

Tesis Doctorales

Abordajes proteómicos para el estudio de la secreción no clásica y la fosforilación en *Saccharomyces cerevisiae*

Elena López Villar

Directores: **Lucía Monteoliva** y **Concepción Gil García**.

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

El trabajo realizado en el Departamento de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid (España), en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Odense (Dinamarca), ha permitido desarrollar estudios de secreción proteica y fosforilación en *Saccharomyces cerevisiae*.

Un elevado número de proteínas, clásicamente descritas como citosólicas, al carecer de péptido señal para su entrada en la ruta de secreción, han sido localizadas en el exterior de distintos microorganismos, relacionándose con rutas de exportación no convencional. La combinación de aproximaciones de biología molecular, microscopía de fluorescencia y técnicas proteómicas, ha permitido profundizar en la localización subcelular de una de estas proteínas, Eno2p, y su relación con rutas de secreción no clásicas. Se comprobó que los 169 aminoácidos aminoterminales son suficientes para exportar invertasa intracelular al espacio periplásmico. Más aún, estudios de microscopía confocal indicaron que dicho fragmento, fusionado a la proteína verde fluorescente, se localizaba no solo en el citoplasma sino también en la membrana plasmática. Además, mediante estudios proteómicos consistentes en fraccionamiento e identificación de proteínas de membrana de *S. cerevisiae* tratadas con carbonato sódico, se detectó Eno2p como una proteína asociada a membranas (Lopez Villar et al., *Genetic and Proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. Proteomics, 2006*). Por otro lado, se ha puesto a punto una estrategia para la identificación y cuantificación de la fosforilación de proteínas en levaduras tras su estimulación con factor alfa. El marcaje metabólico mediante SILAC, de células con y sin tratamiento, permitió la cuantificación relativa de las proteínas y fosfopéptidos. Para el enriquecimiento en fosfopéptidos se han combinado distintos tipos de cromatografías (ATP Sepharose, IMAC (Quiagen) y dióxido de titanio (TiO₂) con DHB), de las cuales la

combinación IMAC (Quiagen) junto con TiO₂/DHB mostró el mejor rendimiento. Mediante la utilización de cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas ESI-QqTOF y las herramientas computacionales MASCOT y VEMS, se identificaron y cuantificaron treinta y ocho residuos fosforilados. Treinta de éstos, no descritos hasta la fecha, están relacionados con metabolismo, ciclo celular y síntesis de proteínas entre otros procesos celulares. Además, estudios preliminares utilizando el espectrómetro de masas LC-ESI-LTQ-FT-ICR mostraron mayor sensibilidad de esta tecnología para la detección de péptidos fosforilados (Lopez Villar et al., *Complementary enrichment methods in phosphopeptides from yeast, coupled to SILAC and Mass Spectrometry, 2007*).

Microbiota asociada a criaderos de moluscos. Patogénesis y probiosis.

Susana Prado Plana

Directores: **Juan L. Barja Pérez** y **Jaime Montes Pérez**.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

El cultivo de moluscos bivalvos es un sector de gran importancia económica y social en Galicia. En la actualidad, el agotamiento de los bancos naturales ha convertido a los criaderos en la única fuente de semilla autóctona, especialmente en lo que se refiere a ostra (*Ostrea edulis*) y almejas (*Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, y la especie alóctona *R. philippinarum*). Sin embargo, estas instalaciones se enfrentan a episodios de mortalidades masivas, derivados en muchas ocasiones de infecciones bacterianas, que dificultan la regularidad del suministro e implican pérdidas económicas. El tratamiento del agua de los cultivos mediante diversos procedimientos físico-químicos ha resultado insuficiente, conllevando además problemas como la aparición de resistencias, el elevado coste económico o la prohibición de su uso por la legislación actual. Por ello en los últimos años se buscan soluciones alternativas, entre las que destaca el uso de bacterias probióticas.

En este trabajo hemos llevado a cabo un seguimiento de los problemas asociados a diferentes criaderos gallegos, que nos han permitido identificar de forma clara tres bacterias responsables de episodios de mortalidades larvarias. Los experimentos realizados demuestran que son capaces de

causar graves mortalidades en cultivos larvarios de ostra plana dentro de las primeras 48 horas. En todos los casos han resultado ser bacterias pertenecientes al género *Vibrio*. El patógeno 145.98 ha sido identificado como *Vibrio neptunius*, siendo la primera descripción de esta especie como patógena. Sin embargo, la caracterización fenotípica y genotípica de los aislados 203 y 638 apunta a su descripción como nuevas especies dentro del género.

