





Universitat Autònoma de Barcelona

Acinetobacter baumannii

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Motilidad y virulencia en el patógeno nosocomial ***Acinetobacter baumannii***

María Pérez Varela

Tesis Doctoral

Septiembre, 2018

Directores: Dr. Jordi Barbé García y Dr. Jesús Aranda Rodríguez

Tutor: Dr. Jesús Aranda Rodríguez

Departament de Genètica i Microbiologia-Facultat de Biociències



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



Universitat Autònoma
de Barcelona

Memoria presentada por **María Pérez Varela** para optar al grado de Doctora en el Programa de Doctorado en Microbiología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

María Pérez Varela

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Jordi Barbé García y el Dr. Jesús Aranda Rodríguez.

Dr. Jordi Barbé García

Director

Dr. Jesús Aranda Rodríguez

Director y tutor

Bellaterra, Septiembre de 2018

En la vida no hay nada que temer, solamente hay que comprender

MARIE SKŁODOWSKA-CURIE

A mis padres y a mi hermano Gabriel

Resumen

Acinetobacter baumannii es un microorganismo causante de infecciones nosocomiales que, en los últimos años, se está convirtiendo en un serio problema de salud a nivel mundial. La aparición de cepas resistentes a prácticamente todos los agentes antimicrobianos de uso frecuente en clínica provoca que algunas infecciones sean prácticamente intratables. Junto a su enorme capacidad de desarrollar resistencias, *A. baumannii* también se caracteriza por ser capaz de desplazarse a través de superficies mediante un particular tipo de motilidad poco estudiado y exclusivo de este género que se conoce como *surface-associated motility*. El objetivo global de esta Tesis Doctoral es la identificación de genes implicados en este tipo de motilidad, así como el estudio de su relación con la patogenicidad de *A. baumannii*.

En este trabajo, se han aislado mutantes espontáneos resistentes a rifampicina con patrones de motilidad alterados y se ha estudiado su virulencia en el modelo de *Caenorhabditis elegans*. Además, mediante el análisis del perfil transcripcional de los mutantes y la cepa salvaje se han identificado 6 genes, ampliamente distribuidos entre cepas clínicas, cuya expresión disminuye en los mutantes que presentan una pérdida de motilidad. La construcción de mutantes y el posterior análisis fenotípico revelaron que la inactivación de 4 de estos genes provoca una reducción de la motilidad y de la virulencia en *A. baumannii*. Entre los productos de estos genes se encuentran las enzimas metabólicas aldeído deshidrogenasa (*AU097_RS16805*) y dihidroxiácido deshidratasa (*AU097_RS17045*), un posible componente de un transportador de taurina (*AU097_RS14730*) y un hipotético transportador de membrana de la superfamilia MFS (*AU097_RS17040*).

Por otro lado, se ha llevado a cabo la caracterización de la bomba de expulsión de tipo MFS codificada por el gen *AU097_RS17040* de *A. baumannii*. El análisis *in silico* del producto de este gen indicó que se trata de una proteína conformada por 12 hélices α -transmembrana y que sus dominios N- y C-terminal se encuentran ubicados en el citoplasma. En cuanto al estudio del patrón de resistencia del mutante de este gen se observó que este muestra una mayor sensibilidad a las quinolonas, a trimetoprim y a novobiocina, siendo el primer transportador MFS descrito en *A. baumannii* implicado en resistencia, motilidad y virulencia.

Con el objetivo de estudiar si bombas de expulsión pertenecientes a las otras 5 superfamilias participan en la motilidad y la virulencia de *A. baumannii*, en la última sección de este trabajo se estudió el efecto de la inactivación de genes que codifican permeasas de diferentes superfamilias de transportadores. Así pues, se ha demostrado que la permeasa de la bomba de expulsión RND codificada por el gen *A1S_2736*, la bomba de expulsión MATE codificada por el gen *A1S_3371* y la bomba de expulsión SMR codificada por el gen *A1S_0710* están implicadas en *surface-associated motility* y virulencia. Además, en este trabajo también se han identificado dos nuevas permeasas que forman parte de bombas de expulsión de tipo ABC, codificadas por los genes *A1S_1242* y *A1S_2622*, que también están implicadas en ambos fenómenos. Sin embargo, no se observaron cambios ni en la motilidad ni en la virulencia de *A. baumannii* tras la inactivación de los genes *A1S_0027*, *A1S_0536*, *A1S_1057* y *A1S_1535*, que codifican permeasas de bombas de expulsión de tipo ABC, ni la de los genes *A1S_1503* y *A1S_2063*, que codifican transportadores PACE.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que la inactivación de ciertas enzimas metabólicas y bombas de expulsión provoca una reducción de la motilidad y de la virulencia en *A. baumannii*. De esta forma, se relaciona claramente por primera vez una abolición de la motilidad de tipo *surface-associated motility* con una atenuación de la virulencia en este patógeno nosocomial. Además, los datos obtenidos en este trabajo abren nuevos frentes en el estudio de nuevos mecanismos de resistencia en este microorganismo.

Resum

Acinetobacter baumannii és un microorganisme causant d'infeccions nosocomials que, en els últims anys, s'està convertint en un seriós problema de salut a nivell mundial. L'aparició de soques resistents a pràcticament tots els agents antimicrobians d'ús freqüent en clínica provoca que algunes infeccions siguin pràcticament intractables. Juntament amb la seva enorme capacitat de desenvolupar resistències, *A. baumannii* també es caracteritza per ser capaç de desplaçar-se a través de superfícies mitjançant un particular tipus de motilitat poc estudiat i exclusiu d'aquest gènere que es coneix com *surface-associated motility*. L'objectiu global d'aquesta Tesi Doctoral és la identificació de gens implicats en aquest tipus de motilitat, així com l'estudi de la seva relació amb la patogenicitat d'*A. baumannii*.

En aquest treball, s'han aïllat mutants espontanis resistents a rifampicina amb patrons de motilitat alterats i s'ha estudiat la seva virulència en el model de *Caenorhabditis elegans*. A més, mitjançant l'anàlisi del perfil transcripcional entre aquests mutants i la soca salvatge s'han identificat 6 gens, àmpliament distribuïts entre soques clíniques, l'expressió dels quals disminueix en els mutants que presenten una pèrdua de motilitat. La construcció de mutants i el posterior anàlisi fenotípic van revelar que la inactivació de 4 d'aquests gens provoca una reducció de la motilitat i de la virulència en *A. baumannii*. Entre els productes d'aquests gens es troben els enzims metabòlics aldehyd deshidrogenasa (*AU097_RS16805*) i dihidroxiàcid deshidratasa (*AU097_RS17045*), un possible component d'un transportador de taurina (*AU097_RS14730*) i un hipotètic transportador de membrana de la superfamília MFS (*AU097_RS17040*).

D'altra banda, s'ha dut a terme la caracterització de la bomba d'expulsió de tipus MFS codificada pel gen *AU097_RS17040* d'*A. baumannii*. L'anàlisi *in silico* del producte d'aquest gen va indicar que es tracta d'una proteïna conformada per 12 hèlixs α -transmembrana i que els seus dominis N- i C-terminal es troben ubicats en el citoplasma. En quant a l'estudi del patró de resistència del mutant d'aquest gen es va observar que aquest mostra una major sensibilitat a les quinolones, al trimetoprim i a la novobiocina, sent el primer transportador MFS descrit a *A. baumannii* implicat en resistència, motilitat i virulència.

Amb l'objectiu d'estudiar si bombes d'expulsió pertanyents a les altres 5 superfamílies participen en la motilitat i la virulència d'*A. baumannii*, en l'última secció d'aquest treball es va estudiar l'efecte de la inactivació de gens que codifiquen permeasas de diferents superfamílies de transportadors. Així doncs, s'ha demostrat que la permeasa de la bomba d'expulsió RND codificada pel gen *A1S_2736*, la bomba d'expulsió MATE codificada pel gen *A1S_3371* i la bomba d'expulsió SMR codificada pel gen *A1S_0710* estan implicades en *surface-associated motility* i virulència. A més, en aquest treball també s'han identificat dues noves permeasas que formen part de bombes d'expulsió de tipus ABC, codificades pels gens *A1S_1242* i *A1S_2622*, que també estan implicades en els dos fenòmens. No obstant això, ni la inactivació dels gens *A1S_0027*, *A1S_0536*, *A1S_1057* i *A1S_1535*, que codifiquen permeasas de bombes d'expulsió de tipe ABC, ni la dels gens *A1S_1503* i *A1S_2063*, que codifiquen transportadors PACE, van provocar canvis en la motilitat i la virulència d'*A. baumannii*.

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi Doctoral posen de manifest que la inactivació de certs enzims metabòlics i bombes d'expulsió provoca una reducció de la motilitat i de la virulència en *A. baumannii*. D'aquesta manera, es relaciona clarament per primera vegada una abolició de la motilitat de tipus *surface-associated motility* amb una atenuació de la virulència en aquest patògen nosocomial. A més, les dades obtingudes en aquest treball obren nous fronts en l'estudi de nous mecanismes de resistència en aquest microorganisme.

Abstract

Acinetobacter baumannii is a microorganism that causes nosocomial infections and, in recent years, it is becoming a serious health problem worldwide. The emergence of strains resistant to practically all the antimicrobial agents frequently used in the clinic environment turns some infections practically untreatable. With its enormous ability to develop resistances, *A. baumannii* is also characterized by being able to move through surfaces through a particular little known sort of motility exclusive to this genre, which is known as surface-associated motility. The overall objective of this Doctoral Thesis is the identification of genes involved in this kind of motility, and the study of its relationship with the pathogenicity of *A. baumannii*.

In this work, rifampin-resistant spontaneous mutants presenting altered motility patterns have been isolated and their virulence has been studied in the *Caenorhabditis elegans* model. In addition, through the analysis of the transcriptional profile between these mutants and the wild-type strain, 6 genes were identified, widely distributed among clinical strains, and whose expression was found decreased in the nonmotile mutants. The construction of mutants by gene disruption and the subsequent analysis of their motility and virulence revealed that the inactivation of 4 of these genes causes a reduction in motility and virulence in *A. baumannii*. The products of these genes include the metabolic enzymes aldehyde dehydrogenase (*AU097_RS16805*) and dihydroxy acid dehydratase (*AU097_RS17045*), a possible component of a taurine transporter (*AU097_RS14730*) and a hypothetical membrane transporter of the MFS superfamily (*AU097_RS17040*).

On the other hand, characterization of the efflux pump of the MFS superfamily encoded by the gene *AU097_RS17040* of *A. baumannii* was carried out. The *in silico* analysis of the product of this gene indicated that it is a protein composed of 12 transmembrane α helices and that its N- and C-terminal domains are located in the cytoplasm. Regarding the study of the resistance profile of the mutant of this gene, it was observed that this mutant shows a greater susceptibility to quinolones, trimethoprim and novobiocin, being the first MFS transporter described in *A. baumannii* involved in resistance, motility and virulence.

In order to study whether expulsion pumps belonging to the other 5 superfamilies participate in the motility and virulence of *A. baumannii*, in the last section of this work the

effect of inactivation of genes that encode permeases from different superfamilies of transporters was studied. Thus, it has been shown that the permease of the RND efflux pump encoded by the *A1S_2736* gene, the MATE efflux pump encoded by the *A1S_3371* gene and the SMR efflux pump encoded by the *A1S_0710* gene are involved in surface-associated motility and virulence. In addition, in this work we have also identified two new permeases belonging to ABC efflux pumps, encoded by the genes *A1S_1242* and *A1S_2622*, which are also involved in both phenomena. However, neither the inactivation of the genes *A1S_0027*, *A1S_0536*, *A1S_1057* and *A1S_1535*, which encode permeases of ABC-type efflux pumps, nor that of the genes *A1S_1503* and *A1S_2063*, which encode PACE transporters, resulted in changes in surface-associated motility nor in virulence.

The results obtained in this Doctoral Thesis show that the inactivation of certain metabolic enzymes and efflux pumps causes a reduction in motility and virulence in *A. baumannii*. In this way, an abolition of surface-associated motility with an attenuation of virulence in this nosocomial pathogen is clearly related for the first time. In addition, the data obtained in this work open new fronts in the study of new mechanisms of resistance in this microorganism.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia y taxonomía del género <i>Acinetobacter</i>	3
1.2. Características del género <i>Acinetobacter</i>	7
1.3. Importancia clínica del género <i>Acinetobacter</i>	8
1.4. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en <i>A. baumannii</i>	11
1.4.1. Modificación enzimática del antimicrobiano	12
1.4.1.1. β -lactamasas	12
1.4.1.1.1. β -lactamasas de clase A	13
1.4.1.1.2. β -lactamasas de clase B.....	13
1.4.1.1.3. β -lactamasas de clase C.....	14
1.4.1.1.4. β -lactamasas de clase D	15
1.4.1.2. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	16
1.4.2. Transportadores de membrana.....	17
1.4.2.1. Porinas	18
1.4.2.2. Bombas de expulsión.....	18
1.4.2.2.1. Superfamilia de transportadores RND	20
1.4.2.2.2. Superfamilia de transportadores MFS	21
1.4.2.2.3. Superfamilia de transportadores MATE.....	23
1.4.2.2.4. Superfamilia de transportadores SMR.....	24
1.4.2.2.5. Superfamilia de transportadores PACE.....	25
1.4.2.2.6. Superfamilia de transportadores ABC.....	25
1.4.3. Alteraciones del sitio de acción	28
1.5. Factores de virulencia y patogenicidad en <i>A. baumannii</i>	29
1.5.1. Proteínas implicadas en la captación de hierro.....	30
1.5.2. Fosfolipasas	31

1.5.3. Porinas	32
1.5.4. Lipopolisacárido y polisacáridos capsulares	33
1.5.5. Vesículas de membrana externa	34
1.5.6. Sistemas de secreción	35
1.5.7. Proteínas implicadas en la formación de <i>biofilm</i> y la adherencia.....	36
1.5.7.1. Operón <i>CsuA/BABCDE</i>	38
1.5.7.2. Proteína Bap (<i>Biofilm-associated protein</i>)	39
1.5.7.3. <i>Quorum sensing</i>	39
1.5.8. Estructuras y proteínas implicadas en la resistencia a la desecación	41
1.6. Motilidad.....	42
1.6.1. Clasificación de la motilidad bacteriana	44
1.6.1.1. <i>Swarming</i>	44
1.6.1.2. <i>Swimming</i>	44
1.6.1.3. <i>Twitching</i>	45
1.6.1.4. <i>Gliding</i>	48
1.6.1.5. <i>Sliding</i>	48
1.6.2. Motilidad en <i>A. baumannii</i>	49
2. OBJETIVOS.....	55
3. RESULTADOS	59
3.1. Estudio del patrón de motilidad y virulencia de mutantes espontáneos de <i>A. baumannii</i> resistentes a rifampicina y análisis de su perfil transcripcional	63
3.2. Caracterización funcional de la bomba de expulsión de tipo MFS <i>AbaQ</i> , codificada por el gen <i>AU097_RS17040</i> de <i>A. baumannii</i>	83
3.3. Evaluación del papel de múltiples transportadores pertenecientes a las diferentes superfamilias de bombas de expulsión en la motilidad y la virulencia de <i>A. baumannii</i>	91
4. DISCUSIÓN	129

4.1. Aislamiento y caracterización de mutantes espontáneos de <i>A. baumannii</i> resistentes a rifampicina que presentan un patrón de motilidad alterado.....	132
4.2. Estudio de la virulencia de los mutantes espontáneos de <i>A. baumannii</i> resistentes a rifampicina con un patrón de motilidad alterada	136
4.3. Identificación de nuevos genes implicados en la motilidad y la virulencia en <i>A. baumannii</i> mediante el análisis del perfil transcripcional de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina con motilidad alterada.....	138
4.4. Caracterización funcional de la bomba de expulsión de tipo MFS AbaQ, codificada por el gen <i>AU097_RS17040</i> de <i>A. baumannii</i>	143
4.5. Evaluación del papel de múltiples transportadores pertenecientes a las diferentes superfamilias de bombas de expulsión en la motilidad y la virulencia de <i>A. baumannii</i>	146
5. CONCLUSIONES	155
6. ANEXOS.....	159
6.1. <i>Novobiocin inhibits the antimicrobial resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis in Acinetobacter baumannii</i>	161
7. REFERENCIAS	165
8. AGRADECIMIENTOS.....	199

Índice de figuras

Figura 1.1. Imagen de células de <i>A. baumannii</i> obtenida mediante microscopía electrónica de barrido.....	7
Figura 1.2. Representación esquemática de las 6 superfamilias de transportadores de membrana según sus características estructurales.....	19
Figura 1.3. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia RND.....	20
Figura 1.4. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia MFS DHA-1	22
Figura 1.5. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia MATE	23
Figura 1.6. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia SMR	24
Figura 1.7. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia PACE	25
Figura 1.8. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia ABC	26
Figura 1.9. Representación esquemática de la estructura del lipopolisacárido	33
Figura 1.10. Representación esquemática de los sistemas de secreción de <i>A. baumannii</i>	35
Figura 1.11. Representación de las etapas de formación de un <i>biofilm</i>	37
Figura 1.12. Representación esquemática de los tipos de motilidad bacteriana	43
Figura 1.13. Estructura del <i>pilus</i> de tipo IV	46
Figura 1.14. Representación esquemática de la hipotética ruta de quimiotaxis de <i>P. aeruginosa</i>	47
Figura 1.15. Patrones de motilidad de la cepa <i>A. baumannii</i> M2 en placas con agar Difco (4.A.) o con agar Eiken (4.B.) a distintos porcentajes	53

Índice de tablas

Tabla 1.1. Especies genómicas reconocidas en el género <i>Acinetobacter</i>	5
Tabla 1.2. Principales bombas de expulsión en <i>A. baumannii</i>	27
Tabla 1.3. Características generales de los tipos de motilidad	43

1 INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Historia y taxonomía del género *Acinetobacter*

Las enfermedades infecciosas constituyeron una de las principales causas de mortalidad durante los últimos siglos. Por ello, el descubrimiento y posterior desarrollo de agentes antimicrobianos representó un factor clave reduciendo las tasas de mortalidad. Sin embargo, paralelamente a estos avances, las bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar o impedir la acción de los antimicrobianos. Es por ello, que en las últimas décadas se ha incrementado la aparición de cepas multirresistentes. Entre los géneros bacterianos que destacan por su gran capacidad de adaptarse y desarrollar resistencias a antimicrobianos se encuentra *Acinetobacter*. Pese a que los miembros de este grupo han sido considerados durante décadas como bacterias inocuas, en los últimos años han emergido numerosas cepas multirresistentes y con una gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales.

El género *Acinetobacter* se caracteriza por una historia taxonómica repleta de cambios constantes, lo cual ha impedido comprender en profundidad sus propiedades biológicas, así como su importancia clínica. El hecho de que *Acinetobacter* sea una bacteria que se ha aislado simultáneamente en diferentes ambientes ha dificultado su clasificación taxonómica, y a que este microorganismo haya sido denominado de distintas maneras llevando esto a una gran confusión.

La primera descripción del género *Acinetobacter* fue realizada en 1911 por Beijerinck, quien aisló un microorganismo del suelo capaz de crecer en un medio mínimo con acetato de calcio al que denominó *Micrococcus calcoaceticus* (Beijerinck, 1911). Desde ese momento se fueron descubriendo microorganismos similares que se fueron asignando al menos a 15 géneros y especies diferentes. Brisou y Prévot fueron los primeros en utilizar el término *Acinetobacter* en 1954 para distinguir los microorganismos del género *Achromobacter* que presentan motilidad de los que no (Brisou y Prevot 1954). Este género estaba compuesto por una colección heterogénea de bacterias gram negativas saprófitas no pigmentadas tanto oxidasa positivas como negativas. En 1968, Baumann y colaboradores demostraron mediante diversas pruebas nutricionales y bioquímicas que estas cepas podían separarse en un grupo distinto de las *Moraxella* oxidasa positivas (Baumann *et al.*, 1968). Pese a esto, no resultaba sencillo distinguir entre especies diferentes basándose en características fisiológicas. Fue en 1971 cuando el género *Acinetobacter* se incluyó en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey,

Introducción

encontrándose solamente *Acinetobacter calcoaceticus* como especie tipo y *Acinetobacter anitratus* y *Acinetobacter lwoffii* como las dos únicas subespecies (Lautrop, 1974).

Durante los años posteriores, continuó resultando complicado discernir mediante pruebas bioquímicas entre las diferentes especies del género, por ello, a finales de la década de 1980 se propuso el uso de la técnica de hibridación del DNA para la identificación de especies genómicas. Una especie genómica debe incluir cepas con un porcentaje de hibridación DNA-DNA del 70% o más y una estabilidad térmica de hibridación de los dos DNAs de 5°C o menor. Además, únicamente las especies genómicas que pueden ser diferenciadas mediante características fenotípicas reciben un nombre formalizado. Bouvet y Grimont propusieron en 1986 una nueva clasificación del género basada en estas técnicas de hibridación DNA-DNA, describiendo 12 genoespecies de *Acinetobacter* diferentes entre las que se encuentran las actuales *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, y *A. lwoffii* (Bouvet y Grimont, 1986). De esta forma, se adoptó la definición de especies genómicas para clasificar a los miembros de este género. Esta clasificación se completó con los trabajos de Bouvet y Jeanjean y de Tjernberg y Ursing resultando en la descripción de genoespecies adicionales (Bouvet y Jeanjean 1989; Tjernberg y Ursing 1989). Es necesario puntualizar que, con el fin de evitar confusiones, se añaden los sufijos BJ (Bouvet-Jeanjean) o TU (Tjernberg-Ursing) para definir a las especies genómicas establecidas en cada uno de los dos estudios. Recientemente, se han identificado 10 nuevas especies de *Acinetobacter* entre las que se encuentran las especies de origen humano *A. parvus*, *A. schindleri* y *A. ursingii*; y 7 especies aisladas de plantas de aguas residuales denominadas *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernhergiae*, *A. townneri*, *A. tandooi* y *A. gernerii* (Nemec *et al.*, 2001, 2003; Carr *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto, las especies reconocidas actualmente dentro del género *Acinetobacter* se muestran recogidas en la Tabla 1.1.

Hoy en día, pese a que *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis* están emergiendo como patógenos nosocomiales relevantes, *A. baumannii* es la especie con mayor importancia clínica dentro de este género (Peleg *et al.*, 2008). Estas 3 especies, junto con *A. calcoaceticus*, se engloban dentro del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* ya que se encuentran tan estrechamente relacionadas que resulta complicado distinguirlas mediante características fenotípicas (Gerner-Smidt *et al.*, 1991). Sin embargo, en el ámbito clínico su uso no es muy extendido ya que se incluyen las 3 especies clínicas más importantes junto a la especie ambiental *A. calcoaceticus*.

Tabla 1.1. Especies genómicas reconocidas en el género *Acinetobacter*. Tabla modificada de Peleg *et al.* (2008).

Nombre de la especie genómica	Número de la especie genómica	Cepa tipo o de referencia
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	ATCC 23055
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	ATCC 19606 ^{T (1)}
	3	ATCC 19004
	13 TU	ATCC 17903
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	4	ATCC 17906
<i>Acinetobacter junii</i>	5	ATCC 17908
	6	ATCC 17979
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	7	ATCC 17909
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	8	ATCC 15309
	9	ATCC 9957
	10	ATCC 17924
	11	ATCC 11171
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	12	IAM 13186
	13 BJ	ATCC 17905
	14	Bouvet 382
	15 BJ	Bouvet 240
	15 TU	M 151 ^a
	16	ATCC 17988
	17	Bouvet 942
<i>Acinetobacter baylyi</i>		DSM 14961 ^T
<i>Acinetobacter bouvetii</i>		DSM 14964 ^T
<i>Acinetobacter gerneri</i>		DSM 14967 ^T
<i>Acinetobacter grimontii</i>		DSM 14968 ^T
<i>Acinetobacter parvus</i>		NIPH384 ^T
<i>Acinetobacter schindleri</i>		NIPH1034 ^T
<i>Acinetobacter tandoii</i>		DSM 14970 ^T
<i>Acinetobacter tjenbergiae</i>		DSM 14971 ^T
<i>Acinetobacter towneri</i>		DSM 14962 ^T
<i>Acinetobacter ursingii</i>		NIPH137 ^T

(1) El superíndice ^T hace referencia a que se trata de una cepa tipo.

Introducción

Teniendo en cuenta su origen, epidemiología y perfil de resistencias a antimicrobianos se distinguen 3 grandes poblaciones dentro del género *Acinetobacter*. El primer grupo está constituido por cepas aisladas en hospitales y que son capaces de colonizar e infectar a pacientes hospitalizados. Dentro de este grupo se encuentran miembros de la especie *A. baumannii* destacando muchos de ellos por su resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, pese a ser sensibles a la mayoría de antimicrobianos, también forman parte de este primer grupo las cepas ATCC 17978, aislada de un caso de meningitis fatal, y la cepa tipo ATCC 19606, aislada de un paciente con infección de orina (Piechaud y Second, 1951; Hugh y Reese, 1967). La cepa ATCC 17978 es una de las más estudiadas debido a que fue la primera de *A. baumannii* cuyo genoma fue completamente secuenciado (Smith *et al.*, 2007). A la segunda población pertenecen cepas que forman parte de la microbiota de la piel humana y de otros animales, y también aisladas de restos de alimentos. Se encuentran aquí las especies *A. johnsonii*, *A. lwoffii* y *A. radioresistens*. El último grupo comprende cepas sensibles a antimicrobianos aisladas del suelo y fuentes ambientales como *A. calcoaceticus* y *A. johnsonii* (Towner, 2009).

En cuanto a la identificación de los miembros del género *Acinetobacter*, esta se lleva a cabo empleando tanto pruebas fenotípicas, que serán comentadas en el siguiente apartado, como técnicas moleculares. Un método usado frecuentemente para identificar a nivel de género estas especies es el ensayo de transformación de Juni (Juni, 1972). Esta prueba consiste en la habilidad del mutante auxótrofo del triptófano *trpE27* de la cepa BD413 de *A. baylyi* de ser transformado con el DNA de alguna de las especies de *Acinetobacter* y que este revierta al fenotipo salvaje. Además, es común el uso de técnicas moleculares para la identificación a nivel de especie como la restricción del DNA ribosómico 16S amplificado (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, ARDRA), el ribotipado, la secuenciación del gen *rpoB* o el *fingerprinting* por polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (Gerner-Smidt, 1992; Claeys *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1997; Khosravi *et al.*, 2015).

En la actualidad, el género *Acinetobacter* se incluye en el dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Moraxellaceae*, en la que también se incluyen los géneros *Moraxella* y *Psychrobacter* (Rossau *et al.*, 1991).

1.2. Características del género *Acinetobacter*

Los miembros del género *Acinetobacter* son pequeños bacilos gram negativos con un tamaño de 1 a 1,5 por 1,5 a 2,5 μm en la fase de crecimiento exponencial pero que, normalmente, adoptan una forma más cocoide en la fase estacionaria (Figura 1.1) (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996). Pese a que presenta la típica pared celular de las bacterias gram negativas, en muchas ocasiones se confunden con gram positivos debido a que las células se decoloran de manera distinta debido a su resistencia a la decoloración con etanol. Por ello, se dice que la variabilidad en la tinción de Gram es elevada, encontrándose células muy teñidas tras el tratamiento con etanol y otras que han sido completamente descoloridas (Baumann *et al.*, 1968). Además, el hecho de que en cultivos puros se distribuyan en pares o formando cadenas de longitud variable hace que su identificación sea más complicada. Las especies del género *Acinetobacter* en medio sólido normalmente forman colonias con borde circular, a veces mucosas, de coloración amarilla pálida a gris-blanquecina pese a que algunas especies ambientales producen un pigmento marrón (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996).

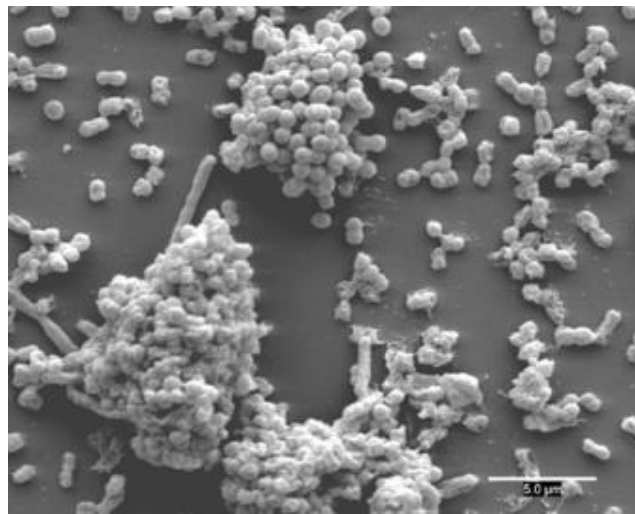


Figura 1.1. Imagen de células de *A. baumannii* obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Imagen obtenida de Roca *et al.*, (2012).

Los miembros de este género presentan un amplio rango de temperaturas de crecimiento, siendo su temperatura óptima de 30-37°C, aunque algunos aislados clínicos pueden llegar a crecer a 42°C. Se trata de microorganismos que en un primer momento se englobaron dentro de este género por carecer de motilidad. Sin embargo, actualmente se sabe que son capaces de desplazarse por medios semisólidos pese a no poseer flagelos (Bergogne-

Introducción

Bérézin y Towner, 1996). El genoma de los miembros del género *Acinetobacter* presenta en su DNA un contenido en G+C de 39-47% (Rossau *et al.*, 1991).

En cuanto a sus características bioquímicas, las especies de este género son aerobias estrictas, no fermentadoras, oxidasa e indol negativas, catalasa positivas e incapaces de reducir nitritos. El test de la oxidasa permite diferenciar a las bacterias del género *Acinetobacter* de otras bacterias no fermentadoras (Baumann *et al.*, 1968). Asimismo, la mayoría de especies pertenecientes a este género pueden crecer en medios minerales simples con sales de amonio o nitratos y una única fuente de energía y carbono (Warskow y Juni, 1972).

El aislamiento en el laboratorio se realiza en medios estándar como *Trypticase Soy Agar* (TSA) o *Brain Heart Infusion* (BHI) agar. Por otro lado, para el aislamiento de especies clínicas, se emplean medios selectivos y diferenciales como el agar MacConkey aunque es preferible emplear medios específicos para este género. Herellea agar es un medio selectivo comercializado por Difco que contiene varios antimicrobianos y es recomendado para aislar *Acinetobacter*, también se encuentra el medio Leeds *Acinetobacter*, que resulta útil para la mayoría de especies tanto clínicas como ambientales (Jawad *et al.*, 1994).

1.3. Importancia clínica del género *Acinetobacter*

Acinetobacter emergió como un patógeno nosocomial a finales de la década de 1970 y desde entonces ha ido aumentando gradualmente su relevancia como patógeno, principalmente, aunque no exclusivamente, dentro del ámbito hospitalario (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996). Pese a que también se han encontrado casos de infecciones causadas por *A. pittii* y *A. nosocomialis*, la mayor parte de los aislados clínicos pertenecen a la especie *A. baumannii* (Visca *et al.*, 2011).

En la actualidad, esta especie se está convirtiendo en una causa habitual de múltiples brotes hospitalarios destacando por la aparición, cada vez más frecuente, de aislados multirresistentes a antimicrobianos. Estas cepas multirresistentes se han aislado en hospitales de distintas áreas geográficas y afectan, generalmente, a individuos con graves enfermedades subyacentes. Los mayores afectados por esta infección son pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCIs), especialmente aquellos asistidos mediante ventilación mecánica, y pacientes de las unidades de quemados (Towner, 2009). Además, alarmantemente, la diseminación de estas resistencias entre regiones con elevadas tasas de infecciones causadas

por bacterias resistentes a otras regiones con tasas más bajas, se está convirtiendo en un preocupante problema de salud a nivel mundial (Visca *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2012). Por este motivo, recientemente, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (*Infectious Diseases Society of America*, IDSA), ha destacado a *A. baumannii* como uno de los 6 microorganismos más peligrosos formando parte del grupo de los patógenos conocidos como ESKAPE en el que se encuentran: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Boucher *et al.*, 2009).

La importancia de las infecciones causadas por *A. baumannii* radica en su difícil control y tratamiento. Esto es debido a la alta adaptabilidad de este patógeno a las condiciones ambientales, pudiendo crecer a distintos rangos de temperatura y pH, y a su enorme capacidad de adquirir resistencias a antimicrobianos, como ya se ha mencionado anteriormente (Seifert *et al.*, 1993; Peleg *et al.*, 2008; Pendleton *et al.*, 2013). Junto a ello, existen una serie de factores de riesgo que predisponen al paciente a ser infectado por esta bacteria. Por un lado, se encuentran factores del propio paciente como cirugía mayor, heridas importantes destacando quemaduras o la presencia de enfermedades de base. Por otra parte, un ingreso en la UCI, un largo período de hospitalización o el contacto con material médico contaminado son factores de riesgo relacionados con la exposición. Además, también tienen un papel clave los factores de riesgo relacionados con el tratamiento médico como la ventilación mecánica, la presencia de dispositivos invasivos como catéteres, el número de procedimientos invasivos y el previo uso de antimicrobianos (García-Garmendia *et al.*, 2001).

En cuanto a la transmisión de la infección por *A. baumannii*, ocurre en la mayoría de los casos a través del contacto, aunque puede propagarse mediante el aire a través de aerosoles. Puede ser debida bien a un contacto directo vía persona-persona, incluyendo la transmisión a través de las manos del personal hospitalario, pacientes o visitantes, o bien a un contacto indirecto a través de superficies o material contaminado. Por ello, en el control de los brotes tiene un papel clave la identificación del origen de la contaminación, el aislamiento de pacientes colonizados y el cumplimiento de las normas de higiene universales por parte del personal sanitario (Dijkshoorn *et al.*, 2007a; Wieland *et al.*, 2018).

La infección por *A. baumannii* presenta varias manifestaciones clínicas siendo la más común la neumonía, seguida de la bacteremia e infecciones de heridas y quemaduras, y menos frecuentemente infecciones del tracto urinario y meningitis (Howard *et al.*, 2012; McConnell *et al.*, 2013).

Introducción

Actualmente, la neumonía adquirida en el hospital es la infección más importante causada por *A. baumannii*, especialmente la neumonía asociada a la ventilación mecánica (*Ventilator-Associated Pneumonia*, VAP). Los pacientes ingresados en la UCI y con necesidad de ventilación mecánica conforman el grupo de mayor riesgo para el desarrollo de esta infección. Su incidencia se ve favorecida, como ya se ha comentado anteriormente, por el uso previo de antimicrobianos y de equipos de ventilación mecánica. Asimismo, la persistencia de *A. baumannii* en el material hospitalario o en las manos de los trabajadores, junto con su presencia en estos equipos, facilitan la diseminación de la infección dentro del hospital (Dijkshoorn *et al.*, 2007b; Howard *et al.*, 2012; Luna y Aruj, 2007). Varios estudios han indicado que *A. baumannii* es la causa de entre el 3-5% de las neumonías nosocomiales, aumentando estos porcentajes en las neumonías asociadas a ventilación mecánica padecidas por pacientes ingresados en la UCI (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996).

Recientemente, se han constatado casos de neumonía adquirida en la comunidad ocasionada por *A. baumannii* en regiones tropicales de Australia y Asia. Estas infecciones han sido asociadas con factores subyacentes como el tabaquismo o el alcoholismo y presentan elevadas tasas de mortalidad. Sin embargo, resulta complicado discernir si esto es debido a la situación previa del paciente o a los factores de virulencia de la bacteria (Chen, 2001; Anstey *et al.*, 2002).

La bacteremia causada por este patógeno es otra de las infecciones más frecuentes y cursan mayoritariamente en pacientes ingresados en la UCI. Los orígenes más comunes son la neumonía e infecciones de catéteres intravenosos, y en menor medida las infecciones del tracto urinario y las heridas. Las bacteremias causadas por *A. baumannii* se relacionan con una elevada tasa de mortalidad en la UCI, únicamente superada por las ocasionadas por *P. aeruginosa* y *Candida spp.* (Seifert *et al.*, 1995; Cisneros y Rodríguez-Baño, 2002; Peleg *et al.*, 2008).

Las infecciones causadas por *A. baumannii* en heridas y quemaduras son menos frecuentes en las unidades de quemados, pero destacan en el ambiente militar. En los últimos años, *A. baumannii* ha sido el microorganismo más frecuentemente aislado en infecciones de este tipo en heridos de guerra en Irak y Afganistán. El tratamiento de estas infecciones resulta muy complejo debido a las multirresistencias que presentan y a la mala penetración de los antimicrobianos en las zonas quemadas (Petersen *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007).

La infección del sistema nervioso central que produce con mayor frecuencia *A. baumannii* es la meningitis. Los casos de meningitis ocasionados por este microorganismo ocurren en

pacientes que se recuperan de neurocirugías y, normalmente, se tratan de infecciones producidas por varias especies gram negativas (Briggs *et al.*, 2004; Metan *et al.*, 2007).

En cuanto al tratamiento de las infecciones causadas por *A. baumannii*, en los últimos años la aparición de cepas multirresistentes provoca que el rango de antimicrobianos efectivos sea reducido. Hoy en día, los antimicrobianos que presentan mayor actividad frente a *A. baumannii* son las carbapenemas que, normalmente, se administran conjuntamente con sulbactam, un inhibidor de β -lactamasas que permite que el betalactámico no sea degradado (Peleg *et al.*, 2008). Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a estos compuestos ha obligado al uso de otros antimicrobianos alternativos como la colistina o la tigeciclina. La colistina es una polimixina que, pese a que a finales del siglo XX cayó en desuso debido a su nefrotoxicidad, actualmente se ha retomado su uso clínico debido al surgimiento de cepas multirresistentes (Plachouras *et al.*, 2007). En cuanto a la tigeciclina, se trata de una tetraciclina derivada de la minociclina, que ha mostrado efectos positivos contra la infección producida por *A. baumannii* y que presenta un efecto sinérgico con otros antimicrobianos (Mutlu *et al.*, 2012).

1.4. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *A. baumannii*

El desarrollo de los antimicrobianos está considerado como uno de los grandes avances de la medicina moderna ya que permite el tratamiento efectivo de pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad o asociadas a hospitales. Sin embargo, y desde su descubrimiento, estos han ido perdiendo eficacia debido a la aparición y diseminación de resistencias a antimicrobianos entre patógenos. Es por ello que en los últimos años han surgido los términos *multidrug-resistant* (MDR), *extensively drug-resistant* (XDR) y *pandrug-resistant* (PDR) para referirse a cepas bacterianas con distintos patrones de resistencia. La falta de consenso en estas definiciones, hecho que dificultaba la comparación de datos entre distintos brotes y la realización de estudios epidemiológicos, generaron la necesidad de crear una nomenclatura común. Por ello, en 2011 un comité de expertos creó una terminología estandarizada para describir los patrones de resistencia adquirida en *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Para cada grupo de microorganismos se definieron categorías de agentes antimicrobianos que testar basándose en los antimicrobianos empleados y probados normalmente en los laboratorios clínicos y de referencia como el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) o el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). El perfil de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de distintos grupos

Introducción

permite clasificarlos en bacterias MDR, XDR o PDR. De esta forma, se entiende por MDR aquel microorganismo que es resistente al menos a un agente en tres o más categorías. Una bacteria XDR es aquella que presenta resistencia a, como mínimo, un agente en todas las categorías, pero no a todos. Por último, se dice que un microorganismo es PDR cuando es resistente a todos los agentes antimicrobianos de todas las categorías (Magiorakos *et al.*, 2012).

En el caso de *A. baumannii* es frecuente encontrar brotes de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos destacando aquellas resistentes a carbapenemas conocidas con las siglas CRAB (*Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii*) (Pogue *et al.*, 2013). Como ya se ha comentado anteriormente, este patógeno posee una gran capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que le permite persistir en el ambiente hospitalario, convirtiéndose en una de las bacterias nosocomiales más exitosas.

En general, el desarrollo de resistencias puede ser debido a la adquisición de nueva información genética mediante transferencia horizontal de genes o bien por la mutación de genes propios. La adquisición de resistencias tiene lugar por el efecto combinado de elementos móviles, integrones y plásmidos; mientras que la modificación de genes se debe a mutaciones espontáneas que modifican la diana del antimicrobiano o a la inserción o delección de elementos móviles que alteran la expresión de los mecanismos de resistencia intrínsecos (Roca *et al.*, 2012).

A. baumannii presenta un elevado número de mecanismos de adquisición de resistencia entre los que se encuentran la modificación enzimática del antimicrobiano, la presencia de transportadores de membrana, cambios en la permeabilidad de la membrana, procesos metabólicos alternativos y alteraciones del sitio de acción (Lee *et al.*, 2017).

1.4.1. Modificación enzimática del antimicrobiano

1.4.1.1. β -lactamasas

Las β -lactamasas son el mecanismo de resistencia a antimicrobianos predominante en *A. baumannii*. Las β -lactamasas son enzimas que inactivan mediante la hidrólisis del anillo β -lactámico antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapenemas. Teniendo en cuenta su secuencia proteica fueron clasificadas por Ambler en 1980 en cuatro clases: A, B, C y D (Ambler, 1980).

1.4.1.1.1. β -lactamasas de clase A

Las β -lactamasas de clase A, al igual que las de clase C y D, presentan una serina en su sitio activo que es necesaria para catalizar la hidrólisis del antimicrobiano. Estas enzimas hidrolizan principalmente penicilinas y cefalosporinas (Jeon *et al.*, 2015).

Pese a que no se trata de las β -lactamasas con mayor relevancia en *A. baumannii*, se han descrito varios tipos entre las que se encuentran enzimas de espectro reducido como TEM-1 activas contra aminopenicilinas (Chen *et al.*, 2006), SCO-1 contra penicilinas (Poirel *et al.*, 2007) o CARB-2 y -4 contra carboxipenicilinas (Vedel *et al.*, 1989).

Asimismo, se han descrito enzimas de espectro extendido pertenecientes a este grupo que degradan antimicrobianos como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Entre ellas destaca PER-1, la primera de este tipo identificada en *A. baumannii* en cepas de cinco hospitales de Turquía y que no solamente confiere resistencia a cefalosporinas sino que también a ampicilina-sulbactam (Vahaboglu *et al.*, 1997). Por otro lado, CTX-M-2 se encontró en cepas resistentes a cefotaxima, ceftriaxone, cefpodoxima y aztreonam presentes en pacientes de un hospital de Japón. Los plásmidos de estas cepas mostraron el mismo patrón de restricción que los presentes en cepas de *Proteus mirabilis*, indicando que probablemente se hayan transmitido desde esta bacteria mediante transferencia horizontal (Nagano *et al.*, 2004). Otra de las β -lactamasas identificadas en *A. baumannii* es CTX-M-15, que se identificó en cepas aisladas de muestras de orina en un hospital de India y en heridos del terremoto de Haití ocurrido en enero del 2010, encontrándose asociada con el elemento móvil *ISEcp1* e integrada en el cromosoma de *A. baumannii* mediante un proceso similar a la transposición (Potron *et al.*, 2011). También se identificó otra β -lactamasa de amplio espectro denominada SHV-12, que se encontró durante un brote de *A. baumannii* continuo a uno de *Enterobacter cloacae* de las mismas características, codificada en un plásmido, sugiriendo su adquisición mediante transferencia horizontal (Al Naiemi *et al.*, 2005). Por último, VEB-1, identificada en pacientes de un hospital de Francia, se encuentra localizada en el cromosoma y forma parte de un integrón de clase 1 igual al caracterizado en aislados de *P. aeruginosa* (Poirel *et al.*, 2003).

1.4.1.1.2. β -lactamasas de clase B

Estas β -lactamasas también se conocen como metalo- β -lactamasas o MBLs ya que, a diferencia del resto, presentan un ión metálico, generalmente zinc, en su sitio activo. Las β -

Introducción

lactamasas de clase B se diferencian de las de los otros grupos en que presentan un amplio rango de sustratos, son capaces de hidrolizar carbapenemas y otros β -lactámicos a excepción del aztreonam. Además, son fácilmente transferibles ya que se encuentran normalmente en integrones formando parte de transposones (Walsh *et al.*, 2005; Bush y Jacoby, 2010; Zhao y Hu, 2011).

