rodríguez-Martínez<sup>2</sup>, L. Martínez-Martínez<sup>3</sup>, Martínez, J. L. <sup>1</sup>. E-mail: bsanchez@cnb.csic.es

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla y Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla, <sup>3</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Santander.

*Stenotrophomonas maltophilia* es un patógeno oportunista intrínsecamente resistente a varios antibióticos. El número de cepas de *S. maltophilia* resistentes a quinolonas ha aumentado en los últimos años, no encontrándose asociada esta resistencia a mutaciones en los genes codificantes de topoisomerasas. Se han propuesto dos mecanismos para explicar dicha resistencia: cambios en la permeabilidad de la membrana y actividad de bombas de expulsión. Sin embargo se ignora si estos mecanismos son suficientes para explicar los bajos niveles de sensibilidad en estas cepas. En los últimos años se han identificado en diferentes patógenos bacterianos un nuevo gen plasmídico, *qnr*, implicado en resistencia a quinolonas (1, 4). Este gen ha sido posteriormente identificado en el genoma de diversos microorganismos como *Shewanella algae* y varias especies de *Vibrionaceae* (2, 3).

Un análisis de los genomas secuenciados de dos cepas de *S. maltophilia* (K279a y R551-3), permitió identificar la presencia de un posible gen *qnr*, *Smqnr*, en este microorganismo. La proteína SmQnr de *S. maltophilia* K279a posee un porcentaje de identidad de 38%, 59%, 38% y 41% con otras Qnr descritas (QnrA1, QnrB2, QnrS2 y VvQnr respectivamente). Se amplificaron, secuenciaron y clonaron en pGEMT distintos alelos *qnr* de diferentes cepas de *S. maltophilia*, tanto de origen clínico como ambiental. El estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a diferentes quinolonas de la cepa *E. coli* KZM120 ( $\Delta$ acrAB) conteniendo los diferentes alelos del gen *qnr* obtenidos, indica que este gen proporciona resistencia a fluoroquinolonas pero no al ácido nalidíxico. Los niveles de resistencia a diversas fluoroquinolonas variaban, desde 2 a 32 veces la CMI del control, en función de la secuencia de aminoácidos, y los niveles de expresión de la proteína

Qnr. Un mutante derivado de la cepa *S. maltophilia* D457, deficiente en *qnr*, mostró mayor sensibilidad a quinolonas, lo que indica que *qnr* está implicado en la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a estos antibióticos.

1. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-9.
2. **Poirel, L., A. Liard, J. M. Rodriguez-Martinez, and P. Nordmann.** 2005. Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* **56**:1118-21.
3. **Poirel, L., J. M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard, and P. Nordmann.** 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3523-5.
4. **Tran, J. H., and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5638-42.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.2. - 09.15 H.**

**Caracterización del gen *igaA* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

C.B. García-Calderón, J. Casadesús, F. Ramos-Morales  
*Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla.*  
claragarcia@us.es

El gen *igaA* de *Salmonella enterica* (Cano et al., 2001) es un gen esencial que codifica una proteína de membrana y que posee homólogos en *Escherichia coli* (*yrfF*) y *Proteus mirabilis* (*umoB*). El gen *igaA* se identificó a partir de un mutante puntual viable capaz de proliferar en fibroblastos en cultivo: de ahí que recibiera el nombre de *igaA* (“intracellular growth attenuator”). Este mutante era, además, mucoso y presentaba defectos en virulencia (Cano et al., 2001) y en movilidad (Cano et al., 2002). Se postula que el producto del gen *igaA* ejerce un efecto negativo, a nivel postraducciona, sobre la ruta de señalización RcsC-RcsD-RcsB (Domínguez-Bernal et al. 2004), ruta que está implicada en regulación de la virulencia (García-Calderón et al. 2005). Experimentos de RT-PCR indican que *igaA* es el primer gen de un operón al que pertenecen también los genes *yrfG*, *yrfH* e *yrfI*. Hemos definido el punto de inicio de la transcripción en este operón y hemos localizado posibles secuencias consenso para un promotor dependiente de  $\sigma 70$ . Los datos experimentales apoyan la dependencia de  $\sigma 70$ . Por último, una mutagénesis con el transposón defectivo Tn10dTc sobre una estirpe portadora de una fusión *igaA::lacZ* nos ha permitido identificar reguladores de la expresión de *igaA*.

1. **Cano, D. A., G. Domínguez-Bernal, A. Tierrez, F. García-Del Portillo and J. Casadesús.** 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. *Genetics* **162**:1513-1523.
2. **Cano, D. A., M. Martínez-Moya, M. G. Pucciarelli, E. A. Groisman, J. Casadesús and F. García-Del Portillo.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**:6463-6474.
3. **Domínguez-Bernal, G., M. G. Pucciarelli, F. Ramos-Morales, M. García-Quintanilla, D. A. Cano, J. Casadesús and F. Garcia-del Portillo.** 2004. Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for *Salmonella* virulence. *Mol Microbiol* **53**:1437-1449.
4. **García-Calderón, C. B., M. García-Quintanilla, J. Casadesús and F. Ramos-Morales.** 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica* *rscC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**:579-588.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.3. - 09.30 H.**

**Caracterización funcional de la proteína represora  
del sistema RcsCDB.**

Fátima García-Quintanilla, Miguel A. De Pedro y Francisco García-del Portillo. Departamento de Biotecnología Microbiana. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Darwin, 3. 28049. Madrid. [figarcia@cnb.csic.es](mailto:figarcia@cnb.csic.es)

La proteína IgaA se identificó en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium como una proteína de membrana interna. Ésta actúa como un represor del sistema de señalización RcsCDB. Dicho sistema se activa en respuesta a estrés en peptidoglicano y contribuye a la resistencia a antibióticos. El tratamiento de *S. typhimurium* con amdinocilina (mecilinam), un antibiótico  $\beta$ -lactámico inhibidor de la proteína PBP2, permite obtener clones mucosos resistentes, algunos de los cuales mapean su mutación en el locus *igaA*. Estos datos sugieren una posible relación entre la síntesis de peptidoglicano y la actividad de IgaA.

El peptidoglicano es un componente esencial para la bacteria que asegura su integridad estructural. También contribuye al mantenimiento de la forma celular y constituye una plataforma para el anclaje de otros componentes de la envuelta celular como proteínas o polisacáridos. Aunque la proteína IgaA se localiza en la membrana interna, una pequeña fracción de ésta parece estar asociada a peptidoglicano. Esta asociación se observa en la estirpe silvestre y en una estirpe *igaA1*, que expresa una proteína IgaA con una mutación puntual R188H, cuando se crecen en medio rico. Sin embargo, en medio mínimo esta mutación en IgaA afecta a su anclaje a peptidoglicano. En un estudio previo se ha descrito que dicha mutación confiere a la bacteria un fenotipo esférico cuando ésta crece en medio mínimo. Para determinar por tanto qué cambios en la composición del peptidoglicano, provocados o no por IgaA, afectan al anclaje de esta proteína al mismo, se compararon mediante HPLC muestras de peptidoglicano de las cepas silvestre y mutante (R188H) crecidas en medio mínimo y medio rico. Los resultados preliminares no muestran grandes diferencias en la composición del peptidoglicano entre las estirpes cuando crecen en medios similares. Se observan sin embargo cambios en la composición y longitud media de las cadenas cuando las estirpes se crecen en distintos medios. Analizando muestras tratadas o no con amdinocilina, tratamos de completar nuestros datos y determinar el papel de IgaA en la regulación de la síntesis o composición del peptidoglicano.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.4. - 09.45 H.**

***Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para la caracterización de la proteína efectora SteC de *Salmonella Typhimurium***

P. Fernández-Piñar\*, A. Alemán, R. Rotger, M. Molina, H. Martín  
*Departamento de Microbiología II, Universidad Complutense de Madrid*  
pfpinar@farm.ucm.es

Numerosas proteínas efectoras bacterianas actúan en la célula hospedadora sobre rutas de señalización mediadas por MAP kinasas y/o sobre el citoesqueleto. Dado que dichas rutas de señalización están conservadas en células eucariotas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser un buen modelo para el análisis funcional de estos efectores bacterianos. Para la identificación y caracterización de nuevas proteínas efectoras de *Salmonella Typhimurium*, se construyó una genoteca de este microorganismo en un plásmido de expresión bajo el control del promotor inducible *GAL1* y fue transformada en levadura, obteniéndose clones de DNA bacteriano que producían inhibición del crecimiento al ser sobreexpresados.

Uno de los genes identificados fue SteC, un efector secretado por el sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella*. La inhibición del crecimiento se debe a la región amino terminal de la proteína, y tanto la expresión de SteC como de su región amino terminal produce inhibición de la señalización a través de la ruta de apareamiento mediada por las MAP kinasas Kss1 y Fus3 a nivel de Gpa1, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica de la ruta. Dicha actividad de SteC en levadura requiere la presencia de una proteína Gpa1 funcional y capaz de unirse a proteínas RGS. Además, SteC interacciona con Gpa1. Todo ello se debe posiblemente a la presencia de un dominio de homología con proteínas reguladoras negativas de la señalización por proteínas G (RGS) en la región amino terminal de SteC, de modo que actuaría sobre Gpa1 con una actividad GAP (*GTPase activating protein*), de manera similar a la proteína RGS de *S. cerevisiae* Sst2. De hecho, SteC es capaz de disminuir los niveles de señalización elevados producidos por la falta de Sst2. Por otra parte, el estudio de la localización celular de la proteína bacteriana expresada en levadura ha demostrado que SteC y su región amino terminal se localizan en la periferia celular, presumiblemente en membrana plasmática, y en membranas internas de las células de levadura.

Este trabajo está subvencionado con los proyectos S-SAL-0246-2006 de la Comunidad Autónoma de Madrid y el proyecto BIO2007-67299 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.5. - 10.00 H.**

**El Sistema de Dos Componentes PhoPR de *Mycobacterium tuberculosis* está positivamente autorregulado en la cepa virulenta H37Rv**

Jesús Gonzalo-Asensio (jagonzal@unizar.es)<sup>1,4</sup>, Carlos Y. Soto (cysotoo@unal.edu.co)<sup>2</sup>, Ainhoa Arbués (ainhoaar@unizar.es)<sup>1,4</sup>, M. Carmen Menéndez (carmen.menendez@uam.es)<sup>3</sup>, María J. García (mariaj.garcia@uam.es)<sup>3</sup>, Carlos Martín (carlos@unizar.es)<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza; Zaragoza, España. <sup>2</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia; Bogotá. Colombia. <sup>3</sup>Departamento de Medicina Preventiva. Universidad Autónoma de Madrid; Madrid, España. <sup>4</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias, España

Antecedentes: La cepa avirulenta H37Ra es una variante isogénica de H37Rv, siendo esta última la cepa virulenta de *M. tuberculosis* utilizada como referencia. Estudios recientes han demostrado que una mutación puntual en el dominio de unión al DNA de PhoP contribuye considerablemente a la atenuación de H37Ra (Chesne-Seck *et al.*, J. Bacteriol 2008; Frigui *et al.*, PLoS Pathog 2008; Lee *et al.*, Cell Host Microbe 2008). Por otra parte, se ha demostrado que el gen *phoP* de H37Ra está autorregulado negativamente mediante unión directa de la proteína a su propio promotor (Gupta *et al.*, FEBS Lett 2006). Estos hallazgos nos llevaron a estudiar si la mutación descrita anteriormente afecta a la autorregulación de PhoP.

Resultados: En este trabajo purificamos la proteína PhoP de H37Rv para identificar el sitio exacto de unión a su propio promotor mediante ensayos de movilidad en gel y “footprinting” con DNasa I. Nuestros resultados demuestran que PhoP se une a una región similar a la anteriormente descrita en H37Ra. Sin embargo, contrariamente a la autorregulación negativa de *phoP* descrita en la cepa H37Ra, nuestros experimentos utilizando fusiones del promotor de *phoP* con el gen *lacZ* demuestran que dicho gen está autorregulado positivamente en H37Rv. En este trabajo también demostramos que los genes del sistema de dos componentes *phoPR* se transcriben juntos. Además, experimentos de Real Time-PCR muestran que el gen *phoR* está posiblemente regulado por PhoP.

Conclusiones: Contrariamente a lo que se ha descrito en la cepa avirulenta H37Ra, en este trabajo demostramos que PhoP está autorregulado positivamente en la cepa virulenta H37Rv. Dadas las implicaciones del gen *phoP* en la virulencia de *M. tuberculosis*, este hallazgo podría explicar las bases de la atenuación de la cepa H37Ra.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.6. - 10.15 H.**

**Implicación de la secuencia de inserción IS6110  
en la virulencia de *M. tuberculosis***

H. Alonso, C. Martín, S. Samper e I. Otal

*Grupo de Genética de Micobacterias*, Universidad de Zaragoza y CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Calle Domingo Miral s/n, 50009-Zaragoza. [henar@unizar.es](mailto:henar@unizar.es), [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es), [samper@unizar.es](mailto:samper@unizar.es) y [otali@unizar.es](mailto:otali@unizar.es)

La secuencia de inserción IS6110, específica del complejo *M. tuberculosis*, se encuentra de forma variable en número y posición en el genoma, generando un alto grado de polimorfismo entre cepas. Esta secuencia podría estar implicada en la alta capacidad de transmisión de algunas cepas. La inserción de IS6110 en regiones codificantes puede llevar a la inactivación de algunos genes y, por otra parte, se ha demostrado que IS6110 puede incrementar la expresión de genes adyacentes generando nuevas secuencias promotoras.<sup>1,2</sup> La familia Beijing, predominante en Asia, es emergente en Europa. Una de las características del genotipo de esta familia es que contienen un número elevado de copias de la secuencia de inserción IS6110.

La familia W-Beijing está implicada en brotes que pueden ser debidos a ventajas genéticas que modifican las respuestas del huésped o inducen algunos factores de virulencia. Estamos estudiando la cepa de *M. tuberculosis* GC1237, causante de un brote de tuberculosis en Gran Canaria, que se encuentra dentro de la familia Beijing.<sup>3</sup> Uno de los objetivos de este estudio fue la localización de las secuencias de inserción IS6110 en el genoma de la cepa GC1237. Para ello, se empleó la técnica de LM-PCR (Ligation mediated PCR) que permite amplificar las regiones flanqueantes a la secuencia de inserción IS6110. Los fragmentos amplificados se secuenciaron y posteriormente se compararon con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Esto permitió identificar la posición y la orientación de cada copia de la secuencia de inserción IS6110 en el genoma de GC1237. Algunas de las secuencias de inserción localizadas se encuentran en dirección y posición para actuar como promotores de los genes flanqueantes, estamos realizando estudios de RT-PCR para analizar el posible efecto de la secuencia de inserción IS6110 en dichos genes.

1- Soto CY et al., 2004. Clin Microbiol.; 42:212-9.

2- Safi H, et al., 2004. Mol. Microbiol. 2004 May; 52(4): 999-1012.

3- Caminero J. A., et al. 2001. Am J Respi Crit Care Med. 164: 1165-1170.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.7. - 10.30 H.**

**Caracterización funcional de Lmo1413, una proteína lpxtg de superficie de *L. monocytogenes***

Valentina D'Orazio, Carlos Sánchez-Monforte, Francisco García-del Portillo and M. Graciela Pucciarelli.

Departamento de Biotecnología Microbiana. Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Darwin 3, 28049 Madrid. vdorazio@cnb.csic.es

Una de las familias de proteínas de superficie de *L. monocytogenes* mejor caracterizadas es aquella que engloba proteínas unidas covalentemente al peptidoglicano. Una característica común a estas proteínas, presente en la gran mayoría de bacterias Gram-positivas, es la presencia en su extremo C-terminal de un motivo 'LPTXG' reconocido y procesado por un enzima denominada sortasa A (Srt A).

Los estudios de proteómica sin-gel realizados por nuestro grupo demostraron la presencia de 13 proteínas LPXTG en el peptidoglicano de *L. monocytogenes* cuando la bacteria era crecida en medio rico. Este número representa aproximadamente un tercio de las proteínas totales de esta familia predichas en el genoma de *L. monocytogenes*. Seis de ellas están ausentes en especies no patógenas del género *Listeria*, lo que les hace ser considerados como posibles factores de virulencia.

Nuestro proyecto se centra en el estudio funcional de una de estas proteínas, Lmo1413. Esta proteína LPXTG contiene en tandem tres dominios MucBP (de unión a mucina). Hemos generado un mutante defectivo en Lmo1413, con el que hemos realizado estudios de invasión y proliferación intracelular en líneas celulares epiteliales y macrófagos. Se han realizado también ensayos *in vitro* con proteína Lmo1413 purificada con la finalidad de evaluar la capacidad de unión de Lmo1413 a mucina purificada. Los resultados preliminares sugieren que Lmo1413 puede interaccionar con la compleja mezcla de glicoproteínas secretadas que forma la mucina. Por otro lado, la ausencia de Lmo1413 parece afectar de manera muy específica la expresión de las otras proteínas LPXTG que contienen dominios de tipo MucBP. Esta observación apoyaría la existencia de mecanismos de compensación de déficit en proteínas concretas en la pared celulares de esta bacteria. Actualmente estamos efectuando también estudios en modelos *in vivo* de ratones para dilucidar el posible papel de Lmo1413 en el proceso infectivo.



Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN V:  
PATOGENESIS MOLECULAR I**

Moderador: José A. Bengoechea, Fundación Caubet-Cimera,  
Palma de Mallorca

**O.V.8. - 10.45 H.**

**Estudio del Transcriptoma de las proteínas GGDEF  
de *Staphylococcus aureus***

Nekane Merino, Gabriel Gallo, Marta Vergara, Jaione Valle, Cristina Solano, Cristina Latasa, Begoña García, Alejandro Toledo-Arana, José R. Penadés e Iñigo Lasa

Laboratorio de Biofilms Microbianos. Instituto de Agrobiotecnología,  
Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra. Pamplona.

Las proteínas GGDEF/EAL representan un nuevo sistema de transducción de señal exclusivo de bacterias, que utiliza el c-di-GMP como transmisor secundario de señales. Los niveles de c-di-GMP en la bacteria dependen de su síntesis por la actividad diguanilato ciclasa del dominio GGDEF y su degradación por la actividad fosfodiesterasa del dominio EAL. La regulación por c-di-GMP ha sido relacionada con distintos procesos celulares: diferenciación celular, expresión de factores de virulencia, movilidad, síntesis de exopolisacáridos y en el proceso de formación de biofilm. El genoma de *S. aureus* codifica para una proteína con dominio GGDEF conservado (SA0701) y para otra proteína con un dominio GGDEF altamente modificado (SA0013). Dentro de un estudio global dedicado a analizar la función de estas proteínas en la formación de biofilm de *Staphylococcus*, hemos construido mutantes simples y mutantes dobles que carecen de estas proteínas en dos cepas de *S. aureus* genéticamente no relacionadas y hemos analizado distintos fenotipos relacionados con el comportamiento multicelular. Para conocer como afecta la ausencia de estas proteínas al transcriptoma de la bacteria, hemos hibridado arrays comerciales de affymetrix y comparado el transcriptoma de los mutantes simples y el mutante doble con la bacteria salvaje. Los resultados obtenidos muestran que cada proteína regula un grupo particular de genes aunque existe un solapamiento significativo en los regulones de ambos genes. En conjunto, estos resultados indican que en *S. aureus*, las proteínas con dominio GGDEF SA0701 y SA0013 regulan importantes procesos biológicos, algunos de ellos al menos a nivel transcripcional.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN VI:  
PATOGENESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**O.VI.1. - 11.30 H.**

**Subversión del sistema inmune innato por  
*Klebsiella pneumoniae*.**

José Antonio Bengoechea

Programa Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA

Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias  
(CiberRes). Área de Microbiología, Universitat de les Illes Balears

Palma Mallorca. E-mail: [bengoechea@caubet-cimera.es](mailto:bengoechea@caubet-cimera.es)

El sistema inmune innato es la primera barrera defensiva frente a las infecciones. Uno de los principales mecanismos defensivos es la inflamación caracterizada por elevados niveles locales de citoquinas y quimioquinas así como por el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de infección. La inducción de estas respuestas se desencadena tras el reconocimiento de estructuras expresadas por los patógenos, los denominados PAMPs (del inglés “pathogen-associated molecular patterns”) por los receptores PRR (del inglés “pattern recognition receptors”). De éstos los más estudiados son los receptores “Toll-like” (TLRs). Tras el reconocimiento de diversos PAMPs, los TLRs activan la expresión de las vías de señalación intracelulares del factor NF- $\kappa$ B y de las MAP Kinasas las cuáles son imprescindibles para la expresión de diversos mecanismos defensivos. *Klebsiella pneumoniae* es un importante patógeno humano causante de neumonías e infecciones urinarias. La morbilidad de las infecciones por este patógeno se ha incrementado debido a la mayor frecuencia con que se aíslan cepas multirresistentes a los antibióticos. Sin embargo, los mecanismos de patogenicidad de *K. pneumoniae* son todavía poco conocidos.

Los resultados de nuestro grupo de investigación demuestran que una de las estrategias de patogenicidad empleadas por *K. pneumoniae* para sobrevivir y multiplicarse es la subversión del sistema inmune innato. Así estudios de genómica funcional muestran que *K. pneumoniae* no sólo no induce una respuesta inflamatoria sino que también es capaz de bloquearla. Concretamente, *K. pneumoniae* impide la activación de las vías de NF- $\kappa$ B y de las MAP Kinasas con la consiguiente reducción en la secreción de quimioquinas y péptidos antimicrobianos. Para ello, *K. pneumoniae* activa la expresión de varios sistemas anti-inflamatorios que la célula emplea para controlar las respuestas inflamatorias. En este proceso desempeñan un papel importante los TLRs 2 y 4 ya que su inhibición mediante RNAi impide la activación de los citados sistemas. Nuestros resultados indican que diversos factores bacterianos intervienen en el proceso pero destacan sobre ellos el polisacárido capsular, el LPS y la proteína OmpA.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN VI:  
PATOGENESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**O.VI.2. - 11.45 H.**

**Estudio de los mecanismos de virulencia del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipable: persistiendo en un ambiente estéril?**

Junkal Garmendia<sup>1,2,3</sup>; garmendia@caubet-cimera.es

<sup>1</sup>Fundación Caubet-Cimera, Programa de Infección e Inmunidad, recinto Hospital Joan March, carretera Sóller, km 12, 07110, Bunyola, Mallorca; <sup>2</sup>Ciber de Enfermedades Respiratorias; <sup>3</sup>Departamento Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Illes Balears, carretera Valldemossa, km 7.5, 07122, Palma de Mallorca

El pulmón es una de las mayores superficies corporales en contacto con el exterior y, por tanto, una de las principales vías de entrada de microorganismos. Sin embargo, es un órgano estéril, lo que indica la eficacia de sus mecanismos defensivos. La inmunidad innata del pulmón comprende barreras mecánicas, proteínas en el fluido en contacto con el epitelio pulmonar, citoquinas, células dendríticas y macrófagos alveolares.

El tabaquismo es uno de los principales factores de riesgo de las infecciones pulmonares, a través de una alteración de la capacidad innata del pulmón para eliminar patógenos eficazmente. Las alteraciones provocadas por la exposición continuada al tabaco facilitan el acceso de microorganismos al tracto respiratorio inferior, que en fumadores se encuentra persistentemente colonizado por patógenos bacterianos Gram negativos. *Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT) es uno de los patógenos oportunistas más frecuentemente aislado en pacientes respiratorios crónicos, responsable de neumonía, bronquitis y otitis media, entre otros. En nuestro laboratorio, llevamos a cabo una disección de los mecanismos moleculares y celulares que determinan la interacción de HiNT con el epitelio pulmonar humano y con el macrófago alveolar, así como de los factores de virulencia utilizados por este patógeno. Asimismo, está siendo analizada la modulación de la interacción huésped-patógeno debido a la exposición al humo de tabaco. Nuestro trabajo indica que *Haemophilus influenzae* presenta una fase de vida intracelular persistente en epitelio pulmonar humano. El patógeno persiste intracelularmente en estado viable en un compartimento vacuolar de naturaleza ácida. Por otra parte, si bien el macrófago alveolar sano elimina de forma eficaz la infección por NTHi, la capacidad de macrófagos alveolares extraídos de lavado broncoalveolar (BAL) de individuos fumadores para fagocitar *Haemophilus influenzae* está significativamente disminuida respecto a la de individuos no fumadores.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN VI:  
PATOGENESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**O.VI.3. - 12.00 H.**

**Virulencia de *Brucella*: genes potencialmente implicados en el control del tráfico intracelular**

Zúñiga-Ripa, A.\*; Iglesias-García, O.; Moriyón, I.; Iriarte, M.

\* *Depto. de Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona, España. azuniga@alumni.unav.es*

Las brucelas son parásitos intracelulares facultativos capaces de replicarse en compartimentos membranosos que no son fusionados con lisosomas, provocando así infecciones crónicas. Esto supone una capacidad para controlar el tráfico intracelular, pero los mecanismos utilizados por *Brucella* para ello son desconocidos.

Las moléculas de fosfatidilinositol (PIP) actúan en el tráfico de membranas regulando la vía fagocítica. El PIP3 sirve para reclutar EEA 1 ("Early Endosome Antigen 1") y la GTPasa Rab7, necesarios para la fusión endosoma-lisosoma y destruir el patógeno. Además, la unión de EEA1 y PIP3 al endosoma podría estar modulada por los niveles de  $Ca^{2+}$ , a su vez críticos para incorporar componentes lisosomales al fagosoma. Por tanto, los PIP son dianas ideales para patógenos intracelulares y la interferencia con los niveles de  $Ca^{2+}$  podrían también afectar al tráfico intracelular.

