

## Alicia Bravo García

Científica Titular  
abravo@cib.csic.es



**PhD, 1988**  
Universidad Complutense de Madrid  
**Postdoctoral, 1988-1990**  
Max-Planck Institut für molekulare Genetik (Berlín)  
**Postdoctoral, 1991-1992**  
**Investigadora contratada, 1993-2005**  
Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Madrid  
**Investigadora Programa Ramón y Cajal 2005-2007**  
**Científica Titular, 2007**  
**Jefa de Grupo, 2012**  
CIB, CSIC

## Manuel Espinosa Padrón

Profesor Ad Honorem  
mespinosa@cib.csic.es



**Profesor de Investigación, 1990**  
**Profesor Ad Honorem, 2012**  
CIB, CSIC  
**Miembro de EMBO, 1996**  
**Evalúador EMBO, 2007-2010**  
Young Investigator Programme  
**Evalúador, 2008-2012**  
Long-Term Fellowships  
**Coordinador, 2008-2015**  
Proyecto CONSOLIDER INTERMODS  
**Coordinador, 2009-2011**  
Red Española REDEEX  
**Presidente Internacional, 2012-2014**  
Society of Plasmid Biology

### Otros miembros | Other lab members:

Wai Ting Chan  
Virtudes Solano Collado  
Cristina Fernández López

Sofía Ruiz Cruz  
Carolina Hierro Yap  
Verónica Navarro Martínez

<http://www.cib.csic.es/en/grupo.php?idgrupo=45>

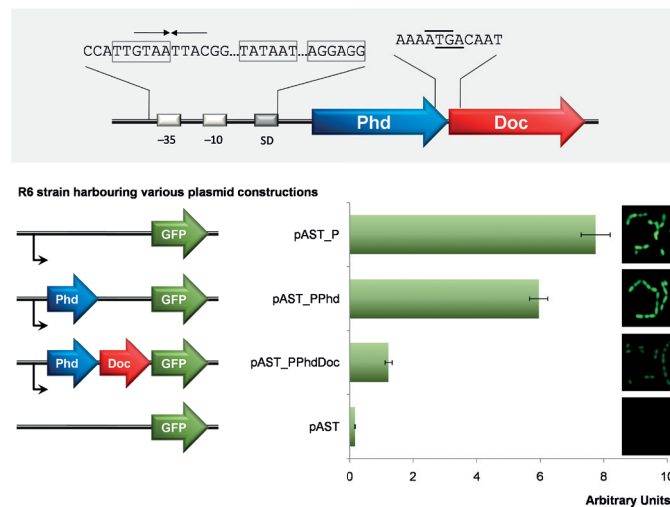
# Expresión Génica y Transferencia Genética en Bacterias

Trabajamos en la expresión global de genes de bacterias patógenas en condiciones de colonización de nuevos nichos o cuando están sometidas a estrés. También estudiamos transferencia genética horizontal en estas bacterias.

**1** Reguladores globales implicados en la virulencia de *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*. Estamos trabajando en la caracterización molecular de reguladores de la familia Mga/AtxA. Hemos purificado la proteína MgaSpn de *S. pneumoniae* y estudiado sus propiedades de unión a DNA. Utilizando DNA lineal de cadena doble, hemos observado que MgaSpn reconoce determinadas conformaciones del DNA en lugar de una secuencia específica. Tras unirse al sitio primario, MgaSpn genera complejos proteína-DNA multiméricos. Actualmente, nuestro principal objetivo es identificar los genes diana de los reguladores en estudio y analizar el papel de dichos reguladores en virulencia.

**2** Operones cromosómicos de Toxinas-Antitoxinas (TAS) de *S. pneumoniae*. Hemos clonado, secuenciado y caracterizado los genes de tres TAS, y descrito la existencia de posibles nuevos sistemas. Ensayos funcionales han demostrado que, además de los operones relBE2Spn, yefMyoeBSpn y pezAT, en el cromosoma del pneumococo existe un cuarto operón que codifica la antitoxina Phd y la toxina Doc. Se estudian los operones así como las características de unión de las proteínas que codifican a sus DNAs diana.