Las MBLs se han identificado en una gran variedad de especies gram negativas, en *A. baumannii* se han encontrado enzimas de esta clase adquiridas de otras bacterias pertenecientes a distintos grupos. En cuanto a las MBLs IMP, se han identificado seis variantes en este patógeno que son IMP-1 en Japón y Korea del Sur, IMP-2 en Italia, IMP-4 en Hong Kong, IMP-5 en Portugal, IMP-6 en Brasil e IMP-11 también en Japón (Walsh *et al.*, 2005).

Otro grupo importante de MBLs son las enzimas de tipo VIM, identificadas por primera vez en un aislado de *P. aeruginosa* en Verona (Lauretti *et al.*, 1999). En *A. baumannii* se ha detectado la presencia de aislados portadores de VIM-2 en Korea del Sur, área donde estas enzimas se encuentran muy extendidas entre *P. aeruginosa* y enterobacterias (Yum, 2002). Asimismo, en Korea también se han encontrado aislados productores de SIM-1 portadoras de este gen en un *cassette* insertado en un integrón de clase 1 (Lee *et al.*, 2005).

Por último, las MBL de tipo NDM, que inicialmente fueron identificadas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, también se han detectado en aislados clínicos de *A. baumannii*, tanto del tipo NDM-1 como su variante NDM-2 (Kumarasamy *et al.*, 2010; Kaase *et al.*, 2011).

1.4.1.1.3. β -lactamasas de clase C

Las β -lactamasas de esta clase se caracterizan porque degradan todas la penicilinas y cefalosporinas, excepto la cefepima, así como inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico (Drawz *et al.*, 2010).

A. baumannii presenta una β -lactamasa de clase C que se encuentra en su cromosoma y que se expresa constitutivamente, esta enzima se denomina AmpC (Bou y Martínez-Beltrán, 2000). Mediante análisis genéticos, se ha detectado que los genes *ampC* presentes en *Acinetobacter* spp. probablemente descienden de un gen primitivo común, estando así más relacionados entre sí que con los de otras especies bacterianas. Es por esto que se ha propuesto

una nueva familia de enzimas denominada cefalosporinasas derivadas de *Acinetobacter* (*Acinetobacter-Derived Cephalosporinases*, ADCs) (Hujer *et al.*, 2005).

Pese a tratarse de una cefalosporinasa no inducible, la expresión de esta enzima puede verse incrementada por la presencia de un elemento de inserción (*Insertion Sequence*, IS) situado *upstream* del gen. Los elementos de inserción IS son pequeños fragmentos de DNA móviles con una organización génica simple que son capaces de insertarse en diferentes regiones del genoma. En *A. baumannii* la presencia del IS conocido como IS*Abal upstream* del gen actúa provocando la sobreexpresión de esta β -lactamasa (Héritier *et al.*, 2006).

1.4.1.1.4. β -lactamasas de clase D

Las β -lactamasas de clase D, también conocidas como oxacilinasas (OXAs), se caracterizan por ser capaces de hidrolizar oxacilinas. Las enzimas de este tipo presentes en *Acinetobacter* representan un subgrupo atípico capaz de hidrolizar carbapenemas, por lo que se denominan β -lactamasas de clase D hidrolizantes de carbapenemas (*Carbapenem-Hydrolysing class D β -Lactamases*, CHDLs) (Poirel y Nordmann, 2006).

En *A. baumannii* se distinguen 5 subgrupos de β -lactamasas de clase D: la familia OXA-51/69, que comprende oxacilinasas cromosómicas y las oxacilinasas adquiridas OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 y OXA-143.

El subgrupo OXA-23 constituye el mayor subgrupo de este tipo de enzimas. La principal β -lactamasa de este grupo, OXA-23, fue inicialmente identificada bajo el nombre de ARI-1 en un plásmido de un aislado de Escocia, constituyendo la primera oxacilinasas con actividad carbapenemasa identificada (Paton *et al.*, 1993). En este subgrupo también se encuentran OXA-27 y OXA-49 que difieren de OXA-23 en algunas sustituciones aminoacídicas. Desde su identificación, el gen *bla*_{OXA-23}, situado tanto en el cromosoma como en plásmidos, se ha encontrado distribuido en diferentes cepas a lo largo de todo el mundo (Poirel y Nordmann, 2006).

El segundo subgrupo es el denominado OXA-24/40. Inicialmente se creía que OXA-24 y OXA-40 eran enzimas distintas, pero posteriormente se comprobó que se trataba de la misma proteína. OXA-24 fue identificada por primera vez en un aislado de *A. baumannii* carbapenema resistente en España (Bou *et al.*, 2000). A este grupo también pertenecen las enzimas OXA-25 y

Introducción

OXA-26 identificadas en España y Bélgica, estas presentan más de un 98% de homología entre sí y con OXA-24 (Afzal-Shah *et al.*, 2001).

El tercer subgrupo consiste en la β -lactamasa OXA-58 y sus variantes OXA-96, OXA-97 y OXA-164 (Bonnin *et al.*, 2013). La enzima OXA-58 se encontró en un plásmido presente en un aislado de un hospital de Francia y se observó que era capaz de hidrolizar penicilinas, oxacilinas e imipenem pero no cefalosporinas de amplio espectro (Poirel *et al.*, 2005). Esta β -lactamasa se encuentra extendida por diversas partes del mundo y presenta una gran prevalencia en Italia y Grecia (Poirel y Nordmann, 2006).

El cuarto subgrupo OXA-143 fue identificado recientemente en un aislado clínico de Brasil portador de esta enzima en un plásmido. Esta se caracteriza por hidrolizar penicilinas, oxacilina, meropenem e imipenem pero no cefalosporinas de amplio espectro (Higgins *et al.*, 2009).

Al igual que lo observado en la β -lactamasa de clase C AmpC, la expresión de OXA-58 y probablemente de OXA-23 se puede ver aumentada por la inserción *upstream* del elemento *ISAbal* que actúa como un promotor (Turton *et al.*, 2006).

Por último, se encuentra la familia OXA-51/69 que comprende oxacilinasas cromosómicas intrínsecas de *A. baumannii*, que también pueden aumentar su expresión por la presencia de elementos de inserción *upstream* (Héritier *et al.*, 2005; Turton *et al.*, 2006).

1.4.1.2. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*Aminoglycoside-Modifying Enzymes*, AMEs) son el principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos que posee *A. baumannii*. Estas enzimas pueden clasificarse en 3 grupos: acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas. La actividad de las AMEs consiste en la modificación de los grupos hidroxilo o amino de los aminoglucósidos de manera que se produce una disminución de su afinidad por el sitio de acción, la subunidad 30S del ribosoma (Smith y Baker, 2002). Estas enzimas se encuentran codificadas por genes situados tanto en el cromosoma como en plásmidos y, generalmente, se encuentran asociadas a integrones de clase 1 e islas de resistencia (Gallego y Towner, 2001; Nemeč *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2009).

Por otro lado, en *A. baumannii* se ha descrito una metilasa del rRNA 16S denominada ArmA que confiere resistencia a aminoglucósidos como gentamicina, tobramicina y amikacina

(Doi *et al.*, 2007). Además, recientemente se han caracterizado aislados portadores de esta metilasa en combinación con la β -lactamasa OXA-23 (Bakour *et al.*, 2014).

1.4.2. Transportadores de membrana

Las bacterias gram negativas presentan un elevado número de transportadores de membrana que translocan una gran variedad de moléculas al exterior celular. La envoltura celular de las bacterias constituye una barrera permeable selectiva que proporciona protección hacia compuestos tóxicos del medio y permite el paso de nutrientes. En bacterias gram negativas esta se encuentra compuesta por una membrana interna o citoplasmática, una delgada pared celular de peptidoglicano y una membrana externa. El espacio que se localiza entre la membrana interna y la externa recibe el nombre de espacio periplasmático y es aquí donde se sitúa el peptidoglicano. En la membrana externa se localizan elementos como el lipopolisacárido y las porinas, mientras que en la membrana interna se encuentran las bombas de expulsión, aunque las más complejas también tienen algún componente en la membrana externa (Cabeen y Jacobs-Wagner, 2005).

Tanto algunas porinas como bombas de expulsión participan en la resistencia a antimicrobianos y en la virulencia en *A. baumannii*. Las porinas son canales presentes en la membrana externa de las bacterias gram negativas y que permiten el paso de sustancias mediante transporte pasivo. En cambio, los sistemas de expulsión permiten el transporte de sustancias pero de una manera dependiente de energía (Fernández y Hancock, 2012).

En este apartado se describirá el papel que tienen estos elementos en la resistencia a antimicrobianos, lo que les permite a las bacterias expulsar antimicrobianos y otros compuestos fuera de la célula. La expulsión del antimicrobiano al exterior provoca una menor acumulación de este en el interior celular y, por tanto, un aumento de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Debido a su capacidad para expulsar diversos compuestos tóxicos, estas proteínas contribuyen a la supervivencia de los microorganismos en diferentes hábitats y condiciones (Pidcock, 2006).

Introducción

1.4.2.1. Porinas

Las porinas, denominadas también proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*, OMPs), son capaces de formar canales permitiendo el paso de moléculas a través de la membrana externa en bacterias gram negativas. Estas proteínas pueden actuar en la adhesión a otras células o en la unión de compuestos bactericidas a la superficie de las bacterias. Cambios en su estructura o en su expresión constituyen estrategias que permiten la supervivencia de los microorganismos en presencia de antimicrobianos (Vila *et al.*, 2007).

Hasta el momento, en *A. baumannii* las porinas han sido poco estudiadas y su función permanece aún sin esclarecer. Sin embargo, se han identificado algunas OMPs relacionadas con su capacidad de resistencia a antimicrobianos, especialmente a β -betalactámicos.

La principal OMP de *Acinetobacter* es la proteína modificable por calor, HMP-AB (*Heat-Modifiable Protein*), que presenta una elevada homología con la proteína de membrana externa OmpA de *Enterobacteriaceae* y la proteína OmpF de *Pseudomonas* spp. Esta porina pertenece a la familia OmpA y permite la difusión de azúcares y β -lactámicos (Gribun *et al.*, 2003).

Otra porina descrita en este microorganismo es CarO, una proteína de 29 kDa que se caracteriza por formar un canal monomérico inespecífico y que se encuentra relacionada con la resistencia a carbapenemas (Siroy *et al.*, 2005).

Por otra parte, se han relacionado varias porinas con la resistencia a carbapenemas como Omp33-36, identificada en un aislado en España (Tomás *et al.*, 2005) o la porina Omp43, homóloga a OpdR de *Pseudomonas* implicada en el transporte de imipenem (Dupont *et al.*, 2005). OmpW es una porina con gran homología a las OmpW de *E. coli* y *P. aeruginosa* y que podría estar implicada en la resistencia a colistina y ceftriaxona (Vila *et al.*, 2007).

1.4.2.2. Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son estructuras proteicas que se localizan en la membrana citoplasmática, aunque existen algunas con una organización más compleja que puede extenderse al periplasma y a la membrana externa. Estos elementos evitan la acumulación de compuestos en el interior celular de una manera activa (Fernández y Hancock, 2012).

Las bombas de expulsión se han clasificado en 6 superfamilias teniendo en cuenta su similitud aminoacídica, fuente de energía, número de componentes, número de regiones transmembrana y tipo de sustrato. En *A. baumannii* se han identificado transportadores de membrana pertenecientes a las 6 superfamilias: Adenosine triphosphate-Binding Cassette (ABC), Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE), Small Multidrug Resistance (SMR), Major Facilitator Superfamily (MFS), Resistance Nodulation Division (RND) y Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE), identificada recientemente en *A. baumannii* (Piddock, 2006; Coyne *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2015). Estos transportadores se clasifican en transportadores activos primarios y secundarios según la fuente de energía que empleen. Los únicos miembros del primer grupo son los transportadores ABC que emplean la energía de la hidrólisis del ATP para expulsar sustancias al exterior. Por otro lado, los transportadores activos secundarios se dividen en aquellos que acoplan el transporte con el flujo de protones (H^+) entre los que se encuentran los transportadores MFS, PACE, RND y SMR, y los que realizan un transporte por antiporte empleando sodio (Na^+) como sucede en los miembros de la superfamilia MATE (Saier and Paulsen, 2001; Hassan *et al.*, 2018). En la Figura 1.2 se representa la estructura transmembrana de cada familia y al final de este apartado se recogen en la Tabla 1.2 las principales bombas de expulsión descritas en *A. baumannii*.

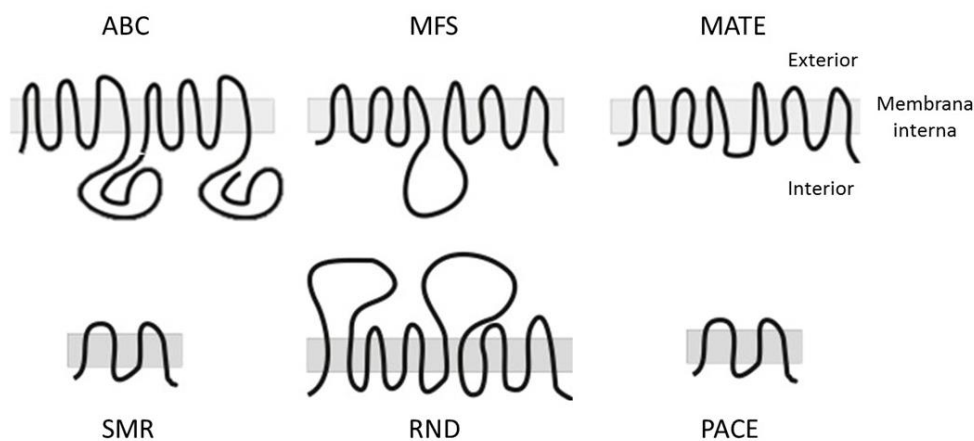


Figura 1.2. Representación esquemática de las 6 superfamilias de transportadores de membrana según sus características estructurales. Imagen modificada de Schindler y Kaatz (2016).

1.4.2.2.1. Superfamilia de transportadores RND

Los transportadores de tipo RND tienen un papel importante en el transporte de antimicrobianos en las bacterias gram negativas. Se trata de los transportadores de mayor tamaño y se encuentran formados por tres componentes: una proteína de la membrana externa que actúa como un canal, una proteína de la membrana interna y una proteína periplasmática que une estos dos componentes (Figura 1.3). La proteína de membrana presenta una estructura conformada por una hélice transmembrana (*TransMembrane Spanner*, TMS) en la región N-terminal seguida de un dominio extracitoplasmático, seis TMSs, un segundo dominio extracitoplasmático y cinco TMSs antes de la región C-terminal. Esta proteína se encuentra anclada a la proteína de membrana externa mediante las proteínas periplasmática (Saier y Paulsen, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2015).

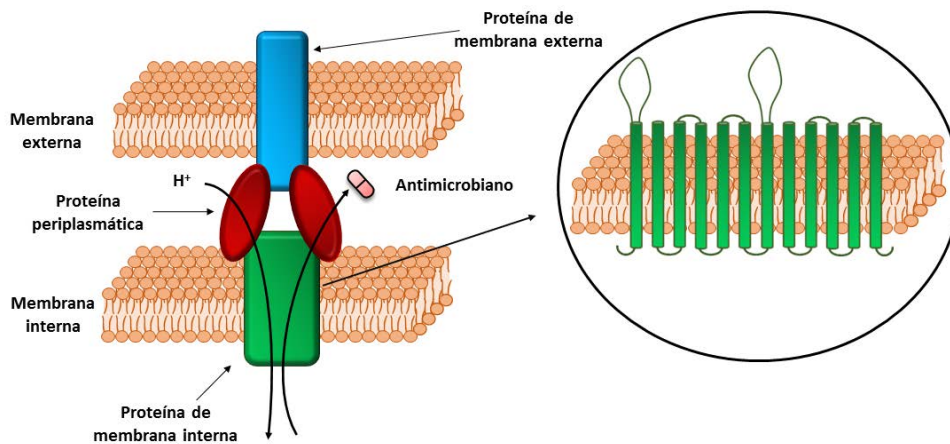


Figura 1.3. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia RND.

El transportador RND más estudiado en *A. baumannii* es el denominado AdeABC, que está relacionado con la resistencia a múltiples antimicrobianos entre ellos la tigeciclina y los aminoglucósidos (Magnet *et al.*, 2001; Ruzin *et al.*, 2007). Al igual que todas las bombas de este tipo está compuesto por tres elementos: una proteína transmembrana (AdeB), una proteína de membrana externa (AdeC) y una proteína de fusión de la membrana interna (AdeA) (Magnet *et al.*, 2001). Los genes *adeABC* se encuentran precedidos por un sistema regulador que consta de dos genes denominados *adeRS*, que codifican un sensor quinasa (AdeS) y un regulador de respuesta (AdeR) (Marchand *et al.*, 2004). Mutaciones puntuales en estos dos genes provocan la sobreexpresión de esta bomba y por tanto una mayor resistencia a antimicrobianos (Yoon *et al.*, 2013).

Otro sistema RND descrito en *A. baumannii* es AdeIJK que está compuesto por los genes *adel*, *adeJ* y *adeK*, que codifican una proteína de fusión de membrana interna, una proteína transmembrana y una proteína de membrana externa, respectivamente. Este transportador es capaz de expulsar múltiples antimicrobianos incluyendo β -lactámicos, cloranfenicol y eritromicina entre otros, así como compuestos tóxicos como acridina o pironina. Sin embargo, no es capaz de expulsar bromuro de etidio (Damier-Piolle *et al.*, 2008). No se han encontrado genes reguladores en la región de este operón, sin embargo, mediante la secuenciación del genoma de la cepa *A. baumannii* BM4454 en la que se identificó por primera vez este sistema se observó que el gen *adeN* actúa como represor del operón *adeIJK* (Rosenfeld *et al.*, 2012). Otro sistema RND descrito en este patógeno es el transportador AdeXYZ que muestra un porcentaje de identidad del 97% con AdeIJK y se encuentra relacionado con la resistencia a β -lactámicos, ciprofloxacina, rifampicina, cloranfenicol y tetraciclina (Chu *et al.*, 2006).

AdeFGH es otro miembro de la familia RND descrito en este microorganismo que consta de una proteína de fusión (AdeF), una proteína transmembrana (AdeG) y una proteína de membrana externa (AdeH). Se identificó mediante la realización de un estudio transcriptómico de mutantes espontáneos resistentes a cloranfenicol y norfloxacina de un mutante defectivo de los genes *adeABC* y *adeIJK* en la cepa en los que estos fueron descritos. Los datos obtenidos revelaron que este transportador confiere resistencia a prácticamente los mismos antimicrobianos que los dos sistemas anteriores. Junto a ello, se observó que se encuentra regulado por el gen *adeL* que se localiza *upstream* de este operón. Mutaciones en este regulador provocan la sobreexpresión de *adeFGH* (Coyne *et al.*, 2010).

En *A. baumannii* se ha descrito otro sistema RND que consta únicamente de dos componentes que son la proteína transmembrana AdeE y la proteína AdeD. La inactivación del gen *adeE* resulta en una mayor susceptibilidad del mutante a amikacina, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofoxacina, eritromicina, bromuro de etidio, meropenem, rifampicina y tetraciclina (Chau *et al.*, 2004).

1.4.2.2.2. Superfamilia de transportadores MFS

La superfamilia de los transportadores MFS es muy diversa y sus miembros, normalmente, actúan como exportadores específicos de ciertas clases de antimicrobianos en lugar de transportar diversos tipos. Se trata de permeasas constituidas por 12 (*Drug:H⁺*

Introducción

Antiporter-1, DHA-1) o 14 (*Drug:H⁺ Antiporter-2*, DHA-2) TMSs que funcionan por antiporte de protones (Figura 1.4) (Saier y Paulsen, 2001).

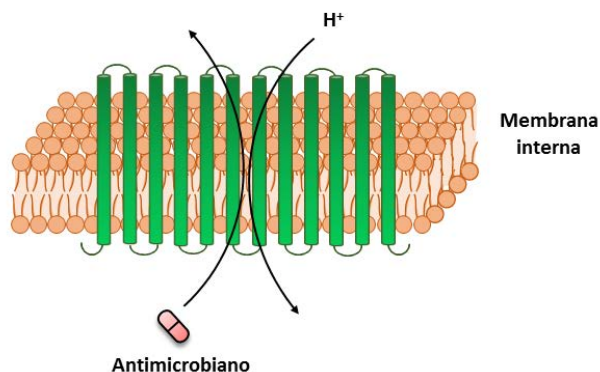


Figura 1.4. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia MFS DHA-1.

En *A. baumannii* se han identificado múltiples miembros englobados dentro de este grupo. Unos de los MFS más estudiados son TetA, implicado en la resistencia a tetraciclina, y TetB, implicado en la resistencia a tetraciclina y minociclina, aunque ninguno de los dos está relacionado con el transporte de gliciliclinas (Ribera *et al.*, 2003a). En un estudio destinado a analizar la prevalencia de estos genes en 79 cepas de *A. baumannii* resistentes a tetraciclina se observó que *tetB* se encontraba en el 66% de ellas y *tetA* en el 13,6% (Martí *et al.*, 2006). En cuanto a su localización, el gen *tetA* y su regulador, *tetR*, se encuentran situados en un transposón, mientras que *tetB* se encuentra en pequeños plásmidos (Ribera *et al.*, 2003a; Srinivasan *et al.*, 2009a).

Se han encontrado otros dos transportadores de la superfamilia MFS relacionados también con la resistencia a cloranfenicol, denominados CraA y CmlA, que confieren resistencia a este antimicrobiano. CraA presenta una estructura similar a la bomba MdfA de *E. coli* pese a que difieren en la especificidad de sustratos (Roca *et al.*, 2009). El transportador CmlA, al igual que el anterior, únicamente transporta cloranfenicol y se describió por primera vez situado en una isla de resistencia de 86 kb en la cepa *A. baumannii* AYE (Fournier *et al.*, 2006). Además de estos dos MFS, mediante análisis bioinformáticos de los transportadores DHA-2 codificados por el genoma de *A. baumannii* se encontró una nueva proteína de membrana denominada AedC relacionada con el transporte de cloranfenicol y tetraciclina (Hassan *et al.*, 2011). Recientemente se ha identificado un tercer transportador denominado FloR localizado en un plásmido de un aislado MDR de *A. baumannii* que también confiere resistencia a cloranfenicol además de a florfenicol. Este muestra un 99% de identidad aminoacídica con una bomba que expulsa estos dos antimicrobianos presente en la isla genómica 1 de *Salmonella* (Hamidian *et al.*, 2017).

Recientemente, se llevó a cabo un estudio bioinformático con el fin de identificar transportadores MFS de tipo DHA-2 en la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* identificándose 6 hipotéticos transportadores denominados AedA-F. La construcción de mutantes defectivos de estos genes reveló que entre ellos destacaban *aedC* por conferir resistencia a tetraciclina y cloranfenicol y *aedF* por conferir resistencia a bromuro de etidio y 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Por otro lado, la delección del resto de genes no mostró diferencias significativas en cuanto a la resistencia a ningún antimicrobiano (Hassan *et al.*, 2011).

Finalmente, en los últimos años se han descrito nuevos miembros de la superfamilia MFS relacionados con resistencia a otros antimicrobianos. El transportador AmvA proporciona resistencia a antimicrobianos como la eritromicina, así como a desinfectantes, detergentes y colorantes como la acriflavina, cloruro de benzalconio y metil viológeno (Rajamohan *et al.*, 2010). Otro MFS es el transportador AbaF que no solamente está asociado con la resistencia a fosfomicina sino que también lo está con la formación de *biofilm* y la virulencia (Sharma *et al.*, 2017). En cuanto a la resistencia a colistina, se ha encontrado un transportador MFS denominado EmrAB que proporciona resistencia a este antimicrobiano y contribuye a la adaptación al estrés osmótico (Lin *et al.*, 2017).

1.4.2.2.3. Superfamilia de transportadores MATE

La superfamilia de transportadores MATE está compuesta por proteínas formadas por 12 TMS que pese a no tener ningún motivo con secuencia conservada comparten un 40% de similitud de secuencia entre sí, lo que indica que presentan una estructura y mecanismo de transporte que es el mismo en todos ellos (Figura 1.5) (Du *et al.*, 2015).

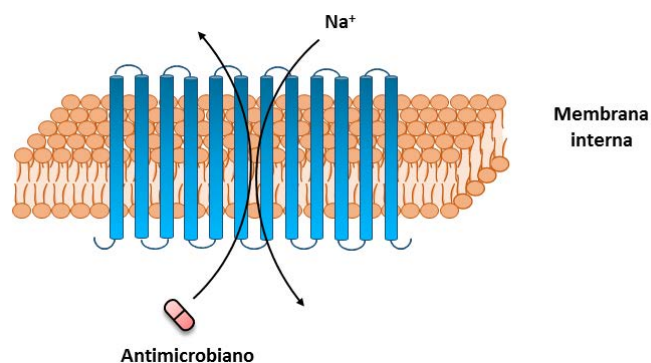


Figura 1.5. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia MATE.

Introducción

El primer miembro de la familia MATE identificado en *A. baumannii* es AbeM, que está relacionado con la expulsión de aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol y trimetoprim (Su *et al.*, 2005). Otros miembros de esta familia son AbeM2 y AbeM4 que proporcionan resistencia a quinolonas, mientras que AbeM3 no se ha encontrado que confiera resistencia a ningún antimicrobiano (Eijkelkamp *et al.*, 2011a).

1.4.2.2.4. Superfamilia de transportadores SMR

La superfamilia de transportadores SMR comprende proteínas de pequeño tamaño que cuentan con 4 TMSs que generalmente funcionan como homodímeros (Figura 1.6).

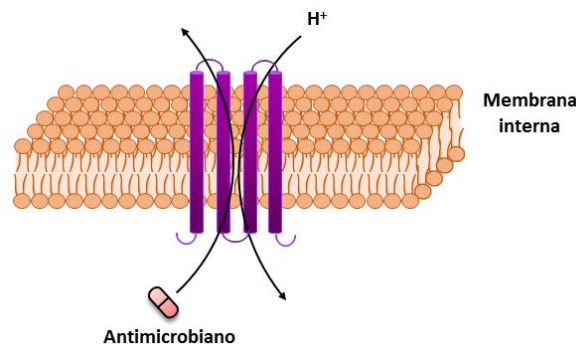


Figura 1.6. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia SMR.

En *A. baumannii* se ha caracterizado la proteína AbeS que afecta a la resistencia de varios antimicrobianos y agentes desinfectantes. La delección del gen *abeS* resulta en una mayor susceptibilidad a cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, novobiocina y eritromicina, así como a compuestos como deoxicolato, cloruro de tetrafenilfosfonio (TPPCI), bromuro de etidio o dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) (Srinivasan *et al.*, 2009b). Asimismo, también se ha observado que la expresión del gen *A1S_0710* de la cepa ATCC 17978 en *E. coli* KAM32, un mutante defectivo de los transportadores *acrAB* e *yhE*, provocaba una mayor resistencia a SDS y deoxicolato. Este gen presenta una elevada homología con el gen *sugE* de *E. coli* que está relacionado con la resistencia a compuestos tóxicos de amonio cuaternario (Gebreyes, 2008).

1.4.2.2.5. Superfamilia de transportadores PACE

En *A. baumannii* se ha identificado una sexta familia de la que forma parte el transportador Acel conocida como *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE) (Hassan *et al.*, 2015). Los transportadores de este tipo analizados hasta el momento parecen estar conformados por 4 hélices transmembrana que funcionan como oligómeros (Figura 1.7) (Hassan *et al.*, 2018). El transportador Acel de *A. baumannii* confiere resistencia al desinfectante clorhexidina y se encuentra regulado por AceR que en presencia de esta sustancia estimula la expresión de *acel* (Hassan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Además de Acel, existe también otro transportador de este tipo en el genoma de *A. baumannii* codificado por el gen *A1S_1503* que confiere resistencia a acriflavina (Hassan *et al.*, 2015).

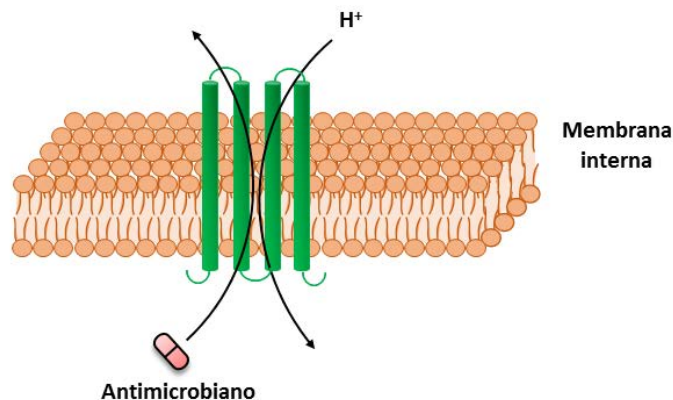


Figura 1.7. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia PACE.

1.4.2.2.6. Superfamilia de transportadores ABC

La superfamilia de los transportadores ABC emplea para la translocación de sustratos la energía generada por la hidrólisis del ATP. Estos transportadores se organizan en 4 unidades funcionales o dominios: dos dominios integrales de membrana y dos dominios citoplasmáticos, donde se une el ATP, denominados NBD (*Nucleotide-Binding Domains*) (Figura 1.8). La estructura de cada dominio de membrana se encuentra conformada, dependiendo del tipo de transportador, por 6 o 10 hélices transmembrana por lo que el transportador completo posee un total de 12 o 20 segmentos transmembrana (Wilkins, 2015). Los dominios de membrana conforman la ruta de translocación, mientras que los NBD unen e hidrolizan ATP proporcionando la energía suficiente para que se produzca el paso de sustancias. Además, cuentan con una proteína de unión que presenta alta afinidad por los sustratos cuya función es la introducción de estos en el complejo de transporte. Normalmente, los genes que codifican los componentes

Introducción

que constituyen este tipo de transportadores se encuentran formando parte del mismo operón. Además, estos componentes se expresan como polipéptidos individuales aunque, en algunos casos, los distintos dominios se encuentran fusionados en polipéptidos multifuncionales (Rees *et al.*, 2009; Zolnerciks *et al.*, 2011).

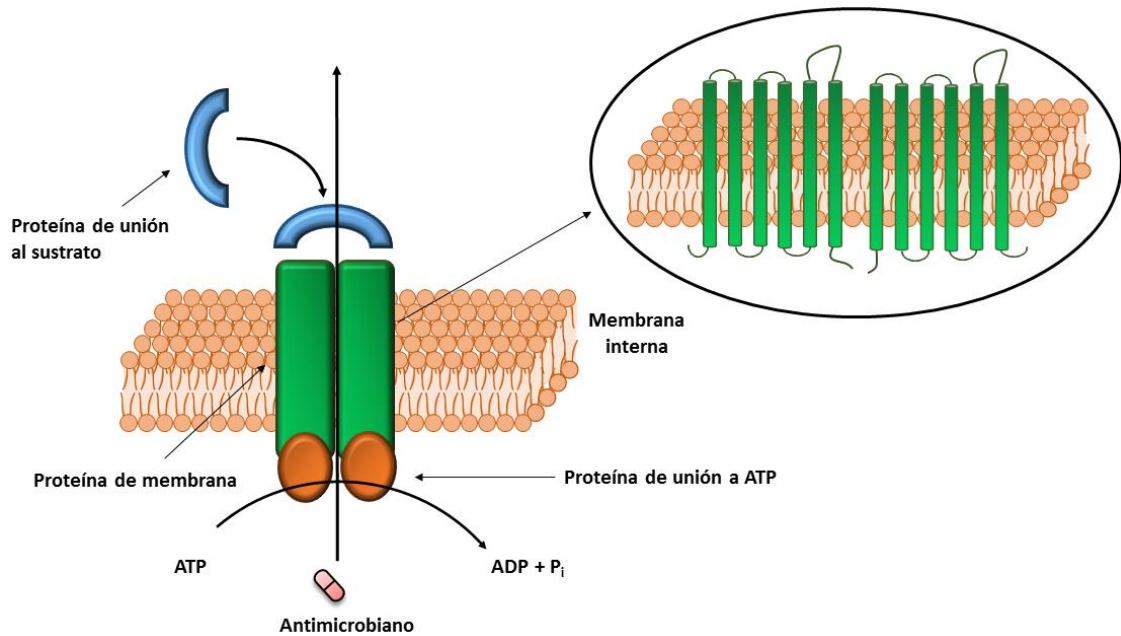


Figura 1.8. Representación esquemática de un transportador de la superfamilia ABC.

En *A. baumannii* únicamente existen dos miembros de esta superfamilia caracterizados. Uno de ellos es el transportador ABC codificado por el gen *A1S_1535* que confiere resistencia a 1,10-fenantrolina y antimicrobianos como la gentamicina, kanamicina, cloranfenicol o oxitetraciclina (Li *et al.*, 2016). El otro miembro perteneciente a esta superfamilia de transportadores es el codificado por el gen *A1S_0536* relacionado con la extrusión de macrólidos (Okada *et al.*, 2017).

Tabla 1.2. Principales bombas de expulsión descritas en *A. baumannii*.

Superfamilia	Transportador	Sustratos	Referencia
RND	AdeABC	Aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim, tigeciclina y bromuro de etidio	(Magnet <i>et al.</i> , 2001; Ruzin <i>et al.</i> , 2007)
	AdeED	Amikacina, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, bromuro de etidio, meropenem, rifampicina y tetraciclina	(Chau <i>et al.</i> , 2004)
	AdelJK	β -lactámicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, lincosamidas, fluoroquinolonas, novobiocina, rifampicina, trimetoprim, acridina, safranina, pironina y SDS	(Damier-Piolle <i>et al.</i> , 2008)
	AdeFGH	Azitromicina, ciprofloxacina, gentamicina y zeocina	(Coyne <i>et al.</i> , 2010; Leus <i>et al.</i> , 2018)
	AdeXYZ	β -lactámicos, ciprofloxacina, rifampicina, cloranfenicol y tetraciclina	(Chu <i>et al.</i> , 2004)
MFS	TetA	Tetraciclina	(Ribera <i>et al.</i> , 2003a)
	TetB	Tetraciclina y minociclina	(Vila <i>et al.</i> , 2007)
	CraA	Cloranfenicol	(Roca <i>et al.</i> , 2009)
	CmlA	Cloranfenicol	(Fournier <i>et al.</i> , 2006)
	AedC	Cloranfenicol y tetraciclina	(Hassan <i>et al.</i> , 2011)
	Flor	Cloranfenicol y florfenicol	(Hamidian <i>et al.</i> , 2017)
	AedF	Bromuro de etidio y DAPI	(Hassan <i>et al.</i> , 2011)
	AmvA	Ciprofloxacina, eritromicina, norfloxacina, novobiocina, naranja de acridina, acriflavina, cloruro de benzalconio, clorhexidina, DAPI, deoxicolato, metilviológeno, bromuro de etidio, pironina Y, SDS, y TPPCI	(Rajamohan <i>et al.</i> , 2010)
	AbaF	Fosfomicina, cloranfenicol y bromuro de etidio	(Sharma <i>et al.</i> , 2017)
EmrAB	Colistina	(Lin <i>et al.</i> , 2017)	
MATE	AbeM	Aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim, DAPI, TPPCI, triclosan, acriflavina, daunorubicina, doxorubicina, bromuro de etidio y rodamina	(Su <i>et al.</i> , 2005)
	AbeM2	Ciprofloxacina	(Eijkelkamp <i>et al.</i> , 2011a)
	AbeM4	Ciprofloxacina	(Eijkelkamp <i>et al.</i> , 2011a)
SMR	AbeS	Cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, ácido nalidíxico, norfloxacina, novobiocina, naranja de acridina, acriflavina, clorhexidina, DAPI, deoxicolato, bromuro de etidio, metilviológeno, pironina Y, rodamina, SDS y TPPCI	(Srinivasan <i>et al.</i> , 2009b)
	A1S_0710	SDS y deoxicolato	(Gebreyes, 2008)
PACE	AceI	Clorhexidina	(Hassan <i>et al.</i> , 2015)
	A1S_1503	Acriflavina	(Hassan <i>et al.</i> , 2015)
ABC	A1S_0536	Macrólidos	(Okada <i>et al.</i> , 2017)
	A1S_1535	1,10-fenantrolina, gentamicina, kanamicina, cloranfenicol y oxitetraciclina	(Li <i>et al.</i> , 2016)

1.4.3. Alteraciones del sitio de acción

Modificaciones en las dianas de los antimicrobianos pueden producir resistencia a estos. En *A. baumannii*, entre estos mecanismos se encuentran las mutaciones de los genes *gyrA*, *parC* y *rpoB*, cambios en las proteínas de unión a penicilinas, proteínas protectoras de ribosomas y modificaciones del lipopolisacárido.

En *A. baumannii*, la resistencia a quinolonas se produce frecuentemente por la aparición de mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (*quinolone-resistance determining regions*, QRDR) de la DNA girasa y de la DNA topoisomerasa IV (Fàbrega *et al.*, 2009). Las mutaciones más importantes son las que provocan sustituciones en los aminoácidos Ser83→Leu en GyrA y Ser80→Leu en ParC. Estos cambios provocan una menor afinidad de la quinolona por su diana, lo que se manifiesta en una mayor resistencia (Vila *et al.*, 1995, 1997).

Pese a que el mecanismo de resistencia a β -lactámicos más conocido y estudiado son las β -lactamasas, un mecanismo no enzimático de resistencia a estos son los cambios en la afinidad o expresión de las proteínas de unión a penicilinas (*Penicillin Binding Proteins*, PBPs). Estas proteínas catalizan la síntesis del peptidoglicano, el componente primario de la pared celular, y son diana de los antimicrobianos β -lactámicos. Gehrlein y colaboradores observaron que un mutante con una PBP de 24 kDa sobreexpresada y otras seis con bajos niveles de expresión presentaba una mayor resistencia a imipenem (Gehrlein *et al.*, 1991). En otro trabajo se ha descrito que la ausencia de una PBP de 73,2 kDa se relaciona con la resistencia a imipenem y meropenem, mientras que la ausencia simultánea de esta proteína y una PBP de 70,1 kDa se asocia con niveles de resistencia mayores a ambos antimicrobianos (Fernández-Cuenca *et al.*, 2003).

En cuanto a las proteínas protectoras de ribosomas, la única proteína de este tipo identificada en *A. baumannii* es TetM, que presenta una identidad del 100% con TetM de *S. aureus* y protege al ribosoma de la acción de la tetraciclina, doxiciclina y minociclina (Ribera *et al.*, 2003b).

En *A. baumannii* la resistencia a polimixinas está relacionada con modificaciones en el lipopolisacárido que interfieren en la unión del antimicrobiano con la membrana externa de la bacteria. La resistencia a polimixinas se encuentra vinculada al operon *pmrCAB* que está formado por un sistema regulador de dos componentes que incluye a los genes *pmrB*, que codifica un sensor quinasa, y *pmrA*, que codifica un regulador de respuesta. Estos dos genes regulan la expresión de *pmrC*, que codifica una fosfatidiletanolamina transferasa, encargada de

la modificación del lípido A. Se ha observado que mutaciones que causan una desregulación en la expresión de los genes *pmrA* y *pmrB*, conllevan la sobreexpresión del gen *pmrC*, que modifica el lípido A provocando resistencia a colistina en esta bacteria (Adams *et al.*, 2009; Beceiro *et al.*, 2011). Por otro lado, la resistencia a colistina puede ser debida a mutaciones que afectan a genes implicados en la síntesis del lípido A como *lpxA*, *lpxC* y *lpxD*, que conllevan la pérdida total del lipopolisacárido (Moffatt *et al.*, 2010).

En cuanto a la resistencia a rifampicina en *A. baumannii* esta se encuentra relacionada con mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa. En un estudio llevado a cabo con diversos aislados con elevada resistencia a rifampicina se observó que la mayoría de ellos presentaban mutaciones puntuales en el gen *rpoB* (Giannouli *et al.*, 2012). Este hecho se corroboró al secuenciar una región del gen *rpoB* de mutantes espontáneos a rifampicina de la cepa ATCC 17978. Los resultados mostraron que estos mutantes presentaban mutaciones que provocaban sustituciones aminoacídicas en esta región (Norton *et al.*, 2013).

1.5. Factores de virulencia y patogenicidad en *A. baumannii*

El hecho que la colonización por *A. baumannii* es más frecuente que la infección, sugiere que la patogenicidad en esta especie es generalmente baja. Sin embargo, cuando se desarrolla una infección, esta puede convertirse en grave. Tradicionalmente, *A. baumannii* ha sido considerado como un patógeno de baja virulencia, principalmente por el hecho de infectar a pacientes con una condición clínica subyacente. Sin embargo, el aumento de las infecciones causadas por cepas MDR de este microorganismo en los hospitales de todo el mundo ha despertado un creciente interés por dilucidar cuáles son sus factores de virulencia (McConnell *et al.*, 2013).

En los últimos años, el aumento de técnicas moleculares relativamente baratas y rápidas ha permitido la secuenciación de genomas completos de cepas de este microorganismo, así como la realización de análisis comparativos. Junto a ello, el desarrollo de herramientas moleculares que permiten modificar el genoma y la existencia de modelos animales de infección están facilitando la identificación de los factores que contribuyen a su virulencia. Pese a estos avances, los factores identificados en este patógeno permanecen siendo escasos si se comparan con los de otras bacterias gram negativas. Sin embargo, profundizar en su conocimiento es clave

Introducción

para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para controlar las infecciones causadas por *A. baumannii* (McConnell *et al.*, 2013; Harding *et al.*, 2017).

1.5.1. Proteínas implicadas en la captación de hierro

El hierro es uno de los nutrientes esenciales para casi todos los microorganismos. Este micronutriente presenta un papel clave en múltiples procesos celulares como la síntesis del DNA, el transporte de electrones, el transporte de oxígeno, la síntesis de ATP, la reducción del nitrato en el ciclo del nitrógeno o actuando como cofactor de una gran variedad de enzimas. Este elemento puede encontrarse en forma de ión ferroso (Fe^{+2}), que es soluble, lo que permite su incorporación a través de la membrana celular; o bien en su forma insoluble de ión férrico (Fe^{+3}). Pese a ser muy abundante en la naturaleza, no siempre se encuentra en la forma disponible para las bacterias, ya que en presencia de oxígeno y a pH neutro sufre oxidación a ión férrico y finalmente se vuelve insoluble en forma de oxihidróxido férrico. Además, en el hospedador el hierro se encuentra unido a la hemoglobina, almacenado como ferritina o ligado a la transferrina. Esto reduce notablemente su disponibilidad para los patógenos, lo que les ha llevado a desarrollar una serie de estrategias para acceder a la concentración óptima de este metal. De esta forma, los microorganismos cuentan con sistemas para su captación, como moléculas quelantes denominadas sideróforos (Skaar, 2010; Saha *et al.*, 2013).

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que presentan afinidad por el hierro. En *A. baumannii* el sideróforo mejor caracterizado es la acinetobactina, que fue descrita por primera vez en la cepa ATCC 19606, en cultivos bajo condiciones limitantes de hierro (Yamamoto *et al.*, 1994). La reducción de la biosíntesis y el transporte de esta molécula, mediada por las proteínas BauA y BasD, respectivamente, se ha relacionado con una menor habilidad del patógeno para persistir en condiciones limitantes de hierro, así como para causar la muerte en modelos animales (Gaddy *et al.*, 2012). Además de la acinetobactina, estudios recientes han descrito dos *clusters* de genes relacionados con la síntesis y el transporte de sideróforos que incluyen posibles genes que codifican monooxigenasas y acetiltransferasas en varias cepas tipo. Mediante el estudio de los genomas de estas cepas también se han identificado genes que codifican proteínas relacionadas con la captación y transporte de hierro, como un homólogo del sistema TonB o receptores de membrana externa (Antunes *et al.*, 2011a).