El genoma de *Brucella* contiene 4 ORFs con motivos de proteínas con actividad inositol fosfatasa y 2 con motivos de unión al  $Ca^{2+}$ . Los resultados preliminares indican que las mutaciones en ORF BAB2\_0522 (PIP fosfatasa) ó BAB1\_1355 (de unión a  $Ca^{2+}$ ), por sí solas, no generan atenuación en el modelo murino. No obstante, debido a su redundancia, estamos construyendo mutantes múltiples en todas ellas y analizando su atenuación.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN VI:  
PATOGENESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**O.VI.4. - 12.15 H.**

**Identificación de un transportador funcional de urea y de un sistema de transporte de níquel en la región ureasa 2 de *Brucella*.**

Sangari, F. J., A. M. Cayón, A. Seoane, y J. M. García Lobo. Departamento de Biología Molecular/IBBTEC. Universidad de Cantabria-CSIC-IDICAN, Santander.

La mayoría de los miembros del género *Brucella* tienen una alta actividad ureasa. La ureasa consiste en un complejo multiprotéico formado por varias subunidades estructurales y otras accesorias, y que requiere la presencia de iones de níquel para su ensamblaje. Todas las especies de *Brucella* secuenciadas hasta el momento tiene no una, sino dos regiones con capacidad de codificar ureasas, pero un análisis mutacional de las mismas demostraba que sólo la ureasa producida por la región *ure1* es activa. Esta ureasa está implicada en la supervivencia de la bacteria a las condiciones de pH ácido observadas en el estómago, y juega un papel importante en la ruta de infección gastrointestinal, que es la más importante en el caso de infecciones humanas. Sin embargo, el alto nivel de conservación de la región *ure2*, y el hecho de que alguno de sus genes se expresaba *in vivo* sugería que dicha región tenía alguna función.

La región *ure2* de *Brucella* presenta una alta homología y sintenia con la región ureasa de *Yersinia*, con un conjunto similar de genes estructurales y accesorios. Este hecho, junto con la ausencia de esta región en otras alfa-proteobacterias, sugiere que estos genes han podido ser adquiridos por transferencia genética horizontal. Mediante un análisis *in silico* y RT-PCR identificamos un conjunto adicional de genes que forman parte del operón ureasa. Estos consisten en un posible transportador de urea, *ureT*, y un transportador de tipo ABC que tiene homología con sistemas de transporte de cobalto tipo *cbiKMQO*. Mutantes en *ureT* y *cbiO*, que codifica para la proteína de unión a ATP del sistema de transporte de metales, demuestran que ambos sistemas son activos en *B. abortus*. La función de UreT es la de transportar urea rápidamente al interior de la bacteria, mientras que el transportador CbiKMQO es necesario para incorporar eficientemente el níquel necesario para la actividad de la ureasa. El resultado de estas dos funciones proporcionadas por la región *ure2* es el incremento de la actividad ureasa, y la rápida incorporación de urea a bajas concentraciones, lo que destaca la importancia de la ruta gastrointestinal para la patogénesis de *Brucella*.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN VI:  
PATOGENESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**O.VI.5. - 12.30 H.**

**SmrA, una nueva bomba de resistencia a fluoroquinolonas en *Streptococcus suis*.**

J.A. Escudero, A. San Millán, B. Gutierrez. L. Hidalgo, A. G. De la Campa y B. Gonzalez-Zorn

*Streptococcus suis* es un patógeno de distribución mundial responsable de brotes caracterizados por una elevada mortalidad. La resistencia a fluoroquinolonas en esta especie se debe a la acumulación de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* y a un fenómeno de eflujo del antibiótico (Escudero *et al.* AAC 2007). En gram positivos se conocen varias bombas capaces de expulsar fluoroquinolonas hidrofílicas del citoplasma, como NorA B y C de *Staphylococcus aureus*, Bml y Blt del género *Bacillus* o PmrA de *S. pneumoniae*. Todas ellas pertenecen a la *Major Facilitator Superfamily* (M.F.S.) y su expresión es controlada por reguladores positivos en trans.

En el genoma de *S. suis* hemos encontrado un gen que codifica una proteína de 401 aminoácidos que presenta un 58% de identidad con PmrA, al que hemos llamado *smrA*. La modelización de SmrA revela 12 segmentos transmembrana y permite su inclusión en la M. F. S. Hemos obtenido la secuencia nucleotídica completa de *smrA*, incluyendo su región promotora, de un total de 15 cepas no relacionadas. De ellas, ocho no poseen eflujo alguno, cuatro presentan un fenotipo de eflujo intermedio y tres poseen un fenotipo alto. Todas las cepas con eflujo presentan mutaciones responsables de una sustitución aminoacídica en posición 107 (V/T107A). Además, las tres cepas con nivel alto de eflujo y una con nivel intermedio poseen mutaciones en su región promotora en la caja -10 putativa.

Hemos clonado *smrA* de diferentes cepas incluyendo su promotor en el vector bifuncional pLS1 y transformado *S. pneumoniae* R6. Actualmente estamos realizando experimentos para establecer los niveles de expresión de *smrA* en estas cepas dados el entorno heterólogo y la ausencia del regulador nativo.

SmrA es un nuevo miembro de la M.F.S. que parece estar implicado en la resistencia a fluoroquinolonas en cepas clínicas de *S. suis*. La adquisición de este fenotipo de eflujo parece ser un proceso acumulativo en el que se producen mutaciones en el gen que alteran la proteína y mutaciones en la región promotora que afectan a su expresión.

Jueves 18 de Septiembre de 2008

**SESIÓN VI:  
PATOGENESIS MOLECULAR II**

Moderador: Francisco García del Portillo, CNB, CSIC, Cantoblanco

**O.VI.6. - 12.45 H.**

**Drogas, sexo y R&R: Los antibióticos como promotores de variación genética en bacterias.**

Jesús Blázquez, Elena López y Alejandro Couce.

Centro Nacional de Biotecnología- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). C/ Darwin, 3. Campus de la UAM-Cantoblanco. 28049-Madrid. blazquez@cnb.csic.es

El uso, y muchas veces abuso, de los antibióticos como agentes terapéuticos y/o promotores de crecimiento animal ha significado un enorme reto adaptativo para las bacterias, ya sean patógenas, comensales o ambientales. Los antibióticos han actuado como una fuerza evolutiva que ha seleccionado bacterias resistentes y ha favorecido su diseminación. Sin embargo, hay evidencias que indican que los antibióticos no son meros agentes selectores (en el sentido darwinista clásico), sino que pueden actuar como verdaderos promotores de resistencia. En esta comunicación, presentaremos resultados que muestran que concentraciones subinhibidoras de algunos antibióticos incrementan la tasa de variación genética en bacterias. Este incremento se realiza mediante la estimulación de las tasas de mutación y de recombinación.

Jueves 18 de Septiembre de 2008  
18,30 H

Conferencia plenaria III:

## **“Geomicrobiología del subsuelo, vida en el lado oscuro”**

Ricardo Amils

Universidad Autónoma de Madrid. Centro de Biología Molecular y  
Centro de Astrobiología (INTA-CSIC). ramils@cbm.uam.es

La reciente demostración de que la vida es capaz de desarrollarse en las rocas del subsuelo, a varios cientos de metros de profundidad, independientemente de la radiación solar, ha sido una de las revoluciones más importantes en la biología del último siglo. Este campo de creciente interés, no sólo a nivel fundamental, sino también aplicado, es de particular importancia astrobiológica, ya que permite desarrollar escenarios de vida temprana en nuestro planeta, así como ampliar la posibilidad de existencia de vida en otros cuerpos planetarios. A pesar de su interés, las limitaciones metodológicas asociadas a la necesaria perforación se traducen en un conocimiento limitado de la abundancia, diversidad y metabolismos asociados a este tipo de vida. Para ilustrar las dificultades inherentes a este tipo de investigación se discutirán los resultados preliminares del proyecto MARTE (Mars Analogue Research and Technology Experiment) recientemente desarrollado en colaboración entre el Centro de Astrobiología y la NASA, el cual ha permitido conocer la geomicrobiología subterránea de la Faja Pirítica Ibérica responsable de las características extremas de la cuenca del Río Tinto.



### **3. COMUNICACIONES COMO PÓSTER**

## **P.1. Proteína A promueve la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus***

Nekane Merino, Alejandro Toledo-Arana\*, Marta Vergara, Jaione Valle, Cristina Solano, Enrique Calvo, Juan Antonio Lopez, José R. Penadés e Iñigo Lasa

*Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra. 31006-Pamplona.*  
alejandro.arana@unavarra.es

En esta comunicación presentamos evidencias de la participación de proteína A en el establecimiento de interacciones célula-célula y la formación del biofilm en *S. aureus*. Proteína A pertenece a la familia de proteínas LPXTG, proteínas que se encuentran ancladas covalentemente al peptidoglicano y que juegan un papel muy importante en la virulencia de esta bacteria. Proteína A es conocida por su capacidad para unir la región Fc y Fab de las inmunoglobulinas (Igs) y el factor Von Willebrand (vWF), una glicoproteína del suero que media la adhesión de plaquetas en sitios donde se produce daño endotelial. La unión de la proteína A a la región Fc de las Igs, preferentemente IgGs, actúa como un “disfraz” inmunológico interfiriendo en la opsonización e inhibiendo la fagocitosis. Utilizando cromatografía nano-líquida acoplada y espectrometría de masas hemos identificado que proteína A es un componente importante de la matriz proteica que desarrolla *S. aureus* cuando el sistema *agr* está inactivo. Proteína A no necesita estar covalentemente anclada a la envoltura celular para inducir formación de biofilm y en su ausencia la capacidad de la bacteria para inducir la adhesión a un catéter implantado subcutáneamente disminuye significativamente. Estos resultados apoyan la teoría de que algunas de las proteínas de la superficie que hasta ahora han sido mayoritariamente implicadas en la unión a proteínas de la matriz extracelular, pueden también jugar un papel relevante en la interacción entre bacterias de la misma o distinta especie.

## **P.2. Análisis molecular del regulón compuesto por la cadena O, H-NS, invasin y *flhDC* en *Yersinia enterocolitica* O:8**

Catalina M. Llompart<sup>1,2\*</sup>, Camino Pérez-Gutiérrez<sup>3</sup>, José A. Bengoechea<sup>2,3,4</sup>.  
Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Dureta, Palma, España<sup>1</sup>.  
Bases Moleculares de Patogenicidad y Virulencia, Centro de Investigación  
Biomédica en Red (CibeRes), Bunyola, España<sup>2</sup>. Programa Infección e  
Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears, España<sup>3</sup>. Universitat  
de les Illes Balears, Palma, España<sup>4</sup>.  
\*E-mail: llompart@caubet-cimera.es

*Yersinia enterocolitica* es un patógeno Gram-negativo que provoca diversos síndromes gastrointestinales. La cadena O es el componente más expuesto al exterior del LPS y se ha descrito como un importante factor de virulencia. En estudios previos demostramos que en *Y. enterocolitica* O:8 (YeO8) la expresión de la cadena O está coordinada con la de otros factores de virulencia de *Yersinia*. Así, en una cepa mutante para la cadena O (YeO8- $\Delta$ manC) la expresión de *inv*, importante en el proceso de colonización intestinal, es más baja que en la cepa silvestre, mientras que *flhDC*, el principal operón que controla la expresión del flagelo, está sobreexpresado.

El objetivo de este estudio es dilucidar el circuito regulatorio que subyace a la disminución de la expresión de *inv* y a la sobreexpresión de *flhDC* en YeO8- $\Delta$ manC. RovA es el principal regulador de *inv*, y su expresión fue similar entre YeO8- $\Delta$ manC y YeO8. La expresión de H-NS, el represor transcripcional de *inv*, también fue similar entre YeO8- $\Delta$ manC y YeO8. Sin embargo, los niveles de proteína H-NS sí fueron superiores en YeO8- $\Delta$ manC. Además, la sobreexpresión de H-NS incrementó la expresión de *flhDC* y esto se tradujo en un aumento en la movilidad. Nos planteamos si las proteasas podrían estar involucradas en el aumento no transcripcional de los niveles de proteína H-NS en YeO8- $\Delta$ manC. Para estudiarlo, se construyó la fusión transcripcional *clpXP::lucFF* y se vio que en la cepa YeO8- $\Delta$ manC la expresión de *clpXP* es inferior que en YeO8. También se construyeron cepas mutantes para ClpXP y Lon. En la cepa YeO8- $\Delta$ clpXP los niveles de transcripción de los promotores *rovA* y *flhDC* son equivalentes a los obtenidos en YeO8- $\Delta$ manC. Los valores de movilidad y de translación de *inv* en YeO8- $\Delta$ clpXP también se corresponden a los de la cepa YeO8- $\Delta$ manC. Estos resultados sugieren que ClpXP es uno de los primeros elementos que participan en el circuito de regulación en el que están implicados H-NS, *flhDC* e *inv*.

### **P.3. Regulation of the *std* fimbrial operon of *Salmonella enterica* by DNA adenine methylation, SeqA and YifA**

Marcello Jakomin and Josep Casadesús  
*Departamento de Genética, Universidad de Sevilla*  
ciello76@us.es

DNA adenine methylase (Dam) mutants of *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* grown in Luria-Bertani medium contain high levels of the fimbrial protein StdA encoded on the chromosomal operon *stdABC*, while wild type strains do not produce the protein. Furthermore, transcriptomic analysis has indicated that high levels of *stdABC* mRNA are found in Dam<sup>-</sup> mutants. After mini-Tn10 mutagenesis in a strain carrying a translational *stdA::lacZ* fusion, we have identified SeqA as an additional repressor of *stdA* expression and YifA as an activator.  $\beta$ -galactosidase assays show a high level of *std* expression in both Dam<sup>-</sup> and SeqA<sup>-</sup> mutants while in wild type strains the operon is totally repressed. Derepression in a SeqA<sup>-</sup> strain is 5-6 fold lower than in a Dam<sup>-</sup> strain, while in a double Dam<sup>-</sup> SeqA<sup>-</sup> mutant the level of *stdA::lacZ* expression is similar to that found in a Dam<sup>-</sup> strain. These observations suggest that SeqA function is dependent on DNA methylation. Knock-out of the poorly known *yifA* gene eliminates derepression of the fusion in both Dam<sup>-</sup> and SeqA<sup>-</sup> mutants, suggesting that the LysR-related YifA protein may be an activator of *std* transcription. These lines of evidence are supported by western blotting, flow cytometry and real time quantitative PCR assays. Three GATC sites located upstream from the *stdA* promoter may be involved in Dam-dependent transcriptional control of *std*.

## **P.4. Análisis de una nueva betalactamasa de *P. aeruginosa* implicada en la virulencia de esta bacteria**

Alicia Fajardo\*, Nadia Martínez-Martín<sup>1</sup>, José L. Martínez  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). <sup>1</sup>Dirección actual: Centro de  
Biología Molecular (CSIC) \*afajardo@cnb.csic.es

En ambientes hospitalarios, la capacidad de una bacteria para producir infección depende tanto de su virulencia como de su baja susceptibilidad a los antimicrobianos (1). Para la búsqueda de genes implicados simultáneamente ambos procesos hemos analizado dos genotecas de mutantes de inserción de *Pseudomonas aeruginosa*. El 3,7% de los 5952 mutantes analizados presenta cambios en su sensibilidad a los antibióticos (2). Para evaluar la virulencia de estos mutantes, estudiamos su citotoxicidad. Se localizaron los genes mutados mediante PCR inversa y secuenciación. Hemos determinado que al menos 71 *loci* del genoma de *P. aeruginosa* contribuyen de forma simultánea a su virulencia y susceptibilidad a los antibióticos.

En esta comunicación presentamos un estudio más detallado de uno de los mutantes, que es hipersensible a antibióticos de la familia de los beta-lactámicos (imipenem y ceftazidima) y posee unos valores de citotoxicidad inferiores a los de la estirpe silvestre. Cuando comparamos las regiones amplificadas que flanquean el transposón con la base de datos del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), vimos que se trataba del gen PA5542, que codifica una proteína a la que se le asigna una posible función como beta lactamasa. Para corroborar el fenotipo de PA5542, hicimos mutantes de delección en dicho gen. También sobreexpresamos el mismo en *E. coli*, e hicimos ensayos de sensibilidad a beta-lactámicos, tanto en el mutante de delección, como en el *E. coli* que expresa PA5542. Observamos cambios de sensibilidad a seis beta-lactámicos.

Podemos por tanto concluir: 1) una fracción importante del genoma de *P.aeruginosa* contribuye a su fenotipo de virulencia y susceptibilidad a los antimicrobianos. 2) hemos identificado una nueva beta-lactamasa codificada en el cromosoma de *P. aeruginosa* y hemos determinado sus sustratos potenciales. Un mutante en el que la beta-lactamasa está inactiva es también menos citotóxico, lo que indica que existe una conexión entre la resistencia a beta-lactámicos y la virulencia de *P. aeruginosa*.

1. J. L. Martínez, F. Baquero, *Clin Microbiol Rev* **15**, 647 (2002).
2. A. Fajardo *et al.*, *PLoS ONE* **3**, e1619 (2008).

## **P.5. La desnitrificación en *Thermus thermophilus*: El doble papel de la nitrato reductasa**

Felipe Cava, Zahra Chalafi, Laura Alvarez, Carlos Bricio y José Berenguer

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Universidad Autónoma. 28049-Madrid. jberenguer@cbm.uam.es

En las bacterias modelo hasta ahora estudiadas, el complejo III respiratorio, o complejo bc, juega un papel fundamental en el transporte de electrones desde las NADH respiratorias hacia las reductasas terminales de Nitrito (Nir), óxido nítrico (Nor) y óxido nitroso (Nos) durante la desnitrificación.

En el genoma de *Thermus thermophilus* se encuentra codificado un complejo bc (Fbc) heterotetramérico que resulta esencial para la respiración aeróbica, única forma de obtención de energía para muchos de los aislados de esta especie. Sin embargo, existen cepas de esta especie que presentan capacidad de crecimiento anaeróbico mediante desnitrificación parcial, con acumulación de nitrito, o completa, con liberación de N<sub>2</sub>. Hemos observado que en las cepas desnitrificantes la transcripción del complejo III (promotor P<sub>fbc</sub>) se encuentra reprimida durante la desnitrificación, por lo que dicho complejo no juega un papel relevante en el transporte de electrones en tales condiciones. Por el contrario, la presencia de nitrito u óxido nítrico en anaerobiosis produce en tales cepas la inducción de la nitrato reductasa (Nar). Dado que esta enzima se diferencia de sus homólogas en que posee un citocromo c periplásmico como cuarta subunidad, hemos llevado a cabo un estudio que demuestra que, además de su papel en la reducción de nitrato, esta enzima es capaz de actuar en el transporte de electrones desde una NADH respiratoria específica de desnitrificación hasta las reductasas terminales Nir, Nor y Nos, sustituyendo de esta forma al complejo III respiratorio. En este papel como transportador de electrones, el grupo hemo más distante de la membrana juega un papel esencial. Por otra parte, hemos podido demostrar que la proteína reguladora DnrT, de la familia CRP, es responsable de la represión de la transcripción de los operones codificantes del complejo III y del complejo I empleados durante la respiración aeróbica, siendo a su vez inductor necesario para la transcripción de las enzimas de la desnitrificación.

## **P.6. La proteína OmpA de *Klebsiella pneumoniae* media resistencia frente a péptidos antimicrobianos y modula la respuesta inflamatoria**

Catalina March<sup>1,2\*</sup> Enrique Llobet<sup>1,2</sup>, Paloma Giménez<sup>2</sup> y José A. Bengoechea<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA, Bunyola, Mallorca. <sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CibeRes).

\*e-mail: march@caubet-cimera.es

La membrana externa de las bacterias gram negativas está formada por fosfolípidos, lipopolisacárido (LPS) y proteínas de membrana externa (OMPs). La proteína OmpA es posiblemente la OMP mejor caracterizada y una diana para los sistemas defensivos del huésped. Así, OmpA es degradada por la elastasa de neutrófilos y, por tanto, las bacterias que expresan OmpA son más susceptibles a ser eliminadas por los neutrófilos que mutantes que no expresan la proteína. Por otro lado, otros trabajos demuestran que OmpA interfiere en la activación del sistema inmune innato. OmpA está implicada en la resistencia frente al complemento y parece ser necesaria para la supervivencia intracelular de *E. coli* en monocitos y macrófagos.

En este estudio se pretende estudiar, primero, si OmpA contribuye a la susceptibilidad frente a los péptidos antimicrobianos (PAs), componentes defensivos del sistema inmune innato frente a infecciones. Y, en segundo lugar, si OmpA modula la respuesta inmune activada por las células epiteliales respiratorias humanas (línea celular A549) tras una infección. Como modelo bacteriano hemos empleado *Klebsiella pneumoniae*, un típico patógeno humano.

Los resultados indican que un mutante deficiente en OmpA fue más sensible frente a los PAs que la cepa silvestre. Estas diferencias no se debieron a cambios en la superficie bacteriana debidos a la ausencia de OmpA. Los datos sugieren que OmpA está implicada en la activación de algún sistema de resistencia frente a los PAs. Por otra parte, se observó que el mutante OmpA indujo mayor secreción de IL-8 en las células epiteliales que la cepa silvestre. Los datos sugieren que la activación de la IL-8 fue debida a la activación de las vías de señalización intracelular del NF- $\kappa$ B y de las MAPK, vía activación de los receptores TLR2 y 4.

## **P.7. Modulation of inflammatory host cell response by *Klebsiella pneumoniae***

Verónica Regueiro, Christian G. Frank, David Moranta, Junkal Garmendia and José Antonio Bengoechea

<sup>1</sup>Program Infection and Immunity, Fundacion Caubet-CIMERA, Bunyola, Mallorca <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CibeRes) email: christian.frank@caubet-cimera.es

*Klebsiella pneumoniae* (KP), an encapsulated gram-negative bacterium, is an opportunistic human pathogen, and as such a frequent cause of pneumonia (especially nosocomial pneumonia) and urinary tract infections.

We recently reported that in contrast to the wildtype a decapsulated mutant KP induces an inflammatory response in human airway epithelial cells (Regueiro et al, *Microbiology* 152:555-66, 2006). This response was dependent on the activation of Toll-like receptors (TLR) 2 and 4. We have now investigated the absence of an inflammatory response to wildtype KP further, and describe here an anti-inflammatory effect of KP on host cells.

Inflammatory responses of A549 cells can be stimulated by treatment with pro-inflammatory cytokines such as Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). We observed that pre-infection of A549 cells with wildtype KP caused a reduction of IL-1 $\beta$  induced secretion of Interleukin-8 (IL-8), while conditioned medium or UV-killed bacteria did not elicit this effect. KP-dependent reduction of IL-8 secretion was also observed when it was stimulated with TNF- $\alpha$  or the TLR2-agonist Pam3CSK4. Lower IL-8 secretion coincided with lower induction of IL-8 mRNA, indicating that activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B might be affected, as it is required for efficient IL-8 expression. Indeed, activity of a NF- $\kappa$ B promoter-dependent luciferase reporter was reduced, and, in a microscopy based assay for NF- $\kappa$ B localization, infection led to a complete block of IL-1 $\beta$  induced translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus. The NF- $\kappa$ B inhibitory protein I $\kappa$ B- $\alpha$ , normally degraded upon activation of NF- $\kappa$ B signaling, was stabilized relative to control cells, pointing to a block of signaling events upstream of NF- $\kappa$ B. Furthermore, we observed lower IL-1 $\beta$  dependent phosphorylation of the major MAP-kinases p38, ERK and JNK, which could be restored by inhibition of MKP1, a protein phosphatase we found to be upregulated in A549 cells during KP infection.

Upregulation of MKP1 by a pathogenic bacterium that lacks a type-III secretion system might represent a novel mechanism to avoid undesired host-cell responses.



## **P.8. STM2208/2209: un nuevo locus de *Salmonella enterica* regulado por metilación Dam**

Ignacio Cota, Josep Casadesús

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

*Avda. de Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla.*

icota@us.es

La metiltransferasa Dam de *Salmonella enterica* regula diversos procesos celulares, como la reparación de emparejamientos erróneos, la iniciación de la replicación cromosómica, el reparto cromosómico y la transcripción de determinados genes. Un análisis transcriptómico realizado en nuestro laboratorio identificó una serie de genes presuntamente regulados por Dam. Entre ellos se encontraba el locus STM2208/STM2209, cuyos transcritos eran más abundantes en un mutante Dam<sup>-</sup>. Por tanto, STM2208/STM2209 es un locus reprimido por metilación Dam.

Según las anotaciones que acompañan a la secuencia del genoma de *Salmonella enterica* LT2, el locus STM2208/STM2209 está compuesto por dos pautas abiertas de lectura, separadas por un solo nucleótido, con un contenido muy bajo en G+C (38%). Este detalle, unido al hecho de que STM2208/STM2209 no presente homólogos en otras Enterobacterias, hace pensar que *Salmonella* puede haberlo adquirido por transferencia horizontal. Ambos genes codifican hipotéticas proteínas de membrana interna sin función conocida, con regiones transmembrana bien definidas. Sin embargo, en el curso de nuestra investigación hemos encontrado indicios de que el ARN de STM2209 no se traduce y forma parte del mismo transcrito que STM2208, por lo que podría tratarse en realidad de la región 5'UTR del ARN mensajero de STM2208. Sobre esta región 5'UTR podrían ejercer su acción otros reguladores como RpoS y H-NS, cuya carencia afecta a la expresión de STM2208 pero no a la de STM2209.

Aguas arriba de la región de interés destaca la presencia de cuatro sitios GATC dispuestos simétricamente y separados por 50, 22 y 50 pb, respectivamente. Resulta lógico pensar que Dam podría actuar sobre STM2208/STM2209 metilando dichas secuencias. Esta hipótesis aún no ha sido probada.

## **P.9. La enzima Polinucleotido Fosforilasa de *Bacillus subtilis* es un componente de la maquinaria de recombinación homóloga**

Paula Cardenas, Begoña Carrasco and Juan C. Alonso  
Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de  
Biotecnología, CSIC, C/ Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de  
Madrid, 28049 Madrid, Spain.

