

Paloma López García

Investigadora Científica
plg@cib.csic.es



PhD, 1978
Universidad Complutense de Madrid
Postdoctoral, 1979-1980
Institute of Biochemistry and Biophysics,
Polish Academy of Science (Warsaw, Poland)
1981
Brookhaven National Laboratory (Upton, USA)
Research Associate, 1983
Brookhaven National Laboratory (Upton, USA)
Científica Titular, 1985
Jefa de Grupo, 1987
Investigadora Científica, 1992
CIB, CSIC

Investigadora del equipo | Staff scientist:

Pilar Fernández de Palencia

Otros miembros | Other lab members:

M^a Luz Mohedano Bonillo
Sara Notararigo
Adrián Pérez Ramos

M^a Angeles Corrales González
Montserrat Nacher Vázquez

<https://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=41>

Biología Molecular de Bacterias Gram-Positivas

Nuestro grupo está interesado en el estudio de bacterias ácido lácticas (BAL) con potencial probiótico y de sus rutas metabólicas, que conllevan a la síntesis de compuestos prebióticos, con capacidad de inmunomodulación o con otras propiedades beneficiosas para la salud humana y animal. El objetivo final es encontrar microorganismos y moléculas de interés para el desarrollo de alimentos funcionales probióticos, prebióticos y simbióticos.

En el bienio 2013-2014, en colaboración con la Dra. Alicia Prieto (CIB) y los grupos de las Dras. M^a Teresa Dueñas de la Universidad del País Vasco y Rosa Aznar de la Universidad de Valencia (UV), hemos desarrollado métodos de purificación de exopolisacáridos bacterianos para la posterior evaluación de su actividad biológica. Así, hemos comprobado en colaboración con los grupos de la Dra. Isabel Pérez (CIB) y la UV, que los dextranos producidos por BAL aisladas de productos cárnicos (Fig. 1) poseen actividad antiviral frente a virus de salmónidos y provocan una estimulación de la inmunidad innata y adquirida de truchas arcoiris. El potencial del dextrano en el desarrollo de alimentos funcionales en el sector de acuicultura ha sido protegido por solicitud de patente PCT. En colaboración con el grupo del Dr. Angel Corbí (CIB) hemos comprobado que el (1, 3)(1, 2)-β-glucano producido por BAL aisladas de sidra y recombinantes posee una actividad inmunomoduladora sobre macrófagos humanos y células

THP-1. Resultados que indican un potencial del glucano como coadyuvante en enfermedades inflamatorias. Hemos desarrollado un método inmunológico, que permite la detección directa del glucano en matrices complejas. También, utilizándolo, hemos caracterizado bioquímicamente el enzima que sintetiza el polímero. Hemos determinado las propiedades probióticas de BAL productoras de vitamina B2 aisladas de alimentos basados en cereales y hemos propuesto un mecanismo de regulación de su producción, basado en el plegamiento del mRNA codificado por el operón implicado en la producción de la vitamina. Finalmente, estamos desarrollando vectores plasmídicos, que codifican la proteína fluorescente mcherry. Entre otros, hemos desarrollado un vector en colaboración con los grupos de los Dres. Miguel Angel Pardo (AZTI-Tecnalia) y Giuseppe Spano de la Universidad de Foggia (Italia), que permite la monitorización de la capacidad de BAL para interactuar con enterocitos en un modelo de pez cebra gnotobiótico (Fig. 2).