Otro mecanismo alternativo que presentan las bacterias para la asimilación de hierro es la captación directa de Fe^{+2} mediante el sistema Feo. Este se ha identificado en varias cepas de

A. baumannii y consta de la proteína citosólica FeoA, la permeasa FeoB y el represor FeoC. Asimismo, este patógeno posee una proteína homóloga al regulador Fur (*Ferric uptake regulator*), que controla la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con los sistemas de adquisición de hierro. La búsqueda bioinformática de sitios de unión de Fur mostró que estos se encuentran en regiones intergénicas de los genes del sistema Feo, hecho que corrobora su implicación en la adquisición de hierro (Antunes *et al.*, 2011a).

1.5.2. Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas esenciales para el metabolismo de los fosfolípidos que actúan hidrolizando los enlaces éster presentes en estos. Estas proteínas constituyen un factor de virulencia en múltiples especies bacterianas ayudando a la invasión del hospedador. La degradación de los fosfolípidos afecta a la estabilidad de las membranas de las células del hospedador y puede provocar cambios en su respuesta inmune (Songer, 1997).

En *A. baumannii* se han identificado dos enzimas de este tipo: la fosfolipasa C y la fosfolipasa D. La interrupción del gen que codifica la fosfolipasa C resulta en una disminución de la citotoxicidad causada por este patógeno en células epiteliales humanas, demostrando que es un factor crucial en el daño celular. Además, el estudio del perfil transcripcional de cultivos de *A. baumannii* en presencia o ausencia de etanol, sustancia que aumenta su virulencia en el modelo de *Caenorhabditis elegans*, mostró que la expresión de esta fosfolipasa se ve aumentada por la presencia de etanol en el medio. Esto pone de manifiesto que esta enzima contribuye a la patogénesis y virulencia en este microorganismo (Camarena *et al.*, 2010).

La fosfolipasa D tiene un papel importante en la invasión de células epiteliales y en la resistencia al suero humano. Esta enzima se identificó realizando una genoteca de mutantes en una cepa con una gran capacidad de propagación en el suero humano y se seleccionaron los mutantes que tenían dificultades para crecer en este. Los resultados mostraron que la disrupción de esta enzima provoca una menor bacteremia, así como una menor colonización en el modelo de infección murino (Jacobs *et al.*, 2010). Aparte de esta fosfolipasa, en la cepa ATCC 19606 se identificaron tres fosfolipasas D más cuya delección se relacionó con una menor virulencia en el modelo de larva de la polilla de la cera *Galleria mellonella* y una menor invasión de células epiteliales pulmonares (Stahl *et al.*, 2015). Recientemente, teniendo en cuenta la implicación de esta proteína en la virulencia de *A. baumannii*, se realizaron ensayos de inmunización activa y pasiva en ratón. Los resultados revelaron que se trata de una proteína

Introducción

altamente inmunogénica y con un gran potencial para su uso como agente terapéutico contra este patógeno (Li *et al.*, 2017).

1.5.3. Porinas

Las OMPs además de estar relacionadas con la resistencia a antimicrobianos, como se ha comentado anteriormente, tienen un papel importante en la adaptación y patogénesis en las células hospedador. Participan en procesos como la adherencia e invasión, la inducción de la apoptosis o la formación de *biofilm*.

La porina OmpA es una de las más abundantes en la membrana externa de *A. baumannii* y constituye uno de los factores de virulencia mejor caracterizado en este microorganismo. OmpA es capaz de provocar la apoptosis de las células epiteliales humanas laríngeas dañando las mitocondrias y causando la liberación de moléculas pro-apoptóticas. Esto induce la activación de una cascada de caspasas, lo cual lleva a la degradación del DNA cromosómico. La apoptosis de las células epiteliales permite la entrada de las bacterias a través de la mucosa facilitando la infección (Choi *et al.*, 2005). Otro papel clave de esta porina en la virulencia es su relación con la formación de *biofilm* y la evasión del sistema del complemento. OmpA es necesaria para la formación de *biofilms* en superficies abióticas y resulta esencial para la adhesión a los filamentos del modelo *Candida albicans* y a las células epiteliales alveolares humanas (Choi *et al.*, 2008; Gaddy *et al.*, 2009). Asimismo, se ha detectado que en *A. baumannii* esta porina se une al factor H del suero humano permitiendo evadir al sistema del complemento (Kim *et al.*, 2009).

La porina Omp33, además de su importancia en la resistencia a β -lactámicos, como ya se comentó anteriormente, parece tener un papel importante en la virulencia de *A. baumannii*. La delección del gen que la codifica reduce significativamente la adherencia a las células epiteliales humanas y su invasión junto con una reducción de la citotoxicidad en estas células y macrófagos. En particular, la ausencia de esta proteína en *A. baumannii* atenúa la letalidad en el modelo murino y, además, reduce la concentración de bacterias en el pulmón y el bazo de los animales infectados (Smani *et al.*, 2013). Además, la porina Omp33 purificada induce apoptosis en células del sistema inmune y tejido conectivo activando caspasas y modulando la autofagia. El bloqueo de la autofagia permite a *A. baumannii* sobrevivir intracelularmente provocando citotoxicidad (Rumbo *et al.*, 2014).

1.5.4. Lipopolisacárido y polisacáridos capsulares

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Se encuentra formado por tres partes: un componente hidrofóbico denominado lípido A o endotoxina, un núcleo de oligosacáridos denominado *core* y una región variable de estructuras repetidas llamada antígeno O (Figura 1.9). El LPS es considerado un factor de virulencia en múltiples patógenos y su localización en la superficie celular contribuye a la interacción entre la bacteria y el entorno (Luke *et al.*, 2010).

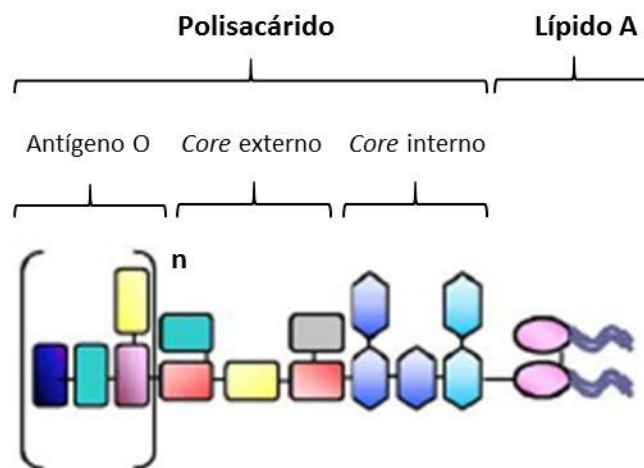


Figura 1.9. Representación esquemática de la estructura del lipopolisacárido. Imagen modificada de Caroff (2003).

En *A. baumannii* se ha observado que mutantes carentes de la glicosiltransferasa LpsB presentan una menor resistencia al suero humano y una menor capacidad de supervivencia en modelos animales (Luke *et al.*, 2010). Junto a ello, la inhibición de la enzima LpxC, implicada en la síntesis del lípido A, ha mostrado una mejor eliminación de *A. baumannii* por parte del sistema inmune y una menor letalidad en el modelo murino (Lin *et al.*, 2012). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, mutaciones en los genes *lpxA*, *lpxC* y *lpxD*, implicados en la síntesis de este componente del LPS, llevan a una pérdida total del LPS, causando resistencia a colistina (Moffatt *et al.*, 2010). Esto indica que el bloqueo de la síntesis del LPS podría constituir una nueva diana terapéutica contra este patógeno.

Otro factor de virulencia importante en *A. baumannii* es la cápsula. El estudio de mutantes en búsqueda de genes necesarios para el crecimiento en líquido ascítico humano llevó a la identificación de dos proteínas relacionadas con esta estructura. Se obtuvieron mutantes defectivos en los genes *ptK*, que codifica una probable tirosin quinasa requerida para la polimerización de la cápsula, y *epsA*, que codifica una probable proteína de membrana que

Introducción

exporta polisacáridos requerida para el ensamblaje de la cápsula. Estos mutantes mostraron un menor crecimiento en líquido ascítico y una menor supervivencia en el suero humano y en el modelo animal de tejido blando de rata (Russo *et al.*, 2010).

El estudio del polisacárido extracelular poli- β -(1,6)-N-acetilglucosamina (PNAG) en *A. baumannii* reveló que se trata de un componente mayoritario de los *biofilms* y que contribuye a la patogénesis en esta bacteria. La delección del *locus pgaABCD*, que codifica enzimas necesarias para la síntesis de este polisacárido, implica la formación de un *biofilm* de menor volumen y grosor que el producido por la cepa salvaje. Por ello, su ausencia demuestra que es un componente crítico para la formación de *biofilm* y constituye un factor de virulencia que protege a *A. baumannii* contra la respuesta innata del hospedador (Choi *et al.*, 2009).

1.5.5. Vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles*, OMVs) son vesículas esféricas de 20-200 nm de diámetro secretadas por una gran variedad de bacterias gram negativas durante su crecimiento. Están compuestas de lipopolisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Múltiples cepas de *A. baumannii* secretan OMVs que contienen factores de virulencia, como OmpA, proteasas y fosfolipasas. La secreción de estas vesículas permite al patógeno la liberación de factores de virulencia en el interior de las células del hospedador sin que haya un contacto directo entre la bacteria y el hospedador (Kwon *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011).

En *A. baumannii*, las OMVs median la adherencia a las células eucariotas, así como la internalización de determinadas sustancias, lo cual contribuye a la patogénesis. La porina OmpA, mencionada ya anteriormente, parece ser el componente mayoritario de las OMVs de la cepa ATCC 19606, y se ha observado que induce citotoxicidad y apoptosis en el hospedador. También se detectaron otras proteínas asociadas con la virulencia en el interior de estas OMVs como proteasas y hemolisinas, o proteínas del sistema CsuA/BABCDE del que se hablará más adelante (Jin *et al.*, 2011). Asimismo, en otro estudio se demostró que las OMVs también pueden transportar plásmidos que presentan genes de resistencia a β -lactámicos como la β -lactamasa OXA-24. Esto probablemente implica una relación con la diseminación de estos marcadores entre distintos aislados de *A. baumannii* (Rumbo *et al.*, 2011).

Por otro lado, debido a que las OMVs contienen múltiples proteínas antigénicas de la membrana externa de la bacteria, podrían constituir una potencial vacuna contra *A. baumannii*. En un modelo experimental empleando ratones inmunizados con OMVs de la cepa ATCC 19606 se observó que se producía inmunización contra esta cepa así como contra otros aislados clínicos (McConnell *et al.*, 2011).

1.5.6. Sistemas de secreción

Los sistemas de secreción representan un componente indispensable para el transporte de proteínas y otras macromoléculas al espacio extracelular. En bacterias gram negativas existen seis sistemas de secreción y estos tienen un papel central en la modulación de las interacciones de las bacterias y su entorno (Tseng *et al.*, 2009). En *A. baumannii* se han identificado varios sistemas de secreción (Figura 1.10).

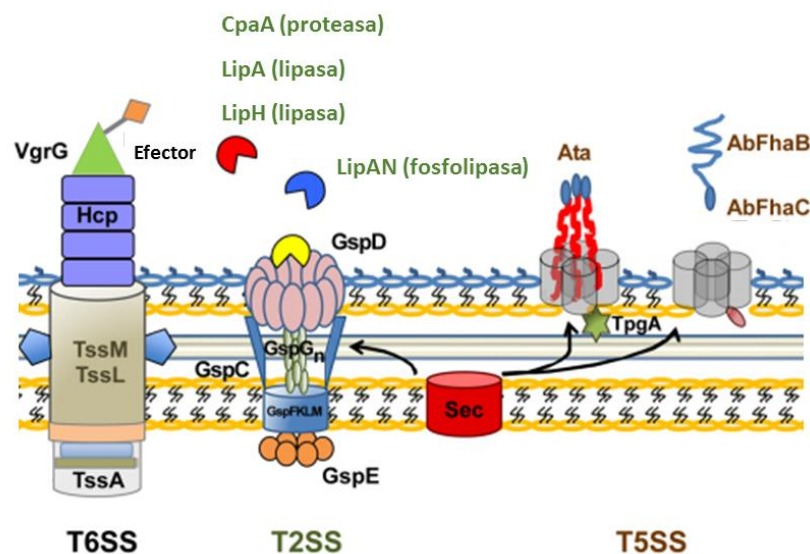


Figura 1.10. Representación esquemática de los sistemas de secreción de *A. baumannii*. Imagen modificada de Elhosseiny (2018).

El primer sistema de secreción descrito en este microorganismo es el sistema de secreción de tipo V (*Type V Secretion System*, T5SS) denominado *Acinetobacter trimeric autotransporter* (Ata), que se trata de una proteína perteneciente a la familia de autotransportadores triméricos. Una de las principales funciones de estos transportadores es actuar como adhesinas facilitando la unión de la bacteria a los tejidos del hospedador. Se ha comprobado que Ata tiene un papel clave en la adhesión de *A. baumannii* al colágeno de tipo IV del hospedador, en la

Introducción

formación de *biofilm* y en el progreso de la infección en un modelo murino (Bentancor *et al.*, 2012). Este complejo interacciona con una lipoproteína denominada TpgA (*Trimeric autotransporter adhesins-associated and peptidoglycan-associated protein A*) que también interactúa con el peptidoglicano (Ishikawa *et al.*, 2016). Además, *A. baumannii* posee también un sistema de secreción de dos componentes TPS (*Two-Partner Secretion system*) denominado AbFhaB/FhaC, que se encuentra también implicado en la adhesión y en la virulencia de este patógeno nosocomial (Pérez *et al.*, 2017).

El sistema de secreción de tipo II (*Type II Secretion System*, T2SS) también se identificó en este patógeno y media la translocación de múltiples proteínas del espacio periplasmático al espacio extracelular. Este sistema está compuesto por entre 12 y 15 proteínas denominadas Gsp (*General Secretory Pathway*), que actúan de manera conjunta secretando al exterior celular diversos factores de virulencia. Entre las moléculas que exporta destacan las lipasas LipA y LipH, así como la proteasa CpaA. Las proteínas LipA y CpaA requieren chaperonas para su secreción que se encuentran codificadas en las regiones adyacentes a sus efectores afines. Se ha demostrado que este sistema es necesario para la virulencia tanto en *G. mellonella* como modelos murinos de infección pulmonar (Harding *et al.*, 2016).

Por último, el sistema de tipo VI (*Type VI Secretion System*, T6SS) posee una estructura conformada por las proteínas Tss y secreta las proteínas Hcp (*Hemolysin Co-regulated Protein*) y VgrG (*Valine Glycine Repeat protein*) facilitando la inyección de proteínas efectoras en la célula diana (Elhosseiny y Attia, 2018). En *A. baumannii* tiene un papel en la competición entre especies bacterianas inyectando efectores que pueden tener actividad bacteriostática o bactericida en otras bacterias (Carruthers *et al.*, 2013).

1.5.7. Proteínas implicadas en la formación de *biofilm* y la adherencia

A. baumannii tiene una enorme capacidad para sobrevivir en diversos ambientes e interactuar con distintos tipos de superficies. Esto le permite permanecer durante largos periodos de tiempo en superficies inertes y colonizar diversos tipos de material hospitalario como catéteres o equipos de respiración mecánica. Junto a esto, es capaz de adherirse a superficies bióticas como las células epiteliales humanas lo que constituye un primer paso en la colonización y la subsecuente infección (Lee *et al.*, 2008).

La capacidad de adherencia tanto a superficies abióticas como bióticas conlleva la formación de *biofilms*. Los *biofilms* son estructuras multicelulares complejas asociadas a una superficie en la que las células se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas. Estos constituyen una barrera protectora hacia la bacteria que le permite sobrevivir en condiciones adversas y durante el proceso de infección. Además, las bacterias que forman parte de los *biofilm* son menos susceptibles a los agentes antimicrobianos. Esto puede ser debido a que el antimicrobiano no consigue penetrar en todo el *biofilm*, o bien porque algunas de las células que forman parte de este se encuentran en un estado estacionario de crecimiento (Costerton *et al.*, 1999).

La formación de *biofilm* comienza con la adhesión inicial y la formación de microcolonias. Esta adhesión puede tener lugar sobre superficies abióticas principalmente gracias a interacciones hidrofóbicas o electrostáticas; o bien sobre superficies bióticas, mediada por proteínas de la superficie celular. La maduración del *biofilm* permite la formación de una estructura tridimensional bien organizada que dispone de canales para el paso de nutrientes a las capas más profundas. El paso final es el desprendimiento del *biofilm*, que permite la dispersión de células platónicas colaborando así a su propagación (Costerton *et al.*, 1999). En la figura 1.11 se representan estas etapas de manera esquemática.



Figura 1.11. Representación de las etapas de formación de un *biofilm*. Imagen modificada de Cogan *et al.* (2016).

La mayoría de las cepas clínicas de *A. baumannii* son capaces de formar *biofilms*, lo que supone un punto importante para la colonización de los tejidos y la supervivencia en el material hospitalario (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). Son varios los elementos que están involucrados en la formación de *biofilm*, entre ellos se encuentran los polisacáridos de superficie, la proteína OmpA, los sistemas de secreción de los que se ha hablado anteriormente, el operón

Introducción

CsuA/BABCDE, la proteína Bap (*biofilm-associated protein*) y el *quorum sensing* (Longo *et al.*, 2014).

1.5.7.1. Operón *CsuA/BABCDE*

Los *pili* son estructuras filamentosas presentes en la superficie bacteriana que constituyen factores de virulencia clave en múltiples patógenos. En las bacterias gram negativas estos se clasifican según su ruta de ensamblaje en: *pili* ensamblados mediante la ruta *chaperone-usher*, *pili* de tipo IV, *curli pili* y *pili* ensamblados mediante una ruta alternativa a la ruta *chaperone-usher* (Proft y Baker, 2009). En *A. baumannii* los *pili* de tipo IV tienen un papel clave en la motilidad, aspecto que se desarrollará en el apartado 1.6, mientras que los *pili* de tipo *chaperone-usher* participan en la formación de *biofilm*.

La producción de los *pili* mediante el sistema de secreción tipo *chaperone-usher* es un factor importante en la formación de *biofilm*. Estos son apéndices localizados en la superficie bacteriana que permiten el reconocimiento y la adhesión a las células del hospedador. Este sistema se encuentra agrupado en *clusters* de genes formados por un *usher*, una chaperona y un gen que codifica la subunidad del *pili* (Busch y Waksman, 2012).

En *A. baumannii* el sistema más estudiado es el operón *CsuA/BABCDE chaperone-usher complex*. La capacidad de formar *pili* está relacionada con la expresión del gen *csuE* que forma parte de este operón. Estudios realizados en la cepa ATCC 19606 demostraron que la interrupción de este gen está relacionada con la inhibición de la formación de *biofilm*. Junto a ello, mediante microscopía electrónica, se analizó este mutante y se comprobó que carecía de *pili*, por lo que la eliminación de este gen provoca la abolición de la producción de *pili*. Por tanto, el gen *csuE* resulta clave para el ensamblaje y producción de *pili*, necesarios para la adhesión (Tomaras *et al.*, 2003).

Este operón se encuentra bajo el control de un sistema de regulación de dos componentes que comprende un sensor quinasa (*BfmS*) y un regulador de respuesta (*BfmR*). La inactivación del gen que codifica *BfmR* resulta en una pérdida de expresión del operón y, por tanto, una abolición de la producción de *pili* y, consecuente, incapacidad de formar *biofilm*. Sin embargo, el mutante defectivo en el gen *bfmS* presentaba una menor capacidad para formar *biofilm*, aunque su formación no se encuentra totalmente abolida (Tomaras *et al.*, 2008).

1.5.7.2. Proteína Bap (*Biofilm-associated protein*)

Otra proteína importante en este proceso es la proteína de membrana homóloga a la proteína *Biofilm-associated protein* (Bap) de *Staphylococcus* spp., recientemente identificada en *A. baumannii*. Esta proteína ha sido identificada por primera vez en *S. aureus* y desde entonces se ha encontrado en otros muchos microorganismos tanto gram positivos como gram negativos.

En *A. baumannii* la proteína Bap no parece estar implicada en la adhesión primaria para la formación de *biofilm* como ocurre con la homóloga de *S. aureus*. Sin embargo, sí se encuentra relacionada con el mantenimiento de la estructura del *biofilm* maduro y tiene un papel en la interacción célula-célula en este. Mediante microscopía y análisis de imágenes tridimensionales de *biofilms* en crecimiento, se observó que el mutante defectivo en este gen es incapaz de mantener el espesor y grosura del *biofilm*, mostrando que esta proteína es necesaria para el desarrollo de la estructura de *biofilm* maduro (Loehfelm *et al.*, 2008).

En un estudio reciente en el que se analizó el genoma de 541 cepas de *A. baumannii* se observó que la proteína Bap es polimórfica, pudiendo distinguirse tres variantes. Junto a ello, en especies del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* se han identificado dos nuevas proteínas denominadas BLP1 y BPL2 (*Bap-Like Proteins* 1-2), cuya secuencia tiene el mismo motivo que Bap en la región N-terminal. Mutantes defectivos en estos genes mostraron una reducción en la formación de *biofilm* y la adherencia a las células epiteliales (De Gregorio *et al.*, 2015).

1.5.7.3. Quorum sensing

Las bacterias producen sustancias químicas que permiten la comunicación intercelular y, además, son capaces de detectar las condiciones ambientales e intercambiar información a través de moléculas de señalización. Pueden detectar la concentración de estos compuestos con el fin de expresar determinados genes y desarrollar una respuesta específica y colectiva. Este mecanismo recibe el nombre de *quorum sensing* y se trata de un sistema de estímulos y respuestas relacionados con la densidad poblacional. Este se encuentra vinculado a multitud de procesos bacterianos como la formación de *biofilm*, esporulación, bioluminiscencia o motilidad (Whitehead *et al.*, 2001).

Normalmente, las moléculas señal más comunes son las derivadas de N-Acil Homoserin Lactonas (AHLs), formadas por un anillo de homoserin lactona y un ácido graso unido mediante

Introducción

un enlace amida que constituye la cadena lateral de longitud variable. El sistema más común de AHLs en bacterias gram negativas está mediado por las proteínas LuxI y LuxR. Las moléculas señal AHLs, producidas por la sintasa LuxI, difunden al interior celular y se acumulan hasta que se alcanza una concentración suficiente. Cuando esto sucede las AHLs se unen a la proteína reguladora LuxR y esto provoca la activación o represión de los genes diana del *quorum sensing*. En muchos casos, el gen *luxI* es una diana del complejo LuxR-AHL, de forma que se produce una autoinducción del circuito (Williams *et al.*, 2007).

En *A. baumannii* el *quorum sensing* parece tener un papel importante en los procesos de adherencia, formación de *biofilm* y motilidad. El sistema consta de dos componentes homólogos a los mencionados anteriormente, la sintasa AbaI y la proteína de unión a las AHLs, AbaR. La proteína AbaI es la única sintasa autoinducible identificada en el genoma de *A. baumannii*. La interrupción del gen que codifica esta enzima resulta en la incapacidad para la producción de moléculas señal. Además, esto se relaciona con una reducción en la formación de *biofilm* en el mutante en comparación con la cepa isogénica parental. Asimismo, la adición exógena de una AHL sintética restaura la capacidad de formación de *biofilm* en los mutantes con este gen interrumpido (Niu *et al.*, 2008).

Por otro lado, se realizó un estudio con AHLs sintéticas en busca de activadores e inhibidores del regulador AbaR. Los resultados revelaron que *A. baumannii* emplea N-(3-hidroxdodecanoil)-L-homoserinlactona y compuestos similares como moléculas señal para activar el *quorum sensing*. En cuanto a los antagonistas del sistema, se encontró que AHLs con grupos aromáticos acilo actúan reprimiendo a AbaR, siendo algunos de ellos capaces de inhibir la motilidad o la formación de *biofilm*. Esto ha puesto de manifiesto que una posible estrategia para evitar la infección por este patógeno podría ser el uso de AHLs sintéticas con el fin de inhibir estos dos procesos (Stacy *et al.*, 2012).

Por último, mediante el estudio de 50 cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. formadoras de *biofilm*, se caracterizaron los tipos de AHLs producidas. Los resultados revelaron que existía una gran diversidad de AHLs entre las distintas cepas pudiendo algunas de ellas producir más de un tipo de estas moléculas. Esto indica que posiblemente la formación de *biofilm* sea un evento multifactorial y las señales del *quorum sensing* son solamente uno de los factores implicados en este proceso (Anbazhagan *et al.*, 2012).

1.5.8. Estructuras y proteínas implicadas en la resistencia a la desecación

La resistencia a la desecación es la habilidad de mantener la viabilidad bajo condiciones de sequedad ambiental. En *A. baumannii* representa un factor clave para su supervivencia en el ambiente hospitalario durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, las bases moleculares de este proceso no se conocen en profundidad debido a que se trata de un fenómeno multifactorial (Jawad *et al.*, 1998).

La resistencia a la desecación en este patógeno nosocomial podría encontrarse vinculada a componentes de la pared celular como la cápsula o el lípido A. En la especie no patogénica *A. calcoaceticus* se observó que los polisacáridos de la cápsula favorecen la supervivencia en condiciones de sequedad ambiental. La cepa encapsulada es capaz de resistir hasta un 30% más que el mutante sin cápsula, incluso en colonias mixtas la supervivencia es mayor que en aquellas del mutante sin cápsula (Ophir y Gutnick, 1994). En *A. baumannii*, se cree que esto podría tener también un papel importante en la resistencia a la desecación debido a la habilidad de la cápsula para retener agua. Relacionado con esto, se encuentra la capacidad de formar *biofilm*, proceso en el que se aumenta la producción de polisacárido capsular para envolver a las células. Para comprobar la relación entre la formación de *biofilm* y la persistencia a la desecación, se estudió la capacidad para sobrevivir sobre cubreobjetos sometidos a distintas condiciones de temperatura y humedad de cepas formadoras y no formadoras de *biofilm*. Mediante microscopía electrónica, se observó que en condiciones de desecación las células de clones formadores de *biofilm* se encuentran formando conglomerados cubiertos por una capa de exopolisacárido. Contrariamente, las células de las cepas no formadoras de *biofilm* no muestran esta capa y aparecen deshidratadas (Espinal *et al.*, 2012).

Recientemente, un estudio ha relacionado la resistencia a la desecación con la acilación del lípido A. Se construyó un mutante defectivo del gen *lpxM*, que codifica una enzima implicada en la adición de grupos acilos durante la biosíntesis del lípido A, y se comprobó que es incapaz de sobrevivir durante largos periodos de desecación. Esto sugiere que, tal vez, cambios en la composición de los lípidos de la membrana podrían resultar en variaciones en la fluidez de esta, alterando su capacidad de retención de agua y afectando esto a la supervivencia a la desecación (Boll *et al.*, 2015).

Por otro lado, se han tratado de identificar otros mecanismos que participan en la resistencia bajo condiciones limitantes de agua y nutrientes. Para ello, se cuantificaron las proteínas sobreexpresadas en una cepa clínica en estas condiciones empleando MALDI-TOF y

Introducción

espectrometría de masas. Entre las proteínas detectadas se encontraron mayoritariamente proteínas de membrana y periplasmáticas, así como proteínas relacionadas con la resistencia a antimicrobianos como la β -lactamasa OXA-51 o bombas de flujo como el transportador RND AdeIJK, ambos anteriormente mencionados. Además, se observó que en la población existían células viables pero no cultivables que se definieron como células en estado inactivo capaces de resistir durante largos períodos de tiempo (Gayoso *et al.*, 2014).

Otro hecho a tener en cuenta es que, durante la desecación, no solamente se produce una pérdida de agua, sino que se trata de un proceso que provoca daños en el DNA de las bacterias. Estos daños provocan la activación del sistema SOS cuya proteína activadora es la recombinasa RecA. En *A. baumannii* la inactivación del gen que codifica esta proteína resulta en una mayor sensibilidad a la desecación. Esto demuestra que RecA tiene un papel clave participando en la protección frente a la desecación. Además, estudios de virulencia *in vitro*, empleando macrófagos, e *in vivo*, en un modelo murino, demostraron que también colabora en la patogénesis (Aranda *et al.*, 2011).

Por último, la capacidad de sobrevivir a condiciones limitantes de agua muestra una gran variabilidad entre las diferentes cepas. Entre las cepas de importancia clínica, algunas muestran una enorme resistencia bajo estas condiciones, permitiéndoles permanecer en el ambiente hospitalario durante largos períodos. Un ejemplo de ello es la cepa *A. baumannii* AYE, aislada en un brote producido en un hospital francés en 2001, que puede mantenerse viva en superficies secas hasta más de 100 días (Antunes *et al.*, 2011b).

1.6. Motilidad

Las bacterias pueden permanecer localizadas o bien desplazarse para ocupar nuevas áreas o invadir los tejidos del hospedador dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y de las condiciones de la superficie. El hecho de desplazarse como un grupo presenta varias ventajas como son el crecimiento y la supervivencia, teniendo distintos tipos de células realizando funciones especializadas, facilidad de acceso a los nutrientes y mecanismos de defensa que protegen de condiciones de estrés como la desecación. Por ello, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos para desplazarse y adaptarse al ambiente.

Actualmente, se distinguen varios tipos de motilidad en función del mecanismo o estructura responsable del movimiento: *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding* y *sliding*. Estas

clases de motilidad no son excluyentes entre sí, pudiendo existir bacterias capaces de desplazarse mediante más de un mecanismo (Harshey, 2003). En la Tabla 1.3 se resumen las características generales de los tipos de motilidad y en la figura 1.12 aparecen representados.

Tabla 1.3. Características generales de los diferentes tipos de motilidad. Modificada de Harshey (2003).

Tipo de motilidad	Estructuras implicadas	Diferenciación celular	Velocidad de movimiento ($\mu\text{m/s}$)	Movimiento
<i>Swarming</i>	Flagelos	Sí	2-10	Activo
<i>Swimming</i>	Flagelos	No	< 40	Activo
<i>Twitching</i>	Pili de tipo IV	No	0,06-0,3	Activo
<i>Gliding</i>	Diversas, depende del microorganismo	No	0,025-0,1	Activo
<i>Sliding</i>	Ninguna	No	0,03-6	Pasivo

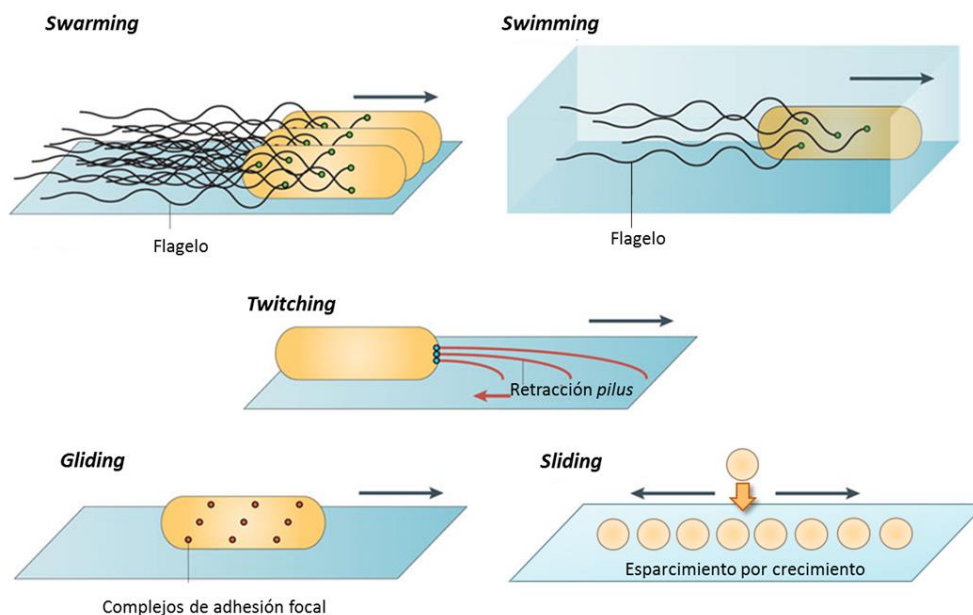


Figura 1.12. Representación esquemática de los tipos de motilidad bacteriana. Imagen modificada de Kearns (2010).

1.6.1. Clasificación de la motilidad bacteriana

1.6.1.1. *Swarming*

Entre los movimientos mediados por flagelos uno de los más estudiados es el *swarming* o movimiento en enjambre. Se trata de un movimiento multicelular producido por la rotación del flagelo que permite a las bacterias desplazarse de manera coordinada. Este tipo de movimiento se ha identificado en múltiples géneros de bacterias tanto gram negativas como *Proteus*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*; como en gram positivas como *Bacillus* o *Clostridium* (Fraser y Hughes, 1999). Mediante el *swarming* las células se desplazan en grupo colonizando toda la superficie disponible pudiendo alcanzar una velocidad de 10 $\mu\text{m/s}$.

Entre las bacterias que realizan *swarming* se distinguen dos clases: *swarmers* robustos y *swarmers* moderados. El primer grupo se caracteriza por ser capaces de moverse en placas con elevada concentración de agar, más del 1,5% de agar. Estas bacterias, como *Vibrio* o *Proteus*, se encuentran hiperflageladas y presentan una morfología hiperelongada cuando realizan esta clase de movimiento. Sin embargo, los *swarmers* moderados, como *Escherichia* o *Pseudomonas*, son capaces de desplazarse únicamente en placas con baja concentración de agar, 0,5-0,8% de agar. A diferencia de los miembros del otro grupo, estas bacterias no presentan cambios tan drásticos en su morfología cuando realizan este tipo de movimiento (Partridge y Harshey, 2013).

1.6.1.2. *Swimming*

El movimiento de tipo *swimming*, a diferencia del anterior, es un movimiento individual que se produce por la rotación del flagelo y tiene lugar en medio líquido. Bacterias como *E. coli*, *S. enterica* o *P. aeruginosa* presentan este tipo de movimiento y pueden llegar a alcanzar una velocidad de hasta 40 $\mu\text{m/s}$ (Kearns, 2010).

El *swimming* ha sido muy estudiado en las últimas décadas, por lo que la implicación del flagelo en este desplazamiento se encuentra bien caracterizada. Los flagelos emergen de la superficie celular y se encuentran dirigidos por un motor basal. Este motor emplea como fuente de energía el gradiente de protones transmembrana. El flagelo consta de un largo filamento helicoidal, una corta estructura curvada denominada *hook* y un cuerpo basal constituido por una barra central y varios anillos. Los dos primeros componentes se sitúan en la región externa de la célula mientras que el cuerpo basal se localiza embebido en la superficie celular (Kearns, 2010).

El motor flagelar puede girar en sentido de las agujas del reloj (*ClockWise*, CW) o en sentido contrario a las agujas del reloj (*CounterClockWise*, CCW), dirigiéndose así la dirección del movimiento. Cuando se produce la rotación del motor en sentido CCW se provoca una onda que hace que los flagelos se coloquen formando un haz que ejerce un empuje sobre la célula provocando un desplazamiento relativamente lineal. Sin embargo, si la rotación del motor ocurre en sentido CW, este haz se dispersa y los flagelos se mueven de manera descoordinada lo que causa un movimiento aleatorio. La alternancia entre estos dos sentidos de rotación provoca un desplazamiento al azar que permite a las bacterias responder a los estímulos ambientales. Cuando se encuentran en presencia de un estímulo atrayente, aumenta la rotación en sentido CCW y disminuye la de sentido CW (Blair, 1995; Harshey, 2003).

1.6.1.3. *Twitching*

En cuanto a los movimientos mediados por *pili* únicamente se distingue el *twitching*, que se trata de un movimiento de superficie producido por la extensión y retracción de los *pili* de tipo IV. Este se caracteriza por conferir un movimiento que permite a las bacterias avanzar a una velocidad de 0,06-0,3 $\mu\text{m/s}$ (Harshey, 2003). El *twitching* se puede producir tanto en superficies orgánicas como inorgánicas, incluyendo células epiteliales, plásticos, vidrio o metal. Además, pese a que en un primer momento se pensó que era un movimiento únicamente social, también pueden desplazarse ligeramente mediante *twitching* células individuales en contacto con sustratos inertes o a bajas concentraciones de agar. El *twitching* se encuentra implicado en la colonización del hospedador y otras formas de comportamiento colonial como la formación de *biofilm* y en el desarrollo de cuerpos fructíferos. Varias bacterias patógenas presentan este tipo de motilidad entre las que destacan *P. aeruginosa*, *A. baumannii* o *Neisseria gonorrhoeae* (Mattick, 2002; Harding *et al.*, 2013).

La extensión y retracción de los *pili* de tipo IV son clave para este tipo de movimiento. Los *pili* son apéndices multiproteicos de alrededor de 5-7 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud que son capaces de ensamblarse y desensamblarse rápidamente participando también en otros procesos como la transformación y la adherencia a superficies (Mattick, 2002). Estudios llevados a cabo en *P. aeruginosa* con *pili* marcados con un compuesto fluorescente mostraron que se extienden y retraen a aproximadamente una velocidad de 0,5 $\mu\text{m/s}$ (Skerker y Berg, 2001).

Introducción

Los *pili* son estructuras que se encuentran formadas por una pequeña subunidad proteica denominada PilA o pilina que se organiza en una conformación helicoidal con 5 subunidades por vuelta. Estas subunidades son sintetizadas como pre-pilina y procesadas por la proteína PilD para convertirse en PilA. Las subunidades de PilA son ensambladas en la proteína de la membrana interna PilC para formar el *pilus*. Este filamento emerge al exterior a través de la secretina de la membrana externa conocida como PilQ y se encuentra fusionado a la proteína de adhesión PilY. La transcripción del gen que codifica la proteína PilA se encuentra controlada por un sistema regulador de dos componentes formado por PilS y PilR. PilS es un sensor quinasa cuya autofosforilación provoca la fosforilación del regulador de respuesta PilR, aumentando la transcripción de *pilA* (Burrows, 2012). En la Figura 1.13 se representan los componentes que conforman el *pilus* de tipo IV.

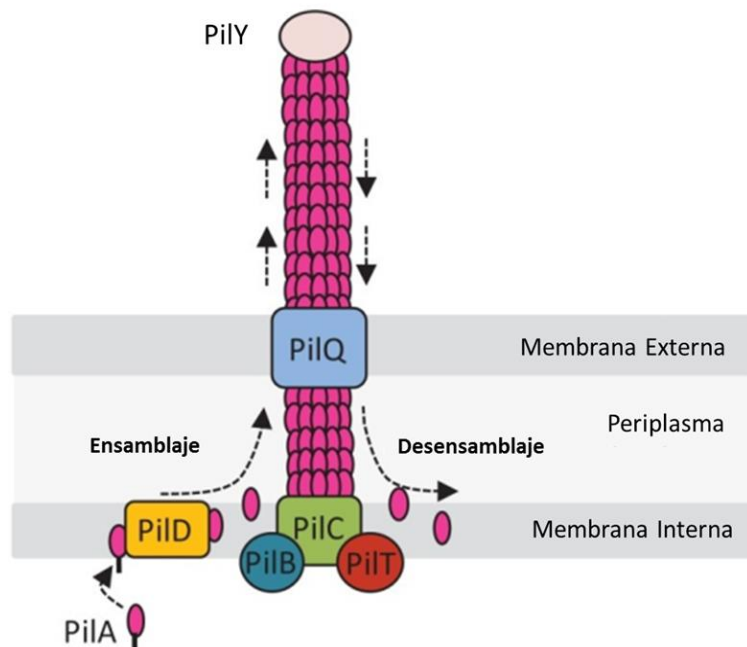


Figura 1.13. Estructura del *pilus* de tipo IV. Imagen modificada de Burdman *et al.* (2011).

Durante el *twitching*, el *pilus* se adhiere a la superficie y mediante su retracción acerca a la célula a la zona donde se ha adherido. Esta retracción se produce por el desensamblaje del filamento formado por subunidades de PilA. Este proceso está mediado por la proteína PilT que promueve el desensamblaje de los *pili*, la degradación de PilA o ambos. Después de la retracción, el *pilus* se vuelve a ensamblar por un proceso en el que participa PilB. A continuación, se extiende de nuevo iniciándose un nuevo ciclo de extensión y retracción que permite el avance de la célula (Mattick, 2002).

Los mecanismos que controlan el movimiento de tipo *twitching* han sido muy estudiados en el patógeno *P. aeruginosa*, en el cual se relaciona con un sistema denominado Pil-Chp. Los genes *pil-chp* se sitúan en el *cluster* de genes IV y muchas de las proteínas que codifican son similares a las que participan en la ruta de quimiotaxis mediada por flagelos. Dicho sistema, representado en la Figura 1.14, está formado por un módulo sensor que consta de un único receptor de pared denominado PilJ que es una MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein). Este se encuentra anclado a una histina quinasa denominada ChpA mediante las proteínas PiiI y ChpC. Cuando PilJ detecta un estímulo se induce la autofosforilación de ChpA y, a continuación, esta proteína fosforila a PilG y PilH, que interactúan con el motor del *pilus* de tipo IV controlando el *twitching*. La proteína PilG fosforilada interactúa con las proteínas de ensamblaje PilB y PilZ y con la deguanilato ciclasa FimX, mientras que PilH fosforilada media la retracción del *pilus* interactuando con PilT y PilU. La integración de estas dos rutas se encuentra mediada por la metilesterasa ChpB y la metiltransferasa PilK (Sampedro *et al.*, 2015).

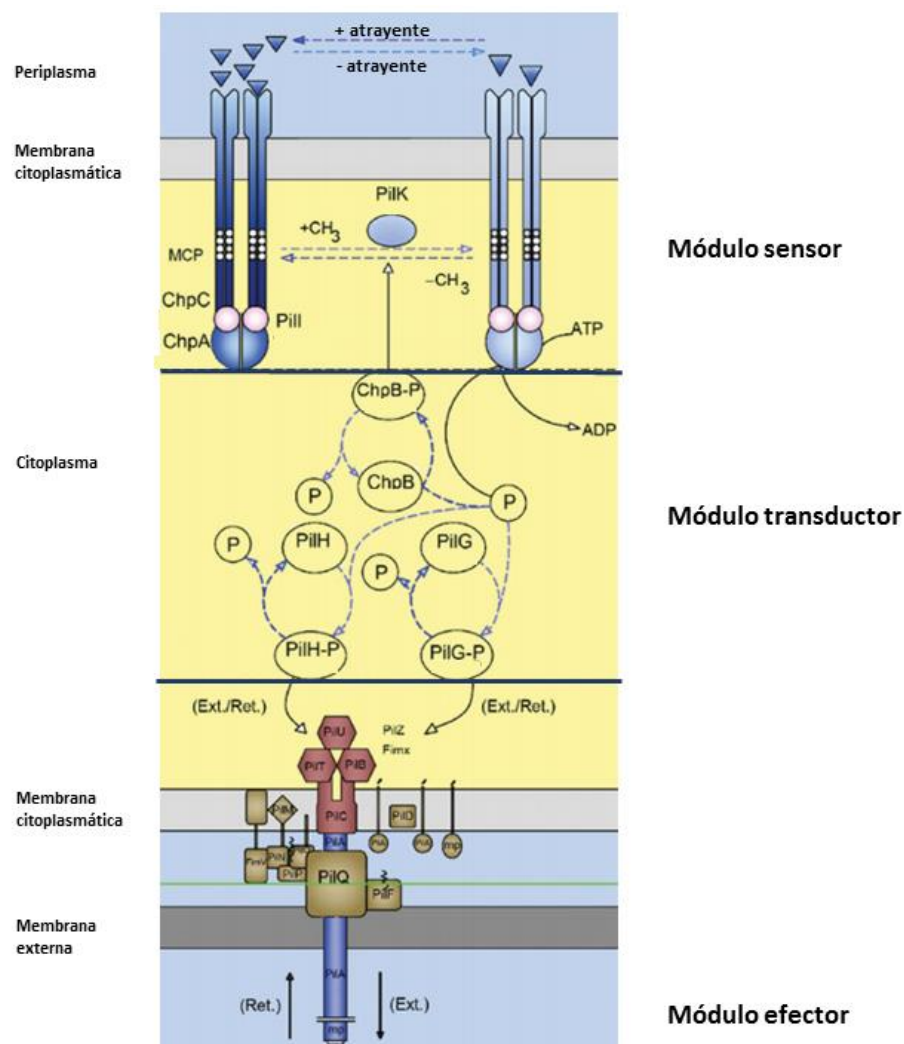


Figura 1.14. Representación esquemática de la hipotética ruta de quimiotaxis de *P. aeruginosa*. Imagen modificada de Sampedro *et al.*, (2015).