Las exonucleasas son esenciales para el procesamiento del ADN durante la replicación y reparación, ya que un procesamiento incorrecto ó inapropiado puede causar inestabilidad genómica. En *Escherichia coli* las exonucleasas en ADN de cadena sencilla con polaridad 3'-5', como ExoI, ExoVII, ExoVIII, ExoIX, ExoX y ExoXI, parecen tener funciones redundantes, pero éstas están ausentes en *Bacillus subtilis*. La proteína polinucleotido fosforilasa (PNPasa), que posee una actividad exoribonucleasa con polaridad 3'-5' dependiente de Mg<sup>2+</sup> y fosfato inorgánico (Pi), es la principal enzima encargada del metabolismo del mRNA *in vivo*. Nuestros datos sugieren que la proteína PNPasa también podría estar participando en la reparación del DNA. En ausencia de PNPasa ( $\Delta pnpA$ ) se incrementa la tolerancia al daño inducido por Mitomicina C (MMC) y Metilmetano-sulfonato (MMS), pero las células  $\Delta pnpA$  son más sensibles que las silvestres al ser tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La inactivación conjunta de *pnpA* y genes de diferentes estadios de la vía de recombinación homóloga originaron diferentes fenotipos en respuesta al tratamiento con MMC, MMS ó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Excepto con el mutante  $\Delta pnpA\Delta recA$ , los mutantes dobles se pueden clasificar en aquellos con ganancia o pérdida de función dependiente del agente mutagénico utilizado. Estudios bioquímicos demuestran que PNPasa posee actividad exodeoxiribonucleasa con polaridad 3'-5' sobre DNA de cadena sencilla y ésta es dependiente de Mn<sup>2+</sup> e independiente de Pi. Nuestros datos sugieren que PNPasa podría estar participando en la generación del un "sustrato de ADN" necesario para el inicio de la recombinación homóloga, vía RecA, independiente de RecA y/o de recombinación no homóloga (NHEJ).

## **P.10. Caracterización en *Listeria monocytogenes* del motivo de anclaje a peptidoglicano reconocido por la sortasa SrtB en las proteínas de superficie Lmo2185 y Lmo2186**

Javier Fernando Mariscotti<sup>1</sup>, Francisco García-del Portillo<sup>2</sup> y Maria Graciela Pucciarelli<sup>1</sup>

Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid<sup>1</sup>  
Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC<sup>2</sup> Campus Cantoblanco, 28049 Madrid, España. e-mail: jmariscotti@cnb.csic.es

En bacterias patógenas Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, las proteínas de superficie cumplen importantes funciones como adherencia, invasión, e interacción con el hospedador o el medioambiente. Dentro de las diferentes clases de proteínas de superficie conocidas, existe un grupo de ellas que son ancladas covalentemente al peptidoglicano mediante reacciones de transpeptidación catalizadas por enzimas denominadas "sortasas". Estas enzimas reconocen motivos conservados en el extremo C-terminal de la proteína sustrato. Estudios de proteómica realizados en nuestro laboratorio revelaron que Lmo2185 y Lmo2186, dos proteínas de superficie de *L. monocytogenes*, son ancladas al peptidoglicano por la sortasa-B (SrtB). La comparación de secuencia de sustratos de SrtB de diferentes Gram-positivos revela una cierta variabilidad de motivos de anclaje (NPQTN en *S. aureus*; NPQTG/NSKTA en *B. halodurans*; y NPKTG/NSKTA en *B. anthracis*). Curiosamente, Lmo2185 presenta un único motivo NAKTN, mientras que Lmo2186 contiene dos posibles motivos NKVTN y NPKSS de reconocimiento para la SrtB. Con el objetivo de identificar el motivo que reconoce SrtB de sus dos proteínas sustrato de *L. monocytogenes*, construimos quimeras conteniendo el extremo C-terminal de Lmo2185 y Lmo2186, cuyo comportamiento se analizó en la estirpe silvestre y en una estirpe deficiente en SrtB. Los resultados obtenidos indican que SrtB reconoce el motivo NAKTN de la proteína Lmo2185 y el segundo motivo NPKSS de la proteína Lmo2186. Asimismo, el estudio de quimeras conteniendo cambios puntuales en el motivo NPKSS de Lmo2186 sugiere que la prolina (P) en posición +2 juega un papel más importante que la lisina (K) en posición +3 en el reconocimiento de la proteína por SrtB.

## **P.11. Caracterización del entorno genético del determinante de resistencia a tetraciclina *tet(32)*: similitudes con *tet(W)* e implicaciones evolutivas**

Manuel Rodríguez-Alcayna<sup>1</sup>, Baquero Maria-Rosario<sup>2</sup>, Rafael Cantón<sup>1</sup>, Helène Marchandin<sup>3</sup>, Fernando Baquero<sup>1</sup> y Juan-Carlos Galán<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. <sup>2</sup>Universidad Alfonso X el Sabio, Madrid. <sup>3</sup>Université Montpellier 1, Faculté de Pharmacie 34060 Montpellier Cedex 5, France.  
alcayna@hotmail.com

Los determinantes de resistencia a tetraciclina son muy diversos (>40 genes descritos con mas de 20% de divergencia) y ampliamente distribuidos tanto en Gram-positivos (G+) como en Gram-negativos (G-), debido a eficaces sistemas de transferencia horizontal. Los genes *tet(M)* y *tet(B)* son los más prevalentes en G+ positivos y G- respectivamente, al estar insertados en estructuras móviles altamente conservadas como Tn916 y Tn10 respectivamente. En 1999 se describió un nuevo gen *tet*, *tet(W)*, el cual ha llegado a ser uno de los determinantes más ampliamente distribuidos tanto en bacterias G+ como G-. La caracterización del elemento genético móvil que porta el gen *tet(W)*, reveló, a diferencia de los mas prevalentes, *tet(M)* o *tet(B)*, una extraordinaria variabilidad de estructuras móviles, incluso dentro de una misma especie. Uno de los últimos genes *tet* descritos, *tet(32)*, es filogenéticamente próximo a *tet(O)*; de hecho, se ha sugerido que el actual *tet(32)*, surgió de un proceso de recombinación entre un ancestral *tet(32)* y *tet(O)*. En este trabajo se ha caracterizado la secuencia completa del *tet(32)* ancestral encontrado en una bacteria anaerobia, *Acidaminococcus intestini*. La secuenciación de las regiones flanqueantes reveló que *tet(32)* se encontraba insertado en los mismos elementos móviles implicados en la movilización del gen *tet(W)*. Teniendo en cuenta que Tet(32) confiere mayor nivel de resistencia a tetraciclina que Tet(W), si *tet(32)* se encuentra en los mismos elementos transponibles que diseminaron *tet(W)*, es probable que asistamos a una explosión de *tet(32)* en poco tiempo. Por otra parte, encontramos varios clones que portaban dos copias de un mismo elemento transponible, portando en un caso *tet(W)* y en otro *tet(32)*. Las dos copias en una misma bacteria incrementa aun mas la CMI a tetraciclina, desde 80µg/ml (una copia) hasta >250µg/ml. Con el fin de determinar la prevalencia de *tet(32)* en *Acidaminococcus*, se analizan 40 cepas procedentes de España y Francia. Esta es la primera descripción del gen ancestral *tet(32)*, descrito en bacterias anaerobias del tracto gastrointestinal humano, así como la identificación de los elementos genéticos móviles implicados en su movilización.

## P.12. Regulación de genes cromosómicos por el RNA plasmídico FinP

Meritxell García-Quintanilla<sup>1</sup>, Kai Papenfort<sup>2</sup>, Francisco Ramos-Morales<sup>1</sup>,  
Jörg Vogel<sup>2</sup> y Josep Casadesús<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Universidad de Sevilla y <sup>2</sup> Max Planck Institut für Infektionbiologie, Berlin  
meritzell@us.es

Los ARNs pequeños no codificantes desempeñan un papel central en la regulación de la expresión génica, tanto en procariotas como en eucariotas. Además de los ARNs antisentido tradicionalmente conocidos que actúan en *cis* en plásmidos y fagos bacterianos, en la última década se han descrito numerosos pequeños ARNs cromosómicos que actúan en *trans* con apareamiento parcial. Dichos ARNs regulan procesos como el *quorum sensing*, la respuesta a diversos tipos de estrés o la virulencia.

FinP es un ARN antisentido codificado en el plásmido de virulencia de *Salmonella enterica*. Este ARN aparee con la región 5' del mensajero de *traJ*, reprimiendo la síntesis de TraJ, el principal activador transcripcional del operón *tra*. Por tanto FinP inhibe la transferencia conjugativa del plásmido. Mientras que el gen *traJ* sólo se transcribe en condiciones muy específicas y en pequeña cantidad, la transcripción de *finP* es constitutiva y masiva. De esta observación surgió la sospecha de que FinP tal vez pudiera interactuar con otros mensajeros, además del de *traJ*.

Mediante experimentos con "microarrays" se observó que la sobreexpresión de FinP modificaba la cantidad de varios ARN mensajeros de genes cromosómicos. Se eligieron tres de ellos –STM4302, *ygaE* y *cysD*– y se confirmó que estaban regulados por FinP mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Cuando se usaron estirpes portadoras de deleciones en STM4302, *ygaE* o *cysD* como donadoras en experimentos de conjugación, se confirmó la existencia de interacción (o "cross talk") entre el plásmido y el cromosoma: la deleción de cualquiera de los 3 genes cromosómicos (STM4302, *ygaE* y *cysD*) produjo un aumento de la frecuencia de transferencia del plásmido.

Por tanto, además de su actividad en *cis* sobre el mensajero de *traJ*, el ARN FinP es activo en *trans* sobre genes cromosómicos. Los productos de dichos genes afectan a la transferencia conjugativa del plásmido de virulencia, tal vez como consecuencia de cambios metabólicos.

## **P.13. Análisis funcional de la interacción de la proteína SlrP de *Salmonella enterica* con proteínas eucarióticas**

Bernal-Bayard, J y Ramos-Morales, F.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.  
Avda. Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla. (jbbayard@us.es)

*Salmonella enterica* es una bacteria patógena que puede causar diversas enfermedades, tales como gastroenteritis e infecciones sistémicas en seres humanos y en una gran variedad de especies animales. *Salmonella* es un patógeno intracelular que interacciona principalmente con células del epitelio intestinal y con macrófagos que permiten la diseminación de las bacterias hacia distintos órganos, provocando la infección sistémica. Para la virulencia de *Salmonella* son necesarios los denominados sistemas de secreción de tipo III (T3SS), semejantes a “microjeringuillas” a través de las cuales la bacteria secreta proteínas al citosol de la célula eucariótica. Estas proteínas, también llamadas efectores, suelen interferir con las rutas de señalización del hospedador permitiendo la invasión del patógeno y su supervivencia y proliferación dentro de vacuolas. Nuestro objetivo es mejorar el conocimiento de la interacción *Salmonella*-hospedador a través del estudio estructural y funcional de efectores de los T3SS de este patógeno. SlrP es una proteína que funciona como sustrato de los dos T3SS que posee *Salmonella enterica*. En este trabajo hemos realizado un análisis de las interacciones de SlrP con proteínas eucarióticas. Este estudio incluye: 1) Un escrutinio, mediante el sistema del doble híbrido, de proteínas eucarióticas que interaccionan con SlrP. Como resultado de esta búsqueda hemos detectado la interacción de SlrP con la tiorredoxina humana. 2) Hemos confirmado esta interacción mediante métodos de proteómica, como la cromatografía de afinidad con proteínas de fusión a GST y la coimmunoprecipitación. 3) Hemos detectado colocalización de SlrP y tiorredoxina en células eucarióticas mediante microscopía confocal. 4) SlrP pertenece a una familia de efectores de los que recientemente se ha demostrado una actividad ligasa de ubiquitina. Actualmente, estamos estudiando el posible papel de SlrP en la ubiquitinación de las proteínas humanas con las que interacciona y el efecto que esto pueda tener en la célula hospedadora.

## **P.14. Diferencias en el coste relativo entre plásmidos relacionados con la diseminación mundial de la $\beta$ -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15**

Aida Ripoll, Rodríguez-Domínguez M, Novais A, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Turrientes MC y Galán JC. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Viejo, Madrid. Correo electrónico: jgalanm.hrc@salud.madrid.org

**Introducción:** En los últimos años se ha producido un desplazamiento en la prevalencia de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), con un mantenimiento de las BLEE de tipo TEM y un incremento de las de tipo CTX-M. Especialmente ha aumentado la diseminación de CTX-M-15 a nivel mundial. Recientemente, nuestro grupo ha sugerido que el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> está estrechamente ligado a unos pocos plásmidos del grupo de incompatibilidad FII, pudiendo ser responsables de la diseminación de esta enzima. Sin embargo, no está aclarado qué fuerza selectora ha permitido el éxito evolutivo de CTX-M-15.

**Objetivos:** Definir el coste asociado a plásmidos de tipo IncFII en un mismo contexto genético. Establecer si existen diferencias en términos de coste entre plásmidos IncFII portando el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> aislados infrecuentemente o ampliamente diseminados.

**Material y métodos:** 4 plásmidos IncFII, portando el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, con diferente nivel de diseminación, (2 plásmidos ampliamente distribuidos, A y B; 2 plásmidos infrecuentemente aislados J y M), fueron electroporados en las cepas isogénicas Rel606 (*ara*<sup>-</sup>) y Rel607 (*ara*<sup>+</sup>). Cocultivos de las 2 cepas (una de ellas portando el plásmido a estudiar) fueron mantenidos durante 7 días, dando pases en medio mínimo de Davis fresco cada 24h, a la vez que se realizaban recuentos de los viables de cada cepa en placas de McConkey con arabinosa. Cada experimento fue realizado 6 veces.

**Resultados:** Las cepas que portan los plásmidos infrecuentes mostraron un coste >10% (rango 13%-17%); mientras que las cepas portando los plásmidos ampliamente diseminados tuvieron un coste <10% (5%-9%). Pases seriados de la cepa salvaje que portadora del plásmido infrecuentemente aislado J, que tenía el mayor coste en cepas de laboratorio, permitió obtener una variante libre de plásmido. El coste de portar el plásmido J en su contexto salvaje fue 9%, casi un 10% menor que en las cepas de laboratorio.

**Conclusiones:** Las cepas que portan los plásmidos ampliamente diseminados (A y B) muestran un menor coste. Esto puede haber facilitado su amplia distribución, llegando a ser plásmidos epidémicos. También se describe un proceso de adaptación del plásmido infrecuente J a un huésped.

## **P.15. Eficiente producción y capacidad de ensamblaje de la proteína L1 delecionada de VPH16**

Bosch Martínez, A., Martínez Martínez, M., Fernández González, E.A., Soto Esteras, T., Benítez Rico, L.

Departamento de Microbiología-III. Facultad de Biología. UCM. Madrid.

(lbenitez@bio.ucm.es)

El virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16) es el papilomavirus de alto riesgo más común, siendo el responsable del 50% de los cánceres de cervix. La expresión heteróloga de la proteína mayoritaria de la cápsida (L1) se ha empleado en la producción de cápsidas virales vacías denominadas VLPs (*partículas virus-like*), dada su capacidad de auto-ensamblaje. Pero la expresión de la proteína en bacterias genera cuerpos de inclusión insolubles que limitan su producción.

La delección de 20 aminoácidos de carácter hidrofóbico del extremo amino-terminal de la proteína L1 de VPH16 producida como proteína de fusión con GST, ha favorecido su expresión en *Escherichia coli*. Se ha logrado una eficiente producción de la proteína L1 mediante la optimización de las condiciones de crecimiento-expresión y la eficaz solubilización de la proteína aún acumulada en los cuerpos de inclusión. La purificación se ha realizado mediante un efectivo sistema de electroelución de la proteína solubilizada, evitando la coprecipitación con chaperonas bacterianas.

Mediante electroforesis PAGE en condiciones no desnaturizantes se ha determinado que la proteína L1 recombinante es capaz de ensamblarse como trímeros y pentámeros e incluso en niveles de agregación superiores cuando se utilizan adecuadas soluciones de ensamblaje. Se ha observado mediante análisis por Microscopía Electrónica que estas estructuras multiméricas parecen corresponder a agregados proteicos. En cambio, cuando se realiza el ensamblaje de la proteína L1 nativa delecionada (escindida de la GST mediante la utilización de trombina) se observan partículas similares a VLPs no completamente formadas, aunque capaces de exponer epítomos conformacionales.



## **P.16. Clonación y purificación de una lipasa producida por la bacteria halófila moderada *Marinobacter lipolyticus***

D. Pérez<sup>1</sup>, S. Martín<sup>1</sup>, E. Mellado<sup>1</sup>, A. Ventosa<sup>1</sup>, G. Fernández-Lorente<sup>2</sup>,  
C. Mateo<sup>2</sup> y J. M. Guisán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/  
Profesor García González, 2, 41012, Sevilla (lpg@us.es)

<sup>2</sup>Dpto. de Biocatálisis, Instituto de Catálisis, CSIC, Campus Universidad Autónoma,  
Cantoblanco, 28049 Madrid

Los ambientes hipersalinos constituyen uno de los ejemplos más característicos de ambiente extremo, presentando además de una elevada concentración de sal otras peculiaridades, como grandes oscilaciones de temperaturas, elevados valores de pH, etc., convirtiéndose en habitats inhóspitos para muchos microorganismos.

*Marinobacter lipolyticus* es una bacteria halófila moderada productora de enzimas lipolíticas cuyas condiciones óptimas de crecimiento coinciden con las de máxima producción enzimática, siendo éstas 1 M de NaCl, pH 7,5, una temperatura de 37°C y una aireación de tres a cinco veces mayor al volumen del cultivo.

Tras el estudio de la actividad lipolítica producida por esta bacteria, detectamos en el extracto celular la presencia de al menos dos lipasas de distinto tamaño y especificidad de sustrato. La construcción de una genoteca en *Escherichia coli* nos ha permitido aislar el gen *lipM* que codifica una de las citadas lipasas. Este gen, es el responsable de la síntesis de la proteína LipM, formada por 271 aminoácidos y una masa molecular estimada de 30,5 KDa.

LipM pertenece a la familia de las □□□-hidrolasas y presenta los motivos característicos de este grupo de proteínas, aunque el pentapéptido conservado que contiene el residuo de Ser de la triada catalítica (Ser, Asp e His) es distinto al descrito para las ocho familias de lipasas bacterianas (Arpigny y Jaeger, 1999).

Con el fin de purificarla y caracterizarla molecularmente, la lipasa *lipM* se ha clonado en distintos vectores de expresión como son pET22b(-), pALEXa y pALEX2Ca.

**Martín, S., Márquez, M. C., Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Arahal, D. R. y Ventosa, A. (2003).** *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1383-1387.

## **P.17. Análisis de las interacciones funcionales entre los componentes de Sistemas de Secreción Tipo IV implicados en conjugación y virulencia**

Esther Fernández-González, Hector D. de Paz, Félix J. Sangari y Matxalen Llosa.

Departamento Biología Molecular (Universidad de Cantabria)  
IBBTEC (UC-CSIC-IDICAN).

Los Sistemas de Secreción Tipo IV (T4SS) son versátiles sistemas para la secreción selectiva de macromoléculas, implicados en procesos biológicos tan diversos como la transferencia horizontal de DNA por conjugación (cT4SS) o la patogenicidad bacteriana (pT4SS). En este trabajo se analiza la interacción funcional existente entre los T4SS de R388, *Bartonella tribocorum* (*Bt*) y *Brucella suis* (*Bs*).

Nuestros estudios previos muestran que la proteína acopladora (T4CP) interacciona con la proteína VirB10 del T4SS reclutando el complejo DNA-proteína durante la transferencia conjugativa <sup>1</sup>. También mostramos mediante análisis de dos híbridos que las T4CPs son capaces de interaccionar con las proteínas VirB10 del pT4SS de *Bt* y *Bs* <sup>2</sup>. Estos resultados abren un nuevo camino para la construcción de híbridos del T4SS que permitan introducir DNA dentro de las células animales <sup>3</sup>.

Ensayos de complementación entre las proteínas Trw de R388 y *Bt* mostraron que únicamente elementos individuales del llamado “núcleo” del complejo pueden ser intercambiados. Además, se ha estudiado la estabilidad de proteínas representativas del T4SS de R388, cuando falta alguna de las proteínas que constituyen el canal, y cuando son sustituidas por las homólogas de *Bt*, viéndose afectadas de diferente manera.

Una observación muy interesante es que en presencia de parte del sistema de secreción de *Bs* los niveles proteicos del T4SS de R388 decrecen considerablemente y su conjugación se ve fuertemente inhibida. Nuestro objetivo ahora es caracterizar este efecto y determinar qué componentes del T4SS son responsables de la inhibición. Posteriormente intentaremos invertir ese efecto, inhibiendo el T4SS de *Bs* (y por tanto su virulencia) mediante la expresión de parte del T4SS de R388.

1. Llosa, M., Zunzunegui, S. & de la Cruz, F. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 100, 10465-10470 (2003).
2. de Paz, H. D. et al. Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology-Sgm* 151, 3505-3516 (2005).
3. Llosa, M. & de la Cruz, F. Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Research In Microbiology* 156, 1-6 (2005).

## **P.18. Caracterización de los genes encargados de la escisión-circularización-integración de SaPIs durante la transferencia mediada por fagos**

\* Mir, I., Martínez, R., Blanco, J., Lasa, I., Penadés, JR.  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113, Moncada, Valencia.  
MAIL: mir\_ign@gva.es

Muchos factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* se transfieren horizontalmente y con alta frecuencia mediante islas de patogenicidad (SaPI). Las SaPIs son elementos genéticos móviles de entre 14 y 17 Kb que se alojan en un sitio cromosomal específico (*att<sub>B</sub>*). La alta transferencia de estos elementos está mediada por bacteriófagos, los cuales inducen la isla e inician un proceso denominado ERP (excision-replication-packaging), donde la isla, tras replicarse utilizando proteínas codificadas por ella, se encapsida utilizando proteínas codificadas por el fago inductor. En este trabajo, caracterizamos el módulo de escisión-circularización de SaPI<sub>bov1</sub>, el cual es necesario para que se lleve a cabo ERP. Nuestros resultados indican que dicho módulo consta de dos proteínas: una con actividad integrasa (Int) y otra con actividad escisionasa (Xis), las cuales se encuentran reguladas por el represor de la isla (Stl). Stl reprime la expresión de los genes *int* y *xis*. La represión desaparece en el momento en que el bacteriófago infecta la bacteria, ya que el fago elimina la acción del represor, comenzando el ciclo ERP. Asimismo, demostramos que la activación de este módulo por el fago permite la transferencia de la isla, aunque ésta no se replique, lo que sugiere que es este módulo, y no el de replicación, el realmente esencial para la transferencia horizontal de estos elementos.

## **P.19. Paisaje genómico de comunidades rizobacterianas: Monitorización de bacterias relacionadas con *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* en la rizosfera de maíz transgénico**

Gema Val, Silvia Marín, Nuria Antón y Rafael P. Mellado  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), c/ Darwin 3, Campus de la Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. E-mail: nanton@cnb.csic.es

Desde el punto de vista biológico el suelo es un medio ambiente complejo y variable. Estirpes bacterianas de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* están entre las más numerosas y ubicuas de las presentes en suelos. Las rizosferas contienen diversas comunidades microbianas responsables de procesos metabólicos que afectan directamente al crecimiento y a la viabilidad de las plantas, dependiendo de los componentes nutricionales presentes en suelos naturales y agrícolas.

Microarrays de ADN comercialmente disponibles conteniendo los genomas completos de las bacterias Gram positivas del suelo *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* se han utilizado para determinar diferencias potenciales entre las comunidades rizobacterianas de maíz genéticamente modificado para expresar la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* (maíz Bt).

No se han observado diferencias en el patrón de hibridación entre rizobacterias de maíz genéticamente modificado y no modificado de dos líneas diferentes de maíz Bt con una sensibilidad de detección estimada de cinco copias sobre el fondo de hibridación procedentes de cultivos en tres localizaciones geográficas diferentes.

Se obtuvieron resultados de hibridación diferenciales cuando el ADN de las rizobacterias se comparó con el ADN de la bacteria correspondiente presente en los microarrays comerciales. La comparación de los resultados obtenidos con ADN de rizobacterias cultivables y no cultivables, indican que las diferencias en los patrones de hibridación observados son en su mayor parte debidos a estas últimas, como era de esperar, ya que la mayor parte de los microorganismos del suelo no son cultivables en el laboratorio.

Los resultados obtenidos muestran también que cada tipo de suelo produce un patrón de hibridación diferente, siendo las diferencias más acusadas cuanto más diferente es la composición química de los correspondientes suelos.

Así, el uso de microarrays de ADN de genoma completo puede servir como una herramienta útil para la monitorización molecular de comunidades rizobacterianas, sin necesidad de incurrir en los sesgos que la amplificación de ADN puede conllevar ni en la subsiguiente secuenciación del gran número de clones resultantes de esa amplificación.

## **P.20. Disección molecular y celular de la interacción del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* No Tipable (HiNT) con el epitelio respiratorio humano**

Pau Morey<sup>1,2\*</sup>, Victoria Cano<sup>1,2</sup>, J.Pau Martí<sup>1,2</sup>, Silvia Mauro<sup>1,2</sup>, José Antonio Bengoechea<sup>1,2,3</sup> y Junkal Garmendia<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Fundació Caubet-Cimera, Hospital Joan March, Ctra. Sóller Km.12, 07110, Bunyola. Mallorca <sup>2</sup>CibeRes Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias

<sup>3</sup>Universitat de les Illes Balears. Cra. de Valldemossa, km 7.5. Palma (Illes Balears). \*E-mail: [morey@caubet-cimera.es](mailto:morey@caubet-cimera.es)

*Haemophilus influenzae* No Tipable (HiNT) es una bacteria Gram-negativa comensal habitual de las vías respiratorias superiores humanas. En determinadas circunstancias (exposición a aerosoles, tabaquismo, infecciones víricas) se convierte en patógeno oportunista. Así, es el microorganismo más frecuentemente aislado en las vías respiratorias inferiores de enfermos con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y está asociado a un conjunto de patologías respiratorias crónicas. Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares utilizados por HiNT para colonizar de forma persistente el tracto respiratorio inferior de pacientes con afecciones respiratorias crónicas son poco conocidos. En este estudio hemos analizado la interacción de tres cepas de HiNT con distintos niveles de fosforilcolina, potencial factor de virulencia de este patógeno con células del epitelio pulmonar humano (A549), así como su capacidad para sobrevivir intracelularmente. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis cuantitativo (recuento en placa) y cualitativo (microscopía de inmunofluorescencia, IF) de la vida intracelular de este patógeno en células A549. Tras adherirse de forma eficiente a las mismas, se produce la internalización de HiNT mediante una reorganización de: (1) el citoesqueleto de microtúbulos de la célula huésped, (2) las zonas ricas en colesterol de la membrana plasmática eucariota. Mediante IF hemos observado que las bacterias intracelulares se localizan en compartimentos subcelulares ácidos con características de ruta endocítica. Se mantienen en estos compartimentos (*Haemophilus influenzae* containing vacuole, HiCV) en estado viable no replicativo durante, al menos, 16 horas. La HiCV no se fusiona con lisosomas maduros ya que no se observa co-localización de HiNT con hidrolasas lisosomales. Estos resultados sugieren que HiNT es capaz de secuestrar compartimentos inmaduros de la ruta endocítica para persistir intracelularmente de forma prolongada.