En la búsqueda de potenciales bacterias probióticas que facilitaran el control de las poblaciones de vibrios en los cultivos, se ensayaron en medio sólido 520 aislados obtenidos de los diferentes compartimentos de los criaderos, frente a cuatro cepas testigo (3 vibrios y un coco Gram positivo). Se seleccionó la cepa 154 por mostrar la máxima actividad frente a todas ellas. Esta cepa tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana que incluye patógenos de acuicultura, especialmente del género *Vibrio*, y cepas de origen clínico. Se demostró su actividad inhibitoria *in vitro*, tanto en medio sólido como en agua de mar. Los estudios *in vivo* confirmaron su capacidad de control del crecimiento de las poblaciones de vibrios en el agua de cultivos larvarios y en cultivos de microalgas utilizados como alimento en criadero. También resultó ser efectiva para combatir infecciones bacterianas, bien surgidas de forma natural bien inducidas en laboratorio, siempre que sea utilizada como medida de prevención.

Esta cepa, junto con otros aislados similares a ella (639, 694 y 847) han podido ser asignadas de forma clara a la especie *Roseobacter gallaeciensis*, recientemente reclasificada dentro del nuevo género *Phaeobacter*. Esta creación de un nuevo género está apoyada por los estudios llevados a cabo en esta Memoria, pero no ocurre así con su división en dos especies, que debe ser objeto de estudios posteriores.

La cepa 154 resulta un candidato idóneo para su uso como probiótico en cultivos marinos larvarios, previniendo la proliferación de patógenos oportunistas.

Control biológico del oídio de cucurbitáceas

Diego Francisco Romero Hinojosa

Directores: **Alejandro Pérez García** y **Antonio de Vicente Moreno**.

Laboratorio de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga

El oídio es la enfermedad fúngica más común en cultivos de cucurbitáceas en todo el

mundo. En el sur de España, *Podosphaera fusca* ha sido descrito como el único agente causante de la enfermedad. El desarrollo de resistencia por parte del patógeno a muchos de los fungicidas comerciales y la demanda de una agricultura más compatible con el medio ambiente, sitúan al control biológico entre las estrategias alternativas de control a tener en cuenta más interesantes. En esta tesis nos planteamos evaluar la posibilidad de controlar al oídio mediante el uso de diferentes agentes de control biológico y dilucidar los mecanismos mediante los cuales llevan a cabo su acción de biocontrol.

En la primera parte de este trabajo seleccionamos dos hongos micoparásitos, *Ampelomyces quisqualis* y *Lecanicillium lecanii*, así como 4 cepas bacterianas identificadas como *Bacillus subtilis* por su capacidad para controlar satisfactoriamente la enfermedad en experimentos *in vitro*. Posteriormente, en ensayos realizados con plántulas de melón mantenidas en cámaras de cultivo, observamos como valores de humedad relativa superiores al 90% favorecían la actividad de biocontrol de estos agentes biológicos. Finalmente, la capacidad antagonista de estos agentes de biocontrol se confirmó en ensayos realizados con plantas de melón mantenidas en invernadero, donde se obtuvieron niveles de control de la enfermedad similares a los obtenidos por un fungicida químico sistémico usado como control. Con respecto a los mecanismos de acción de los agentes, mediante el empleo de diferentes técnicas de microscopía observamos como *A. quisqualis* se comportaba como endoparásito y biotrofo estricto, mientras que *L. lecanii* actuaba como un ectoparásito, mostrando además una fase de vida saprofito. Para corroborar el papel de la antibiosis en la actividad de biocontrol de las cepas de *B. subtilis*, se realizaron experimentos con filtrados bacterianos libres de células, obteniéndose reducciones de la enfermedad en torno al 90%. Paralelamente, observó como está reducción en los síntomas de la enfermedad se asociaba a una reducción similar en la tasa de germinación de conidios de *P. fusca*, debido a la inducción de daños citológicos y morfológicos, finalmente responsables de su incapacidad para germinar. Mediante el empleo de diferentes técnicas analíticas identificamos la producción de antibióticos lipopeptídicos. La capacidad de estos compuestos purificados para inhibir la germinación de conidios de *P. fusca* apoyaron su implicación en la actividad de biocontrol. Finalmente, mediante mutagénesis dirigida a interrumpir la producción de estos compuestos, se confirmó que los lipopéptidos de la familia de las iturinas y las fengicinas eran esenciales en la acti-

vidad de biocontrol de estas cepas de *B. subtilis*.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que los agentes de biocontrol seleccionados son buenos candidatos para ser incluidos en programas de control integrado contra el oídio de las cucurbitáceas.