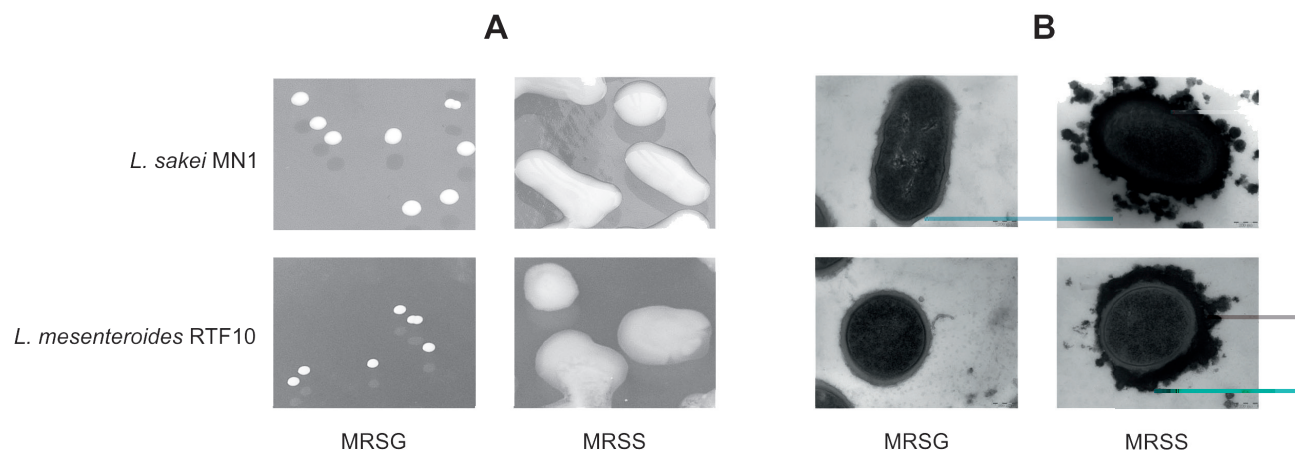


Figura 1 | Figure 1

Detección de la producción de dextrano por bacterias aisladas de productos cárnicos. (A) Colonias bacterianas crecidas en medio MRS agar conteniendo glucosa o sacarosa como fuente de carbono y (B) análisis a nivel celular mediante microscopía electrónica de transmisión.

Detection of dextran production by bacterial strains isolated from meat products. (A) Bacterial colonies growing on MRS agar containing glucose or sucrose as carbon source. (B) Analysis at cellular level by transmission electron microscopy.

Patentes | Patents

- Montserrat Nacher, Paloma López, Alicia Prieto, Sara Isabel Pérez, Sylvia Rodríguez, M^a Luz Mohedano y Rosa Aznar. 5 Junio 2014. *Secuencia de nucleótidos codificante de una enzima con actividad dextranasa, células que la expresan y su uso para la obtención de exopolisacáridos con actividad antiviral y composiciones que los contienen.* **PCT/ES2014/070464**

Financiación | Funding

- FP7-PEOPLE-ITN-2008-238490 (**Unión Europea**)
- AGL2009-12998-C03 (**MICINN**)
- AGL2012-40084-C03 (**MINECO**)



Molecular Biology of Gram-Positive Bacteria

Our group is engaged in the study of lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential, and their metabolic pathways, which lead to the synthesis of prebiotic compounds with immunomodulating activity or other properties that could be beneficial to human or animal health. The final goal is to find interesting microorganisms and compounds that could be used to develop functional foods, probiotics, prebiotics and symbiotics.

During 2013-2014, in collaboration with Dr Alicia Prieto (CIB) and the groups of Dr ^a Teresa Dueñas (Universidad de País Vasco) and Dr Rosa Aznar (Universidad de Valencia) (UV) we have developed methods for purifying bacterial exopolysaccharides for subsequent evaluation of their biological activity. Thus we have shown, in collaboration with the groups of Dr Isabel Pérez (CIB) and the UV, that the dextrans produced by LAB strains (Fig. 1) isolated from meat products possess antiviral activity against salmonid viruses and stimulate both the innate and acquired immune systems of rainbow trout. A patent application has been filed to protect the potential use of the dextrans in functional foods developed for the aquaculture industry. In collaboration with the group of Dr Angel Corbi (CIB) we have shown that a (1 → 3)(1 → 2)-β-D-glucan produced by LAB isolated from cider, and recombinant strains, immunomodulates human macrophages and THP-1 cells. The results indicated that the glucan could have utility as a co-adjuvant in inflammatory diseases. We have developed an immunological method for the direct detection of the glucan in complex media. Using this method we have also biochemically characterized the enzyme that produces the polymer. We have also determined the probiotic properties of LAB strains that produce vitamin B2 (isolated from cereal-based foods) and we have proposed a regulatory mechanism for its production, based on the folding of the mRNA of the operon that is responsible for the production of this vitamin. Finally, we are developing plasmid vectors that encode the mcherry fluorescent protein. Amongst others, we have developed a vector, in collaboration with the groups of Dr Angel Pardo (AZTI-Tecnalia) and Dr Giuseppe Spano (Universidad de Foggia, Italy) that has enabled us to observe the interaction of LAB with enterocytes in a gnotobiotic zebrafish model (Fig. 2).

Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

- Notarigo S, Náchter-Vázquez M, Ibarburu I, Werning ML, Fernández de Palencia P, Dueñas MT, Aznar R, López P, Prieto A [2013] *Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria*. **Carbohydr Polym** 93:57–64.
- Russo P, Capozzi V, Arena MP, Spadaccino G., Dueñas MT, López P, Fiocco D, Spano G [2014] *Riboflavin-overproducing strains of Lactobacillus fermentum for riboflavin-enriched bread*. **Appl Microbiol Biotechnol** 98:3691–3700.
- Mohedano ML, Russo P, de los Rios V, Capozzi V, Fernández de Palencia P, Spano G, López P [2014] *A partial proteome reference map of the wine lactic acid bacterium Oenococcus oeni ATCC BAA-1163*. **Open Biol** <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.130154>.
- Notarigo S, de las Casas-Engel M, Fernández de Palencia P, Corbí AL, López P [2014] *Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1-3)-β-D-glucan from P. parvulus 2.6*. **Carbohydr Polym** 112: 109–113.
- Campelo AB, Rocas C, Mohedano ML, López P, Rodríguez A, Martínez B [2014] *A bacteriocin gene cluster able to enhance plasmid maintenance in Lactococcus lactis*. **Microb Cell Fact** 13:77.
- Werning ML, Pérez-Ramos A, Fernández de Palencia P, Mohedano ML, Dueñas MT, Prieto A, López P [2014] *A specific immunological method to detect and quantify bacterial 2-substituted (1,3)-β-D-glucan*. **Carbohydr Polym** 113:39–45.
- Arena MP, Russo P, Capozzi V., López P, Fiocco D, Spano G [2014] *Probiotic abilities of riboflavin-overproducing Lactobacillus strains: a novel promising application of probiotics*. **Appl Microbiol Biotechnol** 98:7569–7581.
- Mohedano ML, García-Cayuela T, Pérez-Ramos A, Gaiser AR, Requena T, López P [2015] *Construction and validation of a mCherry protein vector for promoter analysis in Lactobacillus acidophilus*. **J Ind Microbiol Biotechnol** DOI: 10.1007/s10295-014-1567-4.
- Russo P, Iturria I, Mohedano ML, Caggianiello G, Rainieri S, Fiocco D, Pardo MA, López P, Spano G [2015] *Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria*. **Appl Microbiol Biotechnol** DOI: 10.1007/s00253-014-6351-x.

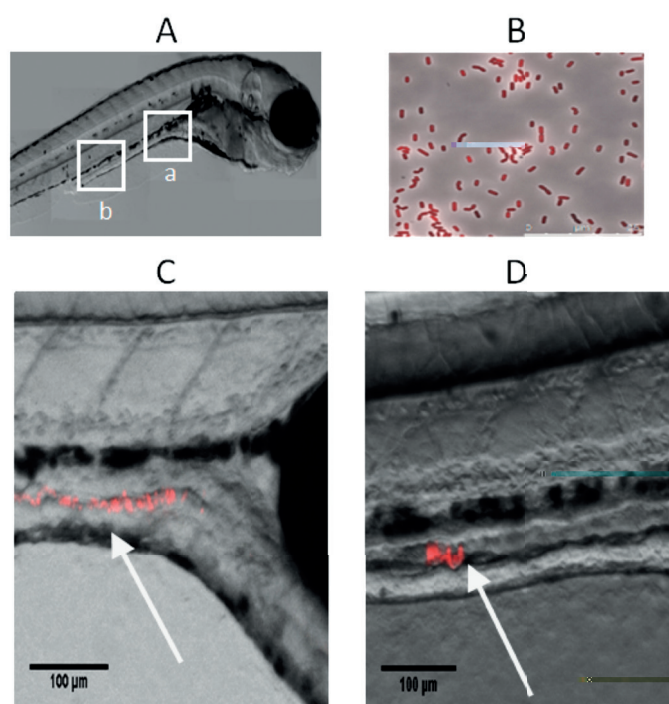


Figura 2 | Figure 2

Detección de la distribución intestinal de *Lactobacillus plantarum* B2 marcado fluorescentemente con el plásmido pRCR12. Larvas de pez zebra (A) infectadas con la bacteria (B) fotografiadas a las 6 h (C) y a las 12 h (D) después de la infección. Las flechas blancas marcan la localización de la estirpe en el intestino medio (a) o posterior (b).

Detection of intestinal distribution of *Lactobacillus plantarum* B2 fluorescently tagged with plasmid pRCR12. Zebrafish larvae (A) infected with the bacterium (B) photographed at 6 h (C) and 12 h (D) postinfection. White arrows mark the localization of the strain in the mid (a) or posterior (b) intestine.