## P.21. Relación entre la subunidad $\theta$ de la DNA polimerasa III y proteínas del tipo H-NS

Pedró, L.<sup>1</sup>, Baños R.C.<sup>1</sup>, García J.<sup>2</sup>, Pons M.<sup>2</sup> y Juárez A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Bioenginyeria de Catalunya-Parc Científic de Barcelona (edifici Hèlix), Baldori Reixac 15-21 08028 Barcelona. <sup>2</sup>Laboratori de RMN biomolecular, Institut de Recerca Biomèdica- Parc Científic de Barcelona, Josep Samitier 1-5 08028 Barcelona.  
e-mail: lpedro@ibec.pcb.ub.es

La holoenzima de la DNA polimerasa III es un complejo dimérico. Cada mitad del complejo contiene un núcleo (core) que consiste en tres subunidades proteicas:  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$ . Los genes que codifican para estas tres proteínas son *dnaE*, *dnaQ* y *holE* respectivamente. La subunidad  $\alpha$  tiene función DNA polimerasa y  $\epsilon$  es un corrector exonucleolítico. Aunque se ha descrito un posible papel de  $\theta$  en la estabilización de la subunidad  $\epsilon$ , la función de ésta está todavía por definir. La proteína H-NS es una proteína asociada al nucleóide que ejerce un papel importante tanto en la estabilidad de la cromatina como en la regulación de la expresión génica en respuesta a factores ambientales. La familia de proteínas Hha/YdgT presenta mimetismo estructural con el dominio amino-terminal de H-NS. Estudios de interacción proteína-proteína demuestran que las proteínas tipo Hha interactúan con miembros de la familia H-NS para formar complejos reguladores de la expresión génica. La presencia de proteínas tipo Hha está restringida a la familia *Enterobacteriaceae*. Aquellos endosimbiontes de esta familia que presentan una significativa reducción genómica, retienen los genes *hha* y *holE* como únicos genes específicos de las enterobacterias. Otras dos evidencias previas sugieren una asociación entre la subunidad  $\theta$  y proteínas tipo H-NS/Hha. (i) Un estudio previo de interactómica ha sugerido la interacción entre  $\theta$  y H-NS y (ii) la estructura terciaria del regulador transcripcional Hha es muy similar a la de la subunidad  $\theta$ .

Para seguir estudiando esta posible relación entre el gen *holE* y el sistema H-NS se ha construido en *Escherichia coli* un juego de mutantes para los distintos genes a estudiar: *hha*, *ydgT* (parálogo de Hha en *E. coli*), *hns* y *holE*, generando combinaciones dobles y triples. Se ha estudiado el efecto de condiciones diferentes de crecimiento (osmolaridad, temperatura, anaerobiosis, fase estacionaria) sobre la tasa de crecimiento de las diferentes cepas objeto de estudio. Asimismo, se han determinado patrones de replicación del DNA por citometría de flujo. Estos estudios establecen una relación entre  $\theta$  y la proteína YdgT, paróloga de Hha en el cromosoma de *E. coli*. Adicionalmente, ha sido posible establecer la existencia de una interacción del trímero  $\epsilon$ - $\theta$ -YdgT por resonancia magnética nuclear. Ello podría establecer un posible mecanismo de control de la replicación a través de proteínas asociadas al nucleóide.

## **P.22. Bactofección mediante *Salmonella enterica* serovar choleraesuis**

Herrero-Gil, A.; Bartolomé, Martínez-Pulgarín, S.; A.; Orden, J. A.; De la Fuente, R.; y Domínguez-Bernal, G.  
Grupo INBAVET. Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,  
Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro s/n 28040  
Madrid-España. gdbernal@vet.ucm.es

Un mecanismo efectivo en la prevención de un elevado número de enfermedades infecciosas sería establecer inmunidad protectora a nivel de las mucosas, ya que se trata de una de las principales vías de entrada de microorganismos patógenos. En nuestro caso, hemos utilizado dos cepas atenuadas de *Salmonella choleraesuis* ( $\Delta phoP$  y  $\Delta rpoS$ ) como vehículos para la liberación de vacunas de DNA (bactofección) en la mucosa con el fin de obtener protección efectiva.

Para ello se procedió a la construcción de un vector de expresión eucariota que vehiculaba el antígeno modelo 3xFLAG (pCMV::3xFLAGm2A). Posteriormente y mediante electroporación se introdujo en  $\Delta phoP$  y  $\Delta rpoS$ , obteniendo así los vehículos vacunales. Se valoraron los niveles de expresión de 3XFLAG mediante PCR cuantitativa a tiempo real en cultivos de macrófagos infectados con  $\Delta phoP$  y  $\Delta rpoS$ ; la permanencia del vector en las cepas vacunales en cultivos *in vitro* y en órganos diana de *Salmonella* en infecciones experimentales de ratones. Finalmente, se evaluó la respuesta inmune humoral y celular frente a *Salmonella* y 3xFLAG a través de ELISA indirecto.

Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos indicaron que: (i) pCMV::3xFLAGm2A es estable *in vitro* e *in vivo*; (ii) las dos cepas utilizadas son capaces de inducir elevados niveles de expresión del antígeno en macrófagos murinos en comparación con la cepa silvestre parental de *Salmonella* y con una cepa atenuada comercial; (iii) se obtuvieron altos niveles de IgG en suero e IgA en lavados intestinales específicos frente a *Salmonella* y 3xFLAG en experimentos de inmunización; (iv) finalmente, se observó un incremento en los valores de INF $\gamma$  producidos por esplenocitos que indican una respuesta celular frente a un estímulo con 3xFLAG.

Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que las cepas atenuadas de *Salmonella choleraesuis*,  $\Delta phoP$  y  $\Delta rpoS$ , pueden constituir excelentes candidatos para ser vehículos de vacunas de DNA dirigidas a las mucosas.

## **P.23. Análisis funcional de RybB, un ARN pequeño de *Salmonella enterica* dependiente de $\sigma^E$ , mediante técnicas genéticas**

Roberto Balbontín<sup>1,2</sup>, Nara Figueroa-Bossi<sup>1</sup>, Josep Casadesús<sup>2</sup>, Lionello Bossi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, 91198, Gif-sur-Yvette, Francia.*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41080 Sevilla, España.*

e-mail: robe@us.es

En bacterias, los ARN no codificantes reguladores o "ARN pequeños" (sRNA) regulan la expresión de genes-diana interaccionando con la región 5' no traducida del ARN mensajero y facilitando o dificultando el acceso del ribosoma. La regulación mediada por sRNA participa en procesos de adaptación a cambios ambientales o condiciones de estrés. En bacterias gram-negativas, condiciones que afectan al plegamiento de proteínas de la membrana externa (OMPs) activan el factor sigma alternativo  $\sigma^E$ , responsable de la transcripción de un conjunto de genes cuyos productos confieren tolerancia a dichas condiciones. El regulón  $\sigma^E$  incluye al pequeño ARN RybB, que inhibe la síntesis de varias proteínas de la membrana externa, reprimiendo la traducción y/o estimulando la degradación de los correspondientes ARN mensajeros. Uno de los ARNm-diana es el de *ompC*. Con objeto de identificar las secuencias determinantes en la interacción RybB:*ompC*, hemos obtenido mutantes alterados en dicha interacción gracias a un procedimiento que combina la PCR mutagénica con la recombinación mediada por el sistema lambda Red. Fragmentos de ADN que contenían el gen *rybB* o la región situada corriente abajo del promotor *ompC* fueron amplificados en condiciones propensas a error y transferidos al cromosoma de una estirpe que porta una fusión *ompC::lacZ* y expresa constitutivamente  $\sigma^E$ . Los mutantes se detectaron por cambios de color en placas indicadoras. De este modo se obtuvo una colección de mutantes, posteriormente ratificados por secuenciación y caracterizados por Northern. Esta estrategia ha permitido identificar las secuencias de ARN implicadas en la interacción RybB:*ompC*, así como las relacionadas con la estabilidad y regulación de RybB. La relevancia de la estequiometría y la sutileza de los efectos detectados subrayan la importancia de abordar este tipo de estudios usando genes en copia única y en su contexto cromosómico nativo (en lugar de los habituales sistemas de sobreproducción del sRNA).



## **P.24. Hidrólisis de GTP y función modificadora de tRNAs de la proteína MnmE de *Escherichia coli***

Silvia Prado, Magda Villarroya, Elvira Cebolla y M<sup>a</sup>Eugenia Armengod.  
Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda Autopista del Saler s/n, 46013  
Valencia. armengod@cipf.es

MnmE es una proteína conservada evolutivamente desde bacterias a humanos, implicada en la modificación del tRNA, aunque su función precisa es aún desconocida. Mutaciones en *mnmE* son pleiotrópicas afectando a diversas características fenotípicas como son el crecimiento celular, resistencia a pH ácido e hiperexcitividad en la lectura de codones de stop. MnmE es una proteína con tres dominios, cada uno de los cuales está relacionado de alguna forma con la función modificadora. La actividad GTPasa es esencial para dicha función, habiéndose propuesto que cambios conformacionales asociados al ciclo GTPasa la facilitarían. Sin embargo, no puede descartarse que la hidrólisis de GTP sea necesaria para llevar adelante una reacción modificadora energéticamente desfavorable. Al contrario de las proteínas Ras, MnmE presenta una alta actividad GTPasa intrínseca y baja afinidad por nucleótidos. Además, MnmE requiere la hidrólisis de GTP (no basta con la unión) para ser funcionalmente activa y utiliza un mecanismo para hidrolizar GTP diferente al de Ras. Datos bioquímicos y estructurales sugieren que MnmE utiliza un nuevo mecanismo de hidrólisis de GTP donde el dominio G dimeriza de manera dependiente de potasio e induce la hidrólisis de GTP. Mediante mutagénesis dirigida y estudios bioquímicos y funcionales demostramos que algunas mutaciones en el dominio G de MnmE no impiden su dimerización ni afectan gravemente su capacidad hidrolítica; sin embargo, son funcionalmente defectuosas. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que cambios conformacionales asociados a la hidrólisis de GTP son esenciales para la función modificadora de la proteína.

## **P.25. Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*: EPTS, estrés celular por deficiencia en la translocación de proteínas extracelulares**

Sonia Gullón, Carmen Palomino y Rafael P. Mellado  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). c/ Darwin 3. Campus de la  
Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain. E-mail:  
sgullon@cnb.csic.es

*Streptomyces lividans* es una bacteria del suelo, Gram positiva, eficiente secretora, cuyo genoma tiene un alto contenido en G+C, que es ampliamente utilizada para la producción industrial de enzimas degradativas extracelulares. En nuestro laboratorio hemos identificado en *S. lividans* cuatro genes que determinan la síntesis de cuatro peptidasas señal tipoI funcionales (*sipW-Z*) localizados uno tras otro en el genoma bacteriano. Análisis proteómico (geles 2D seguidos de espectrometría de masas MALDI-TOF) del secretoma de *S. lividans* nos ha permitido establecer que SipY es la peptidasa señal mayoritaria y que su función puede ser complementada por cualquiera de las otras tres peptidasas minoritarias cuando se utiliza una estirpe carente del gen *sipY*, demostrándose así la inexistencia de especificidad de sustrato entre las diferentes peptidasas señal.

El complejo de membrana formado por las proteínas SecY, SecE y SecG está involucrado en la translocación de proteínas a través de la membrana citoplásmica de bacterias. La comparación de secuencias nos ha permitido la identificación de un gen homólogo a *secG* en el genoma de *S. lividans*, cuya delección resulta en un fenotipo de esporulación retrasada y secreción deficiente. La estirpe deficiente en SecG puede sobreproducir y secretar la enzima modelo  $\alpha$ -amilasa, aunque la cinética de translocación de la proteína sobreproducida al medio de cultivo está sensiblemente retrasada en comparación con la de la estirpe no mutante.

Las estirpes deficientes en SipY o en SecG tienen fenotipos similares de esporulación deficiente y secreción retrasada. Análisis transcripcional utilizando microarrays de genoma completo ha permitido la identificación de los genes involucrados en la respuesta celular al estrés ocasionado por el funcionamiento deficiente de la translocación (EPTS) en las estirpes mutantes. La célula reacciona al EPTS en primera instancia disminuyendo el nivel de transcripción de genes que determinan la síntesis de proteínas extracelulares (como se ha confirmado por análisis por RT-PCR cuantitativa y electroforesis bidimensional de proteínas extracelulares) y de algunos genes reguladores. Aproximadamente el 50% de los genes cuya expresión ha disminuido coincide en ambas mutantes.

## **P.26. Tuberculosis multirresistente en España: análisis filogenético de los casos importados**

P. Gavín, M.J. Iglesias, L. Herrera, M.S. Jimenez, C. Lafoz, A. Cebollada,  
M.A. Lezcano, M.J. Revillo, C. Martín y S. Samper.  
Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Miguel Sevet.  
Isabel la Católica 1-3. 50009-Zaragoza. e-mail: pgavinb.iacs@aragon.es

**Introducción:** *M. tuberculosis* complex puede subdividirse según distintos marcadores moleculares en familias, grupos o linajes (Sreevatsan *et al.*, 1997; Filliol *et al.*, 2003; Gagneux *et al.*, 2006). La procedencia geográfica del hospedador es un factor indicativo del aislado clínico de tuberculosis del que es portador, ya que, aparentemente, existe una asociación estable entre las poblaciones de bacilos tuberculosos y sus hospedadores humanos.

**Objetivo:** Determinar las familias genotípicas/linajes de 159 aislados de TB MR de pacientes extranjeros genotipados en la “Red Española de Vigilancia de la tuberculosis multirresistente” entre 1998 y 2007.

**Material y métodos:** Se estudio el polimorfismo del locus Direct Repeat utilizando la técnica Spoligotyping (Kamerbeek *et al.*, 1997), y del codon 463 del gen *katG* mediante PCR-RFLP con la enzima de restricción *MspI* (Uhl *et al.*, 1996).

**Resultados:** Durante los 10 años de estudio de los casos de TB MR en España, hemos observado un incremento progresivo en el número de aislados procedentes de pacientes extranjeros. En 1998, sólo un 5% de los aislados MR eran de pacientes inmigrantes mientras que en 2007, el 75% de los aislados fueron de pacientes extranjeros. Las familias genotípicas identificadas por Spoligotyping (Filliol *et al.*, 2003) fueron: LAM (24,5%), Haarlem (18,9%), T (17%), W-Beijing (15,7%), X (4,4%), S (2,5%) y Africanum (0,6%). No pudo asignarse una familia genotípica en función de su espoligopatrón al 16,3% de los aislados. En nuestro entorno la mayoría de los aislados de pacientes inmigrantes pertenecen al linaje Euro-Americano descrito por Gagneux y ampliamente distribuido en Europa, África y América (familias Haarlem, LAM, T y X). El linaje Este-Asiático (familia W-Beijing) se asoció a inmigración, principalmente de Europa del Este y China; y el linaje Africano del Oeste (*M. africanum*) se identificó en un paciente procedente del África Subsahariana. No se encontraron aislados del linaje Indo-Oceánico (familia EIA), ni del linaje Indo-Africano del Este (familia CAS).

## **P.27. La multirresistencia en *P. multocida* está mediada por la cohabitación de pequeños replicones**

Álvaro San Millán, José Antonio Escudero, Laura Hidalgo, Belén Gutiérrez,  
Bruno González-Zorn

Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040-Madrid. E-mail:  
bgzorn@vet.ucm.es

*Pasteurella multocida* es un patógeno zoonótico de distribución mundial responsable de un gran número de enfermedades de elevada importancia económica en distintas especies animales y de casos esporádicos en el hombre. El tratamiento de elección está basado en la utilización de tetraciclinas así como de beta lactámicos y estreptomycinina.

El responsable de la resistencia a beta lactámicos en la mayoría de los aislados es el plásmido movilizable pB1000 con el gen *bla<sub>ROB1</sub>*, descrito previamente en *Haemophilus parasuis* (San Millán *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., Junio 2007). Al mismo tiempo, hemos descrito un nuevo plásmido a partir de una única cepa, pB1002, idéntico a pB1000 pero con la inserción del recientemente descrito ISAp11 corriente abajo de *bla<sub>ROB-1</sub>*. Por otro lado, hemos caracterizado la resistencia concomitante a otros antibióticos en los aislados resistentes a beta lactámicos. Todas las cepas son adicionalmente resistentes a sulfamidas y a tetraciclinas y/o estreptomycinina, apareciendo una relación directa del patrón de resistencia y el perfil de plásmidos en todos los casos. Hemos secuenciado los diferentes plásmidos codificantes de los genes de resistencia a tetraciclina *tet(H)* (p9956), *tet(B)* (pB1001) y *tet(O)* (p13142), y los codificantes del gen de resistencia a estreptomycinina *strA* (pTYM1 y pB1003). Estos replicones pertenecen a la familia de plásmidos movilizables MOB<sub>HEN</sub>, y presentan un tamaño de entre 2 y 6 kb. Todos los plásmidos del estudio fueron transformados con éxito en *E. coli*, salvo p13142 y pB1002. Finalmente, estudiamos las propiedades de transferencia y estabilidad del plásmido pB1000, demostrando que es capaz de movilizarse por conjugación.

## **P.28. El regulador tipo LysR AtzR impide la activación del promotor dependiente de $\sigma^{54}$ *Porf98* de *Pseudomonas* sp. ADP**

Ana I. Platero\*, Eduardo Santero y Fernando Govantes  
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de  
Olavide/CSIC. Carretera de Utrera, Km. 1, 41013, Sevilla. \*Correo  
electrónico: aiplagom@upo.es

La bacteria Gram-negativa *Pseudomonas* sp. ADP es el organismo modelo para la biodegradación del herbicida atrazina, que utiliza como fuente de nitrógeno. Previamente hemos demostrado que *Pseudomonas* sp. ADP no es capaz de utilizar la atrazina en presencia de otras fuentes de nitrógeno preferenciales. El regulador transcripcional tipo LysR AtzR es responsable de la activación del operón *atzDEF* que codifica las enzimas necesarias para la conversión de ácido cianúrico en dióxido de carbono y amonio, que son los pasos finales de dicha ruta. El gen *atzR* es transcrito desde un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ , que es activado por NtrC en condiciones de limitación de nitrógeno y reprimido por su propio producto, AtzR.

Recientemente hemos encontrado un segundo promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  inmediatamente por detrás de *atzR*. Este promotor podría dirigir la transcripción de cinco ORFs, *orf98*, *orf97*, *orf96*, *orf95* y *orf94*, que codifican un posible transportador tipo ABC. Hemos utilizado una combinación de análisis de la expresión génica *in vivo* y ensayos de unión proteína-ADN *in vitro* para caracterizar los elementos implicados en la regulación. Nuestros resultados sugieren fuertemente que (i) el promotor *Porf98* se regula de la misma manera que el de *atzR*: positivamente por NtrC y negativamente por AtzR; (ii) la arquitectura de la región promotora es típica de un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ : el sitio de unión de NtrC se encuentra más de 100 pb por delante del inicio de la transcripción, y hay un posible sitio de unión de IHF que facilita la interacción entre activador; y ARN polimerasa; (iii) hay además un sitio de unión de AtzR aproximadamente equidistante del promotor y el sitio de unión de NtrC; por último, (iv), AtzR parece reprimir la transcripción alterando el proceso de activación, en vez de interferir con la función de la ARN polimerasa. Estos resultados subrayan la idea de que AtzR es un regulador versátil, capaz de activar un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  (*PatzDEF*) y de reprimir dos promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  (*PatzR* y *Porf98*) mediante mecanismos completamente diferentes (ver la comunicación presentada por Fernando Govantes en esta misma reunión)

## P.29. *qnrB2* en España

Belén Gutiérrez<sup>1</sup>, Silvia Herrera-Leon<sup>2</sup>, José Antonio Escudero<sup>1</sup>, Laura Hidalgo<sup>1</sup>, Rubén González-Sanz<sup>2</sup>, Margarita Arroyo<sup>2</sup>, Álvaro San Millán<sup>1</sup>, M. Aurora Echeita<sup>2</sup>, Bruno González-Zorn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Laboratorio de Referencia de Salmonella, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

E-mail: bgzorn@vet.ucm.es; belen.gutierrez.soriano@gmail.com

Hemos estudiado un aislado de *Salmonella enterica* serovar Bredeney que presenta un perfil inusual de alta resistencia a quinolonas (ácido nalidíxico), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina), aminoglicósidos (gentamicina, kanamicina, ampicilina, tobramicina), beta-lactámicos (amoxicilina, amoxicilina/ ácido clavulánico, cefotaxima) y tetraciclina.

Hemos demostrado que este fenotipo de multiresistencia se transfiere en bloque por conjugación mediante un plásmido de 320 kpb que hemos denominado pb1004, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2. Mediante clonaje hemos obtenido un plásmido recombinante con un inserto de 7612pb que hemos secuenciado completamente. El fragmento contiene el gen *qnrB2* que codifica para una proteína de 215 aminoácidos perteneciente a la familia de repetición de pentapéptidos. *qnrB2* por si sólo es capaz de conferir resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* INVαF<sup>+</sup>. Su entorno genético es distinto al descrito hasta el momento para este gen e incluye dos genes homólogos a genes cromosómicos de *Marinobacter aquaeolei*.

En definitiva, hemos identificado por primera vez en España un gen de la familia *qnrB*. Su entorno genético es novedoso y nos sugiere que este gen tiene un origen marino.

## **P.30. Mecanismo de represión del sistema de bombeo múltiple de drogas SmeDEF de *Stenotrophomonas maltophilia* por el represor transcripcional SmeT**

A. Hernández<sup>1</sup>, P. Sánchez<sup>1,2</sup>, F. Rojo<sup>1</sup>, J.L. Martínez<sup>1</sup>  
ahdez@cnb.csic.es

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, <sup>2</sup>Dirección actual:  
Children's Cancer Research Institute, The University of Texas Health Science  
Center, San Antonio, Texas, USA

La multirresistencia a antibióticos se ha convertido en un serio problema para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En bacterias Gram-negativas las bombas de expulsión de antibióticos tienen una contribución relevante tanto en la resistencia intrínseca como en la resistencia adquirida. Los sistemas de bombeo múltiple de drogas MDR (Multidrug Resistance) son inespecíficos y pueden eventualmente expulsar no solo drogas sino también un amplio rango de compuestos, algunos de ellos esenciales para la supervivencia bacteriana. Esta inespecificidad obliga a que la expresión de los genes que codifican sistemas MDR deba ser fuertemente regulada.

En el patógeno oportunista *Stenotrophomonas maltophilia* la bomba SmeDEF(1) es capaz de expulsar tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y quinolonas. La expresión de SmeDEF está regulada por el represor transcripcional SmeT (2). Para estudiar las bases moleculares de la acción de SmeT como regulador, el represor transcripcional se clonó y expresó, en *E. coli*, como una proteína de fusión a inteína (IMPACT-CN New England, Biolabs). Este sistema permitió purificar la proteína SmeT con su secuencia de aminoácidos nativa. La interacción de SmeT con la zona intergénica *smeT-smeD*, se demostró mediante ensayos de retardo de DNA en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes y footprinting y los nucleótidos implicados en la unión se delimitaron por footprinting y ensayos de interferencia de radical hidroxilo. Así, hemos probado que SmeT se une a una secuencia pseudopalindrómica de 28 pares de bases que se sitúa en la zona intergénica *smeT-smeD*, lo que provocaría la represión de la transcripción, tanto del operon *smeDEF*, como del gen *smeT* que codifica el regulador de la bomba.

1. Alonso, A., and Martinez, J. L. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* **44**(11), 3079-3086
2. Sanchez, P., Alonso, A., and Martinez, J. L. (2002) *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11), 3386-3393

### **P.31. Las islas de patogenicidad son las responsables de la adaptación al hospedador de *Staphylococcus aureus***

\*J. Blanco, E. Maiques, C.Úbeda, I. Lasa, J.R.Penadés

Universidad CEU-Cardenal Herrera/ Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Apdo.187, 12400 Segorbe, Castellón, España.(blanco\_jos@gva.es)

La virulencia de muchas bacterias patógenas es debida a proteínas codificadas por largas agrupaciones de genes denominadas islas de patogenicidad (IPs). Aunque la presencia de IPs es un prerequisite para muchas enfermedades bacterianas, se conoce muy poco acerca de sus orígenes y de su mecanismo de transferencia entre bacterias. En las cepas de *Staphylococcus aureus* se han descrito diversas IPs entre las que se incluyen SaPI1-4 y SaPI<sub>n</sub>1, procedentes de cepas humanas, y SaPI<sub>bov</sub>1-2 procedentes de cepas bovinas. Actualmente hemos secuenciado una nueva IP bovina, SaPI<sub>bov</sub>-BA4. Tras su análisis *in silico* observamos una región homóloga al gen cromosómico de *Staphylococcus aureus* que codifica para la proteína de unión al Factor de von Willebrand (vWbp). Dicha proteína presenta alta homología con la región N-terminal de la estafilo-coagulasa, enzima responsable de la coagulación del plasma. Dado que la estafilo-coagulasa coagula de manera diferencial los plasmas de las distintas especies a las que *S. aureus* infecta, nos planteamos la hipótesis de que otros genes, presentes en islas de patogenicidad, pudiesen complementar esa actividad en aquellos hospedadores en los que la estafilo-coagulasa no es efectiva. Por esta razón investigamos la actividad coagulante del factor vWbp presente en la isla mediante la prueba de la coagulasa en plasma de diferentes especies. Nuestros resultados muestran que la expresión del factor vWbp presente en la isla permite la coagulación del plasma de ovejas y cabras, cosa que no realiza la estafilo-coagulasa cromosómica, lo que sugiere que dicha proteína posee un alto grado de especificidad, relacionada con el hospedador en el que se aisló la cepa. Adicionalmente, este factor ha sido encontrado en otras cepas de origen bovino, pero no en cepas de origen humano o cunícola. Tras estos resultados, podemos concluir que las cepas de *S. aureus* se adaptan al hospedador que infectan mediante la expresión de factores de virulencia codificados en islas de patogenicidad.