Introducción

1.6.1.4. *Gliding*

El *gliding* es un movimiento activo de superficie que no requiere apéndices celulares como flagelos o *pili* y que se produce a lo largo del eje de la célula. Este tipo de movimiento, a diferencia de los tres anteriores que se encuentran vinculados a superficies húmedas, se produce en superficies más firmes y secas. Este peculiar movimiento es característico de tres grupos de bacterias: las mixobacterias, las cianobacterias y el grupo *Cytophaga-Flavobacterium* (Harshey, 2003).

El *gliding* tradicionalmente se ha definido basándose más en las estructuras que no se utilizan (flagelos y *pili*) que en los motores que dirigen este movimiento debido a que no se han apreciado estructuras externas relacionadas. Recientemente, el estudio de genomas de diversas especies, las avanzadas técnicas de microscopía electrónica y de fluorescencia han permitido esclarecer ligeramente las bases de este movimiento. Varios mecanismos se encuentran relacionados con el *gliding* como los canales de protones y elementos del citoesqueleto en mixobacterias o los canales de secreción y adhesinas en flavobacterias (Nan y Zusman, 2016). La enorme diversidad de procesos que median este movimiento hace que las velocidades alcanzadas sean muy diversas según el grupo de microorganismos. De acuerdo con esto, las mixobacterias pueden alcanzar velocidades de entre 0,025-0,1 $\mu\text{m/s}$, y tanto las cianobacterias como el grupo *Cytophaga-Flavobacterium* de 2-4 $\mu\text{m/s}$ (McBride, 2001).

1.6.1.5. *Sliding*

El *sliding* es un movimiento pasivo de superficie producido por el crecimiento y facilitado por un surfactante u otros compuestos que ayudan a reducir la tensión superficial. Se produce por la acción de fuerzas de expansión que se transmiten del centro a los bordes de la colonia que está creciendo, sin embargo, el mecanismo por el que se rige este movimiento no ha sido caracterizado totalmente. Las velocidades alcanzadas mediante este movimiento oscilan entre 0,03 $\mu\text{m/s}$ en *Mycobacterium* hasta 2-6 $\mu\text{m/s}$ en *Serratia* (Harshey, 2003).

En los últimos años, se han clasificado las bacterias que realizan *sliding* en tres grupos según el compuesto adicional que necesitan. En el primero de ellos, se encuentran bacterias como *Serratia* o *Pseudomonas* que requieren únicamente la fuerza ejercida por el crecimiento celular y surfactantes. Los miembros del segundo grupo entre los que se encuentran *Bacillus* y *Sinorhizobium* requieren compuestos secretados adicionales como exopolisacáridos.

Finalmente, el tercer grupo se encuentra compuesto por bacterias que necesitan la fuerza ejercida por el crecimiento y otros compuestos que no son surfactantes como es el caso de *Mycobacterium* (Hölscher y Kovács, 2017).

1.6.2. Motilidad en *A. baumannii*

A pesar de que el nombre del género *Acinetobacter* proviene del griego “akineto” que significa “inmóvil” debido a la ausencia de flagelos, actualmente, se sabe que esta bacteria es capaz de moverse mediante dos tipos de movimiento: *twitching* y *surface-associated motility*. El primero de ellos depende de los *pili* de tipo IV mientras que el segundo es un tipo de movimiento característico del género *Acinetobacter* que le permite desplazarse por superficies semisólidas y no depende de los *pili* (Skiebe *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2017).

La capacidad de este microorganismo de desplazarse fue descrita en detalle por primera vez por Henrichsen, quien estudió la motilidad de 16 cepas distintas de *A. calcoaceticus* y relacionó la presencia de *pili* con la motilidad. Mediante microscopía electrónica observó que las cepas no móviles no poseían *pili* polares mientras que las que eran capaces de desplazarse mediante *twitching* sí (Henrichsen y Blom, 1975).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el movimiento de tipo *twitching* está relacionado con los *pili* de tipo IV. Estos apéndices son capaces de ensamblarse y desensamblarse rápidamente produciéndose ciclos de adhesión y retracción que permiten el avance de las células a través de la superficie. Pese a que los mecanismos de motilidad de *A. baumannii* no han sido todavía esclarecidos, varias investigaciones han puesto de manifiesto que este patógeno se mueve a través de superficies semisólidas mediante *twitching*.

Mediante el análisis bioinformático de genomas completos de *A. baumannii* se ha demostrado la presencia de genes relacionados con los *pili* de tipo IV, así como, genes implicados en su ensamblaje, en el movimiento de tipo *twitching* y la subunidad del *pilus* denominada PilA (Eijkelkamp *et al.*, 2011b). En un estudio transcripcional realizado en la cepa ATCC 17978 bajo condiciones limitantes de hierro en el medio, se observó que varios genes relacionados con los *pili* de tipo IV presentaban un nivel de expresión menor. Entre ellos se encontraban varios genes relacionados con la biosíntesis de los *pili* de tipo IV como *pilB*, *pilT*, *pilU* o *comM-O*. También mostraron un patrón de expresión alterado genes relacionados con la quimiotaxis y la regulación de este complejo, como *pilJ* y *pilR* o *pilS*. Asimismo, ensayos de motilidad realizados bajo

Introducción

condiciones limitantes de hierro revelaron que la cepa ATCC 17978 es incapaz de desplazarse en un medio semisólido. Esto puso de manifiesto que podría existir una correlación entre la baja expresión de estos genes y la ausencia de motilidad (Eijkelkamp *et al.*, 2011b).

Por otro lado, la secuenciación del genoma de varias cepas clínicas de *A. baumannii* capaces de desplazarse mediante *twitching* confirmó la presencia de genes relacionados con los *pili* de tipo IV. La mayoría de estos genes muestran un elevado nivel de conservación entre las diferentes cepas, a excepción del gen que codifica la subunidad del *pilus* PilA (Eijkelkamp *et al.*, 2011b). Junto a ello, el análisis estructural de esta proteína en dos cepas de *A. baumannii* y en una de *A. nosocomialis* evidenció el elevado grado de variación estructural entre sus secuencias (Piepenbrink *et al.*, 2016). Asimismo, se realizaron estudios con virstatina, un inhibidor de la formación de los *pili* de tipo IV en *Vibrio cholerae*, para estudiar su efecto en la motilidad en la cepa ATCC 17978. En los ensayos de motilidad, se observó que la adición de este compuesto en las placas reducía notablemente el desplazamiento. Además, mediante microscopía se observó que las células tratadas con esta sustancia presentan una drástica reducción en el número de *pili*. Por tanto, esto corroboró la hipótesis de que la biogénesis de los *pili* de tipo IV es necesaria para la motilidad en este patógeno (Nait Chabane *et al.*, 2014).

Paralelamente, en un estudio reciente con la cepa M2 de *A. baumannii* se observó que la inactivación del gen *pilT*, que codifica una ATPasa responsable de la retracción de los *pili* en otras bacterias, origina una reducción significativa de la motilidad (Clemmer *et al.*, 2011). Un aspecto interesante relacionado con la motilidad en *A. baumannii* es el descubrimiento de la existencia de un fenotipo de opacidad de las colonias variable de fase. En la cepa *A. baumannii* AB5075 se identificaron dos tipos de colonias: opacas y translúcidas, capaces de interconvertirse entre sí. Estas dos variantes de colonias mostraron notables diferencias fenotípicas entre las que destacan diferencias en la motilidad. Las colonias translúcidas mostraron tener una menor capacidad de desplazarse, así como una menor virulencia en el modelo de *G. mellonella* (Tipton *et al.*, 2015). Este fenómeno también se observó en los mutantes de la cepa M2 de *A. baumannii* con el gen *pilT* interrumpido, ya que las colonias translúcidas no presentan motilidad. Sin embargo, las colonias opacas de este mutante sí son capaces de desplazarse (Clemmer *et al.*, 2011).

Por otro lado, con el fin de constatar si existe una relación entre motilidad y *quorum sensing*, también se interrumpió el gen *abal*, una sintasa autoinductora que media la producción de moléculas señal. Este mutante presenta una motilidad reducida pero al añadir al medio homoserin lactona se restaura su fenotipo, indicando que existe una relación entre motilidad y

quorum sensing. Además, mediante mutagénesis por inserción de transposones se identificaron otros genes implicados en el movimiento, como la porina OmpA, el gen *purK* implicado en la síntesis *de novo* de purinas o genes homólogos a acil-CoA deshidrogenasas (Clemmer *et al.*, 2011).

En los años posteriores se realizaron otros estudios con el fin de profundizar en la comprensión de la relación de los *pili* de tipo IV y la motilidad en *A. baumannii*. La construcción de mutantes de los genes *pilA*, *pilD* y *pilT* en la cepa M2 resultó en la pérdida de la capacidad de transformación natural y del movimiento de tipo *twitching* (Harding *et al.*, 2013). Paralelamente, se observó que cepas clínicas de este patógeno son capaces de incorporar DNA mientras se desplazan a lo largo de superficies húmedas corroborando que *A. baumannii* emplea los *pili* de tipo IV para ambos procesos. Además, la construcción de mutantes defectivos en el gen *pilT* demostró que este es necesario para el movimiento de tipo *twitching* (Wilharm *et al.*, 2013). Todo esto se corroboró con los resultados obtenidos con la cepa ADP1 de *A. baylyi*, un miembro del género *Acinetobacter* no patógeno. En esta especie, los genes relacionados con la biosíntesis y regulación de los *pili* de tipo IV también se encuentran relacionados con la transformación natural y la motilidad (Leong *et al.*, 2017).

Por otro lado, mediante el estudio del perfil transcripcional de cepas de *A. baumannii* en fase de crecimiento exponencial en suero humano se trataron de identificar factores de virulencia en esta bacteria. Bajo estas condiciones, genes que codifican proteínas que participan en la biogénesis de *pili* de tipo IV se encuentran regulados positivamente. Este hecho indica que, probablemente, los *pili* de tipo IV podrían ser importantes para la colonización durante la bacteremia facilitando la diseminación de este microorganismo (Jacobs *et al.*, 2012).

Finalmente, en los últimos años se ha empezado a distinguir el movimiento de tipo *twitching* del de *surface-associated motility*, aunque ambos términos se usaron de manera indiscriminada en estudios anteriores. Sin embargo, el hecho de que mutantes en genes relacionados con los *pili* continuaran moviéndose despertó la idea de la existencia de otro tipo de movimiento independiente de *pili*. El movimiento de tipo *surface-associated motility* presenta una apariencia similar en placa al *swarming* de *P. aeruginosa* aunque en *A. baumannii* no depende de flagelos ya que estos se encuentran ausentes en esta bacteria (Clemmer *et al.*, 2011; Harding *et al.*, 2013). Este tipo de movimiento similar al *swarming* ya se había detectado en este patógeno hace varias décadas aunque no se llegó a denominar *surface-associated motility* hasta hace unos pocos años (Clemmer *et al.*, 2011).

Introducción

Recientemente, el movimiento de tipo *surface-associated motility* se ha demostrado que está relacionado con la síntesis de 1,3-diaminopropano (DAP), la principal poliamina producida por *Acinetobacter* y de función desconocida. Mutantes de los genes *dar* y *ddc* implicados en la síntesis de esta molécula son deficientes en motilidad. Es posible que el DAP o un derivado de este funcione como molécula señal en la regulación de esta clase de movimiento. Junto a ello, se realizaron ensayos de virulencia en *G. mellonella*. En estos estudios se observó que las larvas infectadas con los mutantes presentaban una menor mortalidad, indicando que la motilidad podría contribuir a la virulencia de este microorganismo (Skiebe *et al.*, 2012).

Las condiciones de estrés y los genes de producción del lipopolisacárido son dos factores que afectan a este tipo de motilidad. Se ha comprobado que cuando varias cepas de *A. baumannii* son sometidas a condiciones de estrés la motilidad se ve reducida. Sin embargo, en condiciones de baja concentración de sal sucede lo contrario y se favorece el movimiento. Además, la disrupción del gen *lpsB*, que codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del LPS y de los genes *epsA/ptK* implicados en la síntesis de la cápsula, resulta en una pérdida de la motilidad. La complementación del mutante *lpsB* dio lugar a la restauración del fenotipo salvaje. Sin embargo, la complementación de los otros dos mutantes no revirtió el fenotipo, indicando un probable efecto polar en otros genes implicados en la motilidad (McQueary *et al.*, 2012). Por otro lado, recientemente, se ha comprobado que distintos mutantes resistentes a colistina deficientes en LPS muestran una reducción de la motilidad y de la virulencia en el modelo murino (Carretero-Ledesma *et al.*, 2018).

Otro sistema que está vinculado con la motilidad en *A. baumannii* es el homólogo al sistema de dos componentes OmpR-EnvZ de *E. coli*. Este sistema detecta los estímulos del ambiente y responde a ellos alterando la expresión de otros genes. OmpR es un factor de transcripción que regula la quinasa sensora EnvZ, permitiendo a la célula responder a señales externas. La delección del gen *ompR* se relacionó con una disminución de la motilidad, mientras que los efectos de la delección del gen *enzV* fueron notablemente menores (Tipton y Rather, 2017).

Otra ruta que podría estar implicada en la motilidad de este patógeno es la relacionada con la respuesta quimiotáctica. Así pues, se llevó a cabo la construcción en la cepa ATCC 17978 de un mutante defectivo del gen *A1S_2811*, que codifica un componente componente hipotético del sistema de quimiotaxis. Este mutante no solamente mostró una menor capacidad de formar *biofilm* sino que también mostró una reducción de la motilidad. Además, se observó una reducción del número de *pili* y una menor expresión del gen *abal* que, como ya se ha

comentado, está implicado en la síntesis de moléculas señal. El conjunto de estos resultados indica que el producto del gen *A1S_2811* podría estar relacionado con la motilidad regulando a los genes del operon *csu/ABCDE* y al *quorum sensing* (Chen *et al.*, 2017).

Asimismo, se ha demostrado que la motilidad en medio semisólido depende de la concentración y del tipo de agar (Figura 1.15). En placas con concentraciones de entre 0,25 a 0,45% de agar Difco, *A. baumannii* se desplaza formando ramificaciones que raramente se cruzan entre sí. Sin embargo, en placas con concentraciones de entre 0,30 a 0,50% de agar Eiken el movimiento se caracteriza por la expansión de las células en círculo desde el punto de inoculación hasta el borde de la placa. En ambos casos la motilidad se ve reducida conforme la concentración de agar o agarosa aumenta en el medio (Clemmer *et al.*, 2011; McQueary y Actis, 2011).

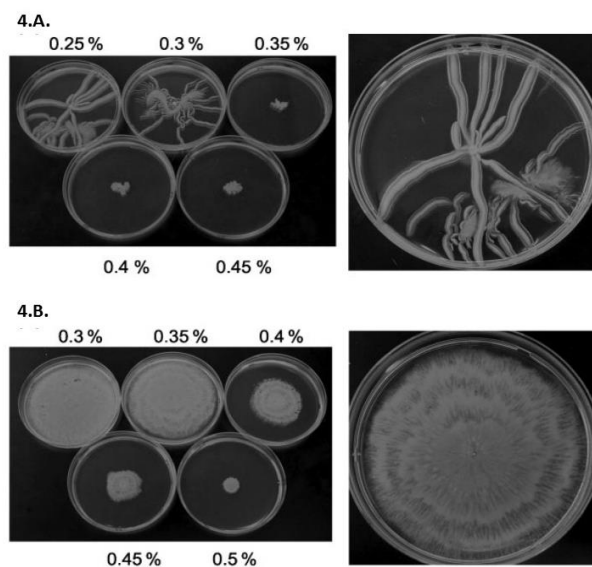


Figura 1.15. Patrones de motilidad de la cepa M2 de *A. baumannii* en placas de motilidad con agar Difco (4.A.) o con agar Eiken (4.B.) a distintos porcentajes de agar. Imagen modificada de Clemmer *et al.*, (2011).

Otro factor que se ha comprobado que influye en la motilidad en *A. baumannii* es la luz, concretamente la luz azul, ya que tanto la motilidad como la formación de *biofilm* se favorece al incubar las células en oscuridad. Esta respuesta a la luz se debe a la presencia del gen *blsA* denominado así porque codifica una proteína que tiene en su extremo N-terminal una flavina que detecta la luz azul (*blue-light-sensing A gene*). La motilidad aumenta al incubar las células en oscuridad y a una temperatura de 24°C (Mussi *et al.*, 2010). Junto a esto, recientemente, se identificó un operón denominado *prpABCD* (*photo-regulated pilus ABCD*) que codifica un *pilus* de tipo I regulado por la luz que está relacionado con la motilidad y la virulencia de este patógeno nosocomial (Wood *et al.*, 2018).

Introducción

Otro factor que se ha observado que influye en la motilidad de este patógeno es la procedencia de los aislados. En un estudio realizado con 60 cepas clínicas de este patógeno, obtenidas a partir de muestras de sangre y esputo de pacientes, se observó que los aislados del esputo formaban más *biofilm* que los de la sangre. No obstante, los aislados de la sangre presentaban una mayor motilidad que los de esputo. Esto podría ser debido a que *A. baumannii* necesita adherirse fuertemente a las células alveolares para facilitar la colonización, lo que se vería favorecido por la formación de *biofilm*. Esta fue la primera vez que se relacionaron estos dos rasgos fenotípicos y la naturaleza de los aislados en este patógeno nosocomial (Vijayakumar *et al.*, 2016).

Por último, la relación existente entre motilidad y virulencia en este patógeno nosocomial ha sido poco estudiada. Recientemente, se ha relacionado el fenotipo de hipermotilidad de un mutante de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 con un incremento de la virulencia (Eijkelkamp *et al.*, 2013). Sin embargo, no está claro si la ausencia de motilidad afecta a la virulencia y patogénesis de *A. baumannii* (McConnell *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2. Objetivos

Acinetobacter baumannii ha emergido en los últimos años como un microorganismo oportunista causante de diversas infecciones nosocomiales de difícil tratamiento. Esto es debido principalmente a su enorme facilidad para desarrollar mecanismos de resistencia a antimicrobianos, su capacidad de supervivencia en el ambiente hospitalario y a la presencia de factores de virulencia (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Harding *et al.*, 2017). De hecho, este patógeno nosocomial es considerado actualmente como uno de los microorganismos más preocupantes según *The Infectious Diseases Society of America*. Además, *A. baumannii* es capaz de desplazarse mediante un particular tipo de motilidad denominado *surface-associated motility*, un proceso poco estudiado en este microorganismo. En estudios previos sobre la mutagénesis inducida por daño en el DNA en *A. baumannii* se aislaron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina (Anexo I) que presentaban un patrón de motilidad alterado. En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la identificación de genes implicados en este tipo de motilidad, así como la determinación de su relación con la virulencia en *A. baumannii*. A continuación, se detallan los objetivos específicos de ese trabajo:

1. Aislamiento y caracterización de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* con patrón de motilidad alterado.
2. Estudio de la virulencia de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* con un patrón de motilidad alterado.
3. Identificación de nuevos genes implicados en la motilidad y la virulencia en *A. baumannii* mediante el análisis del perfil transcripcional de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina con motilidad alterada.

Dado que al alcanzar los objetivos anteriores se identificó una hipotética bomba de expulsión perteneciente a la superfamilia MFS, implicada en la motilidad y en la virulencia de *A. baumannii*, surgieron los siguientes objetivos adicionales:

4. Caracterización funcional de la bomba de expulsión AbaQ, codificada por el gen *AU097_RS17040* de *A. baumannii*.

Objetivos

5. Evaluación del papel de múltiples transportadores pertenecientes a las diferentes superfamilias de bombas de expulsión en la motilidad y en la virulencia de *A. baumannii*.

3 RESULTADOS

PUBLICACIONES

3.1. Estudio del patrón de motilidad y virulencia de mutantes espontáneos de *A. baumannii* resistentes a rifampicina y análisis de su perfil transcripcional

Mutations in the β -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*

Pérez-Varela M, Corral J, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Bou G, Aranda J, Barbé J

Infect Immun 85(8). 2017

Con el objetivo de identificar genes implicados en el *surface-associated motility* y la virulencia de *A. baumannii* se aislaron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de los que el 60% presentaba un patrón de *surface-associated motility* alterado. Los mutantes que perdían motilidad presentaban una sustitución aminoacídica en la glutamina 522 o en la serina 540 de la subunidad β de la RNA polimerasa, proteína diana de la rifampicina que se encuentra codificada por el gen *rpoB*. Los aislados restantes con un fenotipo de motilidad similar al de la cepa salvaje presentaban un cambio aminoacídico en el ácido aspártico 525. La complementación con el gen *rpoB* salvaje restableció la sensibilidad a rifampicina en todos los mutantes y la motilidad en aquellos que la habían perdido.

Por otro lado, con el fin de comprobar si la motilidad juega un papel clave en la patogénesis de *A. baumannii*, se realizaron ensayos de virulencia en el modelo de fertilidad del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes con pérdida de motilidad (Rif^{R5} y Rif^{R8}) presentan una disminución de la virulencia mientras que el mutante con motilidad similar a la cepa salvaje (Rif^{R3}) también presenta un nivel de virulencia similar a esta. La introducción del gen *rpoB* salvaje en los tres mutantes restauró la virulencia al nivel de la cepa salvaje. Además, la introducción en la cepa salvaje del gen *rpoB* amplificado utilizando el DNA genómico proveniente de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina, provocó que esta cepa desarrollara resistencia a rifampicina, así como el mismo patrón de motilidad y virulencia que el mutante del que procedía. Estos resultados ponen de manifiesto que las sustituciones nucleotídicas en el gen *rpoB* de los mutantes Rif^{R5} y Rif^{R8} son la causa de la pérdida de la motilidad y de la virulencia en *A. baumannii*.

El análisis de la expresión génica mediante microarrays de cDNA de los mutantes resistentes a rifampicina con pérdida de motilidad (Rif^{R5} y Rif^{R8}), permitió la identificación de 6 genes cuya expresión disminuye en los mutantes. Para determinar si estos genes participan en este tipo de motilidad, se construyeron mutantes mediante disrupción génica de los 6 genes

Artículo 1

comunes a ambos mutantes cuya expresión disminuía al menos dos veces con respecto a la cepa salvaje. Entre estos genes se encuentran el gen *AU097_RS14730*, que codifica un posible componente de un transportador de taurina; *AU097_RS16805*, cuyo producto es una aldeído deshidrogenasa, al igual que el gen *AU097_RS17030*; *AU097_RS17035*, que codifica una fumarilacetoacetato hidrolasa; *AU097_RS17040*, cuyo producto es un hipotético transportador de membrana de tipo MFS y *AU097_RS17045*, codificante de una dihidroxiácido deshidratasa. El estudio de la motilidad de los mutantes obtenidos reveló que la inactivación de 4 de estos genes (concretamente *AU097_RS14730*, *AU097_RS16805*, *AU097_RS17040* y *AU097_RS17045*) reducía la motilidad. Asimismo, estos mutantes mostraron una virulencia atenuada en el modelo de fertilidad de *C. elegans*, tanto en la cepa ATCC 17978 como en la cepa clínica MAR002.

Finalmente, el análisis *in silico* de 68 genomas de otras cepas, la mayoría procedentes de aislados clínicos, reveló que estos 4 genes, así como los genes situados inmediatamente *upstream* y *downstream* de ellos se encontraban presentes en 61 de los genomas analizados. Todo esto indica que los genes identificados son importantes en la motilidad de tipo *surface-associated motility* y en la virulencia de *A. baumannii*, y que pueden tener relevancia en la patogénesis, debido a su elevado grado de conservación en diversas cepas clínicas.



Mutations in the β -Subunit of the RNA Polymerase Impair the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii*

María Pérez-Varela,^a Jordi Corral,^a Juan Andrés Vallejo,^b Soraya Rumbo-Feal,^b Germán Bou,^b Jesús Aranda,^a Jordi Barbé^a

Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^a; Servicio de Microbiología-INIBIC, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), A Coruña, Spain^b

ABSTRACT *Acinetobacter baumannii* is a major cause of antibiotic-resistant nosocomial infections worldwide. In this study, several rifampin-resistant spontaneous mutants obtained from the *A. baumannii* ATCC 17978 strain that differed in their point mutations in the *rpoB* gene, encoding the β -subunit of the RNA polymerase, were isolated. All the mutants harboring amino acid substitutions in position 522 or 540 of the RpoB protein were impaired in surface-associated motility and had attenuated virulence in the fertility model of *Caenorhabditis elegans*. The transcriptional profile of these mutants included six downregulated genes encoding proteins homologous to transporters and metabolic enzymes widespread among *A. baumannii* clinical isolates. The construction of knockout mutants in each of the six downregulated genes revealed a significant reduction in the surface-associated motility and virulence of four of them in the *A. baumannii* ATCC 17978 strain, as well as in the virulent clinical isolate MAR002. Taken together, our results provide strong evidence of the connection between motility and virulence in this multiresistant nosocomial pathogen.

KEYWORDS *Acinetobacter baumannii*, surface-associated motility, *rpoB*, rifampin resistance

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacterium often responsible for nosocomial infections, based on its capacity to acquire and develop antimicrobial resistance (1). It is one of the most frequently encountered pathogens in intensive care, neonatal, and burn units, where it causes pneumonia and infections involving the central nervous system, skin, soft tissues, and bone (1). However, despite the increasing clinical importance of *A. baumannii*, little is known about the virulence factors that contribute to its pathogenetic properties.

In previous studies of DNA damage-mediated mutagenesis in *A. baumannii* (2–5), we observed an atypical motility pattern in several spontaneous rifampin-resistant (Rif^r) mutants derived from the wild-type (WT) strain ATCC 17978 growing on semisolid medium. Although *Acinetobacter* spp. lack flagella, they exhibit surface-associated motility (6, 7). In a recent study, hypermotile *A. baumannii* derivatives with increasing virulence were isolated, but whether a lack of motility negatively affects the virulence and pathogenesis of *A. baumannii* is unclear (8, 9).

The point mutations conferring rifampin resistance are located in the *rpoB* gene (encoding the β -subunit of the RNA polymerase), and they produce substantial changes in the transcriptional profile of bacterial cells by affecting several promoters (3, 10, 11). Nonetheless, not all mutations conferring rifampin resistance give rise to global modifications in the transcriptional profile of the respective bacterium (12, 13). In this

Received 8 May 2017 Accepted 8 May 2017

Accepted manuscript posted online 15 May 2017

Citation Pérez-Varela M, Corral J, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Bou G, Aranda J, Barbé J. 2017. Mutations in the β -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 85:e00327-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00327-17>.

Editor Andreas J. Bäumlér, University of California, Davis

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jesús Aranda, jesus.aranda@uab.cat.

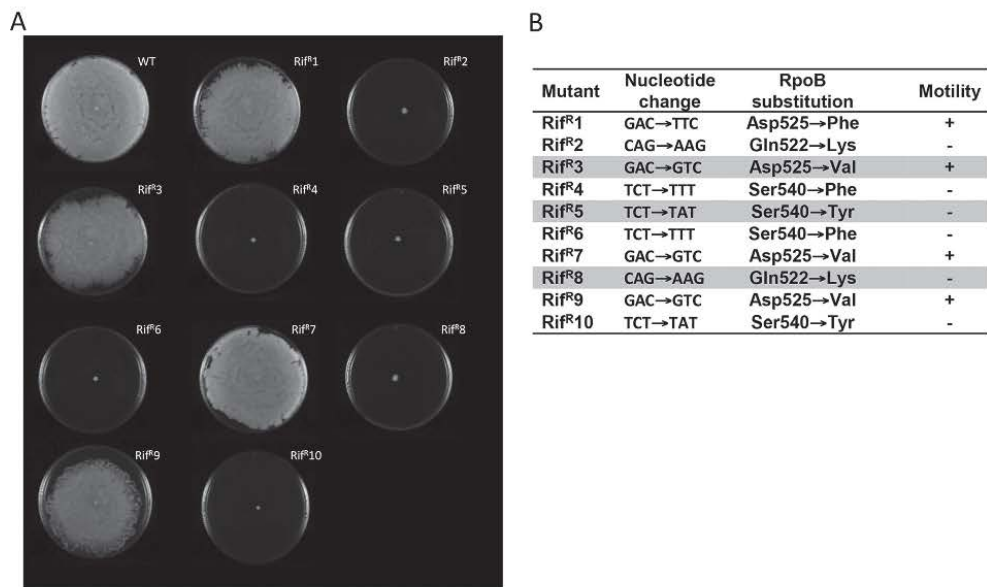


FIG 1 (A) Surface-associated motility assays of *A. baumannii* ATCC 17978 (WT) and 10 rifampin-resistant mutant derivatives (Rif^R1 to Rif^R10). (B) RpoB amino acid substitutions in the rifampin-resistant mutant strains and effects on motility (+, presence of motility; -, absence of motility). Mutants used in subsequent experiments are shaded.

study, *A. baumannii* rifampin-resistant mutants with altered surface-associated motility were isolated. Using DNA microarray technology, several genes involved in the motility and virulence of the bacterial species were identified.

RESULTS

Motility and virulence of *A. baumannii* rpoB mutants. By plating saturated cultures of *A. baumannii* ATCC 17978 in the presence of rifampin (50 mg/liter), we isolated 10 spontaneous mutants (Rif^R1 to Rif^R10) resistant to the antimicrobial. In subsequent motility assays, impaired surface-associated motility was confirmed in 60% of the isolated rifampin-resistant clones (Fig. 1A). Sequencing data for the *rpoB* gene revealed that rifampin-resistant clones with altered motility patterns had an amino acid substitution at either Gln522 or Ser540 of the wild-type RpoB protein (Fig. 1B). Moreover, wild-type motility was detected in rifampin-resistant mutants harboring an amino acid change at position Asp525 of RpoB (Fig. 1B). In several additional experiments, independent *rpoB* mutants that contained an amino acid substitution at either Gln522 or Ser540 were isolated; all of the mutants were similarly impaired in their surface-associated motility (data not shown).

To analyze whether motility plays a role in the pathogenesis of *A. baumannii*, the virulence of three different rifampin-resistant mutants, two with altered motility (Rif^R5 and Rif^R8) and the third with wild-type motility (Rif^R3), was determined in the *Caenorhabditis elegans* fertility model, recently validated for studies of the virulence of this bacterial species (14). The results showed that the virulence of the Rif^R5 and Rif^R8 mutant strains (both with impaired motility), but not of the Rif^R3 mutant (wild-type motility), was significantly lower than that of the wild-type strain (Fig. 2A). Since the growth kinetics of the Rif^R5 (growth rate [μ] = 0.86 ± 0.03 h⁻¹) and Rif^R8 (μ = 0.86 ± 0.02 h⁻¹) mutants in liquid medium were comparable to those of the wild-type strain (μ = 0.83 ± 0.05 h⁻¹), the defects in the motility and virulence of the two mutants cannot be attributed to any reduction in the bacterial growth rates.

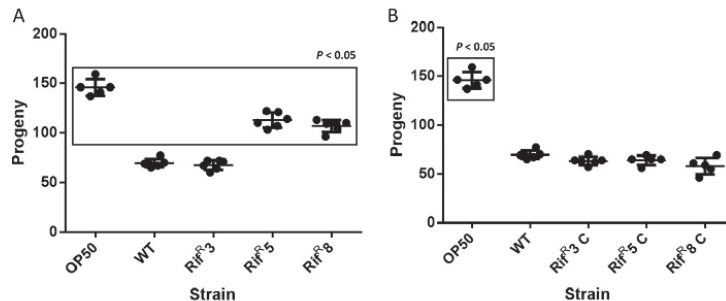


FIG 2 *C. elegans* fertility assay with the Rif³, Rif⁵, and Rif⁸ strains (A) or the complemented mutants (Rif³C, Rif⁵C, and Rif⁸C) carrying the vector pBAV1K-T5-gfp with the wild-type *rpoB* gene (B). Significant ($P < 0.05$) differences between the indicated strains and the *A. baumannii* wild-type strain ATCC 17978 (WT) are boxed. The error bars represent the standard deviations of the means (horizontal lines) from six replicates.

Introduction of the wild-type *rpoB* gene into Rif^r mutants completely restores the wild-type phenotype.

It had been reported that a wild-type *rpoB* gene present in a high-copy-number plasmid restored rifampin susceptibility in a resistant mutant (15). For this reason, and to rule out the possibility that a secondary mutation different from those encountered in the *rpoB* gene was responsible for the phenotypes of the Rif⁵ and Rif⁸ mutants, the *A. baumannii* wild-type *rpoB* was cloned into the high-copy-number expression vector pBAV1K-T5-gfp (16) and introduced into Rif³, Rif⁵, and Rif⁸ *A. baumannii* mutants. As expected, the presence of the wild-type *rpoB* gene in the three resistant mutants restored rifampin susceptibility, evidenced by a reduction in the MIC from >512 mg/liter to 4 mg/liter in all three complemented mutants.

In addition, expression of the wild-type *rpoB* gene was able to restore both the virulence (Fig. 2B) and the surface-associated motility (Fig. 3A) of the Rif⁵ and Rif⁸ *A. baumannii* mutant strains. The vector pBAV1K-T5-gfp without the *rpoB* gene had no effect on rifampin susceptibility (MIC, >512 mg/ml in all cases), virulence (data not shown), or surface-associated motility (Fig. 3A) when introduced into the three Rif^r mutants of *A. baumannii* strain ATCC 17978.

Introduction of the pBAV1K-T5-gfp vector containing the *rpoB* gene isolated from any of the three Rif^r mutants into the wild-type strain conferred rifampin resistance (MIC, >512 mg/ml in all cases). However, only the pBAV1K-T5-gfp plasmid constructions containing the *rpoB* genes amplified from the Rif⁵ and Rif⁸ mutants, and not that from the Rif³ mutant, were able to impair motility when introduced into the *A. baumannii* ATCC 17978 wild-type strain (Fig. 3B). Together, these findings definitively demonstrated that the *rpoB* gene mutations of *A. baumannii* strains Rif⁵ and Rif⁸ were responsible for the lack of both surface-associated motility and virulence in the nosocomial pathogen.

Global transcriptional analysis of rifampin-resistant mutants of *A. baumannii* with impaired motility and virulence.

As mentioned above, mutations in the *rpoB* gene alter gene expression patterns in several bacterial species (17). To obtain insights into the effect of the *rpoB* mutations on *A. baumannii* motility and virulence, the gene expression profiles of *A. baumannii* strains Rif⁵ and Rif⁸ were examined in cDNA microarrays (see Materials and Methods). Among the 3,431 cDNA sequences examined, the expression of 30 from strain Rif⁵ and 221 from strain Rif⁸ differed by more than 2-fold compared to the parental strain. In Rif⁵, 12 sequences were upregulated and 18 were downregulated, while in Rif⁸, 59 were upregulated and 162 were downregulated.

Six downregulated genes were shared by the two strains: two encoding putative membrane transporters and four encoding metabolism-related enzymes (Table 1). Decrease in the expression of these genes was validated by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) (Fig. 4). Furthermore, introduction of the expression vector pBAV1K-T5-gfp carrying a copy of the wild-type *rpoB* gene was able to

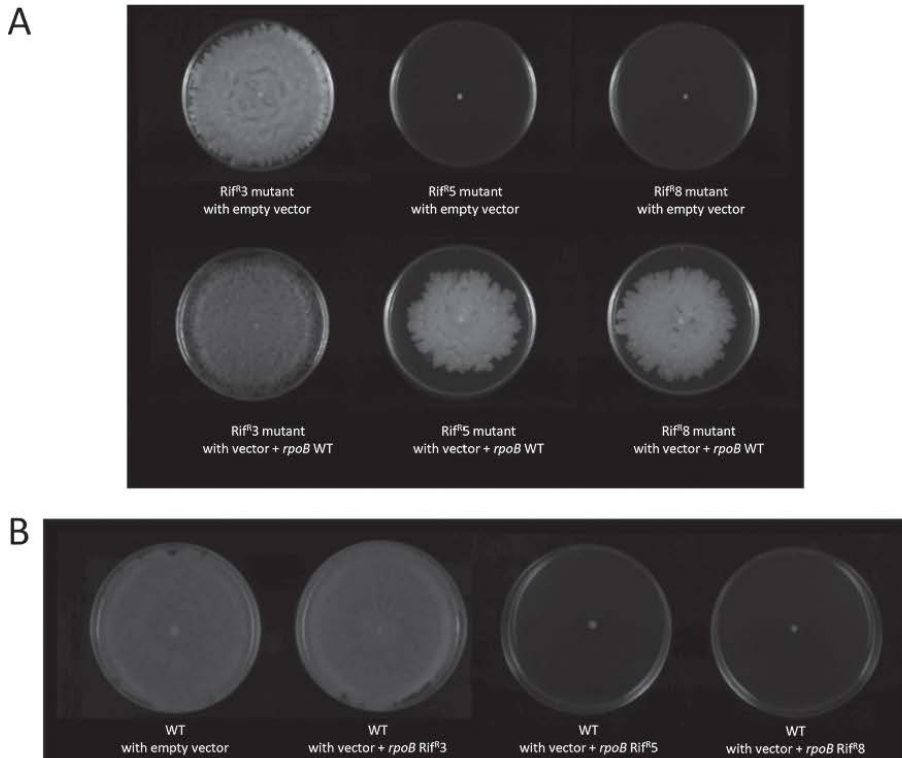


FIG 3 (A) Surface-associated motility assays of the indicated *A. baumannii* ATCC 17978 Rif derivative mutants carrying either the empty expression vector pBAV1K-T5-gfp (empty vector) or the same vector containing the wild-type *rpoB* gene (vector + *rpoB* WT). (B) Surface-associated motility assays of the wild-type *A. baumannii* ATCC 17978 (WT) strain carrying the empty expression vector pBAV1K-T5-gfp (empty vector) or the same vector containing the *rpoB* gene amplified from the indicated Rif^r strain.

increase the expression of these six downregulated genes in both the Rif⁵ and Rif⁸ *A. baumannii* mutants to levels similar to those of the wild-type parental strain (Fig. 4).

To further understand the genetic organization of the six downregulated genes, a transcriptional analysis of their surrounding regions using RT-PCR was carried out. The six genes are organized into four different transcriptional units, three of them polycistronic (Fig. 5) and one monocistronic. Two of the polycistronic units, designated *RS17040-RS17030* and *RS14730-RS14740*, are constituted of *RS17040*, *RS17035*, and *RS17030* and *RS14730*, *RS14735*, and *RS14740*, respectively. Another polycistronic unit

TABLE 1 Downregulated genes in the Rif⁵ and Rif⁸ mutants of *A. baumannii*

Gene	Product description	Fold change ^a	
		Rif ⁵	Rif ⁸
<i>RS14730</i>	Taurine ATP-binding transport system component	-2.7	-2.2
<i>RS16805</i>	Aldehyde dehydrogenase	-5.6	-4.7
<i>RS17030</i>	Aldehyde dehydrogenase	-5.6	-5.6
<i>RS17035</i>	Fumarylacetoacetate hydrolase	-6.6	-5.4
<i>RS17040</i>	Major facilitator superfamily permease	-4.7	-4.3
<i>RS17045</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	-5.4	-5.5

^aFold change in gene expression in the indicated mutants with respect to the wild-type parental strain (ATCC 17978).

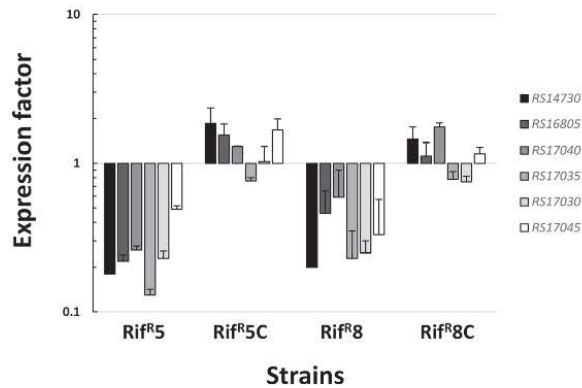


FIG 4 Expression factors of the indicated genes in *A. baumannii* strains. Rif^{R5C} and Rif^{R8C} represent the complemented rifampin-resistant strains Rif^{R5} and Rif^{R8}, respectively, carrying the vector pBAV1K-T5-gfp with the wild-type *rpoB* gene. The expression factor is the ratio of the mRNA concentration of each gene from the indicated strain with respect to the wild-type *A. baumannii* parental strain (ATCC 17978). The error bars represent the standard deviations of the mean of at least two independent experiments, each carried out in duplicate.

contains two genes, *RS17045* and *RS17050*, whereas the *RS16805* gene is a single monocistronic transcriptional unit.

Effect of inactivation of the downregulated genes shared by *A. baumannii* Rif^{R5} and Rif^{R8} mutants on motility and virulence. To determine whether all the genes belonging to either the *RS17040-RS17030*, *RS14730-RS14740*, or *RS17045-RS17050* transcriptional unit are essential for *A. baumannii* motility, each of the open reading frames (ORFs) of these units was systematically inactivated, and the behavior of the resulting knockout mutants with respect to motility and virulence was studied. The results showed that mutations in four genes (*RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045*) abolished motility, whereas inactivation of the remaining genes did not (Fig. 6). As expected, complementation of any of the four nonmotile mutants with the pBAV1K-T5-gfp plasmid carrying the corresponding wild-type gene restored wild-type motility (Fig. 6).

It is worth noting that the constructions used to obtain the insertional mutations were designed so that the gene immediately downstream of the one to be inactivated

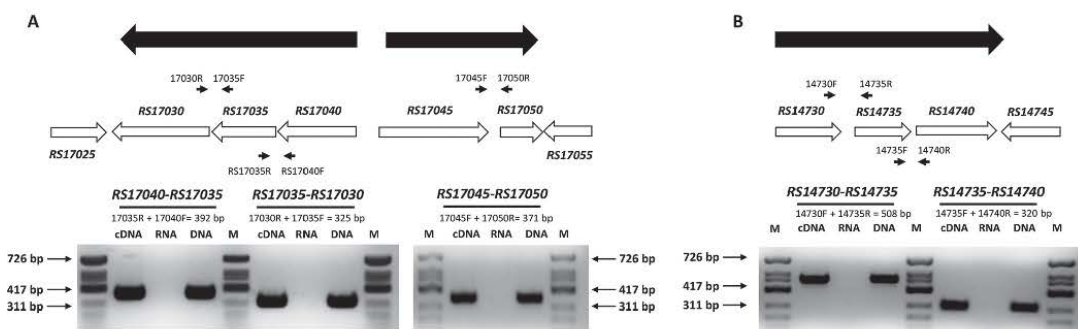


FIG 5 Organization and direction of transcription of the downregulated genes in the Rif^{R3} and Rif^{R5} mutants inactivated in this work and their surroundings according to the annotation of the genome of *A. baumannii* strain ATCC 17978. (A) *RS17025* to *RS17055*. (B) *RS14730* to *RS14745*. The small arrows indicate the oligonucleotides used (listed in Table S2 in the supplemental material). The large black arrows represent genes belonging to the same transcriptional unit, determined by RT-PCR analysis. The RT-PCRs were carried out in the presence of cDNA, total RNA, and DNA using the indicated combination of oligonucleotides amplifying a region of overlap between the specified genes of *A. baumannii* strain ATCC 17978. ϕ X174 DNA/HinfI marker (Biotools) was used as a molecular size marker (lanes M). The lengths of the products amplified by the indicated oligonucleotide pairs are reported with respect to some of the marker bands.