**3** Transferencia conjugativa del plásmido pMV158 mediada por la relaxasa de DNA, MobM. Hemos purificado MobM y dos derivados truncados: MobMN199 y MobMN243. Hemos analizado diversos parámetros biofísicos y estructurales de las tres proteínas. Hemos hallado un elemento genético integrativo y, quizás, movilizable en el cromosoma de un aislado clínico de *Streptococcus agalactiae*. Este elemento contiene un gen, mobSag, homólogo al gen mobM de pMV158, y que estudiamos actualmente.



**Figura 1 | Figure 1**

Organización y regulación del operón phd (antitoxina)-doc (toxina) de pneumococos. Se muestran: promotor, Shine-Dalgarno y repetición inversa (diana de Phd). La regulación transcripcional del operón se probó mediante fusiones en un plásmido que contiene el gen *gfp* sin promotor. Se observaron diversos niveles de GFP que demuestran que Doc es un eficiente co-represor de la transcripción del operón.

Organization and regulation of the pneumococcal phd (antitoxin)-doc (toxin) operon. Promoter, Shine-Dalgarno, and inverted repeat (target of Phd) are shown. Operon transcriptional regulation was tested by gene fusions using a promoterless *gfp*-harboring plasmid. Various levels of GFP were found, demonstrating that Doc is a co-repressor that effectively represses transcription of the operon.



# Bacterial Gene Expression and Gene Transfer

We work on global gene expression of pathogenic bacteria when they are under conditions of colonization of new niches or when they are subjected to stress. We also study horizontal gene transfer in our model bacteria.

**1** Global regulators involved in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*. We are working on the molecular characterization of regulators that are thought to be members of the Mga/AtxA family. We have purified the pneumococcal MgaSpn protein and studied its DNA binding properties. Using linear double-stranded DNA, we have found that MgaSpn recognizes particular DNA conformations rather than a specific nucleotide sequence. On binding to the primary site, MgaSpn generates multimeric protein-DNA complexes. At present, our main aim is to identify the target genes of the regulators under study and to analyse the role of such regulators in virulence.

**2** Chromosomally-encoded Toxin-Antitoxin (TA) operons from *S. pneumoniae*. We have cloned, sequenced and characterized the genes corresponding to three TA systems (TAs). We have reported the existence of new putative TAs. Functional assays have shown that, in addition to the relBE2Spn, yefMyoeBSpn, and pezAT operons, in the pneumococcal chromosome there is a fourth operon that encodes the Phd antitoxin and the Doc toxin. We are also studying the DNA binding features of the proteins and their interactions with their target DNAs.

**3** Conjugative transfer of plasmid pMV158. We have purified the relaxase MobM and two truncated derivatives: MobMN199 and MobMN243. We have studied several biophysical and structural parameters of the three proteins. We have detected the presence of an Integrative and Mobilizable Element (IME) in the chromosome of a clinical isolate of *Streptococcus agalactiae*. This IME harbours a gene, mobSag, which is a homolog of gene mobM from pMV158. At present we are studying the function of the MobMSag protein on the mobilization of the IME island.

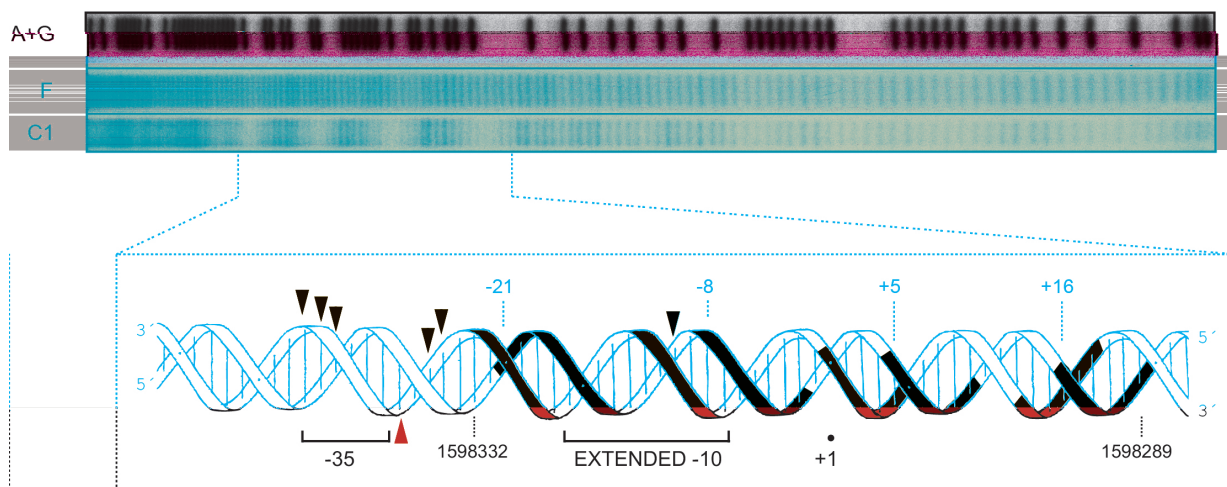
## Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