## **P.32. Eliminación de competidores por inducción de fagos residentes: el ejemplo de la lucha entre *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus***

\*Selva, L., Viana, D., Corpa, JM., Lasa, I, Penadés, JR.  
Universidad CEU-Cardenal Herrera – Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113, Moncada, Valencia.\*(lselva@uch.ceu.es)

Aunque la mayoría de las cepas clínicas son lisogénicas, portando un gran número de fagos temperados, el papel de estos fagos en la competición entre bacterias no se conoce. En este trabajo, usando las bacterias patógenas *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* como modelo, demostramos que los fagos residentes tienen un importante papel en el control de las poblaciones bacterianas. *S. pneumoniae* elimina *S. aureus* de la nariz y la garganta, debido a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aquí demostramos que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por *S. pneumoniae* induce la respuesta SOS en *S. aureus*, y que la letalidad asociada a este proceso está mediada por la activación de los fagos temperados presentes en el estafilococo. Un bioproducto natural de este proceso es la producción y liberación de fagos e islas activas, los cuales pueden diseminar los factores de virulencia codificados en ellos. Por lo tanto, lo que aquí se demuestra es que las bacterias pueden utilizar señales que inducen la respuesta SOS, y por lo tanto la activación de fagos, para eliminar especies competitivas, siendo este un mecanismo novedoso en el estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas.

### **P.33. RinA controla el empaquetamiento y la transferencia de fagos e islas de patogenicidad en *Staphylococcus aureus***

Ferrer, MD., Quiles, N., Tormo, MA., Lasa, I., Penadés, JR.  
Centro de Investigaciones y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Apdo. 187, 12.400 Segorbe, Castellón, España. [ferrer\\_mde@gva.es](mailto:ferrer_mde@gva.es)

La expresión coordinada de los distintos genes presentes en el genoma de los fagos es esencial para la correcta inducción, replicación y empaquetamiento de los mismos. La mutación sistemática de cada uno de los genes presentes en el genoma del fago 11 de *Staphylococcus aureus* nos ha permitido caracterizar la función de RinA. Aunque inicialmente descrito como un regulador de la actividad de la integrasa, nuestros estudios demuestran que esta proteína controla el empaquetamiento del fago, siendo un activador transcripcional de la expresión de los genes del módulo de empaquetamiento. Asimismo, y teniendo en cuenta que un mutante en este gen replica con normalidad pero no es capaz de lisar la bacteria, demostramos que RinA regula la expresión del módulo de lisis del fago. Finalmente, y puesto que las islas de patogenicidad utilizan las proteínas codificadas por el fago para su propia transferencia, demostramos que RinA controla el empaquetamiento y la transferencia de las islas de patogenicidad de *S. aureus*.

## **P.34. En las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*: ¿Quién controla al controlador?**

\*Martínez, R., Mir, I., Tormo, MA., Lasa, I., Penadés, JR.  
Universidad CEU-Cardenal Herrera/ Centro de Investigación y Tecnología  
Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA),  
Apdo.187, 12400 Segorbe, Castellón, España.

\* e-mail: maruro@uch.ceu.es

Aunque las islas de patogenicidad están presentes en la mayoría de las especies bacterianas, las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) presentan como característica diferenciadora su capacidad para replicarse de forma autónoma tras la infección con determinados fagos. En condiciones normales (no inducción de fagos o infección), la isla expresa un represor (StI) responsable de bloquear la replicación de la isla, de forma que si delecionamos ese represor la isla es capaz de autoreplicarse en ausencia de fagos. La pregunta que surge inmediatamente es ¿por qué la presencia del fago es capaz de inducir la replicación de la isla?. Nuestra hipótesis es que el fago, por un mecanismo que desconocemos, contrarresta la acción represora de ORF20, provocando de esta forma la replicación de la isla.

En este trabajo analizamos quién y cómo se controla la expresión de StI, además de analizar el papel regulador de StI sobre la integrasa de la isla. Nuestros estudios utilizando diferentes islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPI1, SaPI2, SaPI3, SaPIbov1, SaPIbov2 y SaPIin1) demuestran que StI se autorreprime, controlando su propia expresión. Además, StI bloquea la expresión de la integrasa de la isla, por lo que la eliminación del mismo es necesario para la correcta transferencia de la isla.

## **P.35. $\sigma^B$ controla la formación de biofilm dependiente de Bap en *Staphylococcus aureus***

M. Martí\*, MP. Trotonda, MA. Tormo, A. Toledo-Arana, I. Lasa, JR. Penadés  
Universidad CEU-Cardenal Herrera/ Centro de Investigación y Tecnología  
Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Apdo.  
187, 12.400

Segorbe, Castellón, España (marti\_mig@gva.es)

*Staphylococcus aureus* produce infecciones que suelen aparecer frecuentemente en su forma crónica y además están asociadas con la formación de biofilm. En algunas ocasiones, la formación de biofilm está relacionada con la producción de la proteína asociada a biofilm (Bap), el producto del gen *bap*. *S. aureus* es capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales *in vitro* e *in vivo* debido a la presencia de una red de reguladores globales entre los que destacan *agr*, *sar*,  $\sigma^B$  y *saeRS*. Estos reguladores están implicados en el control de la expresión de factores de virulencia. Mediante análisis mutacional de estos reguladores globales, determinamos que  $\sigma^B$  era esencial en la formación de biofilm dependiente de Bap. Mutantes por delección en  $\sigma^B$  de tres cepas de *S. aureus* no relacionadas genéticamente mostraron una disminución en la expresión de Bap y en la formación de biofilm. Sorprendentemente, el análisis por Northern blot reveló que  $\sigma^B$  no afectaba de una forma significativa a la transcripción de *bap*. Está bien establecido que los mutantes en  $\sigma^B$  producen grandes niveles de proteasas extracelulares. Este hecho sugiere que las proteasas podrían ser las responsables de la ausencia de Bap en la pared bacteriana. Para confirmar esta hipótesis, realizamos dobles mutantes  $\sigma^B$ -*aur* (aureolisina) y  $\sigma^B$ -*ssp* (operón *ssp*). El análisis de estos mutantes  $\sigma^B$ -*aur* y  $\sigma^B$ -*ssp* mostró que ambos restauraban la capacidad para formar biofilm y expresar Bap en la superficie de la bacteria. Estos resultados sugieren que el efecto de la mutación de  $\sigma^B$  sobre la formación del biofilm dependiente de Bap es debido principalmente a la acción de las proteasas codificadas por el operón *ssp*. Por último, y debido a que *agr* controla la expresión de proteasas de *S. aureus*, se pretende estudiar la relación entre este regulador global y la formación de biofilm dependiente de Bap.

### **P.36. Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* se empaquetan y transfieren utilizando proteínas codificadas por el fago**

Quiles, N.\*, Ferrer, MD., Tormo, MA., Lasa, I., Penadés, JR.  
Centro de Investigaciones y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Apdo. 187, 12.400 Segorbe, Castellón, España. \*(quiles\_nur@gva.es)

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) son elementos genéticos móviles de entre 15-27 Kb que codifican para diversos factores de virulencia. Las SaPIs están presentes en la mayoría de cepas secuenciadas de *S. aureus* y pueden ser movilizadas mediante la infección con fagos de cepas sensibles o mediante la inducción de profagos residentes. Esta movilización conlleva la escisión, replicación y encapsidación del genoma de la isla en cápsides específicas de menor tamaño, y su posterior transferencia a una cepa aceptora con una elevada frecuencia de transducción.

En este trabajo nos planteamos caracterizar la biología del proceso de empaquetamiento del fago 11, fago natural de *S. aureus* y cómo la isla SaPI<sub>bov1</sub>, que es movilizada por este fago, interactúa con el mismo. Para ello deletamos cada uno de los genes que forman parte del módulo de encapsidación del fago y analizamos cómo afectó al empaquetamiento del fago esta delección. Esta aproximación nos ha permitido identificar y caracterizar un total de 23 genes, implicados en el empaquetamiento del fago. Interesantemente, y aunque la isla se escindía y replicaba en todos los casos, los mutantes defectivos en el empaquetamiento del fago fueron incapaces de empaquetar y transferir la isla, lo que demuestra que para su transferencia, la isla utiliza proteínas codificadas por el fago.

## **P.37. Caracterización molecular de los sistemas implicados en la producción de hidroxiectoína en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens***

M. Reina Bueno, M. Argandoña, J.J. Nieto, C. Vargas  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Sevilla (mrb@us.es)

La bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* acumula y sintetiza *de novo* solutos compatibles en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, como son la elevada salinidad (ectoínas) y la temperatura (hidroxiectoína y trehalosa) (1). La síntesis de hidroxiectoína a partir de ectoína está catalizada por la enzima ectoína hidroxilasa, codificada por el gen *ectD*. Estudios previos han puesto de manifiesto que un mutante en *ectD* es termosensible, lo que demuestra el papel de la hidroxiectoína en la termoprotección de *Chromohalobacter* (2).

En este estudio hemos abordado la regulación transcripcional del gen *ectD*. Mediante ensayos de medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional *PectD::lacZ*, ensayos de qPCR y cuantificación de solutos compatibles acumulados mediante HPLC, hemos demostrado que la expresión de *ectD* está osmo y termorregulada y sujeta a un doble control, tanto por el factor general de respuesta a estrés por temperatura  $\sigma^{32}$  como por un regulador transcripcional específico (EctR), cuyo gen se localiza en 5' del gen estructural *ectD*.

Por otro lado, aunque hemos demostrado que *ectD* es el principal responsable de la síntesis de hidroxiectoína, se han puesto de manifiesto otras rutas de síntesis de este soluto compatible. En primer lugar, se ha postulado la existencia de una ruta de síntesis de hidroxiectoína a partir de a partir del ácido  $N\gamma$ -acetildiaminobutírico, precursor de la ectoína (1). En segundo lugar, se ha localizado en el genoma de *C. salexigens* una segunda copia de *ectD*, que hemos denominado *ectE*, y que podría también estar implicado en la síntesis de hidroxiectoína ya que un mutante *ectD* todavía acumula parcialmente este soluto compatible (1). Mediante qPCR hemos comenzado a estudiar la expresión y regulación transcripcional de *ectE* y actualmente estamos abordando el estudio de diferentes mutantes tanto en *ectE* como en el gen que podría codificar la primera enzima de la ruta alternativa de síntesis de hidroxiectoína, para confirmar su implicación en la síntesis de hidroxiectoína en *C. salexigens*.

1. Cánovas et al. (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3774-3779
2. García-Esteba et al. (2006). *J. Bacteriol.* 188: 3774

## **P.38. Presencia de elementos similares a las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* en bacterias Gram-positivas**

\*Tormo, MA., Donat, V., Ferrer, MD., Quiles, N., Mir, I., Martí, M., Martínez, R., Blanco, J., Lasa, I., Penadés, JR.  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113, Moncada,  
Valencia.\*(tormo\_man@gva.es)

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) son una familia de elementos genéticos de 15-27 kb que contienen genes que codifican para toxinas antigénicas, otros factores de virulencia y genes responsables de su propagación. Las SaPIs necesitan, para su movilidad y diseminación, ser inducidas por determinados fagos que activan el ciclo de escisión del cromosoma, replicación de la SaPI y empaquetamiento en cápsides que proporciona el propio fago, aunque la isla codifica para tres proteínas que intervienen en la producción de cápsides específicas para su empaquetamiento. Esta secuencia de eventos es conocida como ciclo de escisión-replicación-empaquetamiento (SaPI excision-replication-packaging ERP). Como consecuencia de su elevada frecuencia de transferencia, las SaPIs se encuentran altamente diseminadas y muchas cepas de *S. aureus* contienen dos o más SaPIs. Todas las SaPIs se encuentran integradas en sitios específicos del cromosoma y están flanqueadas por pequeñas secuencias de repetición, que representan los sitios *att*. Además codifican integrasas específicas que reconocen estos sitios *att*, y son requeridas para la escisión e integración de la isla.

Realizando un análisis *in silico* en busca de estructuras similares a las SaPIs, y analizando los genomas de bacterias publicados, hemos identificado la presencia de elementos relacionados en distintas especies bacterianas Gram positivas, entre las que se encuentran *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* o *Streptococcus suis*. Estos elementos, al igual que ocurre con las SaPIs, presentan los genes necesarios para producir el ciclo de escisión-replicación-transferencia. Asimismo, la presencia de estos elementos en algunas cepas secuenciadas, pero su ausencia en otras cepas relacionadas, indica que son móviles. En este trabajo, presentaremos evidencias acerca de su funcionamiento y relación con las SaPIs de *S. aureus*.

## **P.39. El gen BAB1\_0351 de *Brucella abortus* 2308 codifica una glicosiltransferasa involucrada en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido**

Gil-Ramírez, Y.; Palacios-Chaves, L.; Conde-Alvarez, R.; Moriyón, I.; Iriarte, M.

Dpto. de Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona, España. E-mail: ygilrami@alumni.unav.es

El lipopolisacárido (LPS) es determinante en la patogenicidad de *Brucella*. Es conocido que el polisacárido O del LPS es fundamental en la virulencia. Sin embargo, hemos demostrado que la mutación en una manosiltransferasa (Lpcc) causa atenuación sin afectar al polisacárido O. Esto demuestra la existencia de una rama oligosacáridica en el LPS de *Brucella* que es esencial en la virulencia.

Para investigar si existen otras glicosiltransferasas semejantes a Lpcc, se buscaron las ORF anotadas como glicosiltransferasas en el genoma de *Brucella*. Esto permitió identificar la ORF BAB1\_0351 como perteneciente a la familia 25, que incluye glicosiltransferasas de síntesis del LPS. Por ello, se construyó el mutante no polar (*BAB1Δ0351*), se extrajo su LPS y se comparó con el de la cepa parental. Este análisis mostró que el mutante *BAB1Δ0351* contenía las formas de LPS dotadas de polisacárido O, pero que era deficiente en algún azúcar de la rama oligosacáridica. Los ensayos en modelo murino demostraron la atenuación de *BAB1Δ0351*, lo que refuerza la conclusión de que el papel del LPS de *Brucella* en la virulencia no es sólo asignable a la polisacárido O y abre la posibilidad de diseñar nuevas vacunas.



## **P.40. Problemática de la aplicación de técnicas de cuantificación microbiana al seguimiento de un reactor anaerobio termofílico seco**

B. Montero\*, J.L. García-Morales, D. Sales y R.Solera

Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de los Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales Universidad de Cádiz, Campus Río San Pedro s/n 11510 Puerto Real (Cádiz)

\*e-mail: blanca.montero@uca.es

En el grupo de investigación de Tecnología del Medio Ambiente, grupo de excelencia de la Junta de Andalucía, se ha estudiado desde hace más de dos décadas la degradación anaerobia de vertidos de alta carga orgánica, centrandose sus esfuerzos en los últimos años en el tratamiento biológico de residuos de alto contenido en sólidos como son los residuos sólidos urbanos y lodos de depuradoras. Dentro de los tratamientos biológicos se encontrarían el compostaje y la digestión anaerobia. Ambos desarrollados en el grupo de investigación, siendo la digestión anaerobia, objeto del presente trabajo.

La digestión anaerobia o biometanización consiste en la oxidación biológica de la materia orgánica mediante la actuación coordinada de microorganismos específicos y en ausencia de oxígeno molecular, transformándose dicha materia en productos finales estables e inertes, al mismo tiempo que se genera biogás (fundamentalmente metano y dióxido de carbono) con un potencial energético considerable, y produciéndose el crecimiento de nuevos microorganismos.

Aunque los microorganismos son los principales protagonistas del proceso de digestión anaerobia, tradicionalmente, han sido determinados mediante el parámetro de sólidos volátiles. Para profundizar en el conocimiento de las poblaciones se utilizaron técnicas de cultivo, a pesar de que presentaban dificultades derivadas de las interacciones sintróficas de los microorganismos, de las diferentes velocidades de crecimiento y requerimientos nutricionales, así como de la condición de anaerobiosis obligada. La aplicación de técnicas de microscopía y los test de actividad han permitido la cuantificación y determinación de actividad de estos microorganismos sin necesidad de cultivarlos. Por este motivo tanto la microscopía de epifluorescencia como los test de actividad han sido anteriormente desarrollados y optimizados en trabajos precedentes del Grupo en residuos de bajo contenido en sólidos. Para completar la información sobre la microbiota implicada en el proceso ha sido necesario acudir a otro tipo de métodos más selectivos como la hibridación molecular *in situ* (FISH).

El objetivo principal del presente trabajo es “estimar la concentración y la dinámica de los principales grupos de microorganismos responsables de la digestión anaerobia durante el arranque y la estabilización de reactores anaerobios termofílicos de alto contenido en sólidos”. Para ello se han aplicado tres técnicas de cuantificación microbiana diferentes: Microscopía de Epifluorescencia mediante tinción fluorocromo DAPI, que permite cuantificar la población total, Microscopía de Epifluorescencia mediante autofluorescencia, con la que sólo se pueden contar las metanógenas autofluorescentes, son aquellas donde predomina el cofactor F<sub>420</sub>, que se corresponden principalmente con las metanógenas utilizadoras de hidrógeno, y por último la hibridación molecular *in situ* (FISH) que mediante la aplicación de diferentes sondas permite diferenciar entre *Eubacteria* y *Archaea*, y dentro de éstas entre las utilizadoras de hidrógeno y las acetoclásticas. La aplicación de estas técnicas requiere de un pretratamiento previo a su aplicación en reactores anaerobios termofílicos secos, consistente en la adición del detergente Tween 80 y la agitación de las muestras durante 120 segundos. Asimismo la utilización de la técnica FISH precisa de una puesta a punto, fundamentalmente de la etapa de hibridación, que podría ser realizada en solución o en portaobjeto. Pero debido a problemas de interferencias con la cantidad de sólidos se llega a la conclusión que la forma más adecuada de llevar a cabo la hibridación de estas muestras es en portaobjeto.

El conocimiento específico de los principales grupos microbianos implicados en el proceso de digestión anaerobia nos ha permitido establecer correlaciones positivas entre la evolución de los microorganismos y los principales parámetros de operación del reactor.

## **P.41. Supresión de la sensibilidad a bilis en mutantes Dam<sup>-</sup> de *Salmonella enterica*: activación de bombas de vertido por carencia de AsmA**

S. B. Hernández-Piñero\*, I. Cota, J. López-Garrido, A. I. Prieto, F. Ramos-Morales, J. Casadesús

Dep. Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes 6, Sevilla 41012

\*E-mail: sarabelen84@hotmail.com

Los mutantes Dam<sup>-</sup> de *Salmonella enterica* son sensibles a bilis, y los revertientes capaces de formar colonias sobre medio LB suplementado con bilis de buey llevan dos clases principales de mutaciones: (i) pérdidas de función en el sistema MutHLS de reparación emparejamientos erróneos; (ii) mutaciones nulas en un gen poco conocido, cuyo homólogo en *E. coli* se llama *asmA*. La proteína AsmA de *Salmonella enterica* se localiza en la membrana externa. Experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real han indicado que la carencia de AsmA activa la transcripción de *marAB*, y en menor medida de *acrAB*. Ello puede explicar la capacidad de las mutaciones *asmA* para suprimir la sensibilidad a bilis de los mutantes Dam<sup>-</sup>. La relación entre AsmA y la actividad de las bombas bacterianas de vertido se desconoce. AsmA carece de homología con proteínas conocidas, y no forma parte de ningún sistema de transporte conocido. Es concebible que la activación de las bombas pueda ser una secuela de un defecto estructural (ej. debido a la falta de AsmA en la membrana externa). La capacidad de las mutaciones *asmA* para suprimir la sensibilidad a bilis no es específica del fondo genético Dam<sup>-</sup>, sino que se observa igualmente en fondos Wec<sup>-</sup>, DamX<sup>-</sup>, SeqA<sup>-</sup> y PhoP<sup>-</sup>. Además, las mutaciones *asmA* aumentan levemente la concentración mínima inhibitoria de bilis en comparación con la estirpe silvestre.

## **P.42. *Klebsiella pneumoniae* no estimula la expresión de péptidos antimicrobianos en células epiteliales pulmonares**

David Moranta<sup>1,2</sup>, Junkal Garmendia<sup>1,2</sup>, José A. Bengoechea<sup>1,2</sup>  
Programa de Infección & Inmunidad, Fundació Caubet-CIMERA Illes Balears<sup>1</sup>; Bases Moleculares de Patogenicidad & Virulencia, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes)<sup>2</sup>, Bunyola, España.

El epitelio pulmonar es el primer sitio de contacto entre los microorganismos y el huésped durante una infección. Además, las células epiteliales juegan un papel importante en la defensa del pulmón produciendo quimioquinas y péptidos antimicrobianos (PA). *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno nosocomial multirresistente causante de neumonías de curso muy rápido. Como hemos demostrado previamente, *K. pneumoniae* es resistente a la acción de péptidos antimicrobianos debido a la expresión del polisacárido capsular (CPS). En este contexto, nos propusimos investigar la expresión de PA en células epiteliales pulmonares durante la infección con *K. pneumoniae*, específicamente de las  $\beta$ -defensinas humanas (HBD).

La infección con un aislado clínico altamente virulento de *K. pneumoniae* no indujo la expresión de ninguna de las  $\beta$ -defensinas estudiadas ni siquiera 10h después de la infección. En cambio, un mutante isogénico carente del CPS indujo la expresión de las HBDs 1, 2 y 3 ya a las 4h post-infección. Un mutante isogénico que expresa CPS pero no el antígeno O del lipopolisacárido tampoco indujo la expresión de HBDs.

En el caso de la HBD2, la inducción de su expresión provocada por el mutante descapsulado fue dependiente tanto de la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B como de las vías de señalización de MAP quinasas (ERK y JNK). Además, aunque el mutante descapsulado invadió las células epiteliales (al contrario de lo que ocurre con la cepa silvestre), la inducción del promotor de HBD2 fue independiente de esta internalización. La activación de los receptores “toll-like” está implicada en el reconocimiento del mutante descapsulado ya que la reducción en la expresión de la proteína adaptadora MyD88 inhibió la expresión de HBD2.

En conjunto, los resultados indican que la presencia de CPS en la superficie de *K. pneumoniae* previene de la inducción de HBDs. De esta forma CPS además de conferir resistencia a péptidos antimicrobianos, evita la activación de vías de señalización implicadas en la expresión de HBDs.

### **P.43. Mapeo de residuos esenciales para la actividad de corte de la resolvasa RecU de *Bacillus subtilis*.**

Cristina Cañas, Begoña Carrasco, Esther García Tirado, Silvia Ayora y Juan C. Alonso

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, C/ Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.  
e-mail: ccanas@cnb.csic.es

La resolvasa RecU de *Bacillus subtilis* está implicada en el proceso de recombinación homóloga, reparación del ADN y en segregación cromosomal. *In vitro*, RecU cataliza la resolución de las estructuras de Holliday, es capaz de llevar a cabo el anillamiento de cadenas, y además modula la actividad de RecA. Esto sugiere un doble papel de RecU como mediador de las etapas tempranas y tardías de la recombinación homóloga. RecU está presente en todos los Firmicutes, y la estructura de rayos X presenta una alta similitud con otras resolvasas de arqueas. La estructura de RecU y de la resolvasa Hjc de arqueas se superpone bastante bien, excepto por un tallo, que comprende los residuos 56 al 89 y que sale del cuerpo principal de RecU (residuos 1-55 y 90-206), donde se sitúa el centro catalítico de la proteína (residuos D88, D99 y E101). En este trabajo mostramos que el tallo juega un importante papel en el reconocimiento de la estructura de Holliday. Mutaciones en los residuos Y80 y F81, dan lugar a proteínas que son incapaces de resolver estructuras de Holliday, resultando en cepas que son tan sensibles a un agente tóxico como es el MMS, como la cepa  $\square$ *recU*. Por otra parte, la región del tallo también parece estar implicada en la actividad de modulación de RecA. Mutaciones de los residuos K56 y R71 dan lugar a proteínas que aunque son capaces de resolver estructuras de Holliday y tienen una correcta segregación cromosomal, han perdido la capacidad de interaccionar con RecA y modular su actividad. Las cepas mutantes en estos residuos son igualmente sensibles a MMS como  $\square$ *recU*, lo que indica que se trata de una actividad con un importante papel en reparación por recombinación. Se definen además otras dos regiones esenciales para la actividad de corte de las estructuras de Holliday, fuera del sitio catalítico: la región amino terminal y la comprendida por los aminoácidos 115-119. Es el caso del mutante  $\square$ 1-32 (mutante de delección de los aminoácidos 1 al 32) y los mutantes en los residuos N115 y H119. Las proteínas mutantes han perdido la actividad de corte de las estructuras de Holliday y las cepas mutantes, al igual que las comentadas anteriormente, presentan un fenotipo sensible a MMS.

## **P.44. Secreción de proteínas en *Streptomyces lividans*: Especificidad y ambigüedad de las rutas de secreción**

Esther García, Carmen Palomino, Belén Illana y Rafael P. Mellado  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). c/ Darwin 3. Campus de la  
Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain. E-mail:  
eigarcia@cnb.csic.es

Bacterias del suelo Gram positivas como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces lividans* tienen una elevada capacidad para la producción de enzimas extracelulares degradativas y ambas bacterias se han usado extensivamente para la producción industrial de enzimas homólogas y heterólogas. Las proteínas liberadas al exterior celular a través del sistema de la ruta de secreción mayoritaria (ruta Sec) son un excelente sustrato para la degradación por proteasas extracelulares cuando no están correctamente plegadas. Las proteínas secretadas por la llamada ruta Tat (twin-arginine translocation) son vertidas al exterior celular ya plegadas en su correcta configuración.