Gloria del Solar Dongil

Investigadora Científica
gdelsolar@cib.csic.es



PhD, 1991
Universidad Complutense de Madrid
Científico Titular, 2002
Jefa de Grupo, 2003
Investigadora Científica, 2009
CIB, CSIC

Otros miembros | Other lab members:

José Ángel Ruiz-Masó
Tania Samir Rubio Lepe
Marta Sanz Pérez
Lorena Bordanaba Ruiseco

<https://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=50>

Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-Positivas

PMV158 es el prototipo de una familia de plásmidos promiscuos que replican por "círculo rodante". Las singularidades del replicón básico de pMV158, así como la interacción de este plásmido con cepas de neumococos adaptadas o no a las condiciones de crecimiento en el laboratorio, están siendo investigadas.

RepB continúa siendo el único iniciador de la replicación plasmídica por círculo rodante con estructura atómica resuelta. Mediante la construcción y caracterización de mutantes proteicos estamos estudiando las bases moleculares que subyacen en: i) el reconocimiento específico del DNA del origen por RepB; ii) la actividad catalítica de RepB en las etapas de iniciación y terminación de la replicación; y iii) la posible participación de RepB en el desenrollamiento del DNA. El modelo derivado de estos análisis podría ayudar a explicar la enorme promiscuidad del plásmido pMV158.

CopG es el represor transcripcional más pequeño que se ha caracterizado. La alta afinidad y especificidad de CopG por su DNA diana se basan en la unión secuencial y cooperativa de dímeros de CopG a los 4 sub-sitos que constituyen su operador. En ausencia de interacciones cooperativas, CopG sólo se une al sitio primario del operador. Mediante footprinting de alta resolución hemos determinado el orden secuencial de unión de CopG al operador (Fig. 1). El modo de unión de CopG al DNA, único entre las proteínas de la superfamilia RHH, arroja luz sobre el mecanismo usado por este represor transcripcional para desalojar a la RNAP establemente unida al promotor.

Cepas de neumococos libres de plásmidos o conteniendo pMV158 se sometieron a un proceso de adaptación al crecimiento en condiciones de laboratorio durante 500 generaciones. El incremento en "fitness" de las cepas evolucionadas respecto a las parentales fue algo mayor en el caso de los neumococos que llevan el plásmido. Las cepas evolucionadas, independientemente de si llevan o no plásmido, presentan una menor tendencia que las parentales a formar las características cadenas celulares de neumococos (Fig. 2). Nuestro interés futuro es averiguar cómo han evolucionado algunas características relacionadas con la patogenicidad de esta bacteria.

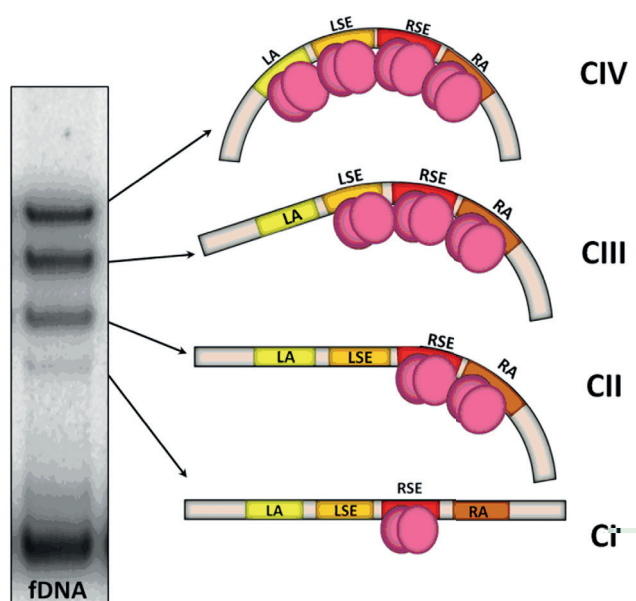


Figura 1 | Figure 1

Ocupación de los 4 sub-sitos (LA, LSE, RSE y RA) del operador de CopG en cada uno de los complejos formados por la unión cooperativa de la proteína al DNA. El RSE es el sitio primario de unión de CopG.

Occupancy of the 4 sub-sites (LA, LSE, RSE and RA) of the CopG operator in each of the nucleoprotein complexes generated by the cooperative binding of the protein to its target DNA. RSE is the primary binding site of CopG.

Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

- López-Aguilar, C., Ruiz-Masó, J. A., Rubio-Lepe, T. S., Sanz, M., del Solar, G. (2013). *Translation initiation of the replication initiator repB gene of promiscuous plasmid pMV158 is led by an extended non-SD sequence*. **Plasmid** 70: 69-77.
- López-Aguilar, C. and del Solar, G. (2013). *Probing the sequence and structure of in vitro synthesized antisense and target RNAs from the replication control system of plasmid pMV158*. **Plasmid** 70: 94-103.
- Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., del Solar, G. (2014). *Plasmid Rolling-Circle Replication*. **Microbiol Spectrum** 3(1):PLAS-0035-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014.