- Chan WT, Yeo CC, Sadowy E, Espinosa M [2014] *Functional validation of putative toxin-antitoxin genes from the Gram-positive pathogen Streptococcus pneumoniae: phd-doc is the fourth bona-fide operon.* *Front Microbiol* 5:677 (doi: 10.3389/fmicb.2014.00677).
- Hernández-Arriaga AM, Chan WT, Espinosa M, Díaz-Orejás R [2014] *Conditional activation of toxin-antitoxin systems: postsegregational killing and beyond.* *Microbiol Spectrum* 2(5): PLAS-0009-2013. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0009-2013.
- Fernández-López C, Bravo A, Ruiz-Cruz, S, Solano-Collado V, Garsin DA, Lorenzo-Díaz F, Espinosa M [2014] *Mobilizable rolling-circle replicating plasmids from Gram-positive bacteria: A low-cost conjugative transfer.* *Microbiol Spectrum.* 2 (5): PLAS-0008-2013. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0008-2013.
- Scheb-Wetzel M, Rohde M, Bravo A, Goldmann O [2014] *New insights into the antimicrobial effect of mast cells against Enterococcus faecalis.* *Infect. Immun.* 82: 4496-4507.
- Lorenzo-Díaz F, Fernández-López C, Garcillán-Barcia MP, Espinosa M [2014] *Bringing them together: plasmid pMV158 rolling circle replication and conjugation under an evolutionary perspective.* *Plasmid* 74: 15-31.
- Solano-Collado V, Lurz R, Espinosa M, Bravo A [2013] *The pneumococcal MgaSpn virulence transcriptional regulator generates multimeric complexes on linear double-stranded DNA.* *Nucleic Acids Res* 41: 6975-6991.
- Fernández-López C, Lorenzo-Díaz F, Pérez-Luque R, Rodríguez-González L, Boer R, Lurz R, Bravo A, Coll M, Espinosa M [2013] *Nicking activity of the pMV158 MobM relaxase on cognate and heterologous origins of transfer.* *Plasmid* 70: 120-130.
- Fernández-López C, Pluta R, Pérez-Luque R, Rodríguez-González L, Espinosa M, Coll M, Lorenzo-Díaz F, Boer R [2013] *Functional properties and structural requirements of the plasmid pMV158-encoded MobM relaxase domain.* *J. Bacteriol.* 195: 3000-3008.
- Espinosa M [2013] *Plasmids as models to study macromolecular interactions: the pMV158 paradigm.* *Res. Microbiol* 164: 199-204.
- Chan WT, Moreno-Córdoba I, Yeo CC, Espinosa M [2013] *TA loci in Streptococcus pneumoniae.* In: **K. Gerdes** (ed.): *Prokaryotic Toxin-Antitoxins.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 315-339. ISBN 978-3-642-33252-4 ISBN 978-3-642-33253-1 (eBook) DOI 10.1007/978-3-642-33253-1

## Financiación | Funding

- 2008-2015: CSD2008-00013 (INTERMODS) (MICINN-MINECO)
- 2010-2013: BFU2009-11868 (MICINN-MINECO)
- 2013-2015: PIE-201320E028 (CSIC)
- 2014-2016: BIO2013-49148-C2-2-R (MINECO)

## CODING



**Figura 2 | Figure 2**

El regulador MgaSpn de *S. pneumoniae* interacciona con una región del DNA (en rojo) que contiene el promotor de su propio gen (tratamiento de los complejos proteína-DNA con el radical hidroxilo). F: DNA, C1: complejos proteína-DNA.

The MgaSpn regulator of *S. pneumoniae* interacts with a DNA region (in red) that contains the promoter of its own gene (hydroxyl radical treatment of the protein-DNA complexes). F: DNA, C1: protein-DNA complexes.