La agarasa es una proteína extracelular de *S. coelicolor* que parece secretarse por la ruta Tat, y la región codificante de la proteína madura ha sido utilizada para comprobar la eficiencia de péptidos líderes de proteínas supuestamente secretadas por esa ruta. El gen *dagA* que determina la síntesis de agarasa se ha propagado en condiciones de sobreproducción en *S. lividans* en nuestro laboratorio y experimentos de co-inmunoprecipitación han demostrado que el enzima es también transportada al complejo translocasa (ruta Sec) por los componentes de la partícula reconocedora de señal (SRP), como el resto de proteínas de la ruta Sec.

La propagación del gen *dagA* en una estirpe mutante en el gen *tatC* (que no se puede propagar en medio líquido) en el que la ruta Tat se encuentra bloqueada ha permitido visualizar la formación de halos de degradación de agar, el sustrato natural de la agarasa, cuando las estirpes bacterianas fueron propagadas en medio sólido. Análogamente, la propagación del gen *xlnC* que determina la síntesis de xilanasa C, en una estirpe deficiente en la proteína SecG, que tiene la ruta Sec comprometida, demostró que esta es una proteína específica de la ruta Tat al no afectarse su secreción. La propagación en idénticas condiciones del gen *amlB* que determina la síntesis de  $\alpha$ -amilasa cuyo péptido líder fue sustituido por el de agarasa demostró que la secreción de este enzima específico de la ruta Sec, no puede tener lugar a través de la ruta Tat. sugiriendo que, en condiciones de sobreproducción, sólo determinadas proteínas pueden dirigirse por ambas rutas de secreción.

## P.45. Herramientas Moleculares en el estudio de la Microbiota Intestinal

Juan Manuel Sánchez-Calvo, María García-Castillo, Mercedes Rodríguez-Baños, Fernando Baquero, Clotilde Vázquez, Rafael Cantón, Rosa del Campo

Servicios de Microbiología y Nutrición y Dietética. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid 28034.

**INTRODUCCIÓN/OBJETIVOS.** El estudio de la microbiota intestinal ha estado siempre ligado a la necesidad de cultivar sus microorganismos. Las nuevas herramientas moleculares han puesto de manifiesto la existencia de un ecosistema mucho más complejo de lo que se creía inicialmente, ocupando un papel relevante las bacterias anaerobias. El objetivo de este trabajo es estudiar cualitativa y cuantitativamente la composición de la microbiota de sujetos intestinalmente sanos con las nuevas herramientas moleculares, intentando definir unos parámetros de normalidad para cada uno de los grandes grupos bacterianos.

**MATERIAL.** Se han incluido heces de 14 personas intestinalmente sanas con resultados analíticos dentro de la normalidad. Se solubilizaron 0,5 gr de heces en 5 ml de solución salina, y después de sedimentar la fibra se procedió a una extracción manual del ADN total mediante fenol/cloroformo. La pureza y cantidad del ADN se midió mediante el sistema NanoDrop. Se realizaron experimentos de PCR-Q para diferentes grupos bacterianos (*Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, Bacterias Ácido Lácticas, y *Fusobacterium*) con cebadores específicos de cada grupo en un equipo 7300 de Applied Biosystem. Como controles de amplificación se utilizó el ADN de una cepa patrón de cada grupo que correspondían con *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus plantarum* y *Fusobacterium nucleatum*. Los resultados fueron analizados mediante el software SPSS con test no paramétricos.

**RESULTADOS.** Se han detectado unos valores medios de densidad bacteriana de  $2,07 \cdot 10^{10}$  ( $\pm 0,67$ ) copias del gen 16S rADN/gr de heces para el grupo de *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, correspondiendo a un rango de  $7,8 \cdot 10^9$  hasta  $5,6 \cdot 10^{11}$ . En el caso de las Bacterias Lácticas, el valor medio fue de  $28,09 \cdot 10^7$  ( $\pm 5,09$ ) y un rango de  $0,89 \cdot 10^6$  hasta  $1,19 \cdot 10^8$ , y finalmente para el grupo *Fusobacterium* el valor medio fue de  $1,10 \cdot 10^6$  ( $\pm 3,08$ ) copias del gen 16S rADN/gr de heces con un rango de  $4,96 \cdot 10^5$  hasta  $1,47 \cdot 10^8$ .

**CONCLUSIONES.** La población bacteriana más estable cuantitativamente, así como la más numerosa, fue la de *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, mientras que los valores que más se dispersaron fueron los del grupo de las Bacterias Lácticas y el grupo *Fusobacterium*.

## **P. 46. Implicaciones genómicas de la movilización de ISPst9 en *Pseudomonas stutzeri* AN10**

Christie-Oleza J.A., Nogales B., Lalucat J. y Bosch R.  
Microbiología, Dto. Biología, Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma de Mallorca.

joseph.christie@uib.es

Las secuencias de inserción (IS) son los elementos genéticos móviles más pequeños y sencillos conocidos. Constan de dos repeticiones invertidas (IR) que la delimitan y que son reconocidas por una transposasa (TnpA), enzima codificada en la propia IS y que lleva a cabo la movilización del sistema. Son muchas las IS descritas hasta la fecha dando lugar a una gran diversidad, pero en ningún caso se ha observado una actividad notable de transposición ni un sistema de regulación que active la movilización de éstas. No obstante se ha observado la activación de la transposición de ISPst9 de *Pseudomonas stutzeri* AN10 en más de un 95% de los que llevan a cabo una conjugación, siendo el establecimiento del pili conjugativo, y todo lo que ello implica, el activador de la movilización de esta IS. La posibilidad de incrementar y controlar la transposición de ISPst9 ha permitido el estudio del mecanismo de salto de ésta y de las implicaciones que esto tiene para el genoma del hospedador.

El mecanismo de transposición usado por ISPst9 es conservativo, escindiéndose de su posición original mediante la formación de especies circulares. La proximidad de dos copias de esta IS en el genoma de AN10 permite, además, la movilización de los genes intermedios (en forma de transposón compuesto), la pérdida de los genes e incluso la duplicación de éstos. Una peculiaridad en este proceso de salto es que, en una frecuencia baja, se dan casos de captura de material genético no replicable en la bacteria. Posiblemente esto se da cuando la TnpA, en lugar de reconocer las IRs más externas del transposón compuesto, reconoce las más internas formándose un transposón con todo el genoma que se inserta en el material genético circular entrante, incorporándolo entre las dos copias de ISPst9 del genoma. Si la inserción se produce en un punto del propio genoma, y dependiendo de la orientación, puede originar inversiones o deleciones.



## **P.47. Identification of the whole set of PBPs of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* by binding of fluorescent antibiotics**

Dorota Korsak<sup>1</sup>, Gabriel O. Gutkind<sup>2</sup> and Juan A. Ayala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of General Microbiology, Faculty of Biology, Warsaw University, Poland, <sup>2</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina, and <sup>3</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, C/ Nicolas Cabrera, 1, 28049, Madrid, Spain

Pencillin-binding proteins (PBPs) are the targets of beta-lactam antibiotics, which are the most used antimicrobials worldwide. PBPs are responsible for the final synthesis steps of the universal exoskeleton of bacteria. From the first identification of these enzymes by Brian Spratt (1) to the present, much attention has been paid to model microorganisms such as *E. coli*, *B. subtilis* or *S. pneumoniae*. However, the increase in the appearance of resistance to beta-lactams and the diversity of the mechanisms involved in that resistance, including modification of the target PBPs, have elevated interest in these enzymes and particularly in those of Gram-positive pathogens. *Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen having the ability to survive in diverse environments, including foods and the cytosol of eukaryotic cells. The “surfaceome” of the model strain EGDe has been annotated (2) and recently revised (3). This includes proteins involved in the synthesis of peptidoglycan. By combined sequence information from the database dedicated to the analysis of the genomes of *L. monocytogenes* (strain EGDe) and of its non-pathogenic relative *Listeria innocua* (strain CLIP 11262) (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) as well as that from the Pfam database (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) and information from the NCBI Conserved Domain database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) and the Interpro database (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), 10 putative genes for PBPs (Lmo1892, Lmo2229, Lmo1438, Lmo2039, Lmo0441, Lmo0540, Lmo1916, Lmo2754, Lmo2812 and Lmo1855) have been localized. These proteins were classified according to molecular classes as PBPA1, PBPA2, PBPB1, PBPB2, PBPB3, PBPC1, PBPC2, PBPD1, PBPD2 and PBPD3, respectively. Previous analysis (4, 5, 6, 7) of *Listeria* cell membrane identified only five proteins able to bind I<sup>125</sup>-penicillinX, I<sup>125</sup>-ampicillin, or H<sup>3</sup>-benzylpenicillin (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, PBP5). By means of fluorescence-labelled antibiotics we have been able to identify the complete set of PBPs, both in whole cell and membrane extracts. Lmo2812 (PBPD2), a low molecular mass LMW-PBP, has been identified as a class C type 5, related to the peptidase S11 family, and a DD-carboxypeptidase activity has been demonstrated using synthetic substrates. Also Lmo2754 (PBPD1) has been

confirmed as a class C, type 5 LMW-PBP with high affinity for ampicillin. The specificity of these two proteins for natural mucopeptides will be discussed.

**1.- Spratt B.G.** 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(8): 2999–3003.

**2.- Glaser, P. et al.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849–852.

**3.- Bierne, H. and P. Cossart** 2007. *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 377–397.

**4.- Gutkind, G.O., S. B. Ogueta, A. C. de Urtiaga, M. E. Mollerach and R. A. de Torres.** 1990. Participation of PBP 3 in the acquisition of dicloxacillin resistance in *Listeria monocytogenes* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 25: 751-758.

**5.- Vicente MF, Berenguer J, de Pedro MA, Pérez-Díaz JC, Baquero F.** 1990. Penicillin binding proteins in *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Hung.* 37(2):227-231.

**6.- Korsak D, Zawadzka JJ, Siwińska ME, Markiewicz Z.** 2002. Penicillin-binding proteins of *Listeria monocytogenes*--a re-evaluation. *Acta Microbiol Pol.* 51(1):5-12.

**7.- Pierre J, Boisivon A, Gutmann L.** 1990. Alteration of PBP 3 entails resistance to imipenem in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(9):1695-1698.

## **P.48. *Klebsiella pneumoniae* coordina la expresión del polisacárido capsular y las modificaciones en el lípido A como respuesta frente a los péptidos antimicrobianos**

Enrique Llobet Brossa<sup>1,2</sup>, Paloma Giménez<sup>1,2</sup>, José A. Bengoechea<sup>1,2</sup>  
Programa de Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-Cimera Illes  
Balears<sup>1</sup>, Bases Moleculares de Patogenicidad y Virulencia, Centro de  
Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes)<sup>2</sup>,  
Bunyola, España.

Los patógenos se enfrentan continuamente a cambios durante una infección. Su capacidad de adaptación a las distintas condiciones está determinada por la activación sistemas de dos componentes. Los péptidos antimicrobianos son piezas clave en la respuesta defensiva del sistema inmune innato frente a las infecciones. En un trabajo anterior demostramos que hay una correlación directa entre la resistencia a péptidos antimicrobianos y la cantidad de polisacárido capsular (CPS) expresado por *Klebsiella pneumoniae*. Además, también demostramos que la presencia de péptidos antimicrobianos no sólo aumenta la cantidad de CPS expresada por *Klebsiella pneumoniae* sino que también aumenta la transcripción del operón *cps*, implicado en la síntesis de CPS.

En este trabajo mostramos que el incremento en la expresión de CPS dependiente de péptidos antimicrobianos está coordinado con modificaciones que se dan en el lípido A de la bacteria y que esta regulación implica los sistemas de dos componentes *PmrA/PmrB*, *PhoP/PhoQ* y *RcsC/YojN/RcsB*. Una concentración subinhibitoria de polimixina B incrementa la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a polimixina B,  $\alpha$ -defensina 1 y HNP-1. La polimixina B induce tanto la expresión de *cps*, como la expresión de *pagP* y del operón *pmrH*, siendo estos los responsables de las modificaciones que se dan en el lípido A, adición de palmitato y aminoarabinosa, respectivamente. La expresión de *pmrH*, *pagP* y *cps* están regulados por los sistemas *PmrA/PmrB*, *PhoP/PhoQ* y *RcsC/YojN/RcsB*. Además, la activación de cada uno de ellos está controlada por los otros.

## **P.49. Identificación de factores sigma-ecf en *Myxococcus xanthus* y estudio de su dependencia del complejo regulador CarD-CarG**

Abellón J; Abellán M; Murillo FJ; Fontes M; Elías-Arnanz M  
Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología,  
Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia,  
javierabellon@um.es

Los factores sigma ECF (*Extra-Cytoplasmic Function*) son factores sigma alternativos que regulan la expresión de genes implicados en respuestas fisiológicas a diferentes tipos de estrés extracitoplasmático. Normalmente, el gen para el factor sigma ECF se cotranscribe con su regulador negativo (factor antisigma), una proteína de membrana que secuestra al factor ECF hasta que la recepción de una determinada señal ambiental provoca la inactivación del factor antisigma y la liberación del factor ECF. Una vez libre, transcribe su propio gen y los genes de respuesta al estrés.

CarQ y CarR, la primera pareja de “sigma ECF-antisigma” descrita en *Myxococcus xanthus* (y una de las primeras en bacterias), se identificó por su papel en la respuesta a la luz azul. Para la expresión de *carQ* y *carR* se requieren, además del propio factor CarQ, tres proteínas activadoras: IhfA (subunidad alfa del factor de integración del huésped), CarD (homóloga a las proteínas HMGA eucarióticas) y CarG (una proteína de unión a zinc que forma un complejo con CarD).

Una búsqueda sistemática de genes cuya expresión depende de CarD-CarG condujo a la identificación de una segunda pareja de “sigma ECF-antisigma”, DdvS y DdvA. Este descubrimiento nos ha llevado a examinar la posibilidad de que el complejo CarD-CarG participe también en la regulación de otros factores sigma de tipo ECF en *M. xanthus*.

El análisis genómico de *M. xanthus* predice 35 genes para factores sigma de tipo ECF (incluidos CarQ y DdvS), de los cuales 27 se cotranscriben con posibles factores antisigma. Para constatar experimentalmente si las proteínas anotadas como factores ECF o factores antisigma se comportan como tales se está analizando si dichas parejas interactúan entre sí, y si los posibles factores antisigma se alojan en la membrana plasmática. Ante el desconocimiento de las señales que activan la transcripción de los genes de los factores ECF, la implicación de CarD-CarG en las respuestas reguladas por estas nuevas parejas de factores sigma-antisigma se está estudiando mediante dos estrategias: la inactivación del factor antisigma o la sobreexpresión del factor ECF.

## **P.50. La proteína Ytl2 inhibe la formación de biofilm y activa la respuesta SOS en ausencia de ParAB en *Salmonella* Enteritidis**

Cristina Latasa<sup>1</sup>, Begoña García<sup>1</sup>, Cristina Solano<sup>1</sup>, Jaione Valle<sup>1</sup>, Josep Casadesus, José R. Penadés, Iñigo Lasa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biofilms Microbianos. Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra. Pamplona.

Con el objetivo de encontrar nuevos elementos implicados en la formación de biofilm de *Salmonella*, nuestro grupo se planteó analizar la implicación de los plásmidos de virulencia de *Salmonella* en el proceso de formación de biofilm. En primer lugar se procedió a la curación de los plásmidos de virulencia de varias cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, de naturaleza conjugativa y no conjugativa respectivamente. Para ello se deletó el operón *parAB*, implicado en el proceso de partición y cuya mutación causa una desestabilización del plásmido y por tanto una segregación aleatoria del mismo que posibilita la obtención de clones libres de plásmido. El análisis fenotípico de las cepas resultantes demostró que el plásmido de virulencia, tanto en el caso de *S. Typhimurium* como de *S. Enteritidis*, no está implicado en el proceso de formación de biofilm. Sin embargo, la delección del módulo de partición resultó tener un efecto negativo sobre el comportamiento multicelular de esta bacteria. Con el objetivo de averiguar las causas por las cuales la alteración en el proceso de partición del plásmido provoca la inhibición de la formación del biofilm, realizamos un análisis transcriptómico mediante la hibridación de microarrays. Los resultados obtenidos mostraron que la mutación de los genes *parAB* provoca una inducción del sistema de dos componentes CpxAR, indicativa de la existencia de perturbaciones a nivel de membrana, así como la activación de la respuesta SOS. Por otra parte, tras realizar una mutagénesis sistemática de las distintas regiones del plásmido de virulencia, llegamos a determinar que la mutación del gen contiguo a *parAB*, *yt12*, es capaz de inactivar las respuestas de estrés y recupera la capacidad de formación de biofilm.

Además, ensayos posteriores han demostrado que en el doble mutante *parAB yt12* el número de copias del plásmido de virulencia desciende drásticamente, lo cual nos ha llevado a postular que Ytl2 coopera con el módulo de partición para que la segregación del plásmido no se produzca aleatoriamente. En ausencia de ParAB, es probable que Ytl2 no funcione correctamente y evite la pérdida del plásmido con consecuencias negativas para la célula que incluyen la activación de respuestas de estrés así como la pérdida de su comportamiento multicelular.

## **P.51. Análisis molecular de los mecanismos de resistencia de *Yersinia enterocolitica* frente los péptidos antimicrobianos.**

M. Mar Reinés<sup>1,3</sup>, Camino Pérez-Gutiérrez<sup>3</sup>, Catalina M. Llompert<sup>2,3</sup>, José A. Bengoechea<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>IMEDEA-CSIC, Unidad de investigación, <sup>2</sup>Hospital Universitario Son Dureta, Palma, Illes Balears. <sup>3</sup>Programa Infección&Inmunidad. Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears. E-mail:mar.reines@caubet-cimera.es

El sistema inmune innato representa la primera barrera frente a las infecciones en la que los péptidos antimicrobianos (PAs) juegan un papel importante. Entre otras estrategias, las bacterias gram-negativas modifican su LPS siendo las modificaciones más importantes: la sustitución del grupo fosfato 4' del lípido A con aminoarabinosa y la adición de un séptimo ácido graso (palmitato). Los genes encargados de estas modificaciones son *pmrHFIJKLM*, *ugd* y *pagP*, respectivamente.

*Yersinia enterocolitica* (YeO8), patógeno de humanos y causante de varios síndromes gastrointestinales, modula la expresión de sus factores de virulencia según la temperatura: algunos se expresan a 21°C (temperatura óptima de crecimiento de la bacteria) y otros a 37°C. Los posibles mecanismos de resistencia frente a los PAs son prácticamente desconocidos.

El objetivo de este estudio es realizar un análisis molecular de los mecanismos de resistencia de YeO8 frente los PAs. Se realizaron experimentos para calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a polimixina, protamina, HNP-1 y magainina. Los resultados muestran que la bacteria fue más resistente a los PAs cuando se crece a 21°C que a 37°C. En consecuencia, se realizó un análisis de la estructura del lípido A a ambas temperaturas. A 21°C predominó una estructura hexaacilada mientras que a 37°C teraacilada. Además, a 21°C el lípido A presentó más adición de aminoarabinosa y de palmitato que a 37°C. A continuación se construyeron fusiones transcripcionales para analizar la expresión de los genes *pmrHF*, *ugd* y *pagP*. La expresión fue mayor a 21°C que a 37°C. Se construyeron mutantes para los genes *pmrHF* y *pagP* y se realizaron ensayos de resistencia frente a los PAs. Ambos mutantes fueron más sensibles que la cepa silvestre pero únicamente a 21°C.

La resistencia de YeO8 frente a los PAs está regulada por la temperatura y depende de la expresión de *pmrHFIJKLM*, *ugd* y *pagP*.

## **P.52. Análisis de la dinámica de interacción del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipable con macrófagos alveolares**

J. Pau Martí<sup>1,2\*</sup>, Pau Morey<sup>1,2</sup>, Verónica Regueiro<sup>1,2</sup>, Jose A. Bengoechea<sup>1,2,3</sup> y Junkal Garmendia<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Fundació Caubet-Cimera, Hospital Joan March, ctra. Sóller Km.12, 07110, Bunyola, Mallorca. <sup>2</sup>CibeRes, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias. <sup>3</sup>Universitat de les Illes Balears, ctra. Valldemossa, km 7.5 Palma (Illes Balears) \*E-mail: pau.marti@caubet-cimera.es

*Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT) es una bacteria Gram-negativa, comensal asintomático de la naso-faringe humana. En individuos con enfermedades pulmonares crónicas se convierte en un patógeno oportunista, que coloniza de manera persistente el tracto respiratorio inferior, pudiendo dar lugar a patologías tipo neumonía, bronquitis crónica o asociación con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Los macrófagos alveolares son fagocitos profesionales residentes en pulmón que constituyen una primera línea de defensa frente a la entrada de microorganismos patógenos. Se desconoce cuál es el papel que juega este tipo celular frente a infecciones causadas por HiNT. Así, hemos llevado a cabo ensayos de adhesión, fagocitosis y monitorización de vida intracelular con el fin de diseccionar la interacción a nivel celular y molecular entre HiNT y el macrófago alveolar. Para ello, hemos utilizado una colección de aislados de HiNT con distinta cantidad de fosforilcolina, un epítipo superficial implicado en la virulencia de este patógeno, y una línea celular de macrófago alveolar en cultivo (MH-S).

Mediante técnicas cuantitativas (recuento de u.f.c.) y cualitativas (microscopía de inmunofluorescencia, I.F.) hemos observado que HiNT se adhiere y es fagocitado por el macrófago alveolar con avidéz. Asimismo, el fagocito profesional elimina la infección por este patógeno a través de su ruta endocítico-fagolisosomal. La utilización de inhibidores químicos nos ha permitido concluir que la fagocitosis de HiNT requiere (i) una red de filamentos de actina funcional, (ii) ciertos niveles de colesterol en la membrana de la célula huésped y (iii) actividad de la enzima fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K). Sin embargo, la exposición del macrófago alveolar al humo de tabaco y/o nicotina disminuye su capacidad para fagocitar HiNT, lo cual tiene implicaciones socio-sanitarias que serán discutidas.

## **P.53. Mutantes espontaneos resistentes a quinolonas en *Vibrio vulnificus*:**

Roig F.J.<sup>1</sup>, Llorens A.<sup>1</sup> y Amaro C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Valencia, España, carmen.amaro@uv.es

*Vibrio vulnificus* es una bacteria estuarina gram negativa que, ocasionalmente, puede infectar al hombre y a los peces y causar desde infecciones en heridas hasta muerte por septicemia (vibriosis). La especie es heterogénea y engloba cepas ambientales de agua, pez, marisco, ostras y cepas clínicas de origen humano o animal aisladas por todo el mundo.

Las vibriosis se tratan con antibióticos que, en el caso de los peces de piscifactoría, se añaden al agua o se dan con el alimento, lo que supone un riesgo importante de aparición de cepas resistentes por mutación espontánea. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el espectro de resistencias naturales a antibióticos en la especie así como averiguar si pueden producirse de forma espontánea mutaciones que lleven a nuevas resistencias y analizar los genes afectados. Para ello hemos trabajado con mas de 120 cepas, clínicas y ambientales aisladas por todo el mundo y pertenecientes a los biotipos y serovariedades definidos en la especie.

Hemos encontrado resistencias naturales a antibióticos parte de las cuales están ligadas a serovariedades patógenas de peces y a la presencia de un plásmido de virulencia. Detectamos resistencias espontáneas a quinolonas en aislados de peces enfermos de la serovariedad zoonótica de la especie. Para dilucidar el origen de estas resistencias realizamos un estudio molecular mediante secuenciación de los genes que en otras especies están implicados en resistencia a quinolonas. Los resultados obtenidos demuestran que la resistencia se debe a mutaciones espontáneas en el gen *gyrA*. Pudiendo colaborar en la resistencia *gyrB* y *parC*.

En conclusión, la especie *V. vulnificus* presenta resistencias a antimicrobianos parte de las cuales están ligadas al biotipo virulento para peces y a un plásmido de virulencia. Además las cepas pueden experimentar mutaciones espontáneas que las hacen resistentes a quinolonas, antibióticos de uso en piscifactorías para el tratamiento de las vibriosis, por lo que debería recomendarse el uso de otros antibióticos distintos a las quinolonas.



## **P.54. Análisis de la diversidad de cassettes génicos en el superintegrón de *Listonella anguillarum***

A. Seoane, F. Sangari y J. M. García Lobo. Departamento de Biología Molecular/IBBTEC. Universidad de Cantabria-CSIC-IDICAN, Santander.

Los integrones se consideran como un elemento clave en la evolución de la resistencia a antibióticos en bacterias gramnegativas, ya que los genes de resistencia incluidos en cassettes se pueden movilizar y expresar en fondos genéticos diferentes. Los ancestros probables de los integrones están en los superintegrónes, y la presencia de superintegrónes es frecuente en los genomas de los vibrios.

*Listonella anguillarum*, es una vibriónacea abundante en estuarios y aguas costeras marinas. Con el objetivo último de establecer una relación entre cassettes de resistencia encontrados en entornos clínicos y en el ambiente, hemos estudiado los cassettes génicos de una cepa de *L. anguillarum* aislada en el agua de la bahía de Santander. Los amplificamos por PCR usando oligonucleótidos degenerados dirigidos al LAR (*Listonella anguillarum* repeat) y los clonamos en el vector pGEM-T Easy. Hemos analizado 300 plásmidos recombinantes y seleccionamos insertos que parecían diferentes. 75 de ellos, los de mayor tamaño, los secuenciamos observando que 19 contenían 2 cassettes, por lo tanto hemos secuenciado 94 cassettes independientes.