Deciphering the role of PhoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence

Jesús Ángel Gonzalo Asensio

Director: Carlos Martín Montañés

Grupo de Genética de Micobacterias. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

La tuberculosis es en la actualidad una de las principales causas de muerte debidas a enfermedades infecciosas, más de dos millones de personas mueren cada año y la tercera parte de la población está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque la tuberculosis es una enfermedad tratable con antibióticos y puede prevenirse mediante vacunación, la aparición de cepas resistentes a los fármacos antituberculosos y la variable eficacia protectora de la vacuna BCG contra las manifestaciones pulmonares de la enfermedad dejan la victoria sobre la tuberculosis fuera de alcance.

La búsqueda de una vacuna eficaz continúa, iniciativas conjuntas de laboratorios europeos y americanos han hecho posible la construcción de eficaces candidatos a vacuna. De hecho, el punto de partida de éste trabajo ha sido el gen *phoP*, cuyo papel en la virulencia de *M. tuberculosis* fue estudiado previamente en nuestro laboratorio en colaboración con el Instituto Pasteur de París. Un mutante *phoP* construido en la cepa clínica MT103 confiere mejor protección contra la tuberculosis que la actual vacuna BCG en varios modelos animales, estos resultados apuntan a dicho mutante como un prometedor candidato a vacuna viva atenuada. Sin embargo, aunque el fenotipo virulento del mutante *phoP* ha sido bien estudiado, los mecanismos moleculares que conducen a la atenuación no están caracterizados. Por ello, esta Tesis se ha enfocado a comprender la función del gen *phoP* y descifrar su papel en la virulencia del bacilo de la tuberculosis.

PhoP es un regulador transcripcional que forma parte del sistema de dos componentes (2CS) PhoPR de *M. tuberculosis*. Los 2CSs median cambios transcripcionales en respuesta a determinados estímulos y están implicados en la regulación de la virulencia en bacterias patógenas. Con el objetivo de caracterizar genéticamente el papel del sistema PhoPR, hemos construido mutantes por

delección en el gen *phoP* o en ambos genes *phoPR* en tres cepas diferentes de *M. tuberculosis*. Los análisis bioquímicos de estos mutantes muestran que PhoP regula coordinada y positivamente la síntesis de lípidos implicados en la virulencia de *M. tuberculosis*. Estos resultados además de constituir una buena explicación para el fenotipo atenuado del mutante *phoP* representan una de las primeras evidencias experimentales de la regulación transcripcional del metabolismo lipídico en el bacilo de la tuberculosis.

Este trabajo también se ha enfocado a comprender el mecanismo de acción del sistema PhoPR. El hecho de que algunos de estos 2CSs autorregulan su propia expresión nos llevó a estudiar la interacción entre PhoP con su propio promotor así como la transcripción del gen *phoP*. Nuestros resultados demuestran que el mRNA de *phoP* se sintetiza desde tres sitios de inicio de la transcripción (*tsp*'s) sugiriendo una compleja regulación de su expresión. Además hemos demostrado que PhoP se une a su propio promotor. La región de unión de PhoP incluye los *tsp*'s de este gen. Estos hallazgos sugieren que PhoPR es un sistema autorregulado y nos hace suponer que la expresión de los genes regulados por PhoP depende en gran medida de su propia expresión.

Uno de los objetivos más ambiciosos de este estudio ha sido la identificación de los genes regulados por PhoP en un intento por comprender la atenuación a nivel transcripcional de la cepa mutante. Para identificar el regulón de PhoP se han llevado a cabo dos estudios: la identificación de perfiles transcripcionales utilizando *microarrays* de DNA y el estudio de patrones de expresión mediante electroforesis bidimensional de proteínas. Ambos experimentos muestran una buena correlación, lo que confiere robustez a nuestro estudio. Los resultados indican que PhoP podría estar implicado en la regulación de tres rutas transcripcionales que controlan: la remodelación de la envoltura celular; la adaptación metabólica a la escasez de oxígeno y la respuesta al choque térmico. Estas respuestas transcripcionales están relacionadas con el estilo de vida intracelular de *M. tuberculosis* y, por tanto con su virulencia, por ello su alteración en el mutante *phoP* podría provocar atenuación.