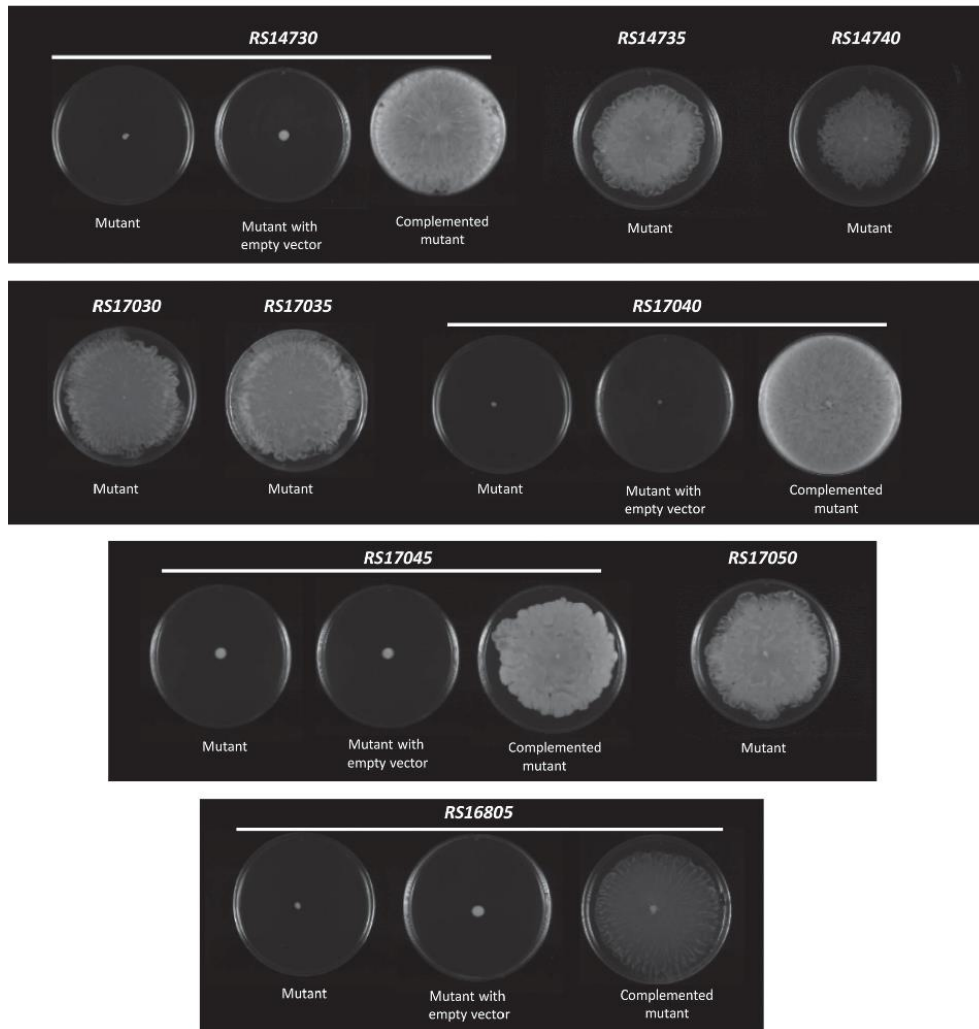


FIG 6 Surface-associated motility assays of the indicated *A. baumannii* strain ATCC 17978 derivative mutants and mutants carrying either the empty expression vector pBAV1TIC-T5-gfp (empty vector) or the same plasmid containing the corresponding wild-type gene (complemented mutants).

was under the T7 promoter present in the pCR-BluntII-TOPO vector (Fig. 7A). To confirm any putative polar effect of the inactivated genes upon distal genes affecting motility, the expression of genes placed downstream of the inactivated gene was confirmed through RT-PCR assays for each strain. The results demonstrated the absence of any polar effect of the genes being inactivated by the insertion of the pCR-BluntII-TOPO plasmid upon the expression of downstream genes (Fig. 7B). Furthermore, all of the *A. baumannii* gene knockout mutants constructed were stable, as confirmed by their culture for 10 passages without selective pressure (data not shown).

The virulence of four mutants lacking motility (*RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045*) was also examined in the *C. elegans* fertility assay. The data showed that all of them were significantly less virulent than the wild-type strain (Fig. 8A). Furthermore,

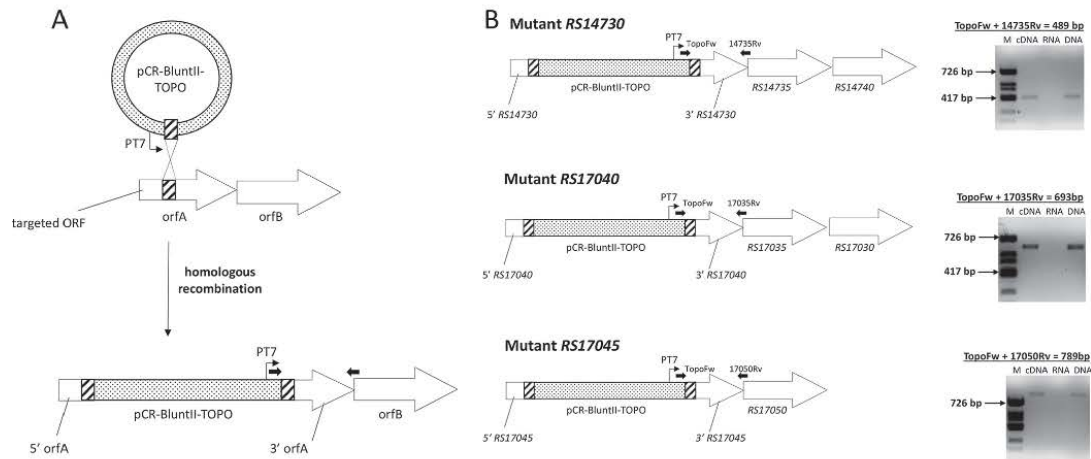


FIG 7 Strategies for plasmid insertion mutagenesis and assessment of the transcription of downstream genes used in this work. (A) Integration of pCR-BluntII-TOPO plasmid into a target gene. The hatched boxes correspond to the internal segment of the target gene. The vector is integrated into the targeted ORF by a single-crossover event. The direction of transcription from the T7 promoter (PT7) is indicated by the small thin arrows. The small black arrow pair represents the oligonucleotides used to assess the transcription of downstream genes. (B) RT-PCRs were carried out in the presence of cDNA, total RNA, and DNA using the indicated combinations of oligonucleotides amplifying overlapping regions between the T7 promoter of the pCR-BluntII-TOPO plasmid and the specified downstream genes of the indicated *A. baumannii* ATCC 17978 mutant derivatives. *Hinf*I-digested Φ DNA was used as a molecular size marker (lanes M). The lengths of the products amplified by the indicated oligonucleotide pairs are reported with respect to some of the marker bands.

the presence in each of the four knockout mutants of the pBAV1TIC-T5-gfp plasmid carrying the corresponding wild-type gene restored virulence to the level of strain ATCC 17978 (Fig. 8B). In concordance with the data obtained in the motility assays (Fig. 6), inactivation of *RS17035*, *RS17030*, *RS14735*, *RS14740*, and *RS17050* did not affect the virulence of strain ATCC 17978 (Fig. 8A). The impaired motility and virulence conferred by these mutations on wild-type *A. baumannii* strain ATCC 17978 were not attributable to any putative effect on the growth kinetics of the respective mutants, which remained comparable to those of the wild-type parental strain (μ [mean] = 0.83 ± 0.05 h⁻¹).

The results of the above-described motility and virulence experiments (summarized in Fig. 9), together with the fact that inactivation of the *RS14730*, *RS17040*, or *RS17045* gene did not give rise to any polar effect on the rest of the genes belonging to their respective polycistronic transcriptional units (Fig. 7), clearly demonstrated that inacti-

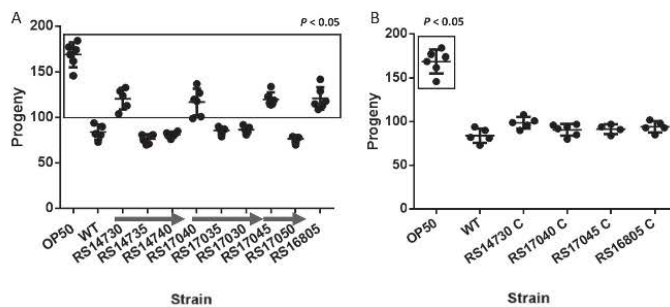


FIG 8 *C. elegans* fertility assay with the indicated *A. baumannii* strain ATCC 17978 derivative mutants (A) and the corresponding complemented mutants (B). Significant ($P < 0.05$) differences between the indicated strains with respect to the *A. baumannii* wild-type strain ATCC 17978 (WT) are boxed. *E. coli* strain OP50 was also included as a nonvirulent control. The arrows indicate genes belonging to the same transcriptional unit.

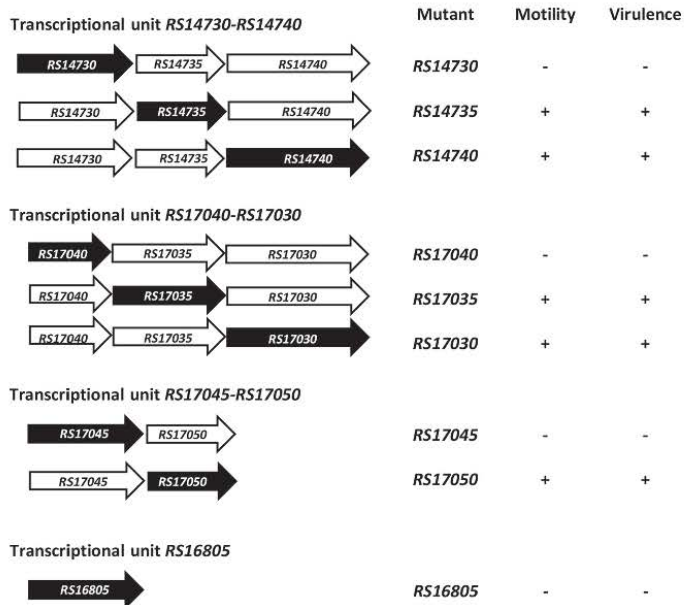


FIG 9 Summary of the effect on *A. baumannii* motility and virulence of the systematic inactivation of the genes studied in this work. The black arrows represent the inactivated genes.

vation of any of these three genes alters the motility and virulence of *A. baumannii* strain ATCC 17978.

Downregulated genes of *A. baumannii* impairing motility are widely distributed among hospital isolates of the species. Given the significant impact on the behavior of *A. baumannii* strain ATCC 17978 following the inactivation of genes *RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045*, an *in silico* search of the sequences of the bacterial species deposited in the NCBI database was carried out to determine the presence of these genes in the genomes of other strains of the microorganism. This search involved 68 *A. baumannii* strains with complete chromosome sequences (see Table S1 in the supplemental material). The presence of the four genes of *A. baumannii* ATCC 17978, as well as the genes immediately upstream and downstream, was detected in 61 of the analyzed strains (see Table S1). These data demonstrate the strong conservation of the *RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045* genes in *A. baumannii* species.

To further corroborate the relevance of these four genes in other *A. baumannii* strains, knockout mutants were constructed in *A. baumannii* strain MAR002, a virulent strain recently isolated from a wound sample collected in the Hospital del Mar in Barcelona, Spain (18). Assays of the mutants indicated that inactivation of *RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045* homologues in *A. baumannii* MAR002 also caused a significant reduction in virulence in *C. elegans* (Fig. 10). In addition, as in strain ATCC 17978, the *A. baumannii* MAR002 strain defective in either the *RS17035* or *RS17030* homologue did not exhibit defective virulence (Fig. 10). These results clearly indicate the significant role of the four genes identified in this work in the virulence of *A. baumannii*.

DISCUSSION

Bacteria are able to live not only as single-celled organisms exhibiting planktonic growth, but also as communities of sessile cells embedded in extracellular matrices, in

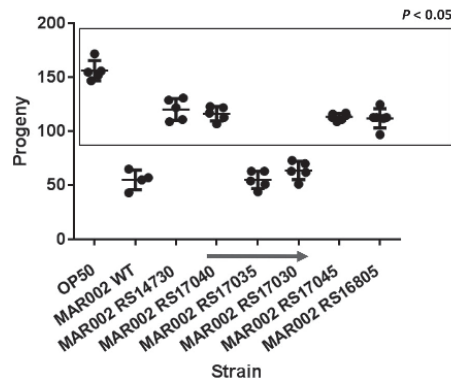


FIG 10 *C. elegans* fertility assay with the WT *A. baumannii* strain MAR002 and derivative mutants. Significant ($P < 0.05$) differences between the specified strains with respect to *A. baumannii* strain MAR002 (WT) are boxed. The *E. coli* strain OP50 is also indicated as a nonvirulent control. The arrow indicates genes belonging to the same transcriptional unit.

which they adhere to one another and to the surfaces on which they reside to form biofilms (19). Bacteria can expand their environments by moving along surfaces through various types of motility that differ in their required components and mechanisms (20). Motility has been linked to the infective capacity of pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa* (21), *Escherichia coli* O157:H7 (22), *Haemophilus influenzae* (23), *Neisseria meningitidis* (24), *Clostridium perfringens* (25), *Legionella pneumophila* (26), and *Proteus* spp. (27). Motility is also associated with enhanced antibiotic resistance (28), protection against host macrophages (29), and the first stage of biofilm generation (30).

The motility of *A. baumannii* is responsive to many of the same environmental and cellular signals involved in bacterial virulence (9). Our results clearly demonstrate that *A. baumannii* mutants with an amino acid substitution at position 522 or 540 of the RpoB protein lack surface-associated motility, which must be attributed to the decreased expression of several genes. The inactivation of some of these genes in *A. baumannii* also caused a reduction in its virulence. Introduction of the wild-type *rpoB* copy restored the wild-type phenotype in the Rif^r5 and Rif^r8 strains (rifampin susceptibility, surface-associated motility, and virulence). Since the wild-type gene encoding the RpoB subunit was cloned in a high-copy-number expression plasmid, recovery of the phenotype in these merodiploids was probably due to the presence of a high number of wild-type RpoB copies, which displaced the mutated RpoB proteins and thereby restored the wild-type phenotype. Similarly, the introduction into the wild-type strain of an expression vector containing the *rpoB* gene amplified from each rifampin-resistant mutant strain reproduced the same phenotype observed in the strain from which it was amplified.

In *E. coli* and *Streptomyces* spp., point mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance give rise to stringent RNA polymerase-like behavior normally associated with nutrient starvation (17). The resulting amino acid substitutions induce a conformational change in the β -subunit of the RNA polymerase that mimics the effect of guanosine tetraphosphate (ppGpp), an effector of the stringent response. The pattern of expression is similar to that seen during this response, but ppGpp is not required, as the same changes are produced in strains defective for the synthesis of the nucleotide (17). Substitutions at position Ser531 of the β -subunit of the *E. coli* RNA polymerase (which corresponds to Ser540 of the *A. baumannii* β -subunit reported here) specifically alter the interaction of *E. coli* RpoB with certain stringent promoters (31). In *N. meningitidis*, mutations in *rpoB* cause global transcriptional changes that functionally mimic the stringent response (32); in *Pseudomonas* spp., a phylogenetic neighbor of

Acinetobacter spp., stringent RNA polymerase is involved in twitching motility (33, 34). Thus, by isolating mutants arising from point mutations in the *A. baumannii* *rpoB* gene, we were also able to identify genes involved in the surface-associated motility of the bacterium (Table 1).

Six downregulated genes widespread among *A. baumannii* clinical isolates were shared by the two analyzed Rif^r *A. baumannii* spontaneous mutants. Inactivation of four of these genes (*RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045*) significantly reduced *A. baumannii* surface-associated motility. Importantly, this loss of motility was associated with attenuation of virulence, not only in *A. baumannii* strain ATCC 17978, but also in the biofilm-hyperproducing *A. baumannii* clinical isolate strain (MAR002). The transcriptome response of *A. baumannii* strain ATCC 17978 during bacteremia was recently analyzed (35). Data obtained in that work confirmed that during this step of the *A. baumannii* infective process, the bacterial cells are in a planktonic state (35). Moreover, the expression levels of the *A. baumannii* genes identified in our study (*RS14730*, *RS16805*, *RS17040*, and *RS17045*) do not increase during bacteremia (35). These results are in concordance with the role of these genes in surface-associated motility. Similar scenarios, in which genes involved in surface-associated motility were not induced under planktonic conditions, have been reported for other bacterial species (36).

In *A. baumannii* Rif^r5 and Rif^r8 mutants, all of the downregulated genes described in this work encode putative proteins that in other bacterial species are related to either transporters or metabolic enzymes and play important roles in motility and virulence. For instance, *RS17040* is annotated as a major facilitator superfamily (MFS) permease. MFS proteins are involved in chemotaxis, which requires bacterial appendages, such as *pili*, for directed movement toward or away from attractants and repellents, respectively. In *Pseudomonas putida*, chemotaxis to the aromatic acid 4-hydroxybenzoate (4-HBA) is mediated by the MFS permease PcaK, a membrane-bound protein that also functions as a 4-HBA transporter (37).

Similarly, *Vibrio cholerae* possesses a chemoreceptor that mediates the response to taurine, a major constituent of human bile, and thus plays an important role in the chemotaxis and virulence of the pathogen (38). The *A. baumannii* *RS14730* gene encodes a putative taurine ATP-binding transport system component involved in the transport of taurine as a sulfur source. Thus, during the *A. baumannii* infection process, there may be competition for taurine between the nosocomial pathogen and its host (39).

Two other downregulated genes identified in the Rif^r5 and Rif^r8 mutants, *RS16805* and *RS17045*, encode a putative aldehyde dehydrogenase and a putative dihydroxy-acid dehydratase, respectively. In enterohemorrhagic *E. coli*, the aromatic aldehyde dehydrogenase FeaB is involved in chemotaxis to norepinephrine (40), whereas in *Pseudomonas syringae*, inactivation of the GDP-D-mannose dehydratase decreases the motility of the plant pathogen (41). A previous study showed that, in *A. baumannii*, genes encoding metabolic enzymes (involved in the synthesis of 1,3-diaminopropane) are also involved in the surface-associated motility of the bacterium (6).

To our knowledge, this is the first report clearly associating loss of motility with the attenuation of virulence in the pathogen *A. baumannii*. The data obtained in this work provide the basis for further investigations of the cellular components and mechanisms involved in the motility of this multiresistant microorganism.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. *A. baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* MAR002, and *E. coli* (strains DH5 α and OP50) were grown in Luria-Bertani (LB) medium and incubated at 37°C with shaking at 180 rpm. When necessary, kanamycin (50 mg/liter) or ticarcillin (80 mg/liter) was added to the growth medium. The plasmids pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) and pBAV1K-T5-gfp (a gift from Ichiro Matsumura; Addgene plasmid 26702), were used for mutant construction and complementation, respectively. Growth was monitored by measuring the absorbance at 600 nm (OD₆₀₀). The growth rate (μ) was calculated based on the exponential segment of the growth curve and defined as $\ln 2g^{-1}$, where g is the doubling time of an exponentially growing culture. For the isolation of rifampin-resistant mutants, saturated cultures of *A. baumannii* ATCC 17978 were plated on LB agar containing rifampin (50

mg/liter) and then incubated at 37°C for 24 h. The MICs for rifampin were determined by broth microdilution.

Sequencing of *rpoB* mutants. Colony PCR was carried out using the oligonucleotides *rpoB*-1441F and *rpoB*-2095R (42) (Invitrogen), which in *rpoB* amplify a 654-bp region, the site of frequent Rif^r-inducing base pair substitutions in the species (42). The PCR products were purified using the GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) according to the supplier's protocols and sequenced (Macrogen) using the same oligonucleotide set. The data were analyzed using DNASTar Lasergene software (DNASTar).

Motility assays. Fresh LB agar motility plates (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.5% glucose, and 0.5% Difco agar) were prepared the day of the assay. After sterilization, the medium was deposited on 9-cm petri dishes with constant agitation to ensure the homogeneous spread of the agar. The inoculum was applied with a sterile toothpick. A single colony was picked and inoculated in the center of the plate, avoiding medium penetration. The inoculated plates were incubated at 37°C, usually for 16 to 20 h, previously determined to be the time required for the wild-type strain to reach the plate border under the experimental conditions. All assays were carried out a minimum of three times in independent experiments. Representative images of the motility of each bacterial strain on a semisolid agar surface are shown.

RNA extraction and RT-PCR. An overnight culture of the corresponding strain in LB medium was diluted 1:50 in fresh medium and then grown until the mid-exponential growth phase ($OD_{600} = 0.6$) was reached. The cells in 10 ml of each culture were pelleted by centrifugation at $13,000 \times g$, resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer, and treated with lysozyme (50 mg/ml) for 10 min at 37°C. Total RNA was extracted using an RNeasy minikit (Qiagen). DNA contaminants were removed from the RNA by digestion with DNase Turbo (Ambion). The absence of DNA in the PCR mixtures was confirmed by incubating the RNA samples without reverse transcriptase. RT-PCR was performed using a first-strand cDNA synthesis kit (Nzytech) and the oligonucleotides listed in Table S2 in the supplemental material, following the manufacturer's instructions.

Microarrays. The microarrays were designed specifically for *A. baumannii* strain ATCC 17978 by Bioarray Diagnóstico Genético (Alicante, Spain) and were performed using eArray (Agilent). Labeling was carried out following the two-color microarray-based prokaryote analysis Fair Play III Labeling v. 1.3 (Agilent). Three independent RNA extractions per condition (biological replicates) were used for each experiment. The quality of the RNA was determined using Bioanalyzer (Bioarray Alicante, Spain). Statistical analysis was carried out using Bioconductor in the software package RankProd for the R computing environment. A gene was considered to be induced when the ratio of the treated preparation to the nontreated preparation was ≥ 2 and the *P* value of the difference compared to the control was < 0.05 . The resulting microarray data sets (WT versus Rif^r5 and WT versus Rif^r8) were submitted to the NCBI GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). During the revision of the manuscript, the genome of *A. baumannii* strain ATCC 17978 was updated. Consequently, in this article, the new annotation (NZ_CP018664.1) has been introduced. The correlation between the old and new annotations of the genes described in this work is presented in Table S3 in the supplemental material.

Gene expression. Gene expression was determined by RT-qPCR using Lightcycler RNA Master SYBR green I (Roche) on a Lightcycler 480 instrument (LC480; Roche) as previously described (43). Specific oligonucleotides (see Table S2 in the supplemental material) were used to validate the expression of the selected genes shown in the microarray to be deregulated. The relative mRNA concentrations of the genes of interest were determined according to a standard curve generated by amplifying an internal fragment of the *gyrB* gene that was not induced under the tested growth conditions. The expression factor was calculated as the ratio of the mRNA concentration of the target gene as expressed in the wild-type strain versus the studied strain.

Mutant construction. Plasmids were inserted into the target genes as previously described (44). Briefly, the kanamycin and zeocin resistance plasmid pCR-BluntII-TOPO, which is unable to replicate in *A. baumannii*, served as a suicide vector. An internal fragment (~500 bp) of the target gene was PCR amplified with the appropriate primers (see Table S2 in the supplemental material) using genomic DNA from *A. baumannii* as the template. The PCR products were cloned into the pCR-BluntII-TOPO vector and propagated in *E. coli* DH5 α . The recombinant plasmids (0.1 μ g) were then introduced into *A. baumannii* by electroporation as previously described (44). Mutants were selected on kanamycin-containing plates. Gene inactivation by plasmid insertion via single-crossover recombination was confirmed by sequencing the amplified PCR product using the appropriate oligonucleotides (see Table S2). All the mutants used in this work were assessed for stability after 10 passages (every 24 h) by incubating cultures of the mutants without selective pressure and then counting the colonies plated on LB plates with and without kanamycin.

Mutant complementation. The plasmid pBAV1K-T5-gfp was used to complement the Rif^r3, Rif^r5, and Rif^r8 mutants by blunt-end cloning the wild-type *rpoB* gene from the *A. baumannii* ATCC 17978 wild-type genome into the XbaI site of the vector, whose overhangs were filled with T4 DNA polymerase (Roche). As this plasmid carries a gene encoding kanamycin resistance, complementation of the mutants constructed using the pCR-BluntII-TOPO vector, which also encodes kanamycin resistance, was carried out using a variant of the pBAV1K-T5-gfp vector (pBAV1TIC-T5-gfp), constructed in this work as follows. The β -lactamase-coding region from the pGEM-T vector (Promega) was PCR amplified, and the blunt-ended PCR product was cloned into the pBAV1K-T5-gfp plasmid digested by EcoRV, whose unique site in the plasmid is present in the coding region of the kanamycin resistance gene. All the genes were cloned into the XbaI site of the pBAV1TIC-T5-gfp vector, except *rpoB*, which contains an XbaI site in its coding region and was cloned into the original vector (pBAV1K-T5-gfp) as described above. The

recombinant plasmids were propagated in *E. coli* DH5 α and introduced into the corresponding *A. baumannii* strain by electroporation as previously described (44). Transformants were selected on plates containing kanamycin (for cells carrying pBAV1K-T5-gfp derivatives) or ticarcillin (for cells carrying pBAV1TIC-T5-gfp derivatives). All of the resulting recombinant plasmids were verified by both PCR and sequencing (Macrogen). The oligonucleotides used in this study are listed in Table S2 in the supplemental material.

In vivo nematode model of virulence. The virulence of the different *A. baumannii* strains used in this work were analyzed in a nematode fertility assay, as previously described (14). Briefly, *C. elegans* strain N2 was fed on the low-virulence *E. coli* OP50 strain grown as a lawn on NGM (nematode growth medium) plates. The nematode eggs were recovered and hatched in M9 medium (0.02 M KH₂PO₄, 0.04 M Na₂HPO₄, 0.08 M NaCl, and 0.001 M MgSO₄), grown to stage L1, and growth arrested overnight at 16°C to physiologically synchronize the worms. The L1 larvae were cultivated to the L4 stage on lawns of the appropriate bacterial strain on NGM plates. A single L4 nematode was then inoculated on a peptone-glucose-sorbitol plate containing the same strain and incubated at 25°C. During the next 3 days, adult nematodes were removed daily to a fresh plate seeded with the same bacterial strain. To determine fertility, nematode progeny were counted daily using a stereomicroscope (Olympus SZ51) 48 h after removal of the parent. Six independent replicates were established for each bacterial strain, and each fertility assay was performed in triplicate. Representative experiments from the *C. elegans* fertility assay are shown. Statistical analysis consisted of a two-tailed one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for *post hoc* multiple-group comparisons. A *P* value of < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Accession number(s). The microarray data sets (wild-type versus Rif^r5 and WT versus Rif^r8) were submitted to the NCBI GEO database under accession number GSE73193.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/IAI.00327-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, XLSX file, 0.1 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, PDF file, 0.1 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 3, PDF file, 0.2 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pilar Cortés (Universitat Autònoma de Barcelona [UAB]), Joan Ruiz (UAB), and Susana Escribano (UAB) for their excellent technical assistance, as well as our UAB students Pau Obregón and Daniel Quiñones for their helpful support.

This study was supported by grant BIO2016-77011-R from the Ministerio de Economía y Competitividad and 20145GR572 from the Generalitat de Catalunya. Jesús Aranda is a Serra Hünter Fellow, Generalitat de Catalunya, Spain. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.
2. Aranda J, Poza M, Shingu-Vázquez M, Cortés P, Boyce JD, Adler B, Barbé J, Bou G. 2013. Identification of a DNA-damage-inducible regulon in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195:5577–5582. <https://doi.org/10.1128/JB.00853-13>.
3. Aranda J, López M, Leiva E, Magán A, Adler B, Bou G, Barbé J. 2014. Role of *Acinetobacter baumannii* UmuD homologs in antibiotic resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1771–1773. <https://doi.org/10.1128/AAC.02346-13>.
4. Jara LM, Pérez-Varela M, Corral J, Arch M, Cortés P, Bou G, Aranda J, Barbé J. 2015. Novobiocin inhibits the antimicrobial resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:637–639. <https://doi.org/10.1128/AAC.01810-15>.
5. Jara LM, Cortés P, Bou G, Barbé J, Aranda J. 2015. Differential roles of antimicrobials in the acquisition of drug resistance through activation of the SOS response in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4318–4320. <https://doi.org/10.1128/AAC.04918-14>.
6. Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, Hammer B, Zimmermann O, Ziesing S, Wichelhaus TA, Hunfeld KP, Borgmann S, Gröbner S, Higgins PG, Seifert H, Busse HJ, Witte W, Pfeifer Y, Wilharm G. 2012. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol* 302:117–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.03.003>.
7. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. 2013. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *mBio* 4:e00360-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-13>.
8. Eijkelkamp BA, Stroehner UH, Hassan KA, Elbourne LDH, Paulsen IT, Brown MH. 2013. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun* 81:2574–2583. <https://doi.org/10.1128/IAI.00065-13>.
9. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37:130–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>.
10. Alifano P, Palumbo C, Pasanisi D, Talà A. 2015. Rifampicin-resistance, rpoB polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *J Biotechnol* 202:60–77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.024>.
11. Qi Q, Preston GM, MacLean RC. 2014. Linking system-wide impacts of RNA polymerase mutations to the fitness cost of rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 5:e01562-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01562-14>.
12. Jin DJ, Gross CA. 1989. Characterization of the pleiotropic phenotypes of

- rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171: 5229–5231. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.5229-5231.1989>.
13. Jin DJ, Gross CA. 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 202:45–58. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90517-7).
 14. Vallejo JA, Beceiro A, Rumbo-Feal S, Rodríguez-Palero MJ, Russo TA, Bou G. 9 July 2015. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.021>.
 15. Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. 1994. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:805–811. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.805>.
 16. Bryksin AV, Matsumura I. 2010. Rational design of a plasmid origin that replicates efficiently in both gram-positive and gram-negative bacteria. *PLoS One* 5:e13244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013244>.
 17. Xu J, Tozawa Y, Lai C, Hayashi H, Ochi K. 2002. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Genet Genomics* 268: 179–189. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0730-1>.
 18. Álvarez-Fraga L, Pérez Rumbo-Feal A, Merino S, Vallejo M, Ohneck JA, Edelmann EJ, Beceiro RE, Vázquez-Ucha A, Valle JC, Actis J, Bou LA, Poza GM. 2016. Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence* 7:443–455. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335>.
 19. Berlanga M, Guerrero R. 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact* 15: 165. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>.
 20. Jarrell KF, McBride MJ. 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6:466–476. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1900>.
 21. Kazmierczak BI, Schniederberend M, Jain R. 2015. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Curr Opin Microbiol* 28:78–82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.017>.
 22. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldaña Z, Ledesma MA, Puente JL, Girón JA. 2009. The type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J Bacteriol* 191:411–421. <https://doi.org/10.1128/JB.01306-08>.
 23. Kolappan S, Tracy EN, Bakaletz LO, Munson RS, Craig L. 2012. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of PIIA from the nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68:284–287. <https://doi.org/10.1107/S1744309111043910>.
 24. Albiger B, Johansson L, Jonsson A-B. 2003. Lipooligosaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* shows altered pilus-associated characteristics. *Infect Immun* 71:155–162. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.155-162.2003>.
 25. Varga JJ, Nguyen V, O'Brien DK, Rodgers K, Walker RA, Melville SB. 2006. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other clostridia. *Mol Microbiol* 62:680–694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05414.x>.
 26. Coil DA, Anné J. 2009. Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* 293:271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01532.x>.
 27. Hola V, Peroutkova T, Ruzicka F. 2012. Virulence factors in *Proteus* bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:343–349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00976.x>.
 28. Butler MT, Wang Q, Harshey RM. 2010. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3776–3781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910934107>.
 29. Tan RM, Kuang Z, Hao Y, Lau GW. 2014. Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. *J Innate Immun* 6:227–239. <https://doi.org/10.1159/000354304>.
 30. Maldarelli GA, Piepenbrink KH, Scott AJ, Freiberg JA, Song Y, Achermann Y, Ernst RK, Shirliff ME, Sundberg EJ, Donnenberg MS, von Rosenving EC. 2016. Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Pathog Dis* 74:ftw061. <https://doi.org/10.1093/femsdp/ftw061>.
 31. Zhou YN, Jin DJ. 1998. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like “stringent” RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2908–2913. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2908>.
 32. Colicchio R, Pagliuca C, Pastore G, Cicatiello AG, Pagliarulo C, Talà A, Scaglione E, Sammartino JC, Bucci C, Alifano P, Salvatore P. 2015. Fitness cost of rifampin resistance in *Neisseria meningitidis*: in vitro study of mechanisms associated with *rpoB* H553Y mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7637–7649. <https://doi.org/10.1128/AAC.01746-15>.
 33. Vogt SL, Green C, Stevens KM, Day B, Erickson DL, Woods DE, Storey DG. 2011. The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun* 79:4094–4104. <https://doi.org/10.1128/IAI.00193-11>.
 34. Chatnaparat T, Li Z, Korban SS, Zhao Y. 2015. The stringent response mediated by (p)ppGpp is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its survival on tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 28:776–789. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-14-0378-R>.
 35. Murray GL, Tsyganov K, Kostoulias XP, Bulach DM, Powell D, Creek DJ, Boyce JD, Paulsen IT, Peleg AY. 2017. Global gene expression profile of *Acinetobacter baumannii* during bacteremia. *J Infect Dis* 215:552–557. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw529>.
 36. Lippolis JD, Brunelle BW, Reinhardt TA, Sacco RE, Thacker TC, Looft TP, Casey TA. 2016. Differential gene expression of three mastitis-causing *Escherichia coli* strains grown under planktonic, swimming, and swarming culture conditions. *mSystems* 1:e00064-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00064-16>.
 37. Ditty JL, Harwood CS. 1999. Conserved cytoplasmic loops are important for both the transport and chemotaxis functions of PcaK, a protein from *Pseudomonas putida* with 12 membrane-spanning regions. *J Bacteriol* 181:5068–5074.
 38. Nishiyama S, Takahashi Y, Yamamoto K, Suzuki D, Itoh Y, Sumita K, Uchida Y, Homma M, Imada K, Kawagishi I. 2016. Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. *Sci Rep* 6:20866. <https://doi.org/10.1038/srep20866>.
 39. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poiré L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie J-M, Raoult D, Médigue C, Weissenbach J, Cruveillé S. 2008. Comparative analysis of acinetobacters: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 3:e1805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001805>.
 40. Pasupuleti S, Sule N, Cohn WB, MacKenzie DS, Jayaraman A, Manson MD. 2014. Chemotaxis of *Escherichia coli* to norepinephrine (NE) requires conversion of NE to 3,4-dihydroxymandelic acid. *J Bacteriol* 196: 3992–4000. <https://doi.org/10.1128/JB.02065-14>.
 41. Chiku K, Tsunemi K, Yamamoto M, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Ishii T, Taguchi F, Iwaki M, Ichinose Y, Ono H. 2013. Defects in D-rhamnosyl residue biosynthetic genes affect lipopolysaccharide structure, motility, and cell-surface hydrophobicity in *Pseudomonas syringae* pathovar *glycinea* race 4. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:505–510. <https://doi.org/10.1271/bbb.120736>.
 42. Norton MD, Spilka AJ, Godoy VG. 2013. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195:1335–1345. <https://doi.org/10.1128/JB.02176-12>.
 43. Aranda J, Garrido ME, Cortes P, Llagostera M, Barbe J. 2008. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* 76:1590–1598. <https://doi.org/10.1128/IAI.00987-07>.
 44. Aranda J, Poza M, Pardo BG, Rumbo S, Rumbo C, Parreira JR, Rodríguez-Velo P, Bou G, Rodríguez-Velo P, Bou G. 2010. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 10:279. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-279>.

Artículo 1

TS1. Presence (+)^a or absence (0) of studied genes and genetic surrounded regions in completely sequenced genomes of *A. baumannii*

Strain	Accession Number	Studied genes								
		RS14730	RS14735	RS14740	RS16805	RS17030	RS17035	RS17040	RS17045	RS17050
6200	NZ_CP010397.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15A34	CP020590.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15A5	CP020574.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1656-2	NC_017162.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17978-mff	NZ_CP012004.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1	NZ_CP010781.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB0057	NC_011586.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB030	NZ_CP009257.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB031	NZ_CP009256.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB042	NZ_CP019034.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ab04-mff	NZ_CP012006.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB307-0294	NC_011595.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB34299	CP014291.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB5075-UW	NZ_CP008706.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Abh120-A2	NZ_CP009534.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AC29	NZ_CP007535.2	+	+	+	+	0	+	+	+	+
AC30	CP007577.1	+	+	+	+	0	+	+	+	+
ACICU	NC_010611.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AF-401	NZ_CP018254.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AF-673	NZ_CP018256.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AYE	NC_010410.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BJAB07104	NC_021726.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BJAB0715	NC_021733.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BJAB0868	NC_021729.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBA7	CP020586.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMC-CR-MDR-Ab4	NZ_CP016295.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMC-CR-MDR-Ab66	NZ_CP016300.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMC-MDR-Ab59	NZ_CP016298.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D1279779	NC_020547.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D36	NZ_CP012952.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DU202	NZ_CP017152.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HRAB-85	NZ_CP018143.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HWB48	CP020597.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IOMTU 433	NZ_AP014649.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JBA13	CP020584.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB01	NZ_CP017642.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB02	NZ_CP017644.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB03	NZ_CP017646.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB04	NZ_CP017648.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB05	NZ_CP017650.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB06	NZ_CP017652.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB07	NZ_CP017654.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KAB08	NZ_CP017656.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBN10P02143	NZ_CP013924.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC4	NZ_CP018677.1/	0	0	0	+	+	+	+	+	+
LAC-4	NZ_CP007712.1	0	0	0	+	+	+	+	+	+
MAR002	NZ_RHB00000000.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MDR-TJ	NC_017847.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MDR-ZJ06	NC_017171.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NCGM 237	NZ_AP013357.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ORAB01	NZ_CP015483.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAA14	CP020579.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSA12	CP020578.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSA6	CP020591.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSMA17	CP020581.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCDC-AB0715	CP002522.2	+	+	+	+	0	+	+	+	+
TYTH-1	NC_018706.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
USA15	CP020595.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
USA2	CP020592.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WKA02	CP020598.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XDR-BJ83	NZ_CP018421.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XH386	NZ_CP010779.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XH856	NZ_CP014541.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XH857	NZ_CP014540.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XH858	NZ_CP014528.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XH859	NZ_CP014539.1	0	0	0	+	+	+	+	+	+
XH860	NZ_CP014538.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YU-R612	NZ_CP014215.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZW-85-1	NC_023028.1	+	+	+	0	+	+	+	+	+

^a(+) indicates a minimum of 90% amino acid identity with respect the ATCC 17978 strain.

Table S2. Oligonucleotides used in this work.

Name	Sequence (5' to 3')	Application
MUT14730F	GGTTTAAAGCGTGCAGAG	Mutant construction
MUT14730R	GTCCGATTTAATTGAGCG	Mutant construction
COM14730F	GTCGTAAGTGGACCAGATG	Mutant verification
COM14730R	CATGTAGGTAACGCCTCC	Mutant verification
MUT14735F	GGTGTCCGCTGGGTTTGTGG	Mutant construction
MUT14735R	CGTTGGTAAAATGACATGC	Mutant construction
COM14735F	GGCAACATTTGGCAGCCAGC	Mutant verification
COM14735R	GCTCAAACTAACTGCGAC	Mutant verification
MUT14740F	CCAGCAGGCTTTGCTTGATC	Mutant construction
MUT14740R	GCTGTAAGTCAAGCGGAAGC	Mutant construction
COM14740F	CCATTGGCGCAATTATTCACG	Mutant verification
COM14740R	GCACATCGCCATTAATAGTTGC	Mutant verification
MUT16805F	TGGTGGTTCACGCAGCGC	Mutant construction
MUT16805R	CATTTGCCCACTGGTACG	Mutant construction
COM16805F	GGTGCCGGTTTCATTGTG	Mutant verification
COM16805R	GCTGTGGCCATATGTCC	Mutant verification
MUT17030F	GACACTGCTTCGGCACTGG	Mutant construction
MUT17030R	GTGCCAGCATTGAGCATAG	Mutant construction
COM17030F	CGTGTCACAGGAACTGC	Mutant verification
COM17030R	CACCTGCCAGCAATAATTC	Mutant verification
MUT17035F	GCAGACTTAAAGGTATTGCC	Mutant construction
MUT17035R	CGAAATAGTGAATATGTACATCG	Mutant construction
COM17035F	CAATCAGTTCGTGATTTAGC	Mutant verification
COM17035R	GGTAATTCGGGTTGCATATGAGC	Mutant verification
MUT17040F	CGACATGCCAATCCACTAC	Mutant construction
MUT17040R	CGATACCAGCCGCTGCACTTGC	Mutant construction
COM17040F	GCGGTTTTATTGGTTTACC	Mutant verification
COM17040R	CGTTCGAGCTTGGCATAGACG	Mutant verification
MUT17045F	ACGTGGTCTGAACTCACC	Mutant construction
MUT17045R	AATGCGTCCAGCAATTGC	Mutant construction
COM17045F	AAATCCATCTTCGACTCC	Mutant verification
COM17045R	AACGACCGTACCATACGC	Mutant verification
MUT17050F	CCTGTCTTTCGCGAAGC	Mutant construction
MUT17050R	CCATGCCTTCATAGGCTTGC	Mutant construction
COM17050F	GGATTAATAAATCGTTTCTG	Mutant verification
COM17050R	GCCATTTTAGTATCGTCTAGC	Mutant verification
14730FXba*	ATGAGTGTACTTGAAGCCAAAC	Mutant complementation
14730RXba*	TCATGTAGGTAACGCCTCC	Mutant complementation
16805FXba*	ATGACCATTATCGGACACAAC	Mutant complementation
16805RXba*	TTAGATCGCTTCTTTAGTCATC	Mutant complementation
17040FXba*	ATGGATTTTCGAAAAGGATG	Mutant complementation
17040RXba*	TTACAAAGGCTTTTGAATATTC	Mutant complementation
17045FXba*	GCCAGCTCCTAGACCATAGGC	Mutant complementation
17045RXba*	CTGAAATTTCTCCAGAAACG	Mutant complementation
rpoBF	ATGGCATACTCATATACCG	Mutant complementation
rpoBR	TTAGTCACCATTTTTTAGTTC	Mutant complementation

17030R	GCCTGATTAACCTCTTGCTCG	RT-PCR assay
17035F	GCAGGCGATGTACATATTCAC	RT-PCR assay
17035R	GCAGTGCGTTGGATCTGGATG	RT-PCR assay
17040F	CACGGGAAATATGGCTGCTGG	RT-PCR assay
14730RTF	TAAAGCGTGCAGAGATTGAGAAAC	RT-qPCR assay
14730RTR	TTGAATCCATAAATCGAGCACTAA	RT-qPCR assay
16805RTF	GCCACTTGACGCCTACA	RT-qPCR assay
16805RTR	CTTTTCACCACTACAGAGCAACCT	RT-qPCR assay
17040RTF	GTAGTACTGACCGCCTGAACGA	RT-qPCR assay
17040RTR	TTAAAAGTCCGATCCCAAATG	RT-qPCR assay
17045RTF	CGGCTACCCTGTTGAGTTTCCTG	RT-qPCR assay
17045RTR	CGATAGTACCTGCACCAATGTCTT	RT-qPCR assay
Gyr ^B RTF	TACAGACGACGGTACCGG	RT-qPCR assay
Gyr ^B RTR	CTGACCGATTTCATCTTCG	RT-qPCR assay
Ap ^R F	CTCCTTACGCATCTGTGCGG	Amplification of the β -lactamase coding region
Ap ^R R	TTACCAATGCTTAATCAGTG	Amplification of the β -lactamase coding region
M13FpUC	GTTTTCCCAGTCACGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO vector
M13RpUC	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO vector
pBAV1KF	GACGAACTCCAATTCCTGTTCCCTTGC	Sequencing primer for pBAV1K-T5-gfp vector
pBAV1KR	GGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAG	Sequencing primer for pBAV1K-T5-gfp vector

*Oligonucleotides including at the sequence 5'-ACTGTCTAGA to allow *Xba*I digestion.