25 de ellos fueron casi idénticos entre sí. Una hibridación por Southern demostró la existencia de múltiples copias (>20) de este cassette en el genoma de *L. anguillarum*. Hemos encontrado que algunos ORFs de nuestros cassettes mostraban fuerte homología con ORFs no incluidos en cassettes en los cromosomas de otras cepas de vibrios. En ningún caso hemos encontrado rastro del elemento LAR cerca de estos homólogos no incluidos en cassettes. También hemos encontrado genes en cassettes que mostraban fuerte homología con genes cromosómicos de otros tipos de bacterias no vibrios pej, *Shewanella*, sugiriendo que podrían haber sido reclutados desde otros tipos de bacterias.

Finalmente determinamos la CMI para varios antimicrobianos conferida por los 75 clones obtenidos, encontrando 3 que conferían una CMI al ciprofloxacino aumentada 4 veces (de 0.06 µg/ml a 0.015 µg/ml que presentaba el control). Este hallazgo nos indica que cassettes de vibrios podrían en algún caso ser el origen de cassettes de resistencia a antibióticos con importantes repercusiones clínicas.

## **P.55. Caracterización genética del fago $\phi$ 11 y papel en la patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.**

\* Donat, V., Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Quiles, N., Mir, I., Martí, M.,  
Martínez, R., Blanco, J., Lasa, I., Penadés, J.R.  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113, Moncada, Valencia.  
\* e-mail: vdonat.cita.ivia@gmail.com

A pesar de su importancia en patogenicidad, al codificar factores de virulencia, y a pesar de haber sido utilizados durante décadas para el tipado de cepas clínicas, muy poco se conoce en la actualidad sobre la biología de los fagos de *Staphylococcus aureus*. A esto hay que añadir el papel que los fagos han adquirido como vehículos implicados en la transmisión de islas de patogenicidad y de los factores codificados en las mismas. Por lo tanto, y en vista de la importancia que estos elementos han adquirido en la virulencia de *S. aureus*, hemos llevado a cabo una caracterización sistemática y detallada de los genes presentes en el genoma del fago 11, fago modelo en nuestros estudios. Para ello se han obtenido mutantes por delección en cada uno de sus 65 genes, utilizando el vector pMAD. Este estudio nos ha permitido identificar y caracterizar cada uno de los genes implicados en los procesos de escisión, replicación y encapsidación del fago. Asimismo, y vista su estrecha relación con la inducción y transferencia de islas de patogenicidad, hemos analizado el papel de cada uno de los mutantes en la biología de las SaPIs.

## **P.56. Las Técnicas Moleculares en Enología: Aplicación de PFGE y PFLP-ADNmt para la caracterización genética, selección y control de cepas de levaduras vínicas en la elaboración de distintos tipos de vinos**

M.E. Rodríguez<sup>1</sup>, L. Rebordinos<sup>1</sup>, M. Molina<sup>2</sup>, J.J. Infante, J.M. Cantoral<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Pol. Río San Pedro s/n, Puerto Real, 11510, Cádiz, Spain.

<sup>2</sup> Bodegas Barbadillo S.A. Sanlúcar de Barrameda (Cádiz)

La fermentación alcohólica es una de las operaciones de la vinificación que más hay que controlar para producir vinos con propiedades organolépticas adecuadas. Es un proceso microbiológico muy complejo en el que participan distintas cepas de levaduras, siendo éstas las que aportan al vino las características típicas de cada uno.

En nuestro laboratorio, en colaboración con una Bodega de Cádiz, en un primer estudio hemos llevado a cabo una caracterización de levaduras silvestres de las fermentaciones espontáneas de un vino blanco joven de la Tierra de Cádiz durante los años 1999 y 2000. A continuación, apoyándonos en ese estudio realizamos una selección de cepas autóctonas para su utilización como iniciadoras de las fermentaciones industriales en vendimias posteriores. Asimismo hemos estudiado la capacidad de desarrollo de distintas cepas comerciales secas activas en las fermentaciones de vinos tintos.

La técnica elegida para analizar la diversidad genética de cepas participantes de las fermentaciones espontáneas y el seguimiento de las cepas inoculadas en fermentaciones industriales fue la *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE) que nos permite la obtención del cariotipo electroforético y diferenciar entre las distintas cepas de levaduras por el número, tamaño e intensidad de las bandas que forman el cariotipo.

Analizamos, por tanto, en vinos blancos, si las cepas autóctonas previamente seleccionadas con patrones cariotípicos P2, P3 y P5 se implantaron con éxito o no durante cinco vendimias consecutivas (años 2001-2005), mostrándose que cepa con cariotipo P5 tuvo una buena capacidad de implantación en tres de las vendimias estudiadas, resultando un producto final con características organolépticas mejoradas respecto a fermentaciones realizadas de manera espontánea.

En el caso de vinos tintos, en las vendimias 2006 y 2007, hemos podido comprobar que las levaduras liofilizadas comerciales no son capaces de dominar sobre las cepas de levaduras autóctonas presente en los mostos teniendo que competir con éstas.

La aplicación de la técnica de PFGE ha sido una herramienta muy útil para conocer la dinámica de las poblaciones de levaduras en las fermentaciones inoculadas, permitiendo analizar los factores que pueden influir cuando no se implantan las cepas inoculadas y así mejorar el proceso en vendimias posteriores. Pero la necesidad de monitorizar las cepas inoculadas durante las fermentaciones en tiempos relativamente cortos tiene cada vez más importancia en las bodegas, ya que en caso de tener sospecha de que no esté presente la cepa inoculada, se pueda actuar sobre las fermentaciones adicionando más inóculo, lo cual supone una ventaja para el bodeguero. Utilizando la técnica de *Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción* del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) con la enzima *Hinf* I, hemos podido controlar con éxito las fermentaciones del vino blanco en estudio cuando éste fue inoculado con una sola levadura autóctona, P5, en las vendimias 2005- 2007. La utilización de esta técnica ha supuesto un método de control microbiológico rápido y fiable que nos pone de manifiesto si la cepa inoculada es la que lleva a cabo la fermentación desde el inicio del proceso hasta su finalización bien cuando se utilizan levaduras autóctonas como comerciales.

## **P.57. Identificación y caracterización de un nuevo determinante de resistencia a aminoglucósidos, *aac(3)-IId*, que confiere alto nivel de resistencia a gentamicina**

Laura Hidalgo, Álvaro San Millán, Belén Gutiérrez, José Antonio Escudero, Bruno González-Zorn.

Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040-Madrid. E-mail: bgzorn@vet.ucm.es

Los aminoglucósidos juegan un papel fundamental en la terapia antimicrobiana contra patógenos tanto Gram-positivos como Gram-negativos. La resistencia bacteriana a aminoglucósidos está asociada frecuentemente con la expresión de enzimas modificadoras capaces de acetilar (AAC), fosforilar (APH), o adenilar (ANT) la molécula del antibiótico. Además, recientemente se han descrito las metiltransferasas del ARNr 16S, caracterizadas por conferir alto nivel de resistencia (CMI > 512 µg/ml) a determinados aminoglucósidos.

Nosotros hemos investigado un aislado de *E. coli* de origen humano de Polonia que muestra alto nivel de resistencia a gentamicina. Sin embargo, el aislado no presenta ninguno de los genes productores de las metilasas descritos hasta el momento. Ensayos de conjugación permitieron transferir el determinante de la resistencia a *E. coli* K802N. A partir del transconjugante clonamos un fragmento de ADN de 3.293 pb, que fue secuenciado completamente. Dicho análisis reveló la presencia de dos secuencias de inserción IS26 flanqueando un gen de tipo *aac(3)-II*. Este gen es homólogo a los otros genes productores de enzimas de la misma familia *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IIb*, y *aac(3)-IIc*. Sin embargo, nuestro gen confiere una CMI > 512 µg/ml a gentamicina, además de poseer un perfil de resistencia a aminoglucósidos distinto al conferido por el resto de enzimas AAC(3)-II, lo que nos llevó a denominarlo *aac(3)-IId*.

## **P.58. Virulencia y transporte de colina en *Brucella abortus* 2308**

Palacios-Chaves L. \*, Conde-Alvarez R., Gil-Ramirez Y., Zuñiga- Ripa A.,  
Moriyón I., Iriarte M.

*Dpto. de Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra,  
Pamplona, España e-mail: lpalacios@alumni.unav.es*

La fosfatidilcolina (PC) es un fosfolípido típico de la membrana de las células eucariotas y es esencial para la viabilidad de la célula. Por el contrario, la presencia de PC en procariontes se reduce a algunas bacterias pertenecientes a la categoría de las  $\gamma$  y  $\alpha$  de las *Proteobacteria*, tales como *Brucella* y sus parientes filogenéticos *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

En *Brucella* se han identificado dos vías de síntesis de PC. En una, la PC se forma por tres metilaciones sucesivas de la fosfatidiletanolamina, realizadas por la enzima fosfatidil-etanolamina metil-transferasa (PmtA) empleando como donador SAM. En otra, la colina se condensa con el CDP-diacilglicérido, requiriéndose una enzima con actividad sintasa (Pcs). Esta última es la principal vía de síntesis de PC en *Brucella* y, aunque se ha propuesto que esta bacteria es auxotrofa para la colina en el huésped, el origen (endógeno o exógeno) de la colina empleada por la vía Pcs no ha sido estudiada todavía.

En *Sinorhizobium* la incorporación de colina requiere varios sistemas de transporte. El mejor caracterizado es un transportador ABC constituido por tres proteínas: ChoX, que une la colina, ChoW, que actúa como permeasa y ChoV, ATPasa que proporciona la energía necesaria para el transporte. La comparación del genoma de *B. abortus* 2308 con el de *Sinorhizobium* permitió identificar 2 regiones, situadas una en cada cromosoma, que contienen ORFs con homología con el sistema de transporte de colina de *Sinorhizobium*. En el cromosoma I, la ORF BAB1\_1593 presenta un 65% de identidad con ChoX, BAB1\_1594 un 63% con ChoW y BAB1\_1595 un 60% con ChoV. En el cromosoma II, la ORF BAB2\_0502 presenta una identidad del 29% con ChoX, BAB2\_0501 del 48% con ChoW y BAB2\_0500 del 47% con ChoV.

Para estudiar el papel de estas ORFs en el transporte de colina, se construyeron mutantes "in frame" en BAB1\_1593 y BAB2\_0502 (proteínas de unión a la colina), así como un doble mutante en ambas ORFs. Los ensayos de transporte de [metil-<sup>3</sup>H]-colina con el doble mutante en un medio con lactato-glicerol-glutamato como únicas fuentes de carbono mostraron que los genes eran funcionales y que el mutante era incapaz de incorporar colina. El análisis de lípidos totales del doble mutante crecido en glucosa-peptona-extracto de levadura reveló la presencia de PC. Además, un triple mutante en los transportadores y en la vía de síntesis dependiente de PmtA también sintetizó PC. En conjunto, estos dos resultados sugieren que existe una vía de síntesis endógena de colina. En coherencia con esta hipótesis, el doble mutante en los transportadores no estaba atenuado en ratones. Estos resultados demuestran que *Brucella* no es auxotrofa para la colina, posiblemente debido a la capacidad de sintetizar colina a partir de los nutrientes obtenidos en su nicho intracelular.

## **P.59. Análisis de los cambios mutacionales del gen de la girasa de *Escherichia coli* y la relación con su grupo filogenético**

C Freyre\*, G Jiménez, F Galán, MA Rodríguez-Iglesias.

Laboratorio de Microbiología. Hosp. Universitario de Puerto Real. Universidad de Cádiz (manuel.rodriguez Iglesias@uca.es)

El objetivo del estudio es detectar mutaciones en la subunidad A de la girasa de cepas uropatógenas de *Escherichia coli* que presentan diferente susceptibilidad a fluorquinolonas y comprobar si las cepas siguen una distribución filogenética en función de la sensibilidad ó resistencia a estos fármacos que se corresponda con la revisada en la literatura.

Se han estudiado 74 cepas de *E.coli* aisladas de muestras de orina de pacientes ambulatorios con infección del tracto urinario. Veintidós de ellas fueron sensibles a fluorquinolonas y resistentes al ácido nalidíxico (NA) y 52 resistentes a fluorquinolonas. Para la detección de mutaciones en girasa A se realizó la secuenciación de las cepas mediante los primers *gyrA-f* CGGTACACCGTCGCGTAC y *gyrA-r* GTCGCCGTCGATGGAAC. Para el estudio filogenético se realizó una PCR multiplex amplificando los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4C2* siguiendo el método de Clermont et al., visualizando las bandas mediante revelado en gel de agarosa.

Las 22 cepas sensibles a fluorquinolonas y resistentes a NA presentaron mutación en la posición 83 (Ser). 20 cepas mutaron la Ser a Leu y 2 a Ala. En el análisis filogenético de este grupo predominó el filogrupo B2 (9 cepas), seguido del D (6 cepas), A (5 cepas) y B1 (2 cepas). En el grupo de cepas resistentes a fluorquinolonas (52 cepas) todas presentaron el cambio en Ser-83 por Leu. En 50 cepas se detectó además la mutación en la posición 87 (Asp). En 44 cepas el cambio aminoacídico fue a Asn, a Gly en 3 cepas y a Tyr en 3 cepas. El filogrupo A fue el predominante en este grupo (24 cepas), seguido del B1 (14 cepas), D (10 cepas) y B2 (3 cepas). En una cepa no se pudo determinar el grupo filogenético.

El número de mutaciones en girasa A en cepas de *E. coli* varían dependiendo de la susceptibilidad a quinolonas. Las posiciones que se ven afectadas con más frecuencia son la 83 y la 87 con los cambios aminoacídicos de Ser por Leu y Asp por Asn respectivamente. Las cepas de *E.coli* uropatógenas siguen una distribución filogenética distinta en función de la susceptibilidad a quinolonas, donde en el grupo de las bacterias resistentes es mayoritario el filogrupo A, y en el de las sensibles predomina el filogrupo B2.

## **P.60. Detección molecular de *Gardnerella vaginalis* en mujeres con descarga vaginal anormal y su coinfección con *Candida***

N Erquínigo, MJ Castro, L García-Agudo, C Román, I Jesús de la Calle, MA Rodríguez-Iglesias.

Laboratorio de Microbiología. Hosp. Universitario de Puerto Real.  
Universidad de Cádiz. (manuel.rodriguez Iglesias@uca.es)

La vaginosis bacteriana es un síndrome de etiología polimicrobiana que afecta a la mucosa vaginal y en el que juega un importante papel *Gardnerella vaginalis*. La vaginitis por *Candida* es un cuadro inflamatorio frecuente que puede acompañar, en ocasiones, a la vaginosis como manifestación de la alteración de la flora normal del tracto genital femenino. El objetivo de este trabajo es analizar el rendimiento de una técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la detección simultánea de *Candida* y *Gardnerella* de forma semiautomatizada (AFFIRM VPIII, Becton Dickinson) seleccionando una población de mujeres con descarga vaginal anormal.

Se han procesado 1.300 escobillones cervicovaginales para el estudio de posibles agentes responsables de vaginitis y/o vaginosis entre marzo de 2006 a septiembre a enero de 2008. En todos los casos se realizaron cultivos en medios convencionales y se analizó la presencia de ADN de *Candida* y *Gardnerella vaginalis* mediante el método Affirm VP III (Becton Dickinson). La sensibilidad del método permite detectar  $10^4$  y  $2 \times 10^5$  respectivamente de cada uno de los agentes.

Se detectó ADN de *Gardnerella vaginalis* en 368 muestras (28.3%). Se ha detectado ADN de *Candida* en 331 muestras (25,4%) comparándose con el cultivo convencional. La coinfección de *Candida* y *Gardnerella* se presentó en 126 muestras (9.6%).

El método se ha demostrado rápido y sencillo para la detección simultánea de ambos patógenos. Supone un procedimiento rápido y más sensible que la microscopía para la detección de levaduras, aunque el cultivo permite recuperar recuentos de levaduras bajos. La detección molecular de *Gardnerella* facilita su identificación ya que las tinciones directas y el cultivo no tienen tanta sensibilidad. La detección de ambos patógenos en cerca del 10% de los casos demuestra la prevalencia concomitante de ambos cuadros clínicos.



## **P.61. Identificación molecular de *Streptococcus agalactiae* mediante PCR en tiempo real y comparación con cultivo convencional**

M Roman-Enri, I Jesús de la Calle, MA Rodríguez-Iglesias  
Laboratorio de Microbiología, Hosp. Universitario Puerto Real, Universidad  
de Cádiz. (manuel.rodriguez Iglesias@uca.es)

*Streptococcus agalactiae* forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal desde donde coloniza vagina. La colonización del tracto genital femenino por el estreptococo del grupo B (SGB) puede ser intermitente y es un hecho importante en las gestantes, por la posibilidad de su transmisión vertical al recién nacido, llegando a ser del 50%. Las tasas de colonización en las gestantes oscilan entre 5 y el 35%, dependiendo de la población en estudio. En nuestra población, alrededor del 12% de las gestantes son portadoras vaginales o rectales del SGB. El objetivo de este trabajo es evaluar la PCR en tiempo real como alternativa al cultivo en el cribado de EGB.

Se han procesado 242 muestras de exudado vaginal obtenidas en medio de Amies a las 35-37 semanas de gestación para el estudio de las gestantes portadoras del SGB. Las muestras fueron sembradas siguiendo procedimientos convencionales en medio Granada (Biomedics) e incubadas en atmósfera anaerobia durante 24-48 horas. Las colonias sugestivas de SGB, pigmentadas o no, fueron confirmadas mediante serogrupo. De forma paralela y de la misma toma se procesó para la detección del gen *cfb* mediante PCR en tiempo real (BD-StrepB, BDGeneOhm) siguiendo las indicaciones del método en un termociclador Smartcycler.

De las muestras estudiadas, 90 fueron positivas tanto por cultivo como por PCR (37% del total), mientras que 133 resultaron cultivo y PCR negativa. En 19 muestras se obtuvieron resultados discordantes, 16 de las cuales presentaron cultivo positivo y PCR negativa. Y en tres muestras se observó PCR positiva con cultivo negativo. En todas las muestras discrepantes se repitió la PCR confirmando los resultados. Al duplicar el inóculo de muestra para la PCR (de 1,5 µl a 3 µl) se recuperaron 3 muestras negativas inicialmente para PCR que resultaron positivas, obteniéndose tras aumentar el inóculo una sensibilidad del 87% y una especificidad de 97%. Las muestras falso-negativas por PCR presentaron un muy bajo número de colonias en el cultivo

La aportación de la PCR en tiempo real directamente de la muestra es conseguir un resultado valorable en menos de una hora y útil en la detección intraparto del EGB. Nuestros resultados indican que la sensibilidad puede ser afectada por el volumen del extracto utilizado, que consigue recuperar algunos casos de las muestras falsamente negativas con una carga bacteriana baja de EGB.

## **P.62. *Klebsiella pneumoniae* incrementa los niveles de los receptores Toll-like 2 y 4 en las células epiteliales pulmonares humanas.**

Verónica Regueiro<sup>1,2</sup>, David Moranta<sup>1,2</sup>, Junkal Garmendia<sup>1,2</sup>, José A. Bengoechea<sup>1,2</sup>

Programa de Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-Cimera Illes Balears<sup>1</sup>, Bases Moleculares de Patogenicidad y Virulencia, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes)<sup>2</sup>, Bunyola, España.

Las células epiteliales pulmonares actúan como barrera contra los patógenos. Estas células reconocen estructuras conservadas expresadas por los microorganismos patógenos vía los receptores Toll-like (TLRs) expresados en su superficie. A diferencia de las células linfoides, la expresión de TLR2 y TLR4 en las células epiteliales pulmonares es baja en condiciones fisiológicas. Nosotros estudiamos si la infección con *Klebsiella pneumoniae* incrementa la expresión de los TLRs en las células epiteliales pulmonares humanas. Encontramos que la expresión de TLR2 y TLR4 en las células A549 y en las células primarias pulmonares humanas (NHBE) se incrementó tras la infección con *K. pneumoniae*. Este incremento en la expresión de los receptores se correlacionó con un aumento en la respuesta celular tras la estimulación con Pam3CSK4 o lipopolisacárido, agonistas de TLR2 y TLR4, respectivamente. Las vías implicadas en el incremento de la expresión de TLR2 y TLR4 fueron la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y las MAP quinasas p38 y p44/42. Nuestros datos demuestran que el primero activa la expresión de ambos TLRs mientras que las dos MAP quinasas inhiben la expresión de los TLRs. Finalmente, mostramos que *Klebsiella* indujo la expresión de TLR2 y TLR4 de forma dependiente de la activación de los TLRs y que el polisacárido capsular podría ser el factor bacteriano responsable de dicho incremento.

## **P.63. Levaduras modelo y “arrays” de lisados en Microbiología Celular: Investigando la modulación de la señalización celular en la célula eucariótica por el factor de virulencia de *Salmonella* SigD**

Isabel Rodríguez-Escudero, Cristina Molero, María Molina, Rafael Rotger y Víctor J. Cid

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Email: vicjid@farm.ucm.es

La invasión de las células epiteliales por *Salmonella* durante el desarrollo de la infección implica la translocación de proteínas bacterianas al citoplasma de la célula diana mediante un mecanismo especializado, el sistema de secreción de tipo III o “inyectosoma”. En concreto, la internalización de la bacteria es dirigida por el inyectosoma codificado por la isla de patogenicidad I (SPI-I). Una de las proteínas así translocadas es la fosfatidilinositol fosfatasa SigD, también conocida como SopB. En nuestro laboratorio utilizamos la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de célula eucariótica para estudios básicos a nivel molecular de factores de virulencia bacterianos. La expresión de SigD en levaduras resulta tóxica debido a la depleción de fosfoinosítidos esenciales. Además de esto, una versión catalíticamente inactiva de SigD o la región amino-terminal no catalítica inhiben el crecimiento de *S. cerevisiae* a causa de la inactivación de la Rho GTPasa Cdc42. SigD co-purifica tanto con Cdc42 de levadura como con su homólogo humano co-expresado en levadura. La sencillez de manejo del modelo de levadura nos ha permitido realizar una búsqueda al azar de mutaciones puntuales de pérdida de función que definen una serie de residuos de SigD esenciales para su interacción con Cdc42 entre las posiciones 52 y 143. Por otra parte, para investigar de manera global la importancia de SigD y su actividad catalítica sobre la señalización en la célula hospedadora, hemos obtenido un “array de lisados” de células HeLa infectadas con *Salmonella* portando o no distintas mutaciones en *sigD* y en otros efectores de la SPI-I. Dicho *array* se hibridó con anticuerpos específicos frente a epítopos fosforilados para detectar cambios en la fosforilación dependientes de la presencia de dichos efectores bacterianos. Los resultados obtenidos permiten concluir que la señalización dependiente de manera específica de SigD, que implica la activación de la proteína quinasa B (Akt), requiere tanto su actividad catalítica como la interacción con Cdc42.

## **P. 64. Estudio del papel de las proteínas GGDEF en la virulencia de *Salmonella***

Violeta Zorraquino\*, Begoña García, Cristina Latasa, Iñigo Lasa y Cristina Solano.

*Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, Pamplona-31006, Navarra,*  
violeta.zorraquino@unavarra.es

El dinucleótido cíclico c-di-GMP (bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate) es un mensajero secundario específico de bacterias que ha sido involucrado en la regulación de numerosos procesos celulares, tales como el comportamiento multicelular, motilidad, diferenciación celular, quorum sensing y virulencia. Niveles celulares bajos de c-di-GMP se han asociado con un aumento en la virulencia de la bacteria. El sistema de transducción de señal en el que el c-di-GMP actúa como mensajero es complejo, en cuanto a que la bacteria generalmente contiene varias proteínas responsables de la síntesis de c-di-GMP que darán lugar a una misma molécula difusible en el citoplasma. En concreto, *S. Enteritidis* contiene en su cromosoma doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF, el cual cataliza la formación de c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP. En este trabajo se han construido doce mutantes en cada uno de los genes que codifican proteínas GGDEF en una cepa clínica de *S. Enteritidis* y se han realizado estudios de virulencia en un modelo de ratón BALB/c. Los resultados demuestran la implicación de algunas de estas proteínas en la virulencia de *Salmonella*.

## **P.65. Implicación de la proteína DamX en la resistencia de *Salmonella enterica* a la bilis**

J. López-Garrido\*, N. Cheng, A. I. Prieto, F. García-Quintanilla†, F. García del Portillo†, J. Casadesús

Dep. Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes 6, Sevilla 41012, y †Departamento de Microbiología Microbiana, CNB-CSIC, Cantoblanco 28049, España. \*E-mail: javierlg@us.es

Las bacterias entéricas son intrínsecamente resistentes a la actividad antimicrobiana de la bilis, y los mecanismos implicados sólo se conocen parcialmente. En *Salmonella enterica*, una de las funciones necesarias para la resistencia a bilis es la metilación Dam. En los mutantes Dam<sup>-</sup>, la ausencia de metilación de sitios GATC tiene efectos pleiotrópicos, como disminución de la movilidad, desregulación de genes específicos e inducción de SOS. Los mutantes Dam<sup>-</sup> son sensibles a bilis, y dicha sensibilidad se suprime parcialmente al inactivar el sistema MuthLS. El gen *dam* forma parte de un operón, y el gen situado inmediatamente aguas arriba se conoce como *damX* (nombre alusivo al desconocimiento de su función). Mediante fraccionamiento celular e hibridación Western, se observó que DamX se localiza en la membrana citoplásmica. Se construyó una delección en fase de *damX*, y se analizaron varios fenotipos relacionados con la metilación Dam. El mutante DamX<sup>-</sup> no presentaba alteraciones en la movilidad, inducción de SOS, ni desregulación de genes controlados por Dam. Además, el patrón de restricción del ADN de un mutante DamX<sup>-</sup> con isosquizómeros sensibles a metilación de adenina era el típico del ADN metilado. En conjunto, estos resultados indican que la delección *damX* no tiene efecto polar sobre *dam*. Sorprendentemente, se observó que el mutante DamX<sup>-</sup> era sensible a bilis. Estudios de complementación en merodiploides mostraron que la sensibilidad era causada específicamente por la carencia de DamX. Además, la sensibilidad a bilis no se suprimía al inactivar el sistema MuthLS, lo que sugiere que los mutantes DamX<sup>-</sup> son sensibles a bilis por causas no relacionadas con la metilación Dam. Es posible que la carencia de proteína DamX en la membrana citoplásmica haga a la célula más sensible a la bilis o que perturbe los mecanismos de vertido de bilis al exterior. De hecho, mutaciones *asmA*, que activan la expresión del operón *marAB*, suprimen la sensibilidad a bilis en fondo DamX<sup>-</sup>.