Aunque el fenotipo atenuado de la cepa mutante debería ser principalmente debido a la mutación en el gen *phoP*, los propios polimorfismos de la cepa parental MT103 podrían haber contribuido a las características fenotípicas y propiedades vacunales del mutante *phoP*, por ello, nos propusimos identificar los polimorfismos de la cepa MT103. Los resultados obtenidos mediante

microarrays de DNA demuestran la pérdida de algunos genes en la cepa MT103 cuando se compara con la cepa de laboratorio H37Rv.

Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias.

Caracterización molecular de genes de resistencia

Ana Belén Flórez García

Directores: Baltasar Mayo Pérez y Abelardo Margolles Barros

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)-CSIC.

Centro de presentación: Facultad de Biología, Universidad de Oviedo.

Tutor: Juan Evaristo Suárez Fernández

En los últimos años, la preocupación por la resistencia a antibióticos se ha extendido a los microorganismos comensales y beneficiosos porque pudieran convertirse en reservorios desde donde los genes de resistencia pudieran transferirse a microorganismos oportunistas y patógenos, con los que contactan durante las fermentaciones y durante el tránsito intestinal. En esta Tesis se han estudiado los niveles de susceptibilidad/resistencia a diversos antimicrobianos en un numeroso grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Leuconostoc* de origen lácteo e intestinal. En un segundo paso, se han analizado las bases moleculares de las resistencias adquiridas, y estudiado el papel de los transportadores inespecíficos tipo MDR en la resistencia.

Las BAL procedentes de quesos tradicionales presentaron pocas resistencias, siendo la mayoría intrínsecas. Tan sólo dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* resultaron sospechosas de portar resistencia adquirida a tetraciclina (CIM >64 µg ml⁻¹). En ambas cepas se demostró, finalmente, la presencia del gen *tet(M)*, localizado en copias de Tn916. El transposón parece haberse insertado en plásmidos residentes de las cepas, y pudo transferirse a cepas de enterococos y lactococos.

Del mismo modo, la gran mayoría de los aislados intestinales se mostraron sensibles o intrínsecamente resistentes a los antibióticos ensayados. Sin embargo, algunas cepas aisladas presentaban valores de CIM a tetraciclina, eritromicina y/o clindamicina alejados de la distribución normal de las CIMs de las cepas sensibles, sugiriendo resis-

tencias adquiridas. La multi-resistencia no es corriente, ya que tan sólo una cepa de *Lactobacillus johnsonii* fue resistente dos grupos distintos de antibióticos: tetraciclina, por medio de un gen *tet(W)*, y eritromicina y clindamicina (fenotipo MLS), codificada por un gen *erm(B)*. Sorprendentemente, el gen *erm(B)* y las regiones adyacentes resultaron ser idénticas a un segmento del plásmido pRE25 de *Enterococcus faecium*, sugiriendo una transferencia desde esta especie. Varias cepas de distintas especies de bifidobacterias se mostraron resistentes a tetraciclina, mediada, de nuevo, por un gen *tet(W)*, muy extendido entre bacterias del rumen e intestinales. La resistencia a macrólidos que presentó una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* no estaba codificada por genes de resistencia, sino que era debida a una mutación de transición en la secuencia del gen codificador del ARN ribosómico 23S. Esta cepa, con aptitudes prebióticas, pudiera ser útil para mantener el equilibrio microbiano intestinal durante tratamientos prolongados con estos antibióticos.

Los transportadores MDR de lactococos y bifidobacterias estudiados en este trabajo no parecen conferir niveles elevados de resistencia a los antibióticos ensayados. Sin embargo, una actividad diferencial de éstos podría contribuir a la variabilidad de CIMs que presentan las cepas sensibles y resistentes.

Como conclusión, las BAL y las bifidobacterias no parecen presentar aún demasiadas resistencias adquiridas. Sin embargo, el análisis de los perfiles de resistencia/susceptibilidad es obligado para las cepas que puedan formar parte de cultivos iniciadores o probióticos. Además, BAL y bifidobacterias podrían ser un grupo modelo para el estudio de los flujos génicos de las resistencias y el ensayo de estrategias que frenen la dispersión.

Estudio de resistencias a tetraciclinas en patógenos porcinos de la familia Pasteurellaceae

Mónica Blanco González

Director: Jesús Navas Méndez

Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria.