TABLE S3. Correspondence between the nomenclature of the new annotation (NZ_CP018664.1) and the old annotation (CP000521.1) of the genes described in this work in the *A. baumannii* ATCC 17978 strain.

NEW ANNOTATION	OLD ANNOTATION	ACCESSION NUMBER
AU097_RS14730	A1S_1443	WP_000114468.1
AU097_RS14735	A1S_1444	WP_001092658.1
AU097_RS14740	A1S_1445	WP_001099243.1
AU097_RS16805	A1S_1796/7	WP_005135215.1
AU097_RS17030	A1S_1835	WP_000234449.1
AU097_RS17035	A1S_1836	WP_001165788.1
AU097_RS17040	A1S_1837/8	WP_000345069.1
AU097_RS17045	A1S_1839	WP_001060808.1
AU097_RS17050	A1S_1840	WP_000029961.1

3.2. Caracterización funcional de la bomba de expulsión de tipo MFS AbaQ, codificada por el gen *AU097_RS17040* de *A. baumannii*

Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*

Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J

Antimicrob Agents Chemother 62(9). 2018

Uno de los aspectos relacionados con el éxito de *Acinetobacter baumannii* como patógeno nosocomial es su gran capacidad de adquisición de determinantes que confieren resistencia a un amplio número de antimicrobianos. En estudios previos (Pérez-Varela *et al.*, 2017) se identificó una hipotética bomba de expulsión de tipo MFS, codificada por el gen *AU097_RS17040* y que ha sido denominada AbaQ (*A. baumannii* *Quinolone resistance transporter*) implicada en la motilidad y en la virulencia de *A. baumannii*. En el presente trabajo se ha llevado a cabo su caracterización funcional.

El análisis *in silico* del producto del gen *abaQ* indicó que se trata de una proteína de 434 aminoácidos integrada por 12 hélices α -transmembrana y que sus dominios N- y C-terminal se encuentran ubicados en el citoplasma. Esta estructura se corresponde con la que presentan los transportadores MFS de tipo DHA-1, que se diferencian de los DHA-2 por la presencia de 12 en lugar de 14 dominios transmembrana. Asimismo, mediante análisis comparativo empleando BLAST y CLUSTALW, se observó que esta proteína presenta un bajo porcentaje de identidad y similitud con otras bombas de expulsión de este tipo. Sin embargo, la búsqueda *in silico* del gen que codifica esta proteína en los genomas de cepas de *A. baumannii* completamente secuenciadas, la mayoría de ellas de origen clínico, reveló que se encuentra altamente conservada entre las distintas cepas de este patógeno nosocomial.

En cuanto a la caracterización del perfil de susceptibilidad a distintos antimicrobianos del mutante obtenido por disrupción del gen que codifica la proteína AbaQ, se observó que la interrupción de este altera la susceptibilidad a ciertos antimicrobianos. En concreto, se detectó una mayor sensibilidad, de entre 2 y 4 veces de diferencia, a trimetoprim y novobiocina del mutante con respecto a la cepa salvaje; y de 8 hasta 32 veces a las quinolonas probadas (ciprofloxacina, ácido nalidíxico y levofloxacina). El mutante no mostró diferencias en comparación a la cepa salvaje en los otros antimicrobianos testados entre los que se

Artículo 2

encontraban β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, polimixinas, tetraciclinas, rifampicina y cloranfenicol.

Por último, para demostrar inequívocamente que el transporte de moléculas mediado por la bomba de expulsión de la superfamilia MFS AbaQ es dependiente de protones se empleó el inhibidor de protones carbonil cianide 3-clorofenilhidrazona (CCCP) Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que AbaQ confiere menor sensibilidad a quinolonas a través de un transporte activo dependiente de protones.



Functional Characterization of AbaQ, a Novel Efflux Pump Mediating Quinolone Resistance in *Acinetobacter baumannii*

María Pérez-Varela,^a Jordi Corral,^a Jesús Aranda,^a Jordi Barbé^a

^aDepartament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

ABSTRACT *Acinetobacter baumannii* has emerged as an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. In previous work, we identified a putative MFS transporter, AU097_RS17040, involved in the pathogenicity of *A. baumannii* (M. Pérez-Varela, J. Corral, J. A. Vallejo, S. Rumbo-Feal, G. Bou, J. Aranda, and J. Barbé, Infect Immun 85:e00327-17, 2017, <https://doi.org/10.1128/IAI.00327-17>). In this study, we analyzed the susceptibility to diverse antimicrobial agents of *A. baumannii* cells defective in this transporter, referred to as AbaQ. Our results showed that AbaQ is mainly involved in the extrusion of quinolone-type drugs in *A. baumannii*.

KEYWORDS *Acinetobacter*, efflux pumps, quinolones

Acinetobacter baumannii is a multidrug-resistant (MDR) pathogen that causes hospital-acquired infections (1). In previous work, we identified a new, putative major facilitator superfamily (MFS) transporter in *A. baumannii* strain ATCC 17978, AU097_RS17040. This transporter, referred to as AbaQ (*A. baumannii* quinolone resistance transporter), is involved in surface-associated motility as well as the virulence of *A. baumannii* (2).

Sequence analysis of AbaQ, annotated as an MFS transporter in *A. baumannii* strain ATCC 17978 (accession number WP_000345069), indicated an open reading frame (ORF) of 1,305 nucleotides. According to the deduced amino acid sequence, the protein consists of 434 residues and has a molecular mass of 47.8 kDa and a theoretical isoelectric point (pI) of 9.27. On the basis of predictions of its secondary structure and transmembrane topology, AbaQ is composed of 12 α -helical transmembrane segments, with both the N and C termini located in the cytoplasm (Fig. 1A). Support for this structure came from an independent analysis that revealed the three-dimensional (3D) structure of the protein (Fig. 1B). These data indicated that AbaQ is a drug H⁺ antiporter 1 (DHA1), which differs from DHA2-type MFS drug transporters by the presence of 12 rather than 14 transmembrane segments (3). The predicted product of the *abaQ* gene exhibited low amino acid identity and similarity (<24% and <38%, respectively) with other MFS transporters involved in drug efflux in *A. baumannii* (Table 1).

To determine whether a lack of AbaQ alters antimicrobial susceptibilities, the responses of two *A. baumannii* *abaQ* mutants obtained in previous work (2) to antimicrobials of different classes were tested. Compared to the wild-type (WT) parental strain, *A. baumannii* ATCC 17978, the *abaQ* mutant had 2- to 4-fold higher susceptibilities to trimethoprim and novobiocin (Table 2). The highest susceptibilities (approximately 8- to 32-fold) occurred in response to the quinolone-type antibiotics ciprofloxacin, levofloxacin, and nalidixic acid (Table 2). In contrast, the mutant and its WT parent did not differ in their susceptibilities to β -lactams (meropenem and ampicillin), aminoglycosides (amikacin and gentamicin), macrolides (erythromycin), and polymyxins (colistin) or to other antimicrobials (chloramphenicol, tetracycline, minocycline, and rifampin) (Table 2). To further corroborate the relevance of this MFS in other *A.*

Received 4 May 2018 Returned for modification 4 June 2018 Accepted 18 June 2018

Accepted manuscript posted online 25 June 2018

Citation Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J. 2018. Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 62:e00906-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00906-18>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jesús Aranda, jesus.aranda@uab.cat.

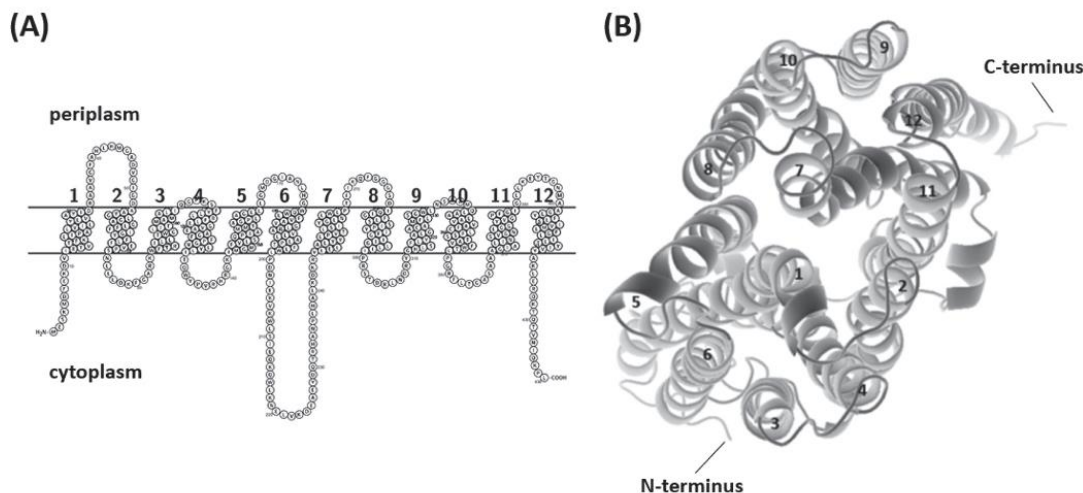


FIG 1 (A) Prediction of the structure of AbaQ using Protter (10). The putative protein is shown parallel to the cytoplasmic membrane. (B) 3D representation of AbaQ viewed along the plane of the membrane from the periplasmic side using RaptorX Structure Prediction (26) and visualized using PyMOL software (27). The 12 transmembrane α -helices are numbered (1 to 12); both the N and C termini are located in the cytoplasm.

baumannii strains, we analyzed the *abaQ* knockout mutant derived from *A. baumannii* strain MAR002, a biofilm-hyperproducing strain recently isolated from a wound sample collected from a patient at the Hospital del Mar in Barcelona (2, 4, 5). Assays of the mutant indicated that inactivation of the AbaQ homologue in *A. baumannii* MAR002 (99% amino acid identity) also caused the highest reduction (approximately 8- to 32-fold) in the MICs of quinolone-type antibiotics (data not shown).

To complement the mutants, the *abaQ* gene, including its own promoter, was amplified from the genome of *A. baumannii* strain ATCC 17978 using the AbaQF_{XbaI} and AbaQ_RX_{baI} oligonucleotides (5'-ACTGTCTAGAGGAATATCACAGCTTGACGCG and 5'-ACTGTCTAGATTACAAAGGCTTTTGAATATTC, respectively), cloning them into the XbaI restriction site of the pET-RA vector (6). Complementation of the *abaQ*-mutant derived from *A. baumannii* ATCC 17978 completely restored antimicrobial susceptibility to the same levels determined in the WT parental strain (Table 2). The recovery of the WT phenotype was also observed in the complemented *abaQ* MAR002 mutant derivative (data not shown). These results provided clear evidence of the critical role of AbaQ in the efflux of quinolone-type antibiotics in *A. baumannii*.

To assess whether AbaQ confers resistance to quinolones through an active efflux mechanism, the MIC of ciprofloxacin in the presence of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone ([CCCP] Sigma) was determined in *A. bau-*

TABLE 1 MFS transporters described in *A. baumannii*

MFS ^a	Accession no.	Main antimicrobial exported	Identity (%) ^b	Similarity (%) ^b	Reference
AmvA	ACQ82816	Erythromycin	17.8	31.0	7
TetA	AAO38186	Tetracycline	17.6	28.5	18
TetB	AFV67369	Minocycline	19	33.8	19
CraA	ABO13543	Chloramphenicol	19	36.9	20
FloR	AQT19056	Chloramphenicol	16.9	28.2	21
CmlA	AMD83513	Chloramphenicol	17.5	28.3	22
AbaF	ABO11759	Fosfomicin	23.7	37.6	23
EmrB	ABO12199	Colistin	17.2	30.7	24
AedC	ABO11341	Tetracycline-chloramphenicol	18.5	32.7	25

^aMFS, Major facilitator superfamily.

^bWith respect to AbaQ of *A. baumannii* strain ATCC 17978, using the Basic Local Alignment Search Tool ([BLAST] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

TABLE 2 MICs of various antimicrobials in wild-type *A. baumannii* ATCC 17978 and the *abaQ* mutant derivative

Antimicrobial	MIC (mg/liter)			MIC (mg/liter)		
	WT	AbaQ ⁻	Fold change ^a	AbaQ ⁻ plus pET-RAØ	AbaQ ⁻ plus pET-RA+AbaQ	Fold change ^b
Ciprofloxacin	0.25	0.0078	32	0.0078	0.25	32
Levofloxacin	0.125	0.0078	16	0.0078	0.125	16
Nalidixic acid	8	1	8	1	8	8
Trimethoprim	16	4	4	4	16	4
Novobiocin	8	4	2	4	8	2
Meropenem	2	2	1	2	2	1
Ampicillin	16	16	1	16	16	1
Amikacin	1	1	1	1	1	1
Gentamicin	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1
Erythromycin	4	4	1	4	4	1
Colistin	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1
Chloramphenicol	16	16	1	16	16	1
Tetracycline	4	4	1	4	4	1
Minocycline	0.062	0.062	1	0.062	0.062	1
Rifampin	4	4	1	NA ^c	NA	NA

^aRatio of the MICs of the wild type (WT) versus *abaQ* mutant derivative (AbaQ⁻).

^bRatio of the MICs for the *abaQ* mutant carrying the pET-RA+AbaQ plasmid (complemented mutant) versus the *abaQ* mutant carrying the empty pET-RA plasmid (pET-RAØ).

^cNA, not applicable (the pET-RA plasmid carries rifampin resistance).

mannii strains carrying (WT and AbaQ⁻ plus pET-RA+AbaQ) or lacking (AbaQ⁻ and AbaQ⁻ plus pET-RAØ) the *abaQ* gene. The addition of CCCP (20 mg/liter) decreased the ciprofloxacin MIC 16-fold in AbaQ-carrying cells (from 0.25 to 0.015 mg/liter) but only 4-fold in cells lacking the *abaQ* gene (from 0.0078 to 0.0019 mg/liter). The addition of CCCP alone did not inhibit bacterial cell growth in any of the *A. baumannii* strains, indicating that the above results were not due to the toxicity of CCCP itself. Accordingly, when ampicillin, which is not a substrate of the AbaQ transporter (Table 2), was used instead of ciprofloxacin, there was no difference in the antimicrobial susceptibilities in the presence or absence of CCCP in any of the cultured *A. baumannii* strains (data not shown). These results unequivocally demonstrated that the *abaQ* gene product confers decreased susceptibility to quinolones by encoding an active efflux transporter.

The majority of the MFS transporters involved in drug-efflux described thus far in *A. baumannii* mediate chloramphenicol efflux, with a smaller number mediating the efflux of other antimicrobials, such as erythromycin, tetracycline, minocycline, fosfomicin, and colistin (Table 1). Among the latter group of transporters is AmvA, which participates in the efflux of erythromycin and different classes of disinfectants, detergents, and dyes but also confers modest resistance to quinolone-type antimicrobials (7). In *amvA* mutant strains, susceptibilities to both ciprofloxacin and norfloxacin were 2-fold higher than in the WT strain, whereas the susceptibility to nalidixic acid was unchanged (7). Other transporters belonging to different families and involved in the extrusion of a wide range of antimicrobials, including quinolones, have been described in *A. baumannii*: AdeABC (8), AdeDE (9), AdeFGH (10), AdeJK (11), AdeM (12), and AdeT (13), all belonging to the resistance/nodulation/division (RND) superfamily; AbeM, AbeM2, and AbeM4 transporters, belonging to the multiple antimicrobial toxin extrusion (MATE) family (12, 14); and AbeS, belonging to the small multidrug resistance (SMR) family (15). No role in quinolone efflux has been detected in the only ATP-binding cassette (ABC) transporter described so far in *A. baumannii* (A1S_1535) (16) or in any of the transporters that make up the most recently discovered family of efflux pumps: the proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE) transporters (17).

To our knowledge, AbaQ, which is widely present in *A. baumannii* clinical isolates and involved in both surface-associated motility and virulence (2), is the first MFS efflux pump shown to play an important role in the extrusion of quinolone-type antimicrobials in this MDR nosocomial pathogen.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joan Ruiz (UAB) and Susana Escribano (UAB) for their excellent technical assistance, as well as our UAB students Paula García and Daniel Quiñones for their helpful support. We also thank the Germán Bou lab for the *A. baumannii* MAR002 strain.

This study was supported by grant BIO2016-77011-R from the Ministerio de Economía y Competitividad.

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

J.A. is a Serra Hünter Fellow, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain.

REFERENCES

- Lynch J, Zhanel G, Clark N. 2017. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: treatment options. *Semin Respir Crit Care Med* 38:311–325. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1599225>.
- Pérez-Varela M, Corral J, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Bou G, Aranda J, Barbé J. 2017. Mutants in the β -subunit of the RNA polymerase impairing the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 85:e00327-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00327-17>.
- Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60:575–608.
- Álvarez-Fraga L, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. 2016. Draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *Acinetobacter baumannii* clinical strain MAR002. *Genome Announc* 3:e00824-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00824-15>.
- Álvarez-Fraga L, Pérez A, Rumbo-Feal S, Merino M, Vallejo JA, Ohneck EJ, Edelmann RE, Beceiro A, Vázquez-Ucha JC, Valle J, Actis LA, Bou G, Poza M. 2016. Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence* 7:443–455. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335>.
- Aranda J, Poza M, Pardo BG, Rumbo S, Rumbo C, Parreira JR, Rodríguez-Velo P, Bou G, Rodríguez-Velo P, Bou G. 2010. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 10:279. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-279>.
- Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. 2010. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65:1919–1925. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq195>.
- Magnet S, Courvalin P, Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3375–3380. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001>.
- Chau S-L, Chu Y-W, Houang ETS. 2004. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4054–4055. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.4054-4055.2004>.
- Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Pêrichon B. 2010. Over-expression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4389–4393. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-10>.
- Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:557–562. <https://doi.org/10.1128/AAC.00732-07>.
- Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. 2011. Development of a high-throughput cloning strategy for characterization of *Acinetobacter baumannii* drug transporter proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20:211–219. <https://doi.org/10.1159/000329836>.
- Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Marcon M, Gebreyes WA. 2011. Molecular cloning and functional characterization of two novel membrane fusion proteins in conferring antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 66:499–504. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq469>.
- Su X-Z, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. 2005. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4362–4364. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4362-4364.2005>.
- Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. 2009. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5312–5316. <https://doi.org/10.1128/AAC.00748-09>.
- Li L, Hassan KA, Brown MH, Paulsen IT. 2016. Rapid multiplexed phenotypic screening identifies drug resistance functions for three novel efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 71:1223–1232. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv460>.
- Hassan KA, Liu Q, Henderson PJF, Paulsen IT. 2015. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* Acel transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *mBio* 6:e01982-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01982-14>.
- Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. 2003. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 52:477–480. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg344>.
- Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Rodríguez-Baño J, Bou G, Miguel Cisneros J, Pachón J, Martínez-Martínez L, Vila J, Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). 2006. Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infect Microbiol Clin* 24:77–80. <https://doi.org/10.1157/13085012>. (In Spanish.)
- Roca I, Martí S, Espinal P, Martínez P, Gibert I, Vila J. 2009. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4013–4014. <https://doi.org/10.1128/AAC.00584-09>.
- Hamidian M, Nigro SJ, Hartstein RM, Hall RM. 2017. RCH51, a multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* ST1031P isolate, carries resistance genes in three plasmids, including a novel potentially conjugative plasmid carrying *oxa235* in transposon Tn6252. *J Antimicrob Chemother* 72:1907–1910. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx069>.
- Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirol L, Richey H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie J-M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2:e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>.
- Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhando T, Pathania R. 2017. Fosfomicin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother* 72:68–74. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw382>.
- Lin M-F, Lin Y-Y, Lan C-Y. 2017. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol* 55:130–136. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6408-5>.
- Hassan KA, Brzoska AJ, Wilson NL, Eijkelkamp BA, Brown MH, Paulsen IT. 2011. Roles of DHA2 family transporters in drug resistance and iron homeostasis in *Acinetobacter* spp. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20:116–124. <https://doi.org/10.1159/000325367>.
- Wang S, Li W, Liu S, Xu J. 2016. RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. *Nucleic Acids Res* 44:W430–W435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw306>.
- Schrödinger LLC. 2010. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. <http://www.pymol.org>.

OTROS TRABAJOS

3.3. Evaluación del papel de múltiples transportadores pertenecientes a las diferentes superfamilia de bombas de expulsión en la motilidad y la virulencia de *A. baumannii*

Role of *Acinetobacter baumannii* efflux pumps belonging to the different superfamilies in antimicrobial susceptibility, surface-associated motility and virulence

Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J

A research paper for *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

En estudios previos se observó que el transportador AbaQ de la superfamilia MFS participa en la patogénesis de *A. baumannii*. Por ello, en este trabajo, se ha tratado de determinar si bombas de expulsión pertenecientes a las otras 5 superfamilias de transportadores presentan un papel relevante en la motilidad de tipo *surface-associated motility* y la virulencia de *A. baumannii*. Con este objetivo se inactivaron genes que codifican permeasas de cada una de las superfamilias: RND (*Resistance Nodulation Division*), MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), ABC (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette*) y PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*).

Se construyeron mutantes mediante disrupción génica de miembros representativos de cada superfamilia de bombas de expulsión. Se seleccionaron los genes *A1S_2736*, *A1S_3371*, *A1S_0710* que codifican bombas de expulsión ya descritas de la superfamilia RND, MATE y SMR, respectivamente. De la superfamilia ABC se seleccionaron los dos únicos miembros descritos codificados por los genes *A1S_0536* y *A1S_1535*. Además, de esta superfamilia de bombas de expulsión se escogieron genes anotados en el genoma de la cepa ATCC 17978 como codificadores de hipotéticas permeasas integrantes de bombas de expulsión de tipo ABC cuya estructura transmembrana se confirmó empleando la plataforma *web Protter*. Los posibles candidatos seleccionados fueron los genes *A1S_0027*, *A1S_1057*, *A1S_1242* y *A1S_2622*. Por último, en cuanto a la superfamilia PACE, recientemente descrita, se seleccionaron los únicos dos miembros identificados codificados por los genes *A1S_1503* y *A1S_2063*.

En la primera parte de este trabajo se estudió el perfil de resistencia de cada uno de los mutantes. El estudio del patrón de resistencia del mutante *A1S_2736* (RND) reveló que este es más susceptible a diversos antimicrobianos como quinolonas o aminoglucósidos, entre otros. El mutante *A1S_3371* (MATE) mostró ser ligeramente más susceptible a tetraciclina al igual que el mutante *A1S_0710* (SMR), que también es más susceptible a desinfectantes, a quinolonas y a trimetoprim. En cuanto a los mutantes de permeasas de la superfamilia ABC y de la superfamilia

Otros trabajos

PACE, estos mostraron una modesta susceptibilidad a determinados antimicrobianos y a agentes biocidas.

Por otro lado, el estudio del perfil de motilidad y virulencia de los diversos mutantes reveló que ciertas bombas de expulsión participan en ambos procesos. La inactivación de los genes *A1S_2736* (RND), *A1S_3371* (MATE), *A1S_0710* (SMR), *A1S_1242* y *A1S_2622* (ABC) provocó una reducción del movimiento de tipo *surface-associated motility* y una atenuación de la virulencia. Sin embargo, la disrupción de los genes *A1S_0027*, *A1S_0536*, *A1S_1057* y *A1S_1535* (ABC), y los genes *A1S_1503* y *A1S_2063* (PACE) no mostró efectos ni en la motilidad ni en la virulencia.

Todo ello pone de manifiesto, que miembros de prácticamente todas las superfamilias de bombas de expulsión están implicadas tanto en *surface-associated motility* como en virulencia en *A. baumannii*.

A research paper for *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Title: Role of *Acinetobacter baumannii* efflux pumps belonging to the different superfamilies in antimicrobial susceptibility, surface-associated motility and virulence

Running title: *A. baumannii* efflux pumps in motility and virulence

Authors: María Pérez-Varela¹, Jordi Corral¹, Jesús Aranda^{1*} and Jordi Barbé¹

¹Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Spain

*Corresponding author: jesus.aranda@uab.cat, Phone: (34) 935811665, Fax: (34) 935812387

ABSTRACT

While the relationship between *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and their role in the acquisition of antimicrobial resistance is well documented, less is known about their involvement in the motility and virulence of this bacterium. In previous work, we identified the AbaQ MFS efflux pump involved in both motility and virulence (Pérez-Varela *et al.* Infect Immun. 2017). In the present study, the main aim is to determine the role of other efflux pumps belonging to the different superfamilies in the motility and virulence of *A. baumannii*. To achieve this objective, knockout mutants of permeases belonging to the rest of efflux pump superfamilies were constructed. The RND mutant *AIS_2736* showed to be more susceptible to various antimicrobials such as β -lactams, quinolones or aminoglycosides, among others. The MATE mutant *AIS_3371* showed a minor effect on resistance to tetracycline as the SMR mutant *AIS_0710*, which is also

Otros trabajos

more susceptible to disinfectants, quinolones and trimethoprim. Most of the ABC mutants (*AIS_0536*, *AIS_1242*, *AIS_1535* and *AIS_2622*) as well as all the PACE (*AIS_1503* and *AIS_2063*) mutants showed a slight susceptibility to certain antimicrobials and to biocide compounds. Moreover, the results showed that the mutants of efflux pumps encoded by the genes *AIS_2736* (RND), *AIS_3371* (MATE), *AIS_0710* (SMR) as well as the newly described ABC permeases *AIS_1242* and *AIS_2662* have a reduced surface-associated motility and an attenuated virulence with respect to the wild-type strain. This report outlines not only the involvement of these transporters in resistance but also in surface-associated motility and virulence in this nosocomial pathogen.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii has emerged in the last years as an opportunistic microorganism that causes nosocomial infections such as pneumonia or infections involving the central nervous system, skin, soft tissues, and bone (1). This phenomenon is due, mainly, to its huge potential to develop antimicrobial resistance, its ability to survive in the hospital environment and the presence of virulence factors (2). Moreover, although the name of the genus *Acinetobacter* means “nonmotile” due to the absence of flagella, *A. baumannii* strains are able to move through surface-associated motility (3, 4). This nosocomial pathogen presents a high number of resistance mechanisms such as enzymatic modification of the antimicrobial, changes in the permeability of the membrane, alternative metabolic processes, alterations of the site of action and efflux pumps (5).

Efflux pumps have been classified into 6 superfamilies according to their amino acid similarity, energy source, number of components, number of transmembrane regions and substrate types (6). In *A. baumannii* transporters belonging to these 6 superfamilies have been identified: Major Facilitator Superfamily (MFS) superfamily, Resistance

Nodulation Division (RND), Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE), Small Multidrug Resistance (SMR), Adenosine triphosphate-Binding Cassette (ABC), and Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE) (7, 8).

In a previous report, we identified a new efflux pump of the MFS superfamily involved in motility and virulence in *A. baumannii* (9). This fact prompted us to study whether efflux pumps belonging to different superfamilies participate in motility and virulence in this nosocomial pathogen. In order to address this point, a representative member of the superfamilies RND (*AIS_2736*), MATE (*AIS_3371*) and SMR (*AIS_0710*) previously described, was selected. In the case of the ABC (*AIS_0536* and *AIS_1535*) and PACE (*AIS_1503* and *AIS_2063*) the two only transporters identified in each group were studied. In addition, new ABC permeases were identified and studied in this work (*AIS_0027*, *AIS_1057*, *AIS_1242* and *AIS_2622*). The data obtained in this work, indicated that efflux pumps belonging to practically all superfamilies are involved not only in antimicrobial resistance but also in surface-associated motility and virulence in the nosocomial pathogen *A. baumannii*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. *A. baumannii* ATCC 17978 and *E. coli* (strains DH5 α and OP50) were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) agar or in LB broth with shaking at 180 rpm. Plasmids were maintained and selected in *E. coli* and *A. baumannii* hosts using, when necessary, the medium supplemented with kanamycin (50 mg/liter) or gentamicin (20 mg/liter used for *E. coli* or 40 mg/liter used for *A. baumannii*). Growth monitoring was performed as follows. Bacterial culture in LB broth was inoculated with 1:100 dilution of an overnight culture and incubated with shaking (180 rpm) at 37°C. The optical density (OD) was measured at 600 nm every hour and each test

Otros trabajos

was performed in triplicate. The plasmids pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) and pVRL1 Gm^R (10) were used for mutant construction and complementation, respectively.

Construction of isogenic derivative mutants and complementation. Gene inactivation was carried out as previously described (11). Briefly, an internal fragment of the target gene was PCR amplified with the corresponding primers indicated in Table 1 using genomic DNA from *A. baumannii* as the template. The PCR products obtained were cloned into the kanamycin and zeocin resistance plasmid pCR-BluntII-TOPO which is unable to replicate in *A. baumannii*, and were propagated in *E. coli* DH5 α . The recombinant plasmids (0.1 μ g) were then electroporated into *A. baumannii* ATCC 17978. Candidate transformant clones were selected on kanamycin-containing plates. Mutants were confirmed by sequencing of the PCR products obtained using primers listed in Table 1. To determinate the stability of the obtained mutants 10 passages (every 24 h) of the cultures without selective pressure were carried out and then the colonies plated on LB plates with and without kanamycin were counted. For complementation, all the genes were cloned into the XbaI-NcoI site or, when necessary, into the XbaI site of the pVRL1 Gm^R vector. The recombinant plasmids were propagated in *E. coli* DH5 α and then electroporated into the corresponding *A. baumannii* mutant. Selection of the complemented mutant was made on plates containing gentamicin. The resulting recombinant plasmids were verified by both PCR and sequencing (Macrogen) employing the appropriate primers listed in Table 1.

***In vitro* antimicrobial susceptibility assay.** Minimum inhibitory concentrations (MICs) for all antimicrobials and disinfectants (Sigma) were determined by the broth microdilution method, using 96-well plates, in Mueller-Hinton medium (Merck) according to CLSI guidelines (12).

Motility assays. Fresh LB agar motility plates (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.5% glucose, and 0.5% Difco agar) were used for all motility assays. Plates were used on the same day that they were prepared. In order to test the motility of the different *A. baumannii* strains, cultures were grown to early stationary phase and a 5 μ l drop was placed on the center of the plate. The inoculated plates were incubated at 30°C, usually for 16 to 20 h, until the wild-type strain reaches the plate border. All assays were carried out a minimum of three times in independent experiments, each in triplicate. The images shown in the figures were imaged using a ChemiDocTM XRS+ system (Bio-Rad) and are representative of all the replica.

***Caenorhabditis elegans* fertility assay.** The virulence of the different *A. baumannii* strains was determined using a nematode fertility assay that was performed as previously described (13). Briefly, *C. elegans* strain N2 was fed with the low-virulence *E. coli* OP50 strain grown as a lawn on NGM (Nematode Growth Medium) plates. To physiologically synchronize the worms the nematode eggs were hatched in M9 medium (0.02 M KH₂PO₄, 0.04 M Na₂HPO₄, 0.08 M NaCl, and 0.001 M MgSO₄) and worms in the first larval (L1) stage were arrested overnight at 16°C. Then, the L1 worms were cultivated to the L4 stage on NGM medium plates seeded with each bacterial strain of this study. One nematode in the L4 state was placed on a PGS (Peptone-Glucose-Sorbitol) medium plate with the same strain and incubated at 25°C. The adult nematodes were transferred to new plates seeded with the same bacterial strain during the next 3 days. For determining fertility, worm progeny was counted daily using a stereomicroscope (Olympus SZ51) 48 h after removing the parent. Six independent replicates were performed with each strain and each fertility assay was performed in triplicate. Statistical analysis was carried out using a two-tailed one-way analysis of variance (ANOVA) and later, the Tukey test for *post hoc* multiple-group comparisons. A replicate has been considered statistically significant

Otros trabajos

when the *P* value is of < 0.05 . Representative experiments from the *C. elegans* fertility assay are shown.

RESULTS

Selection and mutant construction of representative members of different *A. baumannii* efflux pumps belonging to the RND, MATE, SMR, ABC and PACE superfamilies. In a previous work, we identified a member of the MFS superfamily involved in surface-associated motility and virulence in *A. baumannii* (9). To further study the role of efflux pumps belonging to the other 5 superfamilies in surface-associated motility and virulence, several genes that encode different efflux proteins were inactivated by gene disruption. In the Table 2 the gene annotation, the accession number of the protein and the transporter superfamily are shown. A representative member of RND, MATE and SMR superfamily was selected. From the RND efflux pump superfamily, the gene *AIS_2736* was chosen, it encodes the AdeJ homologous protein of the AdeIJK transporter described in the *A. baumannii* strain BM4454 and which confers resistance to several antimicrobials (14). The AbeM3 transporter identified in the *A. baumannii* strain ATCC 17978 encoded by the gene *AIS_3371*, of which no susceptibility to any compound has been detected, was selected from the MATE efflux pump superfamily (15). Regarding the SMR superfamily, the gene *AIS_0710* was chosen, this protein was previously been related in this strain to resistance to several compounds (16). From the ABC efflux pump superfamily, the genes encoding permeases from the only two ABC transporters involved in antimicrobial resistance identified so far were selected: *AIS_0536* and *AIS_1535*, which are involved with extrusion of some antimicrobial agents in the strain ATCC 17978 of *A. baumannii* (17, 18). Moreover, by analyzing the annotation of the genome of this strain several genes annotated as possible permeases of

ABC transporters were found. Based on its permease-like structure by analyzing its amino acid sequence and its transmembrane structure using the *Protter* web platform (<http://wlab.ethz.ch/protter>), the genes *AIS_0027*, *AIS_1057*, *AIS_1242* and *AIS_2622* were also selected as additional putative members of the ABC superfamily. Finally, from the PACE superfamily the only two members of this recently discovered superfamily were selected: the AceI transporter encoded by the *AIS_2063* gene and the *AIS_1503* gene that mediates the translocation of biocide agents and identified in the *A. baumannii* strain 17978 (19). No other PACE members were found in the annotation of the genome of this strain. Therefore, mutants of all these genes were obtained using a suicide vector as described in the Materials and Methods section. All of the resulting mutants were confirmed by PCR (Figure 1) and sequencing (Macrogen) using the appropriate primers listed in Table 1. All the *A. baumannii* mutants constructed were stable, as confirmed by plating with and without kanamycin the incubated cultures of the mutants without selective pressure after 10 passages (data not shown).

Determination of the substrate specificity of the different efflux pumps. The antimicrobial susceptibility of *A. baumannii* ATCC 17978 wild-type and the derivative mutants was determined by microdilution method (Table 3). The results indicated that the RND efflux pump mutant *AIS_2736* highlights for its susceptibility to a wide range of antimicrobial agents (such as β -lactams and quinolones, among others) and to other compounds, for instance sodium dodecyl sulfate (SDS) and deoxycholate (DC), as previously described (14). Moreover, the mutant *AIS_2736* was found more susceptible to compounds not tested before like DC. The *AIS_3371* MATE efflux pump mutant only showed a slight difference in tetracycline despite no antimicrobial resistances were detected previously in this mutant (15). Regarding the *AIS_0710* SMR efflux pump mutant, it shows greater susceptibility to other compounds such as SDS and DC, as

Otros trabajos

previously described (16). In addition, it was found slightly more susceptible to antimicrobials like quinolones, tetracycline and trimethoprim. Concerning the ABC efflux pump mutants, the inactivation of the genes *AIS_0536* and *AIS_1535* results in a resistance pattern as the previously described, being more susceptible to erythromycin and to gentamicin and chloramphenicol, respectively (17, 18). The mutants of the newly described ABC permeases encoded by the genes *AIS_1242* and *AIS_2622* showed modest differences in its resistance profile in comparison with the wild-type strain. However, the inactivation of the ABC permeases encoded by *AIS_0027* and *AIS_1057* did not result in differences in susceptibility to any of the compounds tested. Finally, regarding the PACE superfamily, the AclI mutant was found more susceptible to chlorhexidine whereas the *AIS_1503* mutant was more susceptible to acriflavin, as described before by other authors (8). This last mutant showed also a slight susceptibility to meropenem, amikacin and minocycline.

Surface-associated motility pattern of *A. baumannii* efflux pumps mutants. In order to assess whether the efflux pumps play an important role in the surface-associated motility of *A. baumannii*, the behavior of the knockout mutants with respect to motility was studied. The results showed a loss of motility in the mutants of the RND efflux pump (*AIS_2736*), in the MATE efflux pump (*AIS_3371*) and SMR efflux pump (*AIS_0710*) (Figure 3). The introduction of the plasmid pVRL1 Gm^R carrying the corresponding wild-type gene restores motility in all cases (Figure 3). From the only two described ABC efflux pumps so far (*AIS_0536* and *AIS_1535*) no changes in motility have been observed (Figure 4). However, the mutants of the newly ABC-permeases identified in this work encoded by the genes *AIS_1242* and *AIS_2622* showed a loss of motility, while the motility of the mutants *AIS_0027* and *AIS_1057* was similar to that of the wild-type strain (Figure 4). The introduction of the plasmid pVRL1 Gm^R carrying the corresponding wild-

type gene restored motility in the *AIS_1242* and *AIS_2622* mutants (Figure 4). Finally, in the case of the PACE superfamily the mutants, they showed a motility pattern similar to that of the wild-type strain (Figure 5). No growth differences were observed between the mutants and the wild-type strain (Figure 2).

Effect of inactivation of efflux pumps coding genes on virulence of *A. baumannii* using the fertility *C. elegans* model. *C. elegans* nematode has been used as a model organism to study the virulence of *A. baumannii* by counting the progeny of the worms when they have been fed with the strains of interest (13). Results obtained showed that the mutants of efflux pumps encoded by the genes *AIS_2736* (RND), *AIS_3371* (MATE), *AIS_0710* (SMR) as well as the newly described ABC-permeases, *AIS_1242* and *AIS_2662*, showed an attenuated virulence in comparison with the wild-type strain. However, the mutants *AIS_0536*, *AIS_1535*, *AIS_0027* and *AIS_1057* (ABC) as well as the mutants *AIS_1503* and *AIS_2063* (PACE) that showed a virulence similar to the wild-type strain (Figure 6).

DISCUSSION

Efflux pumps prevent the accumulation of toxic compounds in the cell interior in an active way, therefore some of them have an important role in antimicrobial resistance (7). In a previous study, we identified a new efflux pump of the MFS superfamily involved in motility and virulence in *A. baumannii* (9). This fact brought up us to deepen the involvement of efflux pumps belonging to different superfamilies in the motility and virulence of *A. baumannii* (Table 2). Thus, mutants of genes encoding representative transporters of each of the other 5 remaining superfamilies (RND, MATE, SMR, ABC and PACE) were constructed by gene disruption (Figure 1).

Otros trabajos

The MICs to different compounds for all the mutants were determined (Table 3). Regarding the RND superfamily, the mutant with the inactivated *AIS_2736* gene shows a resistance profile similar to the mutant *adeJ*, that codifies the homologous protein in the *A. baumannii* strain BM4454 (14). Both mutants is susceptible to a wide range of compounds including β -lactams, chloramphenicol, tetracycline, quinolones or trimethoprim, a common feature among members of this group, such as the AcrAB-TolC system of *E. coli* or the MexEF-OprN system of *P. aeruginosa* (20, 21). Referring to the MATE superfamily, the mutant *AIS_3371* shows a slight difference in tetracycline that in previous studies has not been detected (15). This fact could be explained because in the previous studies, the AbeM3 protein had been expressed in *E. coli* but the effect of its inactivation in *A. baumannii* had not been analyzed. Perhaps, having only a slight difference in the susceptibility to tetracycline could not be detected in *E. coli*. On the other hand, the MICs of the SMR superfamily mutant *AIS_0710* coincide with the described by Gebreyes and collaborators, being involved in resistance to SDS and deoxycholate (16). In addition, in the present work several antimicrobials were tested and the mutant *AIS_0710* has also shown slight susceptibility to quinolones, tetracyclines and trimethoprim which were not reported before. AbeS, another member of this superfamily described in *A. baumannii*, confers resistance to various antimicrobials, among which are also quinolones and detergents or disinfectants such as SDS or deoxycholate (22). In other pathogens, such as *S. aureus*, some efflux pumps of the SMR superfamily have also been related to the resistance to disinfectants and antiseptics (23). With reference to the inactivation of genes that encode permeases of ejection pumps of the ABC superfamily, the resistance pattern already described of the mutants *AIS_0536* and *AIS_1535* was confirmed (17, 18). Moreover, new ABC-permease proteins were identified in this work. Regarding to the mutants *AIS_0027* and *AIS_1057* they did not show differences with

respect to the wild-type strain, so it is necessary to carry out further studies to determine their function. However, the mutants *AIS_1242* and *AIS_2622* show differences in the susceptibility to various antimicrobial agents (Table 3). Although there are few members of the ABC superfamily that are considered clinically relevant in MDR bacteria, there are some important ABC transporters in the acquisition of resistances such as MacAB (6). This protein is present in various bacteria such as *E. coli*, *Salmonella enterica* or *Neisseria gonorrhoeae*, homologous to the protein encoded by the *AIS_0536* gene in *A. baumannii* (24–26). Finally, with respect to the recently described superfamily PACE, the mutants *AIS_1503* and *AIS_2063* showed to be more susceptible to acriflavine and chlorhexidine respectively as described by Hassan and collaborators (8, 27). Members of this superfamily, of which little is known, seem to be involved in the transport of biocidal agents (28).

In *A. baumannii*, the knowledge of the role of efflux pumps in motility and virulence is limited. For example, there are some transporters components like the outer membrane protein TonB that have been related to virulence in this pathogen, its deletion decreases virulence in a murine model (29). In the *A. baumannii* strain AB5075, the mutants of the *arpA* and *arpB* genes that encode the components of an RND transporter show an attenuated virulence in the *Galleria mellonella* model (30). Another example is the gene *AIS_0114*, located on the same operon as the *AIS_0116* that encodes a RND transporter possibly involved in the secretion of a lipopeptide, and whose disruption results in a reduction of motility and virulence in *A. baumannii* ATCC 17978 (31). During the preparation of this manuscript, Knight and collaborators published that the protein AdeJ is involved in motility in *Acinetobacter nosocomialis* (32). This coincides with the results obtained in our work about the protein encoded by the gene *AIS_2736* that shows a 99% of identity with the AdeJ protein of *A. nosocomialis*. Otherwise, it was observed that the

Otros trabajos

absence of the gene that encodes the AdeRS two-component system, the regulator of the RND efflux pump AdeABC, causes a loss of motility but not virulence (33). However, overexpression of AdeABC causes an increase in the virulence of *A. baumannii* in a murine model (34). The deregulation of efflux pumps has been related to alterations in motility and virulence, for example in *A. nosocomialis* the deletion of the repressor of the efflux pump AcrAB (AcrR) causes greater motility and virulence in the mutant (35). In addition, there are some examples of other superfamilies such as the fosfomicin MFS efflux pump AbaF or the quinolones MFS efflux pump AbaQ, their inactivation results in a lower virulence in the *C. elegans* model (36, 37). As mentioned, the involvement of efflux pumps in the motility and virulence of *A. baumannii* is a not very studied aspect. There are few studies about members of the RND and MFS superfamilies but nothing is known about the members of the remaining superfamilies MATE, SMR and PACE.

The results obtained in our work showed that the RND efflux pump mutant (*AIS_2736*) presents an altered motility pattern and attenuated virulence compared to the wild-type strain (Figure 3 and 6). In other pathogens the role in motility and virulence of members of this efflux pump superfamily has been studied. In *Pseudomonas aeruginosa*, the RND transporter named MexEF-OprN is related to the transport of a signal molecule that mediates the quorum sensing in this bacterium. Therefore, this efflux pump has been related to swarming motility, with the ability to form biofilms and with the production of virulence factors (38). In another opportunistic pathogen as *Stenotrophomonas maltophilia* the absence of SmeYZ, an RND-type transporter, causes an increase in susceptibility to human serum and neutrophils, as well as a decrease in virulence in a murine model and in swimming motility (39). In the case of the respiratory pathogen *Klebsiella pneumoniae* the absence of the AcrAB efflux system results in a lower capacity of infection (40). In *Enterobacter cloacae* a homologous to the AcrAB-TolC system has

been found to be involved in adaptation to the environment, in fitness and in virulence (41). There are several examples of RND efflux pumps that have been linked to virulence in several pathogens such as *Borrelia burgdorferi* (42), *Salmonella enterica* (43), *Vibrio cholerae* (44) or *Erwinia amylovora* (45).