## **P.66. Estudio de la relación filogenética existente entre cepas de *Colletotrichum acutatum* causantes de la antracnosis en fresa**

C. Garrido, M. Carbú, F.J. Fernández-Acero, I. Vallejo y J. M. Cantoral  
Laboratorio de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Pol. Río San Pedro s/n, Puerto Real, 11510, Cádiz, Spain.

*Colletotrichum acutatum* es uno de los géneros de hongos fitopatógenos más importantes en todo el mundo debido a las cuantiosas pérdidas económicas que ocasiona en una amplia variedad de cultivos. Los estudios realizados hasta la fecha en las poblaciones de *C. acutatum*, aisladas de diferentes huéspedes, han puesto de manifiesto una considerable diversidad genotípica y fenotípica. El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización molecular basada en el estudio de las secuencias del gen ARNr 5.8S y de los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 de cepas de *C. acutatum* aisladas de fresa en diferentes zonas del mundo. Igualmente se llevó a cabo un estudio de “telomeric fingerprinting” con cada uno de los aislados, en el cual, el ADN genómico fue digerido con 4 enzimas de restricción y posteriormente se hibridó usando una sonda específica de la secuencia telomérica. Los diferentes patrones obtenidos aportaron información acerca del polimorfismo existente entre las cepas, así como la estimación del número mínimo de cromosomas de las mismas.

## **P.67. Aproximaciones genéticas para el descubrimiento de nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos en micobacterias**

Ainhoa Lucía, Carlos Martín, José Antonio Aínsa

Grupo de Genética de Micobacterias, Universidad de Zaragoza y CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Calle Domingo Miral s/n, 50009-Zaragoza [ainhoalq@unizar.es](mailto:ainhoalq@unizar.es), [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es), [ainsa@unizar.es](mailto:ainsa@unizar.es)

La resistencia a antibióticos dificulta cada día más el tratamiento de las enfermedades infecciosas, en especial la aparición de cepas de micobacterias multirresistentes y extremadamente resistentes (MDR y XDR). En éstas, la resistencia se debe principalmente a la adquisición de mutaciones cromosómicas, pero se han descrito otros mecanismos (como las bombas de eflujo) que también podrían desempeñar un papel importante en la resistencia.

Nuestro objetivo es hacer un análisis sistemático de varios genomas micobacterianos, para encontrar y caracterizar nuevos genes implicados en resistencia, utilizando herramientas genéticas para la sobreexpresión de genes al azar, lo que aumentará el fenotipo producido por y facilitará la detección de genes “crípticos” de resistencia.

Hemos construido el transposón TnSPAZ con un promotor micobacteriano fuerte (pBlaF\*) orientado hacia el exterior. TnSPAZ puede inactivar genes por inserción y sobreexpresar los genes adyacentes a su punto de inserción. Hemos construido dos bancas de mutantes con TnSPAZ, en *Mycobacterium smegmatis* y en *Mycobacterium bovis* BCG, y hemos obtenido:

- dos mutantes *M. smegmatis* resistentes a INH, con inserción de TnSPAZ en el gen *katG*, lo cual confirma la utilidad de la banca.

- varios mutantes resistentes a etambutol, isoniazida, eritromicina, estreptomycin y ampicilina, cuya resistencia se debe posiblemente a la sobreexpresión del gen adyacente al transposón (lo que se está verificando mediante clonaje, sobreexpresión y Real-Time PCR)

Además, hemos construido una librería genómica de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en un plásmido de sobreexpresión que contiene unos 5000 plásmidos recombinantes (97% del genoma). Estas librería se ha transformado en *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG y se han seleccionado varios clones resistentes a isoniazida, que están siendo analizados. La construcción de una librería genómica de la cepa MBZ, que es una cepa XDR, completará nuestro estudio.

Conclusión: estas herramientas genéticas nos están permitiendo identificar nuevos genes y mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos en micobacterias, cuyo conocimiento tiene un gran interés para superar el problema de las resistencias y crear nuevas drogas de modo racional.

## **P.68. Secreción de proteínas en *Streptomyces coelicolor*: Regulación pleiotrópica del metabolismo secundario por el sistema de dos componentes *degS-degU*.**

Daniel Rozas, Sonia Gullón y Rafael P. Mellado  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). c/ Darwin 3. Campus de la  
Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain. E-mail:  
drozas@cnb.csic.es.

El sistema de dos componentes DegS-DegU de *Bacillus subtilis* regula de forma positiva la producción de proteínas hidrolíticas extracelulares y de algunos genes relacionados con la producción de sustancias biocidas, típicas del metabolismo secundario bacteriano.

*Streptomyces coelicolor* es una bacteria del suelo, Gram positiva y eficiente secretora como *B. subtilis*, cuyo genoma tiene un alto contenido en G+C, que, como *B. subtilis*, es ampliamente utilizada para la producción industrial de enzimas degradativas extracelulares y metabolitos con actividad biocida de interés y aplicación industrial.

La comparación de secuencias nos ha permitido la identificación en *S. coelicolor* de hasta siete posibles parejas de genes potencialmente homólogos al sistema de dos componentes *degS-degU*. Una de ellas fue seleccionada en base a su mayor grado de homología y a su similitud en organización cromosómica con la equivalente pareja de *B. subtilis*. La potencial pareja de genes *degS-degU* de *S. coelicolor* forma un operón bicistrónico al igual que los genes *degS-degU* de *B. subtilis*.

Estudios genómicos utilizando microarrays de ADN conteniendo el genoma completo de *S. coelicolor* nos han permitido verificar la validez de la selección realizada. El análisis del perfil transcripcional de una estirpe sobreproductora de DegU y de otra deficiente en DegU nos ha permitido inferir que DegU regula la expresión de genes que determinan la síntesis de proteínas extracelulares, incluyendo la proteasa extracelular mayoritaria, así como de genes involucrados en la producción de antibióticos y de compuestos del metabolismo secundario.

Análisis por RT-PCR cuantitativa, la determinación de actividades enzimáticas extracelulares relevantes y ensayos específicos para la producción de los antibióticos undecilprodigiosina y actinorhodina, nos han permitido confirmar los resultados del análisis transcripcional.



## **P.69. Diseño de un control interno de amplificación para ensayos de RT-PCR**

Mario Rodríguez-Domínguez, Ripoll, A., Turrientes MC., Cantón, R., Baquero F y Galán JC

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Carretera de Colmenar Viejo. 28034 Madrid. Correo electrónico: [jgalanm.hrc@salud.madrid.org](mailto:jgalanm.hrc@salud.madrid.org).

La utilización de la PCR en tiempo real (RT-PCR) con fines diagnósticos es ya una realidad en los laboratorios de Microbiología Clínica. Sin embargo esta tecnología, aun encuentra algunas limitaciones para su universalización. Una de estas es, curiosamente, el desarrollo de un control interno (CI) universal. La adición de un CI en la reacción de amplificación evita falsos negativos, por problemas de inhibición. Aunque muchas técnicas comerciales de diagnóstico molecular llevan CIs, generalmente se trata de CIs homólogos, es decir que usan la misma pareja de cebadores que son requeridos para amplificar un agente infeccioso específico; lo que genera una especialización del diagnóstico, encareciendo su precio. Con el fin de diseñar un CI universal, también se ha recurrido a genes altamente conservados presentes en todas las especies (controles endógenos), como 16S rDNA, aunque presentan inconvenientes como la variabilidad en el número de copias que dificulta la optimización de las concentraciones de cebadores y sonda. Se propone el diseño de un CI universal basado en la construcción de una secuencia quimérica, que pueda ser incluida en cualquier ensayo de RT-PCR, que no de lugar a falsos positivos por semejanza con secuencias presentes en la muestra y que no se vea afectada por variaciones en su concentración. Así amplificamos un fragmento pequeño de la región conservada del gen de la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 que se ligó por un punto *EcoRI* a un fragmento de la región conservada del gen *aph3'*. El producto resultante es un fragmento genómico de 223 bp, híbrido de TEM-1+*aph3'*, ligeramente mayor que los amplicones de las secuencias dianas de los diferentes agentes infecciosos. En el punto de unión de ambos restos genómicos se diseñó una sonda Taqman. Para comprobar la ausencia de reacción cruzada del CI diseñado se realizaron ensayos de amplificación con DNA obtenido de cepas portando tanto la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 como el gen *aph3'* de las mayoría de las especies bacterianas tanto Gram-positivas como Gram-negativas aisladas en clínica, no detectándose en ningún caso señal de amplificación. Para optimizar las concentraciones de cebadores, sondas y DNA de CI se siguió un esquema en “tablero de ajedrez” combinando distintas concentraciones de cebadores, sonda y DNA de CI. Las concentraciones óptimas fueron 900nm de cebadores y 250nm de sonda. Se consiguió amplificación hasta una concentración de 0,9 ng/ $\mu$ L. Una vez estandarizada las concentraciones de cebadores, sonda y DNA de CI, se realizaron pruebas para la detección de una variedad de especies bacterianas, solo o en multiplex, de cultivo o de muestra clínica, usando siempre el mismo CI. Finalmente se evaluó la opción de añadir el CI al comienzo del proceso de extracción de DNA o al final del proceso de purificación.

## **P.70. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* productoras de la lesión de adhesión y borrado aisladas de rumiantes**

Pilar Horcajo (phorcajo@vet.ucm.es), G. Domínguez-Bernal, R.de la Fuente, S. Martínez Pulgarín, José A. Ruiz Santa Quiteria y José A. Orden.

Grupo INBAVET. Departamento de Sanidad Animal, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid.

Los *Escherichia coli* enteropatógenos (EPEC) son una de las principales causas de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo, mientras que los *E. coli* enterohemorrágicos (EHEC) son patógenos emergentes en los países industrializados que causan desde diarreas hasta graves enfermedades. La patogénesis de estas dos estirpes de *E. coli* se centra en la producción de la lesión de adhesión y borrado (AB) en la mucosa del epitelio intestinal del hospedador. Los genes necesarios para la producción de la lesión de AB se encuentran en la isla de patogenicidad LEE que codifica la intimina, el receptor de la intimina (Tir), un sistema de secreción tipo III y una serie de proteínas efectoras que son inyectadas en la célula hospedadora alterando sus funciones normales en favor de la propia bacteria. Algunas de estas proteínas son EspG, EspH, Map, TccP, TccP2 y EspI.

El objetivo de este estudio fue el de analizar, mediante PCR, la distribución de los genes que codifican diversas proteínas efectoras en 206 cepas de ECEP y 20 de ECEH de rumiantes (ovejas, cabras y vacas) tanto sanos como diarreicos.

En total, 218 (96,5%) cepas resultaron positivas a la presencia del gen *espG*, de ellas 198 fueron EPEC y 20 EHEC. El 100% de las cepas resultaron positivas a la presencia del gen *espH*. En el caso del gen *map*, 200 (88,5%) de las 226 cepas que se estudiaron fueron positivas, 182 enteropatógenas y 18 enterohemorrágicas. De las 226 cepas que se estudiaron 22 fueron positivas a *tccP* (9,7%), de ellas 14 fueron enteropatógenas y 8 enterohemorrágicas. Respecto al gen *tccP2*, el 51,8% (117) de las cepas resultaron positivas. Analizando por separado las cepas de ECEP y ECEH un 50% y un 70%, respectivamente, fueron positivas. Al analizar el gen *espI*, 155 (68,6%) cepas resultaron positivas, de ellas 136 fueron enteropatógenas y 19 enterohemorrágicas.

Conclusión: algunas cepas aisladas de rumiantes poseen muchos de los factores de virulencia que se han asociado a enfermedad en el hombre, lo cual puede indicar su carácter zoonótico.

## **P. 71. Caracterización molecular de enterobacterias resistentes a níquel y cobalto aislada del yacimiento laterítico de Moa, Cuba**

A. Diaz<sup>(1)</sup>, J. Marrero<sup>(1)</sup>, R. Fernandez<sup>(1)</sup>, G. Espinosa<sup>(1)</sup>, J.M. Gómez<sup>(2)</sup>, O. Coto<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Laboratorio Biotecnología de los metales. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Calle 25 entre J e I. Plaza. Vedado. Ciudad Habana. cuba.ocoto@fbio.uh.cu

<sup>(2)</sup> Laboratorio Reactores Biológicos, Dpto. de Ingeniería Química, Tecnologías del Medio Ambiente y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias, UCA. España.

Los suelos ultramáficos se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de metales (entre los que se encuentran el níquel y el cobalto), así como bajas concentraciones de nutrientes esenciales (Broock, 1987), características que los convierten en sustratos de difícil colonización por la mayoría de los microorganismos. Sólo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales pesados pueden sobrevivir en estos ambientes extremos.

Dentro de las tendencias actuales de la Biotecnología se encuentra la obtención y caracterización de nuevas cepas con resistencia a metales pesados con potencialidad de empleo en la biorremediación. Una de las características que distingue a los metales de los contaminantes orgánicos, es que no son biodegradables.

En este trabajo se identificaron 10 cepas bacterianas aisladas del yacimiento niquelífero de Moa (Cuba) y se empleó como cepa tipo a *S. marcescens* ATCC 14056. Nueve cepas fueron determinadas como *Serratia marcescens* y una como *Kluyvera* sp. Las cepas identificadas como *S. marcescens* son no pigmentadas y no producen el pigmento prodigiosina, además presentan elevada resistencia a metales pesados.

El análisis integral de todos los caracteres evaluados (micromorfológico, morfoculturales, fisiológicos, bioquímicos, patrón de resistencia a metales pesados y a antibióticos, patrón de proteínas totales [SDS-PAGE], y amplificación del gen ncrAB (Marrero, 2008) reveló la existencia de nuevas variedades microbianas.

Estos resultados indican que las condiciones del ecosistema ultramáfico de Moa, han propiciado el surgimiento de nuevas cepas de *S. marcescens* con características diferentes a la cepa tipo de la especie, mediante un largo proceso de adaptación a un tipo de suelo muy evolucionado con altos contenidos de metales pesados y condiciones de oligotrofia y sequía edáfica. En la actualidad se estudia sus capacidades de remoción de metales en reactores discontinuos para analizar su viabilidad de aplicación en estudios de bioremediación y/o biorecuperación de zonas contaminadas por metales pesados.

## **4. LISTA DE PARTICIPANTES**

## LISTA DE PARTICIPANTES (orden alfabético de apellidos) y e.mail:

C.P: Conferencia plenaria (I-III)

O: Exposición Oral (Sesiones: I-VI)

P: Panel (Póster: 1-71)

P.67.	Ainsa José Antonio	ainsa@unizar.es
P.49.	Abellón Ruiz Javier	javierabellon@um.es
O.V.6.	Alonso Ezcurra Henar	henar@unizar.es
C.P.I	Amils Ricardo	ramils@cbm.uam.es
P.19.	Antón Hidalgo Nuria	nanton@cnb.csic.es
	Argandoña Bertran Montserrat	montseab@us.es
	Armengod González M <sup>a</sup> Eugenia	armengod@cipf.es
P.47.	Ayala Serrano Juan Alfonso	jayala@cbm.uam.es
O.II.2.	Ayora Hirsch Silvia	sayora@cnb.csic.es
P.23.	Balbontín Soria Roberto	robe@us.es
O.IV.8.	Bedmar Gómez Eulogio J.	eulogio.bedmar@eez.csic.es
O.IV.5.	Benítez Páez Alfonso	abenitez@cipf.es
	Berasain Lasarte M <sup>a</sup> del Carmen	
O.VI.1.	Bengoechea Alonso José	bengoechea@caubet-cimera.es
O.IV.5.	Benítez –Páez Alfonso	abenitez@cipf.es
P.15.	Benítez Rico Laura	lbenitez@bio.ucm.es
P.5.	Berenguer José	jberenguer@cbm.uam.es
P.13.	Bernal Bayard Joaquín	jbbayard@us.es
O.I.5.	Blanco Ana María	marisa.climent@sistemasgenomicos.com
P.31.	Blanco Navarro José	blanco_jos@gva.es
O.III.1.	Blanco Toribio Ana	ablanco@cnb.csic.es
O.VI.6.	Blázquez Gómez Jesús	blazquez@cnb.uam.es
O.II. 1.	Botello Cambero Emilia	ebotello@unex.es
	Campo del Moreno Rosa	rdelcampo.hrc@salud.madrid.org
O.II.5.	Campoy Sánchez Susana	susana.campoy@uab.cat
	Cano Victoria Elizabeth	victoria.cano@caubet-cimera.es
	Carbú Espinosa de los Monteros M.	maria.carbu@uca.es
P.9.	Cárdenas Mastrascusa Paula	pcardenas@cnb.csic.es
	Casadesus Pursals Josep	casadesus@us.es
	Cantoral Fernández Jesús M.	jesusmanuel.cantoral@uca.es
P.43.	Cañas Muñiz Cristina	ccanas@cnb.csic.es
P.46.	Christie Oleza Joseph A.	joseph.christie@uib.es
P.8.	Cota García Ignacio	icota@us.es
P.71.	Coto Orquídea	cuba.ocoto@fbio.uh.cu

O.V.7.	D'Orazio Valentina	vdorazio@cnb.csic.es
	Domínguez-Bernal Gustavo	gdbernal@vet.ucm.es
P.55.	Donat Luis M <sup>a</sup> Victoria	vdonat.cita.ivia@gmail.com
	Escudero José Antonio	joseantonioescudero@yahoo.es
P.60.	Erquinigo Agurto Natalia	nataliaerquinigo@yahoo.com
O.I.3.	Eydallin Gustavo Gabriel	gustavoey@yahoo.com
P.4.	Fajardo Lubián Alicia	afajardo@cnb.csic.es
O.I.2.	Fernández-Acero Francisco	franciscojavier.fernandez@uca.es
O.V.4.	Fernández Piñar Pablo	pfpinar@farm.ucm.es
O.IV.3.	Fernández Vázquez Jorge	jorgefernandez@ub.edu
P.33.	Ferrer García M <sup>a</sup> Desamparados	ferrer_mde@gva.es
P.7.	Frank Christian	christian.frank@caubet-cimera.es
P.59.	Freyre Carrillo Carolina	carokarola@hotmail.com
	Galán Fátima	fatima.galan@uca.es
	Galan Montemayor Juan C.	galanm.hrc@salud.madrid.org
	Gallo Gabriel Osvaldo	gabriel.gallo@unavarra.es
P.44.	García Arranz Esther Isabel	eigarcia@cnb.csic.es
O.V.3.	García Quintanilla Fátima	figarcia@cnb.csic.es
O.V.2.	García Calderón Clara Beatriz	claragarcia@us.es
O.V.2 y P.65.	García del Portillo Francisco	fgportillo@cnb.csic.es
O.IV.1	García Heras Francisco	fgheras@um.es
P.12.	García Quintanilla Meritxell de J.	meritxell@us.es
O.VI.4.	García Lobo Juan M.	juan.garcialobo@unican.es
O.I.4.	García Martínez M <sup>a</sup> Begoña	begona.garcia@unavarra.es
O.VI.2	Garmendia García Junkal	garmendia@caubet-cimera.es
P.66.	Garrido Crespo Carlos	carlos.garrido@uca.es
P.26	Gavin Benavet Patricia	pgavinb.iacs@aragon.es
P.39 y 58.	Gil Ramírez Yolanda	ygilrami@alumni.unav.es
O.III.4.	Gil Santos José Antonio	jose.a.gil@unileon.es
	Giménez Carrero Paloma	paloma.gimenez@caubet-cimera.es
C.P.II.	González Grau Juan M.	jmgrau@irnase.csic.es
O.III.8.	González Muñoz Teresa	mgonzale@ugr.es
O.VI.5.	González-Zorn Bruno	bgzorn@vet.ucm.es
O.V.5.	Gonzalo Asensio Jesús Angel	jagonzal@unizar.es
O.IV.4.	Govantes Romero Fernando	fgovrom@upo.es
P.25.	Gullón Blanco Sonia	sgullon@cnb.csic.es
	Gutiérrez Gómez Adolfo	
P.29.	Gutiérrez Soriano Belén	belen.gutierrez.soriano@gmail.com
P.30.	Hernández Fernández Álvaro	ahdez@cnb.csic.es
P.41.	Hernández Piñero Sara Belén	sarabelen84@hotmail.com
P.22.	Herrero Gil Aldara	aldarah3@hotmail.com
P.57.	Hidalgo del Río Laura	laura.hidalgodelrio@gmail.com
P.70.	Horcajo Iglesias Pilar	phorcajo@vet.ucm.es
P.3.	Jakomin Marcello	ciello76@us.es

	Jiménez Cid Víctor	vicjcid@farm.ucm.es
	Jiménez López Marta	marta.jimenez@uca.es
	Jiménez Taracido Lourdes	lourdes.jimenez@uca.es
O.V.8.	Lasa Uzcudun Iñigo M <sup>a</sup>	ilasa@si.unavarra.es
P.50.	Latasa Osta Cristian	cristina.latasa@unavarra.es
	Llagostera Casas Montserrat	montserrat.llagostera@uab.cat
P.48.	Llobet Brossa Enrique	llobet@caubet-cimera.es
P.2.	Llompert Vázquez M <sup>a</sup> Catalina	llompert@caubet-cimera.es
P.65.	López Garrido Javier	javierlg@us.es
	Pérez Gómez Dolores	
P.6.	March Aguiló Catalina	march@caubet-cimera.es
P.10.	Mariscotti Espamer Javier F.	jmariscotti@cnb.csic.es
P.35.	Martí Jiménez Miguel	marti_mig@gva.es
P.52.	Marti Lliteras Juan Pablo	pau.marti@caubet-cimera.es
O.III.7.	Martínez Martínez Mónica	monmarti@bio.ucm.es
P.34.	Martínez Rubio Roser	roser1984@gmail.com
P.18.	Mir Sanchis Ignacio	mir_ign@gva.es
P.63.	Molina Martín María	molmifa@farm.ucm.es
P.40	Montero Codon Blanca	blanca.montero@uca.es
P.42.	Moranta Mesquida David	david.moranta@caubet-cimera.es
O.III.2.	Moreno Amador M <sup>a</sup> de Lourdes	lmoreno@us.es
O.II.6.	Moreno del Álamo María	mmoreno@cib.csic.es
P.20.	Morey Sancho Pau	morey@caubet-cimera.es
	Navarro José Blanco	
	Otal Gil Isabel	otali@unizar.es
P.21.	Pedró Pijibet Laura	lpedro@ibec.pcb.ub.es
	Pendón Meléndez Carlos	carlos.pendon@uca.es
P.16.	Pérez Gómez Dolores	lpg@us.es
O.IV.7.	Pérez Mellado Rafael	rpmellado@cnb.csic.es
P.28.	Platero Gómez Ana Isabel	aiplagom@upo.es
P.24.	Pradro Martín Silvia	sprado@ochoa.fib.es
	Pucciarelli Graciela M.	mgpuccia@cnb.csic.es
P.36.	Quiles Puchalt Nuria	quiles_nur@gva.es
P.62.	Regueiro Comesaña Verónica	regueiro@caubet-cimera.es
P.37.	Reina Bueno M <sup>a</sup> Mercedes	mrb@us.es
P.51.	Reines M <sup>a</sup> del Mar	mar.reines@caubet-cimera.es
	Riau Arenas Victor	victor.riau@uca.es
P.14.	Ripoll González Aida	aida_ripoll@hotmail.com
P.11.	Rodríguez-Alcayna Manuel	alcayna@hotmail.com
	Rodríguez Baños Mercedes	merche1976es@yahoo.es
P.69.	Rodríguez Domínguez Mario	mjrodriguez.hrc@salud.madrid.org
O.III.3.	Rodríguez de Moya Vera Javier	jrmv@us.es
O.III.6.	Rodríguez Iglesias Manuel A.	manuel.rodriguez Iglesias@uca.es
P.56.	Rodríguez Jiménez M. Esther	mariaesther.rodriguez@uca.es
P.53.	Roig Molina Francisco José	francisco.roig@uv.es

P.61.	Roman-Enri Manuela	enrimicro@hotmail.com
P.68.	Rozas Sáez Daniel	drozas@cnb.csic.es
	Ruiz de los Mozos Igor	faiter78@hotmail.com
	Samper Blasco Sofia	samper@unizar.es
P.27.	San Millán Álvaro	alvsanmillan@hotmail.com
P.45.	Sánchez Calvo Juan Manuel	juma27581@hotmail.com
O.V.1.	Sánchez Martínez M <sup>a</sup> Blanca	bsanchez@cnb.csic.es
P.54.	Seoane Seoane Asunción	asuncion.seoane@unican.es
P.32.	Selva Martínez Laura	nuquipu@hotmail.com
	Solano Goñi Cristina	cristina.solano@unavarra.es
O.III.5.	Solera del Río Rosario	rosario.solera@uca.es
P.1.	Toledo Arana Alejandro	alejandro.arana@unavarra.es
P.38.	Tormo Mas M <sup>a</sup> Ángeles	tormo_man@gva.es
O.IV.6.	Torrents Serra Eduard	etorrents@pcb.ub.es
O.II.4.	Turrientes López María del Carmen	mcturrientes@gmail.com
	Vargas Macías M <sup>a</sup> del Carmen	cvargas@us.es
O.IV.2.	Valderrama Traslaviña Andrés	andresv@cib.csic.es
	Vallejo Fernández de la Reguera I.	inma.vallejo@uca.es
	Vargas Macías M <sup>a</sup> del Carmen	cvargas@us.es
O.I.1.	Viana Martín David	dviana@uch.ceu.es
O.II.3.	Viguera Mínguez Enrique	eviguera@uma.es
	Zahedi Díaz Soraya	soraya.zahedi@uca.es
P.64.	Zorraquimo Salvo Violeta	violeta.zorraquino@unavarra.es
O.VI.3.	Zúñiga Ripa Amaia	azuniga@alumni.unav.es