Financiación | Funding

- CSD00C-08-41920 (MINECO)
- BFU2010-19597/BMC (MINECO)
- BFU2011-14145-E (MINECO)

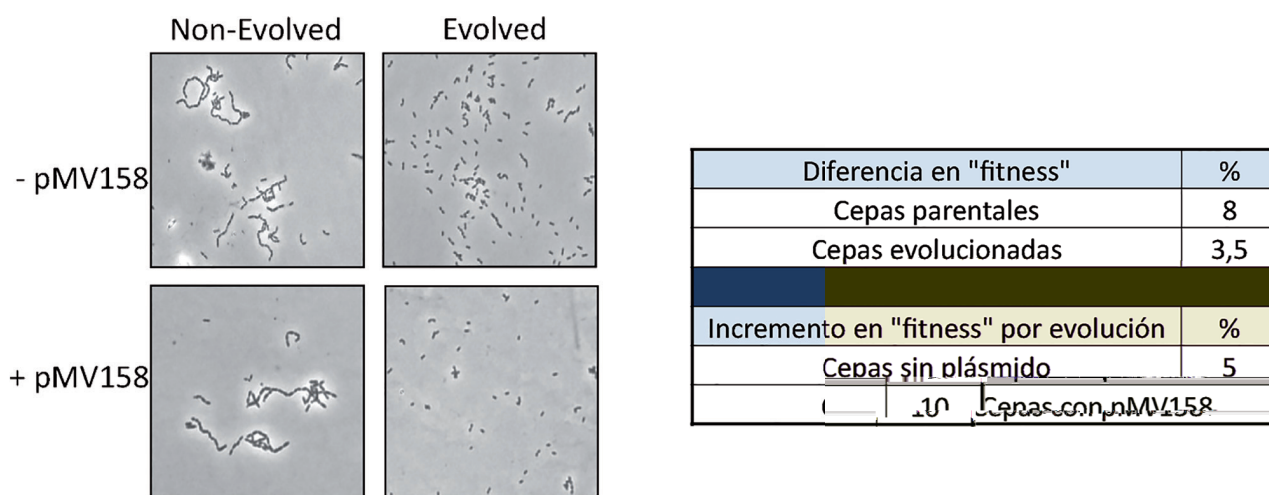


Figura 2 | Figure 2

Aspecto al microscopio óptico de las células de estirpes parentales y evolucionadas de neumococos con o sin pMV158. La Tabla muestra las diferencias en fitness entre las distintas cepas analizadas.

Optical microscope images of pneumococcal cells in parental and evolved strains either containing or not plasmid pMV158. The Table displays the differences in fitness between the studied strains.

Replication and Expression of DNA in Gram-Positive Bacteria

PMV158 is the prototype of a family of promiscuous plasmids replicating by the "rolling-circle" mechanism. The singularities of the pMV158 basic replicon, as well as the interaction of this plasmid with pneumococcal strains either adapted or non-adapted to laboratory growth conditions, are being investigated.

RepB remains the unique plasmid-encoded initiator of rolling-circle replication with solved atomic structure. By constructing and characterizing protein mutants, we are currently studying the molecular bases underlying: i) the specific recognition of the plasmid origin DNA; ii) the RepB catalytic activity involved in the initiation and termination of replication; and iii) the potential role of RepB in the unwinding of the DNA double helix. The model arising from these analyses might help explain the enormous promiscuity of plasmid pMV158.

CopG is the smaller transcriptional repressor characterized so far. The high affinity and specificity of CopG for its target DNA lie on the sequential and cooperative binding of CopG dimers to the 4 sub-sites composing its operator. In the absence of cooperative interactions, CopG can only bind to the primary site of the operator. By high-resolution footprinting, we have determined the sequential order of CopG binding to its operator (Fig. 1). The mode of CopG binding to the DNA, which is singular among proteins of the RHH superfamily, throws some light on the mechanism used by this transcriptional repressor to dislodge RNAP stably bound to the promoter.

Plasmid-free or pMV158-containing pneumococcal strains underwent a process of adaptation to the laboratory culture conditions for 500 generations. The increase in fitness of the evolved strains relative to the parental strains was somewhat larger for the plasmid-containing bacteria. Irrespective of the presence or absence of the plasmid, the evolved strains show a lower tendency to form the characteristic pneumococcal cellular chains (Fig. 2). We are interested in analyzing the potential evolution of some traits related to the pathogenicity of this bacterium.