As for the MATE efflux pump mutant *AIS_3371* and the SMR efflux pump mutant *AIS_0710* of this work, they also showed a reduced motility and an attenuated virulence (Figure 3 and 6). Regarding the MATE superfamily, in *Ralstonia solanacearum* the absence of the DinF efflux pump causes a decrease in virulence in tomato plants (46). In the case of the SMR superfamily, the KpnEF efflux pump of *K. pneumoniae* has been related to the synthesis of the capsule, suggesting that it could play a role in the virulence of this pathogen (47).

Moreover, we also studied the effect of the inactivation of ABC efflux pumps in motility and virulence. Even though the inactivation of the previously described ABC transporters encoded by *AIS_0536* and *AIS_1535* genes had no effects on motility or virulence, here we identified two new ABC permease-like genes (*AIS_1242* and *AIS_2622*) involved in motility and virulence (Figure 4 and 6). However, mutants of other genes encoding components of ABC transporters (*AIS_0027* and *AIS_1057*) did not show changes in motility or virulence. Members belonging to the ABC superfamily in other pathogens have been related to virulence too. Examples of this are the ABC efflux pumps MacAB in *S. enterica*, MrtAB in *Yersinia pseudotuberculosis*, YejABEF in *Brucella melitensis* or Ssu in *Xanthomonas citri* (26, 48–50).

Finally, in this study we assessed the motility and virulence profile of the mutants belonging to the PACE superfamily (*AIS_1503* and *AIS_2063*). Both the motility and the virulence of these mutants are very similar to that of the wild-type strain (Figure 5 and

Otros trabajos

6). The implication in virulence of the recently discovered PACE superfamily has not been studied in any microorganism. Nevertheless it has been found that the AceI protein presents a high degree of conservation among pathogenic bacteria (28), this fact could indicate that it not only participates in the resistance but could also be involved in other physiological processes.

Although it is known that some efflux pumps participate in the bacterial pathogenesis, the mechanisms are not entirely clear. There are several hypotheses such as, for example, that these proteins contribute to the production of virulence factors as it was observed with the RND-type transporter, VexB, in *V. cholerae* or the ABC-type transporter, MacAB, in *E. coli* (51, 52). Another possibility could be that the efflux pumps translocate antimicrobial molecules derived from the host and decrease the attack of the host. Examples of this are the MFS efflux pump FarAB of *Neisseria gonorrhoeae*, the RND efflux pump AcrAB of *E. coli* and the RND efflux pump CmeABC of *Campylobacter jejuni* (53–55). It is also possible that these proteins could translocate certain molecules that modulate processes such as quorum sensing as the RND efflux pump MexEF-OprN of *P. aeruginosa* (38). In *A. baumannii*, a possible function of these efflux systems could be the translocation of surfactants or molecules related to surface-associated motility. Likewise, they could be related to the expulsion of signal molecules that mediate the quorum sensing in this pathogen. In this pathogen, alterations in molecules related to quorum sensing was related to an inhibition of motility (56). In *A. baumannii* the absence of efflux pumps could cause a reduction in motility due to changes in the translocation of signal molecules like lipopeptides and, therefore, a lower capacity of host colonization that can lead to a lower virulence (31). Thus, the development of efflux pump inhibitors represents an important area of research in the fight against multi-resistant pathogens.

Overall, this study provides new insight into the knowledge of efflux pumps and their involvement in motility and virulence in *A. baumannii*. Here we present evidence that members of practically all the superfamilies are involved in surface-associated motility and virulence in this nosocomial pathogen. The inactivation of these transporters would cause a reduction in motility and, therefore, a lower capacity for host colonization, resulting in a lower virulence. Although the mechanisms that mediate the participation of efflux pumps in motility and virulence remain unclear, the study of these proteins represents a new horizon in the understanding of the pathogenesis of *A. baumannii*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Joan Ruiz (UAB) and Susana Escribano (UAB) for their excellent technical assistance, as well as our UAB student Paula García for her helpful support. We truly appreciate Paolo Visca (University Roma Tre, Rome, Italy) for providing plasmid pVRL1 Gm^R. This study was supported by grant BIO2016-77011-R from the *Ministerio de Economía y Competitividad*. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. J.A. is a Serra Húnter Fellow, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain.

Table 1. Oligonucleotides used in this work.

Name	Sequence (5' to 3')	Application
MUT0027F	AGTCGAATTCGTGGAACGAAGCAAGTCG	Mutant construction
MUT0027R	AGTCGAATTCCTTCATCAATACCGAACC	Mutant construction
COM0027R	GCTTGTGCTGAAATAGTCTCAGC	Mutant verification
MUT0710F	AGTCGAATTCGCAGGTGTATTTGAAGTG	Mutant construction
MUT0710R	AGTCGAATTCGAATGCCTGTCCAAACCG	Mutant construction
COM0710R	CAGTCCTGATACAATCAGTACAGCG	Mutant verification
MUT0536F	AGTCGAATTCTGAAGGTGAGCTGGTTGC	Mutant construction
MUT0536R	AGTCGAATTCATCGTATGACCAGCCGCG	Mutant construction
COM0536R	TTCGATAATACGCGTTGC	Mutant verification
MUT1057F	AGTCGAATTCGTGGTCGTGCAAATTGCG	Mutant construction
MUT1057R	AGTCGAATTCCTACTAGGTTTTGTAATGG	Mutant construction
COM1057R	GGATAGTCTCGCTGAACAATTGC	Mutant verification
MUT1242F	AGTCGAATTCAGCCTTGGCTACAGGCG	Mutant construction
MUT1242R	AGTCGAATTCACCACGCGGTCATACAC	Mutant construction
COM1242R	CACGTAAATCAGCACGTTTACC	Mutant verification
MUT1362F	AGTCGAATTCATTAAGATCAAATATTGC	Mutant construction
MUT1362R	AGTCGAATTCCTGGTAATGCGTCTTCC	Mutant construction
COM1362R	CCTGAAAGTAACATCAAAGGC	Mutant verification
MUT1535F	AGTCGAATTCCTGAAAGTTTCTTGAGC	Mutant construction
MUT1535R	AGTCGAATTCGTAGGCGTCAGTTACACGG	Mutant construction
COM1535R	GCAGTAGTAGCAGCAATTACGC	Mutant verification
MUT2063F	AGTCGAATTCGGTCATCATTGCGATTGC	Mutant construction
MUT2063R	AGTCGAATTCGCAATCAGCAAACCACCC	Mutant construction
COM2063R	GGTATAAACCAAATACATAAGG	Mutant verification
MUT2622F	AGTCGAATTCCTCAAGTAATTTAACGC	Mutant construction
MUT2622R	AGTCGAATTCCTGCAAACGAATAGG	Mutant construction
COM2622F	GTCATTGGCAAACAGCCAATAGC	Mutant verification
MUT2736F	AGTCGAATTCCTGCTTTCAATTGAAAGTG	Mutant construction
MUT2736R	AGTCGAATTCGTAGCTATGCGACATGCG	Mutant construction
COM2736R	TCACGATTTATGCTCCTGAG	Mutant verification

MUT3371F	AGTCGAATTCGTCCGGTACCATTAACAC	Mutant construction
MUT3371R	AGTCGAATTCTGATGCTATAGCCGGTGC	Mutant construction
COM3371R	ACGGTTCGGCCGAAGTGG	Mutant verification
CMPL0710F	ATCGTCTAGAATGAAAATGTCTGAAGG	Mutant complementation
CMPL0710R	ATCGCCATGGTTAGGATGGAGACGAA	Mutant complementation
CMPL1242F	ATCGTCTAGAATGATGACAAAATAAATTAC	Mutant complementation
CMPL1242R	ATCGTCTAGATCATGAATTGCCCCCTTGG	Mutant complementation
CMPL1535F	ATCGTCTAGAATGCGTCCATATTTATTGC	Mutant complementation
CMPL1535R	ATCGTCTAGATTAATCTTGACCCTGTACTAC	Mutant complementation
CMPL2063F	ATCGTCTAGAATGCACATTATCCAAG	Mutant complementation
CMPL2063R	ATCGTCTAGATTAATGAAGTGATGCTGC	Mutant complementation
CMPL2736F	ATCGTCTAGAATGCCTATTGCACAATATC	Mutant complementation
CMPL2736R	ATCGTCTAGATCACGATTTATGCTCCTGAG	Mutant complementation
CMPL3371F	ATCGTCTAGAATGCCACCAAGACAGTC	Mutant complementation
CMPL3371R	ATCGTCTAGACTAAATAAGAACTTGG	Mutant complementation
M13FpUC	GTTTTCCCAGTCACGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO and pVRL Gm ^R vectors
M13RpUC	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO and pVRL Gm ^R vectors

Otros trabajos

Table 2. Gene annotation of the genes studied in this work in the genome of the *A. baumannii* ATCC 17978 strain (CP000521.1). The accession number of each protein appears in the middle column and the superfamily to which each transporter belongs appears annotated next.

Gene annotation	Accession number	Transporter superfamily
<i>AIS_2736</i>	WP_000046679.1	RND
<i>AIS_3371</i>	WP_001135124.1	MATE
<i>AIS_0710</i>	WP_000312237.1	SMR
<i>AIS_0536</i>	WP_000165905.1	ABC
<i>AIS_1535</i>	WP_000922240.1	ABC
<i>AIS_0027</i>	WP_000031022.1	ABC
<i>AIS_1057</i>	WP_000536102.1	ABC
<i>AIS_1242</i>	WP_000988396.1	ABC
<i>AIS_2622</i>	WP_000657706.1	ABC
<i>AIS_1503</i>	WP_001161758.1	PACE
<i>AIS_2063</i>	WP_005135057.1	PACE

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MICs, mg/liter) of various antimicrobials for wild-type (WT) *A. baumannii* ATCC 17978 (WT) and the different efflux pumps mutant derivatives. Mutants in which no differences have been observed are not included in this table (*AIS_0027* and *AIS_1057*). The values in which there are differences in comparison to the wild-type strain are shown in boldface and shadowed.

	WT	RND superfamily	MATE superfamily	SMR superfamily	PACE superfamily		ABC superfamily			
		<i>AIS_2736</i>	<i>AIS_3371</i>	<i>AIS_0710</i>	<i>AIS_1503</i>	<i>AIS_2063</i>	<i>AIS_0536</i>	<i>AIS_1535</i>	<i>AIS_1242</i>	<i>AIS_2622</i>
Ciprofloxacin	0.25	0.031	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Levofloxacin	0.125	0.0156	0.125	0.062	0.125	0.125	0.125	0.125	0.062	0.125
Nalidixic acid	8	2	8	4	8	8	8	8	4	8
Trimethoprim	16	4	16	8	16	16	16	16	8	16
Novobiocin	8	0.062	8	8	8	8	2	8	4	8
Meropenem	2	0.5	2	2	1	2	2	2	2	2
Ampicillin	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Amikacin	1	0.5	1	1	0.5	1	0.5	1	1	1
Gentamicin	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25
Erythromycin	4	2	4	4	4	4	2	4	4	4
Colistin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Chloramphenicol	16	8	16	16	16	16	16	8	16	16
Tetracycline	4	1	2	2	4	4	4	4	2	4
Minocycline	0.062	0.0038	0.062	0.031	0.031	0.062	0.062	0.062	0.031	0.031
Rifampin	4	1	4	4	4	4	4	4	4	4
DC	5000	62.5	5000	1250	5000	5000	5000	2500	5000	5000
SDS	2500	156	2500	1250	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Acriflavin	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Chlorhexidine	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6

FIGURE LEGEND

Figure 1. (A) Schematic representation of the strategy used to construct the disruption mutants using the pCRII-Blunt-TOPO and the integrated vector into the target gene. (B) Summary table with the primers used for confirming each constructed mutant and the length of the resulting PCR product. (C) Verification PCR of each mutant. V Ladder NzyTech (lane M1) and λ BsteII-digested DNA (lane M2) were used as molecular size markers.

Figure 2. Growth curves of all the mutants constructed in this work cultured in LB broth and incubated with shaking (180 rpm) at 37°C during 8 hours and optical density readings at 600 nm.

Figure 3. Surface-associated motility assays of the *A. baumannii* strain ATCC 17978 derivative mutants of genes *AIS_2736* (RND superfamily), *AIS_3371* (MATE superfamily) and *AIS_0710* (SMR superfamily) as well as the mutants carrying either the empty expression vector pVRL1 Gm^R (mutant with empty vector) or the same plasmid containing the corresponding wild-type gene (complemented mutants). The surface-associated motility pattern of the wild-type strain is also showed.

Figure 4. Surface-associated motility assays of the *A. baumannii* strain ATCC 17978 derivative mutants of the genes *AIS_0536* and *AIS_1535* (ABC superfamily) and mutants of the hypothetical ABC-permease genes *AIS_0027*, *AIS_1057*, *AIS_1242* and *AIS_2622*. When necessary mutants carrying either the empty expression vector pVRL1

Gm^R (mutant with empty vector) or the same plasmid containing the corresponding wild-type gene (complemented mutants) are also depicted in this figure.

Figure 5. Surface-associated motility assays of the *A. baumannii* strain ATCC 17978 derivative mutants of the genes *AIS_1503* and *AIS_2063* (PACE superfamily).

Figure 6. *C. elegans* fertility assay with the indicated *A. baumannii* strain ATCC 17978 derivative mutants. Boxes indicated strains with significant ($P < 0.05$) differences in comparison with to the *A. baumannii* wild-type strain ATCC 17978 (WT). *E. coli* strain OP50 was included as a nonvirulent control.

REFERENCES

1. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3:243–250.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:538–582.
3. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 157:2534–2544.
4. Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, Hammer B, Zimmermann O, Ziesing S, Wichelhaus TA, Hunfeld KP, Borgmann S, Gröbner S, Higgins PG, Seifert H, Busse HJ, Witte W, Pfeifer Y, Wilharm G. 2012. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol* 302:117–128.
5. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol* 7:55.
6. Piddock LJV. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:629–636.
7. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 55:947–953.
8. Hassan KA, Liu Q, Henderson PJ, Paulsen IT. 2015. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *MBio* 6:1.
9. Pérez-Varela M, Corral J, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Bou G, Aranda J, Barbé J.

2017. Mutations in the β -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 85.
10. Lucidi M, Runci F, Rampioni G, Frangipani E, Leoni L, Visca P. 2018. New shuttle vectors for gene cloning and expression in multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
 11. Aranda J, Poza M, Pardo BG, Rumbo S, Rumbo C, Parreira JR, Rodríguez-Velo P, Bou G. 2010. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 10:279.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-Ninth Edition*. Approved Standard M07-49. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
 13. Vallejo JA, Beceiro A, Rumbo-Feal S, Rodríguez-Palero MJ, Russo TA, Bou G. 2015. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 46:1.
 14. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:557–562.
 15. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. 2011. Development of a high-throughput cloning strategy for characterization of *Acinetobacter baumannii* drug transporter proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20:211–219.
 16. Gebreyes WA. 2008. Novel secondary active transporters conferring antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* with broad substrate specificity. URL:

Otros trabajos

- <https://idsa.confex.com/idsa/2008/webprogram/Paper27595.html>.
17. Okada U, Yamashita E, Neuberger A, Morimoto M, van Veen HW, Murakami S. 2017. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. *Nat Commun* 8:1336
 18. Li L, Hassan KA, Brown MH, Paulsen IT. 2016. Rapid multiplexed phenotypic screening identifies drug resistance functions for three novel efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 71:1223–1232.
 19. Hassan KA, Jackson SM, Penesyan A, Patching SG, Tetu SG, Eijkelkamp BA, Brown MH, Henderson PJ, Paulsen IT. 2013. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc Natl Acad Sci* 110:20254–20259.
 20. Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 23:345–354.
 21. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF. 2014. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509:512–515.
 22. Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. 2009. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5312–5316.
 23. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. 2013. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J* 7:59–71.
 24. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. 2001. Novel macrolide-specific ABC-

- type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:5639–5644.
25. Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. 2005. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 56:856–860.
 26. Bogomolnaya LM, Andrews KD, Talamantes M, Maple A, Ragoza Y, Vazquez-Torres A, Andrews-Polymeris H. 2013. The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from oxidative stress. *MBio* 4(6):e00630-13.
 27. Hassan KA, Elbourne LD, Li L, Gamage HK, Liu Q, Jackson SM, Sharples D, Kolstø AB, Henderson PJ, Paulsen IT. 2015. An ace up their sleeve: a transcriptomic approach exposes the AceI efflux protein of *Acinetobacter baumannii* and reveals the drug efflux potential hidden in many microbial pathogens. *Front Microbiol* 6:333.
 28. Hassan KA, Liu Q, Elbourne LDH, Ahmad I, Sharples D, Naidu V, Chan CL, Li L, Harborne SPD, Pokhrel A, Postis VLG, Goldman A, Henderson PJF, Paulsen IT. 2018. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Research in Microbiology* doi:10.1016/j.resmic.2018.01.001
 29. Abdollahi S, Rasooli I, Mousavi Gargari SL. 2018. The role of TonB-dependent copper receptor in virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Genet Evol* 60:181–190.
 30. Tipton KA, Farokhyfar M, Rather PN. 2017. Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *Microbiologyopen* 6(2):e00418.

Otros trabajos

31. Rumbo-Feal S, Pérez A, Ramelot T, Álvarez-Fraga L, Vallejo J, Beceiro A, Ohneck E, Arivett B, Merino M, Fiester S, Kennedy M, Actis L, Bou, G, Poza M. 2017. Contribution of the *A. baumannii* *AIS_0114* gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:108.
32. Knight DB, Rudin SD, Bonomo RA. 2018. *Acinetobacter nosocomialis*: defining the role of efflux pumps in resistance to antimicrobial therapy, surface motility, and biofilm formation. *Front Microbiol* 9.
33. De Silva PM, Kumar A. 2018. Effect of sodium chloride on surface-associated motility of *Acinetobacter baumannii* and the role of AdeRS two-component system. *J Membr Biol* 251:5–13.
34. Yoon EJ, Balloy V, Fiette L, Chignard M, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. 2016. Contribution of the ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 7(3).
35. Subhadra B, Kim J, Kim DH, Woo K, Oh MH. 2018. Local repressor AcrR regulates AcrAB efflux pump required for biofilm formation and virulence in *Acinetobacter nosocomialis*. *Front Microbiol* 8.
36. Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhandu T, Pathania R. 2017. Fosfomicin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother* 72:68–74.
37. Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J. 2018. Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. doi:10.1128/AAC.00906-18.

38. Lamarche MG, Déziel E. 2011. MexEF-oprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). PLoS One 6.
39. Lin YT, Huang YW, Chen SJ, Chang CW, Yang TC. 2015. The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. Antimicrob Agents Chemother 59:4067–4073.
40. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 54:177–183.
41. Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández Mdel C, Mallo S, Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G. 2012. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 56:2084–2090.
42. Bunikis I, Denker K, Ostberg Y, Andersen C, Benz R, Bergström S. 2008. An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. PLoS Pathog 4:e1000009.
43. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol 59:126–141.
44. Nishiyama S, Takahashi Y, Yamamoto K, Suzuki D, Itoh Y, Sumita K, Uchida Y, Homma M, Imada K, Kawagishi I. 2016. Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. Sci Rep 6: 20866.

Otros trabajos

45. Burse A, Weingart H, Ullrich MS. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:43–54.
46. Brown DG, Swanson JK, Allen C. 2007. Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol* 73:2777–2786.
47. Srinivasan VB, Rajamohan G. 2013. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4449–4462.
48. Crimmins GT, Mohammadi S, Green ER, Bergman MA, Isberg RR, Mecsas J. 2012. Identification of MrtAB, an ABC transporter specifically required for *Yersinia pseudotuberculosis* to colonize the mesenteric lymph nodes. *PLoS Pathog* 8:e1002828.
49. Wang Z, Bie P, Cheng J, Lu L, Cui B, Wu Q. 2016. The ABC transporter YejABEF is required for resistance to antimicrobial peptides and the virulence of *Brucella melitensis*. *Sci ReP* 6:31876.
50. Tófoli de Araújo F, Bolanos-Garcia VM, Pereira CT, Sanches M, Oshiro EE, Ferreira RC, Chigardze DY, Barbosa JA, de Souza Ferreira LC, Benedetti CE, Blundell TL, Balan A. 2013. Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*. *PLoS One* 8:e80083.
51. Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. 2008. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor

- production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun* 76:3595–3605.
52. Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K. 2008. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* 190:7693–7698.
53. Lee EH, Shafer WM. 1999. The farAB-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Mol Microbiol* 33:839–845.
54. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16:45–55.
55. Lin J, Overbye Michel L, Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2124–2131.
56. Nicol M, Alexandre S, Luizet JB, Skogman M, Jouenne T, Salcedo SP, Dé E. 2018. Unsaturated fatty acids affect quorum sensing communication system and inhibit motility and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Mol Sci* 19.

Figure 1

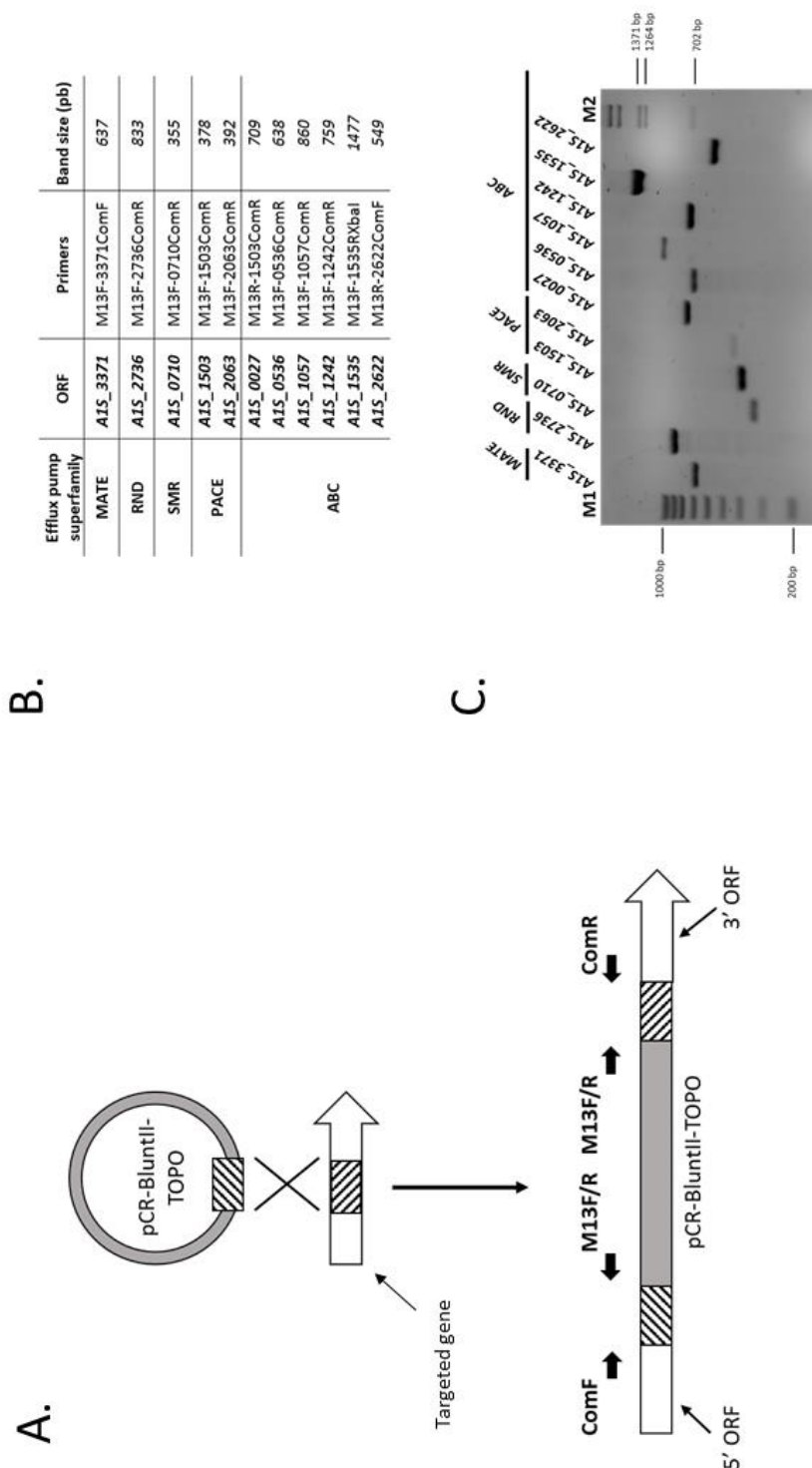


Figure 2

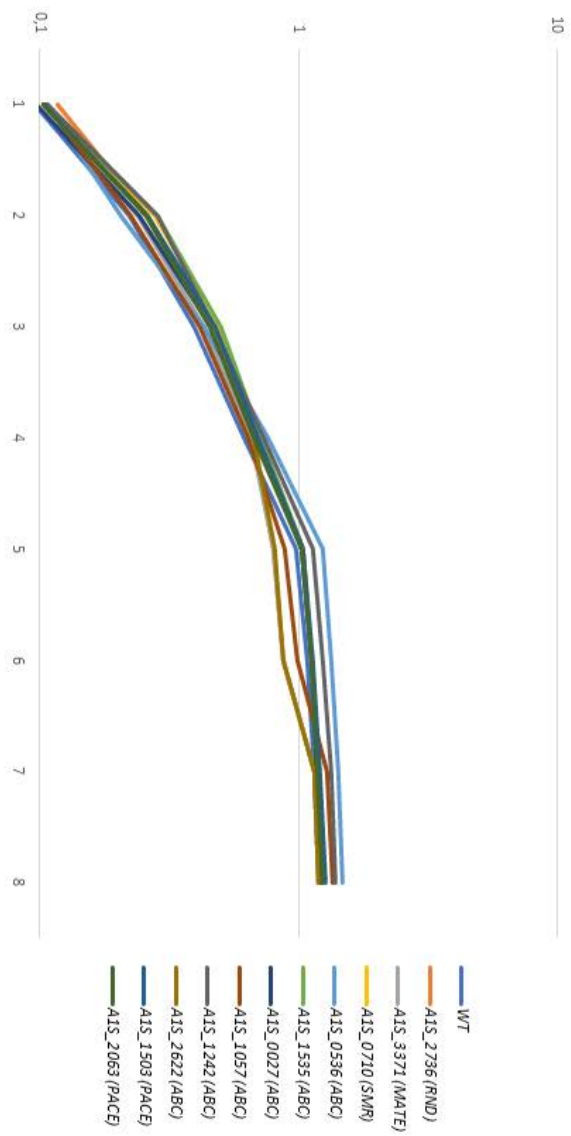


Figure 3

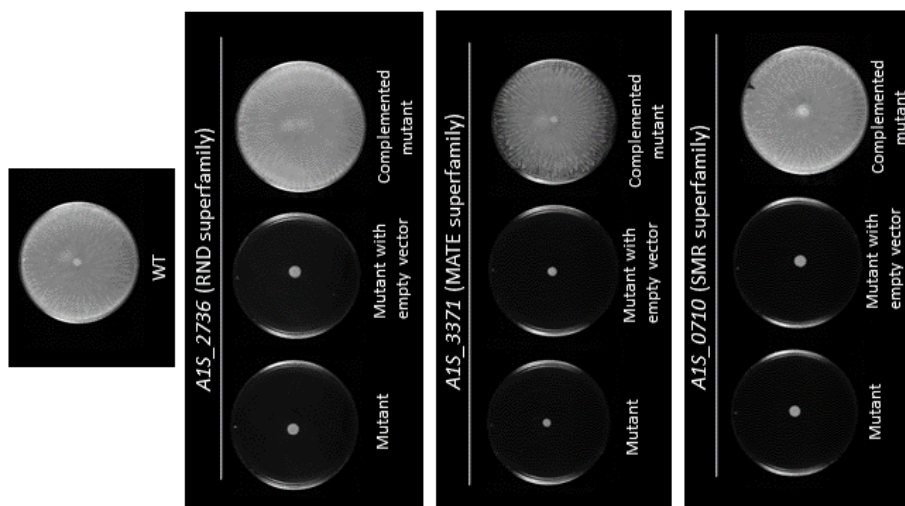


Figure 4

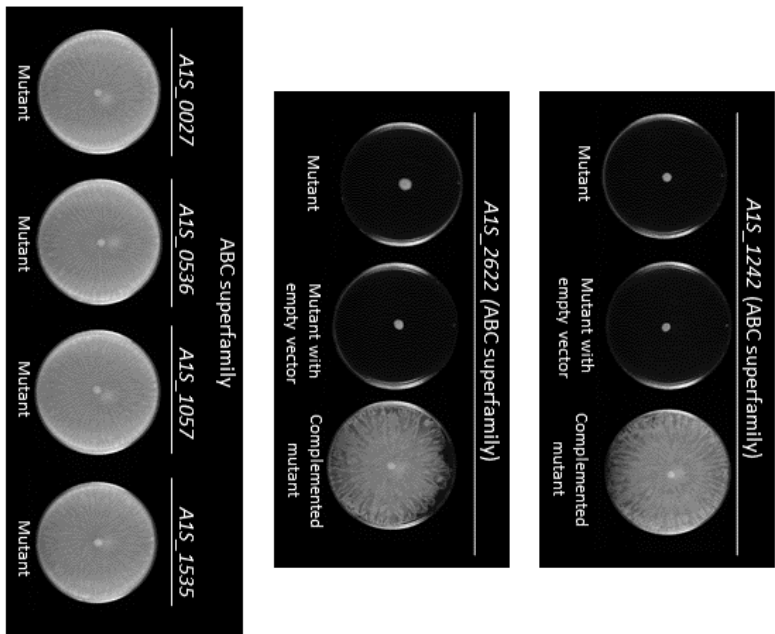


Figure 5

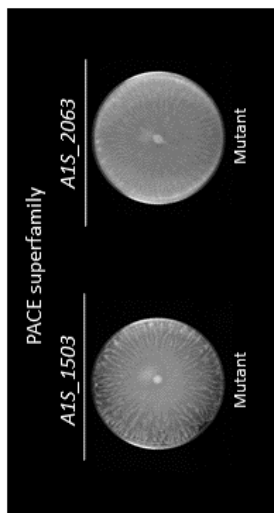
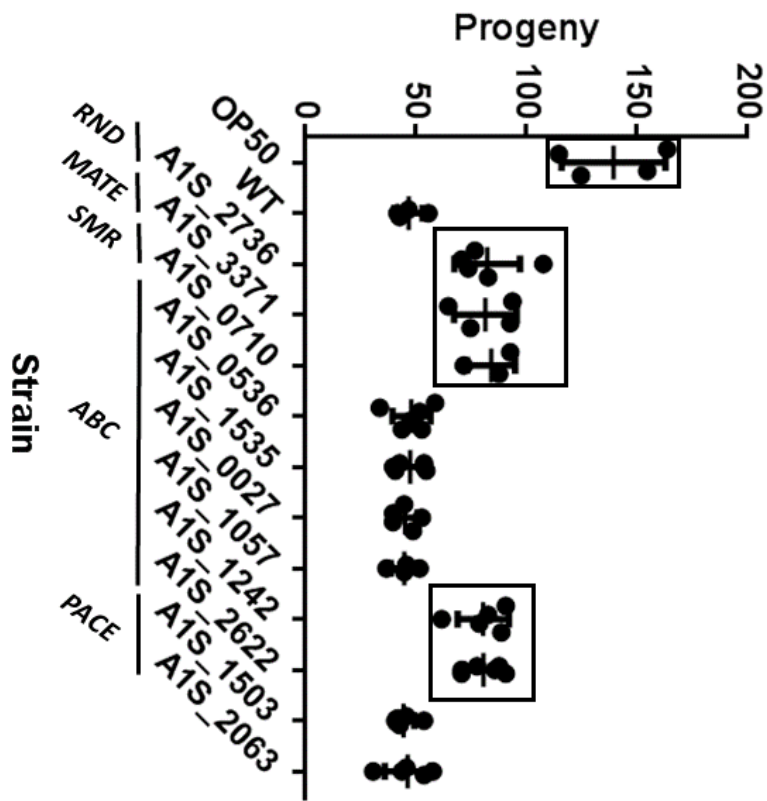


Figure 6



4 **DISCUSIÓN**

4. Discusión

Acinetobacter baumannii es un microorganismo causante de infecciones en hospitales de todo el mundo que afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos ingresados en unidades de cuidados intensivos o con quemaduras graves. En los últimos años, este patógeno nosocomial se está convirtiendo en un serio problema de salud a nivel mundial (Visca *et al.*, 2011). Alarmantemente, una gran parte de los aislados son resistentes a prácticamente todos los antimicrobianos de uso frecuente en clínica. Por ello, la emergencia de cepas multirresistentes provoca que, a pesar del arsenal de antimicrobianos disponible, algunas infecciones causadas por *A. baumannii* se estén volviendo prácticamente intratables. El difícil control de las infecciones causadas por este microorganismo ha provocado que su relevancia como patógeno haya ido aumentando gradualmente en las últimas décadas (Peleg *et al.*, 2008).

A. baumannii se caracteriza por su enorme capacidad para desarrollar y adquirir nuevos mecanismos de resistencia a una gran variedad de antimicrobianos. Además, a pesar de que en un primer momento se describió como un microorganismo incapaz de moverse debido a la ausencia de flagelos, también se caracteriza por ser capaz de desplazarse a través de superficies mediante un particular tipo de motilidad exclusivo de este género que se conoce como *surface-associated motility*. El hecho de que en *A. baumannii* se distingan dos tipos de movimiento que no se empezaron a discernir con claridad hasta hace pocos años: *twitching* (dependiente de *pili* de tipo IV) y *surface-associated motility* (movimiento que parece ser independiente de apéndices), dificulta el conocimiento de los mecanismos que rigen este último (Clemmer *et al.*, 2011).

Debido a que las bases moleculares del movimiento de tipo *surface-associated motility* permanecen sin ser totalmente esclarecidas, la presente Tesis Doctoral tiene como finalidad la identificación de genes implicados en este tipo de motilidad, así como el estudio de su relación con la virulencia en el patógeno nosocomial *A. baumannii*.

4.1. Aislamiento y caracterización de mutantes espontáneos de *A. baumannii* resistentes a rifampicina que presentan un patrón de motilidad alterado

La mutagénesis es un proceso implicado en la adquisición de resistencia a los antimicrobianos en diversos microorganismos debido, entre otras causas, a la introducción de cambios puntuales en los genes que codifican proteínas diana de estos. La expresión de genes del sistema SOS está relacionada con este proceso y provoca un incremento de la tasa de mutagénesis en bacterias como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, entre muchas otras (Sanders *et al.*, 2006; Cirz y Romesberg, 2007; Petrosino *et al.*, 2009). Esta respuesta se induce por daño en el DNA, el cual puede ser causado bien por agentes físicos como la luz ultravioleta o por agentes químicos entre los que se encuentran diversos agentes antimicrobianos (Baharoglu y Mazel, 2014). Entre estos últimos se encuentran los que causan daños directos en el DNA, como por ejemplo las quinolonas, desencadenando la activación del sistema SOS; mientras que otros, como es el caso de los β -lactámicos, activan esta respuesta de una manera indirecta, mediante rutas alternativas como la producción de especies reactivas del oxígeno que generan estrés oxidativo (Händel *et al.*, 2015; Kohanski *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2016). Cuando se producen daños en el DNA se forman hebras monocatenarias a las que se une la proteína RecA, el activador del sistema, formando nucleofilamentos. Esto provoca la autohidrólisis de la proteína LexA, el represor del sistema, y la consiguiente expresión de los genes SOS. En el caso de *A. baumannii*, pese a no poseer LexA, presenta varias proteínas UmuD, DNA polimerasas tendentes a error, una de las cuales, UmuDAb, actúa de forma análoga a LexA (Aranda *et al.*, 2014). El sistema SOS provoca la activación de diversos genes entre los que se encuentra *recA*, cuyo producto además de ser el activador del sistema, protege y estabiliza el DNA dañado participando en su reparación por recombinación homóloga. En esta respuesta también se activan genes como *uvrABC* o *uvrD* que reparan las lesiones en el DNA mediante la escisión de nucleóticos, que codifican las subunidades de una endonucleasa y una DNA helicasa, respectivamente. Asimismo, durante este proceso se activan los genes que codifican polimerasas tendentes a error como *dinA* (DNA polimerasa II), *dinB* (DNA polimerasa IV) o *umuDC* (DNA polimerasa V) (Cox, 1999; Napolitano *et al.*, 2000; Erill *et al.*, 2007; Janion, 2008). Estas últimas participan en la adquisición de resistencias a determinados antimicrobianos ya que pueden provocar mutaciones puntuales en genes que codifican proteínas diana de algunos agentes antimicrobianos, como por ejemplo la rifampicina (Cirz y Romesberg, 2007).

La rifampicina interactúa con la RNA polimerasa uniéndose a la subunidad β (RpoB) y bloqueando la transcripción del RNA. Determinadas sustituciones aminoacídicas en esta subunidad causan cambios conformacionales en la región de interacción, disminuyendo su afinidad por la rifampicina y provocando la aparición de resistencia a este agente antimicrobiano (Campbell *et al.*, 2001). La resistencia a este antimicrobiano se ha relacionado con mutaciones puntuales en el gen *rpoB* en diversas especies entre las que se encuentran *E. coli* y *Mycobacterium tuberculosis* (Billington *et al.*, 1999; Reynolds, 2000). En *A. baumannii*, tras el tratamiento con agentes que dañan el DNA, la frecuencia de aparición de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina se incrementa. Estos mutantes presentan mutaciones puntuales en el gen *rpoB* que han sido originadas durante el proceso de reparación del DNA (Norton *et al.*, 2013). Referente a este fenómeno, en trabajos previos acerca del sistema SOS, específicamente sobre la mutagénesis inducida por daño en el DNA en *A. baumannii* (Anexo I), se aislaron mutantes resistentes a rifampicina, algunos de los cuales presentaban un patrón de motilidad alterado. Por ello, de acuerdo con el primer objetivo establecido en esta Tesis Doctoral se aislaron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina y se focalizó el estudio en aquellos que mostraban patrones de motilidad alterados. En primer lugar, se aislaron 10 mutantes espontáneos resistentes a rifampicina y se realizaron ensayos de motilidad. En estos ensayos, el 60% de los aislados mostraban un patrón de motilidad alterado.

Las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina se acumulan en regiones concretas del gen *rpoB* por lo que se procedió, siguiendo el objetivo 1, a la secuenciación de estas regiones en los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina. Los resultados de la secuenciación revelaron que todos ellos presentaban mutaciones puntuales en el gen *rpoB* (Figura 1, Artículo 1). Las mutaciones detectadas se encontraban en las posiciones glutamina 522, el ácido aspártico 525 y la serina 540. Todas ellas ya habían sido identificadas en mutantes derivados de la cepa ATCC 17978 que presentan resistencia a este antimicrobiano (Norton *et al.*, 2013). Además, los mutantes que presentaban una abolición de la motilidad tenían en común que presentaban una sustitución aminoacídica en la glutamina 522 o en la serina 540. Sin embargo, aquellos que tenían un cambio aminoacídico en el ácido aspártico 525 mostraban un fenotipo de motilidad igual al de la cepa salvaje. A continuación, se seleccionaron como representantes de cada sustitución aminoacídica y patrón de motilidad correspondiente los mutantes Rif^{R3} (Asp525→Val), Rif^{R5} (Ser540→Tyr) y Rif^{R8} (Gln522→Lys). El hecho de que mutaciones en el gen *rpoB* conlleven un fenotipo de motilidad alterado se ha descrito recientemente en varias especies. Por ejemplo, en *E. coli* se observó que determinadas sustituciones aminoacídicas en la proteína RpoB provocan una disminución de la motilidad

Discusión

relacionada con una desregulación de genes implicados en la biosíntesis de los flagelos (Meenakshi y Munavar, 2018). En la bacteria gram positiva *Bacillus velenzensis*, también se ha relacionado la presencia de mutaciones en el gen *rpoB* con la afectación de la motilidad. Los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina presentan una motilidad de tipo *swarming* notablemente reducida en comparación con la cepa salvaje (Cai *et al.*, 2017). Un fenómeno similar sucede en el patógeno de peces *Flavobacterium psychrophilum*, la presencia de determinadas sustituciones aminoacídicas en la proteína RpoB provoca una notable reducción de la motilidad de tipo *gliding* (Gliniewicz *et al.*, 2015).

Por otro lado, la complementación de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* con el gen salvaje revertió el fenotipo de motilidad y sensibilidad a la rifampicina (Figura 3, Artículo 1). Esto demuestra que las mutaciones en el gen *rpoB* son las responsables de los cambios observados. La recuperación del fenotipo salvaje en un mutante espontáneo resistente a rifampicina al introducir un vector de expresión con el gen salvaje ya se había observado en otras especies como es el caso de *M. tuberculosis* (Miller *et al.*, 1994). La recuperación del fenotipo salvaje en los mutantes de *A. baumannii* se podría explicar porque el producto del gen *rpoB* salvaje se encuentra en un elevado número de copias, lo que determina el desplazamiento en el holoenzima de la RNA polimerasa de la subunidad con las sustituciones aminoacídicas que determina la resistencia a rifampicina.

El hecho de que determinadas mutaciones puntuales en el gen *rpoB* provoquen alteraciones en la motilidad podría ser debido a la respuesta astringente. Este es un mecanismo muy conservado en diferentes especies bacterianas que se activa ante señales de estrés y permite la adaptación a condiciones limitantes de nutrientes (Alifano *et al.*, 2015). El 3',5'-bispirofosfato de guanosina (ppGpp) es una molécula señal de esta respuesta que interviene en la regulación de la fisiología bacteriana controlando diversos procesos entre los que se encuentran la transcripción y el metabolismo. Este mecanismo se encuentra regulado, principalmente, por dos enzimas clave: RelA y SpoT. RelA únicamente participa en la síntesis de pppGpp, que posteriormente es convertido en ppGpp siendo este la molécula efectora. La síntesis de pppGpp es inducida por escasez aminoacídica o por choque término. Sin embargo, SpoT se activa ante varias señales de estrés como escasez de ácidos grasos, hierro o de fuentes de carbono y presenta tanto actividad de síntesis como hidrolítica (Hauryliuk *et al.*, 2015). En el proceso que activa la respuesta astringente, la RNA polimerasa interacciona por la región de la subunidad β con el ppGpp. En condiciones de estrés, aumenta la concentración de ppGpp y se produce la unión de esta molécula a la RNA polimerasa provocando alteraciones en la

transcripción de diversos promotores y regulando la expresión de genes requeridos para el crecimiento, la división celular y la respuesta al estrés. En algunas especies bacterianas se ha observado que mutaciones puntuales en el gen *rpoB* causan alteraciones en la afinidad por ciertos promotores resultando en cambios en la expresión génica global. Esto da lugar a una respuesta similar a la que se produce durante la respuesta astringente. Las sustituciones aminoacídicas en la proteína RpoB podrían provocar cambios conformacionales en la proteína que mimetizarían la unión de la molécula de ppGpp (Boutte y Crosson, 2013; Zuo *et al.*, 2013).