Las tetraciclinas se utilizan para la prevención y el tratamiento de diversas patologías de origen infeccioso en el ganado porcino. Además se han usado con profusión para favorecer el engorde de los animales. En los últimos años el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento se

ha desaconsejado en la Unión Europea y desde 2006 está completamente prohibido. No obstante hay datos que sugieren que algunos antibióticos, como es el caso de las tetraciclinas, todavía se usan en exceso como agentes preventivos, suministrados con el alimento o el agua de bebida de los animales.

En este trabajo se ha estudiado la sensibilidad a antibióticos de dos patógenos porcinos bien conocidos: *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis*. Los dos pertenecen a la familia *Pasteurellaceae*. *A. pleuropneumoniae* es el agente causal de la pleuroneumonía porcina mientras que *H. parasuis* produce la enfermedad de Glässer, un tipo de septicemia. La prevalencia de estos dos patógenos ha aumentado en los últimos años debido a la intensificación de la producción y las nuevas prácticas de manejo de los animales. El estudio se realizó sobre 229 aislamientos de *A. pleuropneumoniae* y 77 de *H. parasuis* recogidos en diferentes granjas de la región de Castilla y León durante el período 1997-2000 y que fueron cedidas por el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León. Se observó una elevada incidencia de resistencia en *A. pleuropneumoniae* (el 73% de las cepas eran resistentes a tetraciclina) mientras que la mayor parte de los aislamientos de *H. parasuis* eran sensibles. La mayoría de las cepas resistentes de *A. pleuropneumoniae* eran portadoras de plásmidos que contenían el gen de resistencia (codificante para un transportador o una proteína de protección del ribosoma) junto a genes implicados en su propagación. En *H. parasuis* los determinantes de la resistencia a tetraciclina se localizaron en el cromosoma. Existe una clara correlación entre la localización de los determinantes de resistencia y la prevalencia de la misma en cada especie, por lo

que los plásmidos deben haber contribuido a su propagación por transmisión horizontal.

Los resultados obtenidos muestran altos niveles de resistencia frente a antibióticos de diversas familias, como ocurre en el caso de las tetraciclinas. Aunque resulta difícil obtener datos actualizados del consumo de antibióticos en animales de producción en España, los datos obtenidos reflejan una gran presión de selección en las dos poblaciones bacterianas sometidas al estudio, indicando su utilización excesiva con fines zotécnicos en nuestro país. La tendencia debe ser a una utilización más racional de los antibióticos, acompañada de una mejora en las condiciones higiénicas y sanitarias de las explotaciones, así como en el manejo de los animales, aunque sin caer en la simplificación de pretender su eliminación total. La prohibición en el uso de antibióticos como promotores de crecimiento ha generado gran controversia debido a la disminución de la producción y al aumento de la contaminación ambiental, habiéndose estimado en toneladas la liberación adicional de residuos nitrogenados derivados del metabolismo proteico.

Como resultado de esta tesis se han publicado los siguientes artículos:

- Blanco M; Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Ferri EF, Roberts MC y Navas J. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50(2): 702-8; 2006.
- Gutiérrez-Martín CB, del Blanco NG, Blanco M, Navas J y Rodríguez-Ferri E.F. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Veterinary Microbiology*; 115(1-3): 218-22; 2006.

Novedades bibliográficas

ANTIMICROBIANOS

- ARYA, D.P. **Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery (Wiley Series in Drug Discovery and Development)**. Wiley-Interscience, 2007. 336 pp. 115 \$.
- GOULD, I.A., VAN DER MEER, J.W.M. (EDS.) **Antibiotic Policies: Fighting Resistance**. Springer, 2007. 462 pp. 149 \$.
- HAUSER, A.R. **Antibiotic Basics for Clinicians: Choosing the Right Antibacterial**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 320 pp. 32.95 \$.
- HUANG, Z. **Drug Discovery Research: New Frontiers in the Post-Genomic Era**. Wiley-Interscience, 2007. 536 pp. 125 \$.

INMUNOLOGÍA

- NATHANSON, N. **Viral Pathogenesis and Immunity**, Academic Press (2ª Ed.) 2007. 280 pp. 59,95 \$.
- RESCIGNO, M. (ED.) **Dendritic Cell Interactions with Bacteria (Advances in Molecular and Cellular Microbiology)**. Cambridge University Press; 2007. 266 pp. 130.00 \$.