En especies como *E. coli*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces lividans* se ha observado que mutaciones puntuales en el gen *rpoB* originan cambios en la transcripción de genes regulados por la respuesta astringente mediada por ppGpp (Zhou y Jin, 1998; Lai *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Un fenómeno similar podría suceder en los mutantes de *A. baumannii* Rif^{R5} y Rif^{R8} que pierden motilidad: las mutaciones presentes en el gen *rpoB* podrían causar un cambio conformacional en la proteína RpoB que simularía la unión del ppGpp. Esta variación podría provocar cambios análogos a los que suceden durante la respuesta astringente, produciéndose alteraciones en el perfil transcripcional como ya se ha descrito en otras especies, modificándose la expresión de diversos genes entre los que se podrían encontrar genes relacionados con la motilidad. De hecho, sustituciones en la proteína RpoB de *E. coli*, entre las que se incluye a la serina 531, que corresponde a la serina 540 de esta proteína en *A. baumannii*, provocan alteraciones en la interacción de RpoB con ciertos promotores de genes que participan en la respuesta astringente (Zhou y Jin, 1998). El mismo fenómeno sucede en *Neisseria meningitidis*: el estudio transcripcional de un mutante resistente a rifampicina con una sustitución aminoacídica en la proteína RpoB indicó que también se producía la activación de genes similares a los de la respuesta astringente. Además, entre los genes con un nivel de expresión menor se encontraban genes cuyos productos estaban relacionados con la virulencia como por ejemplo porinas, adhesinas o *pili* de tipo IV (Colicchio *et al.*, 2015).

Se han descrito también alteraciones en la motilidad relacionadas con dos de las proteínas reguladoras de la respuesta astringente, RelA y SpoT. En el patógeno *P. aeruginosa*, la inactivación de los genes *relA* y *spoT* provocan una disminución de la virulencia. Junto a ello, se confirmó que este mutante muestra una síntesis alterada de diversos factores de virulencia, así como una motilidad de tipo *swarming* y *twitching* abolida (Vogt *et al.*, 2011). En el patógeno vegetal *Pseudomonas syringae*, también se ha observado que el ppGpp se encuentra relacionado con la motilidad. El mutante incapaz de sintetizar esta molécula señal presenta la abolición del movimiento de tipo *swarming* y también una menor producción del sideróforo

Discusión

pioverdina, considerado un importante factor de virulencia en este patógeno (Chatnaparat *et al.*, 2015).

Así pues, mutaciones puntuales en el gen *rpoB* provocan una respuesta similar a la respuesta astringente, modificándose la expresión de determinados genes. Por este motivo, el aislamiento de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* con patrón de motilidad alterado constituye una metodología eficaz para la identificación de genes implicados en la motilidad y la virulencia en este patógeno nosocomial.

4.2. Estudio de la virulencia de los mutantes espontáneos de *A. baumannii* resistentes a rifampicina con un patrón de motilidad alterado

De acuerdo con el segundo objetivo de la presente Tesis Doctoral y, con el fin de comprobar si la motilidad juega un papel clave en la virulencia de *A. baumannii*, se llevaron a cabo ensayos de virulencia con los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina. Se evaluó la virulencia tanto de los mutantes Rif^{R5} y Rif^{R8}, que pierden motilidad, como del mutante Rif^{R3}, que presenta un fenotipo de motilidad igual al de la cepa salvaje. En dichos ensayos se empleó el modelo de fertilidad del nematodo *Caenorhabditis elegans*, recientemente optimizado para este patógeno nosocomial (Vallejo *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en este punto indicaron que los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* que presentan un patrón de motilidad alterado muestran una menor virulencia. Sin embargo, no sucede lo mismo en el mutante con una motilidad igual a la cepa salvaje, que muestra también un nivel de virulencia similar a esta (Figura 2, Artículo 1). Pese a que todos los mutantes manifiestan mutaciones puntuales en el gen *rpoB*, dependiendo del perfil de motilidad su virulencia varía, existiendo una correlación entre la capacidad de desplazamiento y la virulencia.

La motilidad se ha vinculado con la capacidad infectiva en una gran variedad de bacterias patógenas. Un ejemplo de ello es el *twitching* en *P. aeruginosa*. Este tipo de movimiento permite el desplazamiento de esta bacteria en sentido contrario al flujo en dispositivos de microfluidos, facilitando la colonización (Kazmierczak *et al.*, 2015). Además, en ensayos de virulencia empleando como modelo a la ameba *Dictyostelium discoideum*, funcionalmente similar a los macrófagos, las células que se encuentran adheridas a la superficie resultan más virulentas que

las que se encuentran en suspensión (Siryaporn *et al.*, 2014). En el caso de *E. coli* enterohemorrágica, los *pili* de tipo IV juegan un papel importante en la virulencia de este microorganismo. Estos apéndices no solamente facilitan la colonización del hospedador mediante la motilidad de tipo *twitching*, sino que también están implicados en la formación de *biofilm* o en la unión específica a proteínas de la matriz extracelular del hospedador como la fibronectina (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009). Los *pili* de tipo IV en *Haemophilus influenzae* participan en la colonización del hospedador de una manera similar a la descrita, por lo que constituyen factores de virulencia potenciales en este patógeno (Kolappan *et al.*, 2012). Otro ejemplo en el que estos apéndices resultan importantes en la virulencia de la bacteria es el caso de *N. meningitidis*, la motilidad de tipo *twitching* se encuentra relacionada con la adherencia a las células del hospedador (Albiger *et al.*, 2003). En *Legionella pneumophila*, esta clase de motilidad también se ha vinculado con la virulencia y la formación de *biofilm* facilitando la colonización (Coil y Anné, 2009). Por último, otro ejemplo sería el patógeno *Proteus mirabilis* que presenta motilidad de tipo *swimming*, *swarming* y *twitching* que le permiten desplazarse a través de los catéteres urinarios colonizando rápidamente al hospedador (Hola *et al.*, 2012).

Relacionado con los efectos de las mutaciones puntuales en el gen *rpoB*, en algunos estudios se ha profundizado en las consecuencias de estas en la virulencia. En el caso de *M. tuberculosis* la presencia de una sustitución aminoacídica en la proteína RpoB se refleja en una menor inflamación en un modelo murino (Rifat *et al.*, 2017). Además, el estudio del perfil transcripcional de una cepa de este patógeno sensible a rifampicina y otra resistente reveló que una gran cantidad de los genes desregulados eran genes relacionados con la virulencia (De Knecht *et al.*, 2013). En el caso de *Staphylococcus aureus* se obtuvieron resultados similares en un modelo de bacteremia probando un mutante espontáneo resistente a rifampicina que resultó tener una virulencia atenuada en comparación con la cepa salvaje (Gao *et al.*, 2013). Otros ejemplos son *Shigella* y *E. coli* enteropatógena, el fenotipo de resistencia a rifampicina también se correlacionó con una menor virulencia en un modelo de virulencia en cobaya (Osada *et al.*, 1973). El mismo fenómeno se observó en un modelo de virulencia murino al estudiar mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *Francisella tularensis* (Bhatnagar *et al.*, 1994).

Una posible explicación de la pérdida de virulencia en los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* podría ser que la abolición de la motilidad provoque una menor capacidad de invasión o también podría deberse a la desregulación de genes relacionados con la virulencia.

4.3. Identificación de nuevos genes implicados en la motilidad y la virulencia en *A. baumannii* mediante el análisis del perfil transcripcional de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina con motilidad alterada

Como se ha comentado en el punto anterior, en diversos patógenos, mutaciones puntuales en el gen *rpoB* originan cambios en la expresión génica similares a los que se producen en la respuesta astringente. Con el fin de abordar el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo un estudio transcripcional de los mutantes espontáneos de *A. baumannii* resistentes a rifampicina con pérdida de motilidad y con virulencia atenuada (Rif^{R5} y Rif^{R8}). El uso de microarrays de cDNA y la comparación de los datos obtenidos en los dos mutantes y en la cepa salvaje permitieron la identificación de genes posiblemente implicados en *surface-associated motility* en este microorganismo.

Los microarrays son una herramienta útil para la comparación de la expresión génica bajo diferentes condiciones o entre distintas cepas permitiendo conocer el transcriptoma de las muestras de estudio. En el microarray de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *A. baumannii* se examinaron 3431 secuencias de cDNA. Los resultados obtenidos se encuentran depositados en la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) bajo el número de acceso GSE73193. Entre las secuencias analizadas se encontró que 30 genes del mutante Rif^{R5} y 221 del mutante Rif^{R8} diferían más de dos veces en su expresión en comparación con la cepa salvaje. De los genes del mutante Rif^{R5}, 12 de ellos presentaban un mayor nivel de transcripción en el mutante y 18 una menor expresión con respecto a la cepa salvaje. En el caso del mutante Rif^{R8}, se encontraron 59 genes con mayor expresión y 162 con menor expresión en comparación con la cepa salvaje. En general, la mayoría de los genes que mostraban una expresión diferencial eran enzimas implicadas en el metabolismo, transportadoras de membrana o reguladores transcripcionales. Ambos mutantes presentaban 6 genes en común que mostraban una disminución de la expresión: *AU097_RS14730*, que codifica un posible componente de un transportador de taurina; *AU097_RS16805*, cuyo producto es una aldeído deshidrogenasa al igual que el gen *AU097_RS17030*; *AU097_RS17035*, que codifica una fumarilacetoacetato hidrolasa; *AU097_RS17040*, cuyo producto es un hipotético transportador de membrana de tipo MFS y *AU097_RS17045* codificante de una dihidroxiácido deshidratasa (Tabla 1, Artículo 1). Para validar los resultados obtenidos en el microarray se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real comprobándose que estos seis genes mostraban una disminución en su expresión en ambos

mutantes (Figura 4, Artículo 1). Además, al introducir el gen *rpoB* salvaje en los mutantes, se recuperaron unos niveles de expresión de estos genes similares a los de la cepa salvaje.

En otros microorganismos, también se ha estudiado el efecto de la presencia de sustituciones aminoacídicas en la proteína RpoB. Por ejemplo, el estudio transcriptómico de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina en *N. meningitidis* reveló que varios genes mostraban alteraciones en su expresión. Entre ellos se encontraban numerosos genes relacionados con el metabolismo y otros genes que codifican reguladores transcripcionales o genes relacionados con la división celular (Neri *et al.*, 2010). Resultados similares se obtuvieron en *M. tuberculosis*, patógeno contra el cual el uso de la rifampicina es habitual para el tratamiento de las infecciones. En mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de este microorganismo se observó que genes cuyos productos participan en el metabolismo o el transporte de moléculas a través de la membrana presentaban una mayor expresión en estos mutantes (Bisson *et al.*, 2012). En el caso de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de *S. aureus*, entre los genes que mostraban variaciones en su expresión se encontraban algunos implicados en el *quorum sensing* o en la biosíntesis de la cápsula (Gao *et al.*, 2013).

En el microarray de los mutantes de *A. baumannii* con pérdida de motilidad Rif^{R5} y Rif^{R8}, entre los genes que mostraban una expresión alterada se encontraban, al igual que en los patógenos citados anteriormente, principalmente, genes relacionados con el metabolismo o el transporte de membrana. Como ya se ha comentado, probablemente esto sea debido a que se produce una desregulación génica similar a la que sucede durante la respuesta astringente. De esta forma, se altera la expresión de algunos genes relacionados con la virulencia o con la supervivencia en el hospedador que modifican la *fitness* de los mutantes.

Entre las secuencias de cDNA que presentaban variaciones en su patrón de expresión se continuó trabajando con 6 genes, mencionados al principio de este apartado, comunes a los dos mutantes cuya expresión difería en más de dos veces con respecto a la cepa salvaje. Se construyeron mutantes mediante disrupción génica y se estudió tanto su patrón de motilidad como de virulencia. Los resultados indicaron que en *A. baumannii* parece existir una relación entre motilidad y virulencia, ya que la ausencia de motilidad ha resultado, en todos los casos, siempre en una menor virulencia (Figuras 6 y 8, Artículo 1). Una explicación a este fenómeno podría ser que la motilidad facilita la colonización del hospedador haciendo esto que las cepas que presentan motilidad sean más virulentas. Pese a que en *A. baumannii* el papel de la motilidad como posible factor que afecta a la virulencia no está del todo esclarecido, sí se han realizado estudios en los que se apunta a una asociación entre motilidad y virulencia en este

Discusión

patógeno nosocomial. Un ejemplo de ello es el caso de un derivado de la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 que presenta una secuencia de inserción en el gen que codifica un represor transcripcional y muestra una mayor motilidad, así como una mayor adherencia a células alveolares humanas y una virulencia considerablemente más elevada en el modelo de *C. elegans* que la cepa salvaje (Eijkelkamp *et al.*, 2013). Por otra parte, en un estudio en el que se construyó un mutante por disrupción génica del gen *prpA*, que codifica la subunidad de la pilina de un *pilus* de tipo I regulado por la luz, se observó que el mutante no solamente perdía motilidad sino que, además, mostraba una notable reducción de la virulencia (Wood *et al.*, 2018).

Otro aspecto que se evaluó en este tercer objetivo es el grado de conservación de los 6 genes desregulados comunes a los mutantes Rif^{R5} y Rif^{R8} de *A. baumannii* entre cepas clínicas cuyos genomas se encuentran completamente secuenciados. La búsqueda *in silico* de estos 6 genes indicó que todos ellos se encuentran altamente conservados en las 68 cepas de las que se dispone de la secuencia completa de su genoma. La presencia de estos genes se detectó tanto en cepas multirresistentes como *A. baumannii* ACICU y *A. baumannii* AYE, así como en cepas susceptibles a la mayoría de antimicrobianos entre las que se encuentra *A. baumannii* AB307-0294. Por otro lado, se llevó a cabo la construcción de mutantes mediante disrupción génica de estos 6 genes en la cepa clínica *A. baumannii* MAR002, recientemente aislada en el Hospital del Mar de Barcelona, obtenida a partir de una muestra de herida (Álvarez-Fraga *et al.*, 2015). La obtención de los mismos resultados que en la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 refuerza la importancia de estos genes en la virulencia de *A. baumannii* (Figura 10, Artículo 1).

Entre los genes que muestran una menor expresión en los mutantes de *A. baumannii* Rif^{R5} y Rif^{R8} y que están implicados en motilidad y virulencia se encuentran los genes *AU097_RS16805* (que codifica una aldehído deshidrogenasa) y *AU097_RS17045* (que codifica una dihidroxiácido deshidratasa). Mediante PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) se analizó el entorno genético de estos genes (Figura 5, Artículo 1). El gen *AU097_RS16805* forma parte de una unidad transcripcional monocistrónica, mientras que, el gen *AU097_RS17045* se encuentra formando parte de una unidad transcripcional con el gen *AU097_RS17050* que codifica un regulador transcripcional, cuya inactivación no tiene efecto en motilidad. En *E. coli* enterohemorrágica la deshidrogenasa de aldehídos aromáticos FeaB tiene un papel importante en el movimiento mediante quimiotaxis hacia la norepinefrina, compuesto que actúa como un quimioatrayente (Pasupuleti *et al.*, 2014). En el caso del patógeno de plantas *P. syringae*, la inactivación de la deshidratasa de GDP-D-manosa provoca una disminución de la motilidad de tipo *swarming* en este patógeno (Chiku *et al.*, 2013). Por otro lado, diversas enzimas metabólicas

relacionadas con la síntesis de 1,3-diaminopropano podrían estar relacionadas con *surface-associated motility*, ya que este compuesto, que es la principal poliamina producida por *Acinetobacter*, podría actuar como molécula señal en este tipo de motilidad (Skiebe *et al.*, 2012). Por todo ello, es posible que la aldehído deshidrogenasa y la dihidroxiácido deshidratasa participen en la modificación de moléculas necesarias para el movimiento de tipo *surface-associated motility* como podrían ser moléculas señal, por el momento todavía desconocidas.

El gen *AU097_RS14730*, cuyo producto es un posible componente de un transportador de taurina podría participar en el transporte de esta molécula para su posterior uso como fuente de sulfuro por la bacteria. El análisis mediante RT-PCR del entorno génico de este gen reveló que es el primer componente de una unidad transcripcional formada por los genes *AU097_RS14735* (que codifica la permeasa de un transportador de taurina) y *AU097_RS14740* (que codifica una taurina dioxigenasa) cuya inactivación no tiene efecto en la motilidad (Figura 5, Artículo 1). La taurina es un compuesto que tiene un papel importante en los mamíferos, participando en procesos como la neuromodulación, osmorregulación o la estabilización de la membrana. Por ello, durante el proceso de infección en este patógeno podría existir una competición entre la bacteria y el hospedador por este compuesto, siendo importantes las proteínas que participan en su transporte (Vallenet *et al.*, 2008). Además, en el patógeno *Vibrio cholerae* se identificó un quimiorreceptor relacionado con la respuesta a la taurina, uno de los principales constituyentes de la bilis humana. Este tipo de receptores podrían ser importantes no únicamente en la quimiotaxis sino también en la virulencia de este patógeno (Nishiyama *et al.*, 2016). En *A. baumannii* este tipo de transportadores podría tener una función similar, participando durante el proceso de infección en la competición frente al hospedador y colaborando en la patogénesis.

Por último, otro de los genes que presenta una menor expresión en los mutantes Rif^{R5} y Rif^{R8} y cuya disrupción resultó en una pérdida de motilidad y atenuación de la virulencia, es el gen *AU097_RS17040*. El producto de este gen de *A. baumannii* aparece anotado como un transportador de tipo MFS y forma parte de una unidad transcripcional junto con los genes *AU097_RS17035* (que codifica una fumarilacetoacetato hidrolasa) y *AU097_RS17030* (que codifica una aldehído deshidrogenasa) (Figura 5, Artículo 1). Los tres genes muestran una menor expresión en los mutantes Rif^{R5} y Rif^{R8} con respecto a la cepa salvaje, sin embargo, únicamente la inactivación del primero de la unidad transcripcional, *AU097_RS17040*, mostró tener efecto en la motilidad y virulencia, mientras que la inactivación de los otros dos genes no mostró tener ningún efecto. Probablemente, los genes *AU097_RS17030* y *AU097_RS17035* presenten una menor expresión por el hecho de formar parte de la misma unidad transcripcional y localizarse

Discusión

downstream al gen *AU097_RS17040*, por lo que la inactivación de este último no causa ningún efecto polar. Los transportadores de tipo MFS se encuentran relacionados con la quimiotaxis, proceso mediante el cual las bacterias se desplazan hacia quimioatrayentes o se alejan de quimiorepelentes empleando apéndices como *pili* o fragelos. En el caso del patógeno *Pseudomonas putida*, el desplazamiento mediante quimiotaxis hacia el ácido aromático 4-hidroxibenzoato está mediado por un transportador de tipo MFS denominado PcaK (Ditty y Harwood, 1999). Otro papel importante de los transportadores de tipo MFS es la expulsión de agentes antimicrobianos. En *A. baumannii*, los estudios referentes al papel de las bombas de expulsión de antimicrobianos en la motilidad y virulencia son bastante limitados. Recientemente, se descubrió que la ausencia del transportador de tipo MFS denominado AbaF, implicado principalmente en la resistencia a fosfomicina, disminuye la virulencia de *A. baumannii* en el modelo de *C. elegans* (Sharma *et al.*, 2017).

En los últimos años, se han realizado estudios transcriptómicos en diversas especies bacterianas con el fin de obtener datos que permitan elucidar las bases moleculares que rigen la motilidad. En *P. aeruginosa*, especie filogenéticamente cercana a *A. baumannii*, se obtuvieron los perfiles transcriptómicos de las poblaciones bacterianas situadas tanto en el centro como en el extremo de las placas de motilidad y de una población crecida en una placa con mayor porcentaje de agar que impedía el desplazamiento de las bacterias. Entre los genes que mostraban diferencias de expresión entre las poblaciones que presentaban motilidad y las que no, se encontraban en mayor proporción genes que codifican factores de secreción y enzimas metabólicas (Tremblay y Déziel, 2010).

Recientemente Murray y colaboradores llevaron a cabo el estudio del perfil transcripcional de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 durante bacteremia en un modelo murino. Los datos obtenidos revelaron que las células durante este proceso infeccioso se encontraban en un estado planctónico (Murray *et al.*, 2017). Además, los genes identificados en esta Tesis Doctoral no muestran un incremento en su expresión durante la bacteremia. Esto podría explicarse porque las células durante este proceso no se encuentran sobre ninguna superficie, sino que se hallan en suspensión, de manera que, en estas condiciones, serían incapaces de desplazarse mediante *surface-associated motility*. Esto reforzaría la posibilidad de que los productos de los genes *AU097_RS14730*, *AU097_RS16805*, *AU097_RS17040* y *AU097_RS17045* se encuentran implicados en este tipo de motilidad. En *E. coli* se llevaron a cabo estudios similares en los que se analizaron las diferencias de expresión génica durante el movimiento de tipo *swarming*, *swimming* y en estado planctónico. Se observó que el perfil transcripcional era

distinto según el tipo de motilidad (Lippolis *et al.*, 2016). Lo mismo sucedió al analizar el patrón de transcripción de células de *A. baumannii* sésiles (formando parte de un *biofilm*) y planctónicas. En las células que se encontraban en el *biofilm* destacaba la expresión de varios genes, entre ellos, los integrantes de un operón implicado en *quorum sensing* en este patógeno (Rumbo-Feal *et al.*, 2013).

4.4. Caracterización funcional de la bomba de expulsión de tipo MFS AbaQ, codificada por el gen AU097_RS17040 de *A. baumannii*

De acuerdo con el cuarto objetivo en esta Tesis Doctoral en el segundo trabajo presentado se llevó a cabo la caracterización de la bomba de expulsión AbaQ (*A. baumannii* *Quinolone resistance transporter*) codificada por el gen AU097_RS17040 de *A. baumannii*, que corresponde al gen A1S_1837/8, según la anotación antigua del genoma disponible en la base de datos del NCBI (CP000521.1). La expresión de este gen disminuye en los mutantes Rif^{R5} y Rif^{R8} y su disrupción resulta en una pérdida de motilidad y virulencia. Además, se encuentra ampliamente distribuido entre las cepas de *A. baumannii* de las que se dispone la secuencia completa de su genoma.

Las bombas de expulsión evitan la acumulación de sustancias tóxicas en el interior celular de una manera activa, por lo que algunas de ellas tienen un papel importante en la resistencia a antimicrobianos. Hasta ahora, se han descrito 6 superfamilias de bombas de expulsión: MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance Nodulation Division*), MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), ABC (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette*) y PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*) (Saier y Paulsen, 2001).

El producto del gen *abaQ* aparecía anotado como un hipotético transportador de tipo MFS del cual su análisis *in silico* reveló que se encuentra integrado por 12 hélices α -transmembrana, cuyos dominios N- y C-terminal están ubicados en el citoplasma (Figura 1, Artículo 2). Esta estructura se corresponde con la que presentan los transportadores MFS de tipo DHA-1, conformados por 12 en lugar de 14 hélices transmembrana como sucede en los MFS de tipo DHA-2 (Saier y Paulsen, 2001). Esta proteína presenta un bajo porcentaje de identidad y similitud con otras bombas de expulsión de este tipo como por ejemplo AmvA, que confiere resistencia a eritromicina (Rajamohan *et al.*, 2010); TetA y TetB, relacionados con la resistencia a tetraciclinas (Ribera *et al.*, 2003a); o bombas de expulsión de cloranfenicol como CraA, FloR o

Discusión

CmlA (Roca *et al.*, 2009; Hamidian *et al.*, 2017; Leong *et al.*, 2017) (Tabla 1, Artículo 2). Los miembros de esta familia de bombas de expulsión en lugar de exportar un amplio rango de antimicrobianos suelen ser específicos de sustrato (Vila *et al.*, 2007).

En cuanto a la caracterización del perfil de resistencia a antimicrobianos del mutante obtenido mediante disrupción génica del gen que codifica la proteína AbaQ, se ha observado que presenta una alteración en la susceptibilidad a ciertos antimicrobianos (Tabla 2, Artículo 2). Se detectó una mayor sensibilidad del mutante, de entre 2 y 4 veces de diferencia a trimetoprim y novobiocina, y de 8 hasta 32 veces a las quinolonas testadas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina y levofloxacina) con respecto a la cepa salvaje. En cuanto a los otros antimicrobianos testados, entre los que se encontraban β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, polimixinas, tetraciclinas, rifampicina y cloranfenicol, el mutante no mostró diferencias en comparación con la cepa salvaje.

En *A. baumannii* se han identificado miembros de otras superfamilias implicados en la resistencia a antimicrobianos del grupo de las quinolonas. Entre ellos se encuentran integrantes de la superfamilia RND como los transportadores AdeABC, AdeDE, AdeIJK o AdeFGH, aunque estos presentan un rango mucho más amplio de sustratos (Magnet *et al.*, 2001; Damier-Piolle *et al.*, 2008; Coyne *et al.*, 2010). También se han relacionado con resistencia a quinolonas los transportadores AbeM, AbeM2 y AbeM4, pertenecientes a la superfamilia MATE (Eijkelkamp *et al.*, 2011a; Su *et al.*, 2005). En el caso de la superfamilia SMR se demostró que el transportador AbeS tenía un ligero efecto en la resistencia a quinolonas pese a que, principalmente, está implicado en la expulsión de agentes desinfectantes o antisépticos como el cloruro de benzalconio o la acriflavina (Srinivasan *et al.*, 2009b). En cuanto a los miembros de la superfamilia MFS, únicamente el transportador AmvA mostró tener un efecto modesto en el transporte de quinolonas. El mutante defectivo en el gen *amvA* presenta una susceptibilidad 2 veces mayor que la cepa salvaje a la ciprofloxacina y a la norfloxacina (Rajamohan *et al.*, 2010). Ninguno de los dos transportadores ABC descritos, codificados por los genes *A1S_0536* y *A1S_1535*, ni los miembros de la superfamilia PACE se han relacionado con una mayor resistencia a quinolonas (Hassan *et al.*, 2018; C.-R. Lee *et al.*, 2017; Okada *et al.*, 2017). La bomba de expulsión AbaQ, es el único miembro de la superfamilia MFS con un papel importante en la expulsión de antimicrobianos del grupo de las quinolonas.

Por último, en este trabajo se trató de confirmar que el mecanismo de transporte de moléculas en AbaQ se corresponde con el descrito para las bombas de expulsión de la familia MFS. Las bombas de expulsión pueden translocar sustancias mediante un transporte activo

primario o secundario. Entre los transportadores que emplean un transporte activo primario únicamente se encuentran las ABC, que expulsan sustancias empleando la energía liberada por la hidrólisis del ATP. Por otro lado, entre los transportadores activos secundarios se encuentran aquellos que acoplan el transporte con el flujo de protones como los MFS, los RND o SMR y los que realizan un transporte por antiporte empleando sodio como los miembros de la superfamilia MATE (Hassan *et al.*, 2018; Saier y Paulsen, 2001). Por este motivo, se empleó el inhibidor de protones carbonil cianide 3-clorofenilhidrazona (CCCP), para confirmar si el transporte de moléculas mediado por AbaQ es dependiente de protones. Un ejemplo, es la bomba de expulsión de fosfomicina AbaF, la adición de CCCP provoca que la CMI a este compuesto disminuya considerablemente en todas las cepas clínicas en las que se ha probado (Sharma *et al.*, 2017). Lo mismo ocurre cuando se añade este inhibidor en combinación con los sustratos del transportador de tipo MFS AmvA, demostrándose que funciona mediante un transporte activo de protones (Rajamohan *et al.*, 2010). En el caso de AbaQ, se empleó como control negativo la ampicilina ya que no se trata de un sustrato de este transportador, no observándose diferencias en la CMI de *A. baumannii* a este antimicrobiano en presencia del inhibidor. Por el contrario, cuando se analizó la CMI a ciprofloxacina de las cepas en combinación con el inhibidor CCCP, se observó una disminución de la CMI de 16 veces en las células con este transportador, mientras que en las carentes de AbaQ, la disminución fue de sólo 4 veces. Estos resultados indican que AbaQ confiere resistencia a quinolonas mediante un transporte activo dependiente de protones.

Las bombas de expulsión muestran un papel clave en el transporte de compuestos tóxicos del interior celular al ambiente extracelular participando en el desarrollo de resistencias a diversos agentes antimicrobianos. Sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a profundizar en el conocimiento de su función en otros procesos como la patogénesis, la comunicación entre bacterias o la formación de *biofilms* (Piddock, 2006).

4.5. Evaluación del papel de múltiples transportadores pertenecientes a las diferentes superfamilias de bombas de expulsión en la motilidad y la virulencia de *A. baumannii*

Las bombas de expulsión, como ya se ha comentado anteriormente, son uno de los mecanismos que presentan las bacterias para resistir a la acción de los agentes antimicrobianos. Asimismo, cada vez se encuentran más evidencias de su participación en la colonización

Discusión

bacteriana y en la supervivencia en el hospedador. Los resultados obtenidos en los apartados anteriores revelaron que la ausencia de la bomba de expulsión de tipo MFS AbaQ repercute en el patrón de motilidad y virulencia de *A. baumannii*. Por ello, en el quinto y último objetivo planteado en la presente Tesis Doctoral se trató de determinar si miembros pertenecientes a las otras superfamilias de transportadores presentan un papel relevante en la motilidad y la virulencia de este patógeno nosocomial. En este último trabajo (Artículo 3) se construyeron mutantes de genes que codifican bombas de expulsión representativas de cada una de las otras 5 superfamilias (RND, MATE, SMR, ABC y PACE), se determinó su patrón de resistencia frente a multitud de compuestos y se estudió su efecto tanto en la motilidad como en la virulencia.

Para abordar este objetivo se llevó a cabo una extensa revisión bibliográfica con el fin de seleccionar distintos transportadores de *A. baumannii* pertenecientes a las diferentes superfamilias de bombas de expulsión. Como representante de la superfamilia de transportadores RND se seleccionó el gen *A1S_2736*, que codifica una proteína con un porcentaje de identidad del 99% con la permeasa AdeJ del transportador AdelJK, descrito en la cepa *A. baumannii* BM4454. En esta cepa este transportador está relacionado con la resistencia a varios tipos de antimicrobianos como por ejemplo fluoroquinolonas, tetraciclinas o cloranfenicol (Ruzin *et al.*, 2007). En cuanto a la superfamilia de transportadores MATE, se seleccionó el transportador AbeM3, descrito ya en la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, codificado por el gen *A1S_3371* y no relacionado con resistencia a ningún agente antimicrobiano (Eijkelkamp *et al.*, 2011a). Por lo que se refiere a la superfamilia SMR, se seleccionó el gen *A1S_0710*, descrito también en esta misma cepa y relacionado previamente con resistencia a SDS y deoxicolato (Gebreyes, 2008). Referente a la superfamilia de transportadores ABC, se escogieron los dos únicos miembros descritos en *A. baumannii*: *A1S_1535*, que confiere resistencia a diversos compuestos entre los que se encuentra la gentamicina (Li *et al.*, 2016), y *A1S_0536*, relacionado con la extrusión de macrólidos (Okada *et al.*, 2017). Debido a que en la anotación del genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 aparecen multitud de genes anotados como posibles componentes de transportadores ABC y ya que de esta superfamilia únicamente existen dos miembros caracterizados, se seleccionaron, además, hipotéticos genes anotados como codificadores de permeasas integrantes de bombas de expulsión de esta superfamilia. Los candidatos seleccionados fueron los genes *A1S_0027*, *A1S_1057*, *A1S_1242* y *A1S_2622*. En todos los casos se confirmó que su estructura se corresponde con la de permeasas de la superfamilia ABC mediante el análisis de su secuencia aminoacídica y de su estructura transmembrana empleando la plataforma *web Protter* (<http://wlab.ethz.ch/protter>). Por último, de la superfamilia PACE, al tratarse de un grupo recientemente descrito y constar

únicamente de dos miembros caracterizados, se seleccionaron ambos, el transportador Acel codificado por el gen *A1S_2063*, implicado en la expulsión de clorhexidina, y el transportador codificado por el gen *A1S_1503*, que media la expulsión de acriflavina (Hassan *et al.*, 2015a; Hassan, *et al.*, 2015b). Además, se realizó una búsqueda *in silico* en el genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 con el fin de encontrar posibles transportadores de esta superfamilia pero no se identificó ninguno más.

Posteriormente, de los genes seleccionados se construyeron mutantes usando la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 mediante disrupción génica (Figura 1, Artículo 3) y se determinó el patrón de resistencia de todos ellos (Tabla 3, Artículo 3). En el caso de los mutantes de bombas de expulsión ya descritas por otros autores se confirmó su patrón de resistencia y se estudió el perfil de resistencia a otros sustratos, mientras que de los mutantes de las hipotéticas bombas de expulsión se caracterizó su susceptibilidad frente a distintos compuestos.

En cuanto al mutante que presenta inactivado el gen *A1S_2736*, que codifica la permeasa de una bomba de expulsión RND, este mostró ser susceptible a un amplio rango de compuestos como las tetraciclinas o las quinolonas, así como al detergente SDS al igual que el mutante del gen *adeJ* que codifica la proteína homóloga en la cepa *A. baumannii* BM4454 (Ruzin *et al.*, 2007). Además, el mutante *A1S_2736* muestra también una mayor susceptibilidad a compuestos no probados anteriormente como el deoxicolato. El hecho de que las bombas de expulsión de la superfamilia RND presenten una diversa variedad de sustratos es una característica común entre los miembros de este grupo, como por ejemplo el sistema AcrAB-TolC de *E. coli* o el sistema MexEF-OprN de *P. aeruginosa* (Du *et al.*, 2014; Köhler *et al.*, 1997).

Referente a la superfamilia MATE, la inactivación del gen *A1S_3371*, que codifica la proteína AbeM3, resultó en una ligera mayor susceptibilidad a tetraciclina en el mutante con respecto a la cepa salvaje. Sin embargo, previamente esta proteína no había sido relacionada con la expulsión de ninguno de los compuestos analizados entre los que se encontraba este agente antimicrobiano (Eijkelkamp *et al.*, 2011a). Este hecho podría explicarse ya que en los estudios previos, la proteína AbeM3 se había expresado en *E. coli* pero no se había analizado el efecto de su inactivación en *A. baumannii*. Tal vez, al haber únicamente una ligera diferencia en la susceptibilidad a tetraciclina no se haya podido detectar en *E. coli*, pero sí mediante la construcción del mutante directamente en *A. baumannii*.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la determinación del perfil de resistencias del mutante del gen *A1S_0710*, que codifica una proteína de la superfamilia SMR coinciden con lo

Discusión

ya descrito por Gebreyes y colaboradores en cuanto a su implicación en la resistencia a SDS y deoxicolato (Gebreyes, 2008). Además, en el presente trabajo se estudiaron diversos antimicrobianos y el mutante *A1S_0710* también ha mostrado mayor susceptibilidad a quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim. En *A. baumannii* existe otro miembro de esta superfamilia descrito, AbeS, que confiere resistencia a diversos antimicrobianos entre los que se encuentran también las quinolonas y detergentes o desinfectantes como el SDS o el deoxicolato (Srinivasan *et al.*, 2009b). En otros patógenos algunas bombas de expulsión de la superfamilia SMR han sido relacionadas igualmente con la resistencia a desinfectantes y antisépticos como es el caso de las proteínas codificadas por los genes *qac* en *S. aureus* (Costa *et al.*, 2013).

En cuanto a la inactivación de los genes que codifican permeasas ya descritas de la superfamilia ABC, se observa una mayor susceptibilidad a eritromicina, en el caso del mutante *A1S_0536*, y a gentamicina y a cloranfenicol, en el caso del mutante *A1S_1535*, coincidiendo con lo ya descrito por otros autores (Li *et al.*, 2016; Okada *et al.*, 2017). Además, se determinó la susceptibilidad a diversos compuestos de los mutantes de los genes *A1S_0027*, *A1S_1057*, *A1S_1242* y *A1S_2622* anotados en el genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 como hipotéticos transportadores ABC. Los mutantes *A1S_0027* y *A1S_1057* no presentaron diferencias con respecto a la cepa salvaje, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios para determinar su función. En cuanto a los mutantes de los genes *A1S_1242* y *A1S_2622*, se observaron modestas diferencias en la susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos (Tabla 3, Artículo 3). Existen pocos miembros de la superfamilia ABC que sean considerados clínicamente relevantes en bacterias MDR (Piddock, 2006). Sin embargo, sí existen algunos transportadores ABC implicados en la adquisición de resistencias. Un ejemplo de ello es la bomba de expulsión de macrólidos denominada MacAB presente en diversas bacterias como *E. coli*, *Salmonella enterica* o *Neisseria gonorrhoeae*, homóloga a la proteína codificada por el gen *A1S_0536* en *A. baumannii* (Kobayashi *et al.*, 2001; Rouquette-Loughli *et al.*, 2005; Bogomolnaya *et al.*, 2013).

Por último, referente a la superfamilia PACE, los mutantes de los genes *A1S_1503* y *A1S_2063* mostraron una mayor sensibilidad a acriflavina y clorhexidina respectivamente, como ya habían descrito Hassan y colaboradores (Hassan *et al.*, 2015a; Hassan, *et al.*, 2015b). Además, el mutante del gen *A1S_1503* mostró ser ligeramente más susceptible a los antimicrobianos meropenem, amikacina y minociclina. Esta superfamilia, identificada por primera vez en *A. baumannii*, ha sido descubierta muy recientemente y a pesar de lo poco que se sabe sobre ella, parece claro que está implicada en el transporte de agentes biocidas (Hassan *et al.*, 2018).

En *A. baumannii*, como ya se ha comentado con anterioridad, la determinación del papel de las bombas de expulsión en la motilidad y la virulencia es un aspecto poco estudiado existiendo escasos estudios sobre ello. Por este motivo y debido a que en los apartados anteriores se observó que un mutante de un transportador MFS perdía motilidad y virulencia, para llevar a cabo el quinto objetivo de la presente Tesis Doctoral se determinó el perfil de motilidad y virulencia de cada uno de los mutantes de miembros de las otras superfamilias de bombas de expulsión. Además, con el fin de descartar posibles efectos de diferencias en el crecimiento en el perfil de motilidad y virulencia se realizaron curvas de crecimiento de todos los mutantes observándose que no existen diferencias entre los distintos mutantes y la cepa salvaje (Figura 2, Artículo 3).

En cuanto al mutante del gen *A1S_2736* (RND) se observó que este presenta una motilidad reducida y una virulencia atenuada en comparación con la cepa salvaje (Figuras 3 y 6 del Artículo 3). Muy recientemente, Knight y colaboradores han relacionado la inactivación del gen que codifica la permeasa AdeJ, con un 99% de identidad con la codificada por el gen *A1S_2736*, con una menor motilidad en la cepa M2 de *A. baumannii*, que en los últimos años ha sido reclasificada como *A. nosocomialis*, coincidiendo esto con los resultados obtenidos en la presente Tesis (Knight DB *et al.*, 2018). En la cepa *A. baumannii* AB5075, los mutantes de los genes *arpA* y *arpB* que codifican los componentes de un transportador de tipo RND presentan una virulencia atenuada en el modelo de *Galleria mellonella* (Tipton *et al.*, 2017). Paralelamente, en otros estudios realizados con la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 se comprobó que la delección del gen *A1S_0114*, situado en el mismo operón que el gen *A1S_0116* que codifica un transportador RND posiblemente implicado en la secreción de un lipopéptido, resulta en una reducción de la motilidad y de la virulencia (Rumbo-Feal *et al.*, 2017). Asimismo, la ausencia del sistema de dos componentes AdeRS, relacionado con la regulación de la bomba de expulsión de tipo RND AdeABC, se traduce en una disminución de la motilidad, aunque no de la virulencia en esta misma cepa (De Silva y Kumar, 2018). En otros estudios sí que se ha observado que alteraciones en la expresión de esta bomba de expulsión provocan cambios en la virulencia. Por ejemplo, la sobreexpresión de AdeABC repercute en un incremento en la virulencia de *A. baumannii* en un modelo murino (Yoon *et al.*, 2016). En otras especies clínicas relevantes como *Acinetobacter nosocomialis* también se ha relacionado la desregulación de bombas de expulsión con alteraciones en la motilidad y la virulencia. Recientemente, en esta especie se relacionó la delección del represor de la bomba de expulsión AcrAB (AcrR) con una mayor motilidad y virulencia en el mutante, indicando que esta bomba de expulsión está relacionada con ambos fenómenos (Subhadra *et al.*, 2018). En otros patógenos, existen varios estudios en los que se

Discusión

relacionan bombas de expulsión de la superfamilia RND con la motilidad y la virulencia. Un ejemplo de ello es el transportador MexEF-OprN de *P. aeruginosa*, que ha sido relacionado con el *quorum sensing*, ya que está implicado en el transporte de una molécula señal que facilita este fenómeno en esta bacteria oportunista. Su inactivación provoca una disminución de la motilidad de tipo *swarming*, una menor capacidad en la formación de *biofilms* y un descenso en la producción de factores de virulencia como la piocianina (Lamarche y Déziel, 2011). Además, en el caso del patógeno oportunista *Stenotrophomonas maltophilia* la ausencia de SmeYZ, una bomba de expulsión de tipo RND, provoca un incremento de la susceptibilidad al suero humano y a los neutrófilos, así como una disminución de su virulencia en un modelo murino. También, se ha observado que el mutante *smeYZ* es incapaz de desplazarse mediante movimiento de tipo *swimming* y, mediante microscopía, se ha detectado la ausencia de flagelos en las células mutantes (Lin *et al.*, 2015). En el patógeno respiratorio *Klebsiella pneumoniae*, otro ejemplo de un transportador RND que participa en la virulencia es AcrAB: en un modelo murino el mutante defectivo de este transportador posee una menor capacidad de infección (Padilla *et al.*, 2010). Un homólogo al sistema AcrAB-TolC también ha sido identificado en otro patógeno del grupo ESKAPE: *Enterobacter cloacae*. Esta bomba de expulsión está implicada en la adaptación al ambiente, en la *fitness* y en la virulencia (Pérez *et al.*, 2012). De manera similar, en otros patógenos como la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (Bunikis *et al.*, 2008), la enterobacteria *S. enterica* (Nishino *et al.*, 2006), el agente causal del cólera *V. cholerae* (Bina *et al.*, 2008a), el agente zoonótico *F. tularensis* (Bina *et al.*, 2008b) y el patógeno de plantas *Erwinia amylovora* (Burse *et al.*, 2004) se ha demostrado que determinadas bombas de expulsión de la superfamilia RND participan en la virulencia.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo también indicaron que tanto el mutante A1S_3371 (MATE) como el mutante A1S_0710 (SMR) muestran una disminución de la motilidad y la virulencia (Véanse Figuras 3 y 6 del Artículo 3). Referente a la superfamilia MATE, la ausencia de la bomba de expulsión de este grupo denominada DinF de *Ralstonia solanacearum* provoca una disminución de la virulencia en plantas de tomate (Brown *et al.*, 2007). En el caso de la superfamilia SMR se ha relacionado la bomba de expulsión KpnEF de *K. pneumoniae* con la síntesis de la cápsula sugiriendo que podría tener una participación en la virulencia (Srinivasan y Rajamohan, 2013).

Además, en este trabajo se han estudiado diversos miembros de la superfamilia ABC en cuanto a su perfil de motilidad y virulencia. En los mutantes de los genes A1S_0536 y A1S_1535, que codifican las dos únicas permeasas de la superfamilia ABC descritas, no se detectaron

cambios ni en la motilidad ni en la virulencia. Lo mismo sucedió en los mutantes de los otros dos genes que codifican componentes de transportadores ABC estudiados en este trabajo (*A1S_0027* y *A1S_1057*), estos presentan una motilidad y virulencia similares a la cepa salvaje. Sin embargo, sí que se observó una reducción de la motilidad y una atenuación de la virulencia en los mutantes de genes que codifican hipotéticas permeasas de la superfamilia ABC *A1S_1242* y *A1S_2622* (Figuras 4 y 6, Artículo 3). En otros patógenos existen algunos ejemplos de bombas pertenecientes a esta superfamilia que se han relacionado con la virulencia. En el caso de *S. enterica* la ausencia de la bomba de expulsión de tipo ABC MacAB provoca una notable disminución de la virulencia en un modelo murino (Bogomolnaya *et al.*, 2013). Lo mismo sucede en *Yersinia pseudotuberculosis* en el que la ausencia de MrtAB, un transportador ABC, repercute en un descenso de la virulencia de este patógeno (Crimmins *et al.*, 2012). En *Brucella melitensis* otro transportador miembro de esta superfamilia, YejABEF, también está relacionado con la supervivencia de este patógeno en los macrófagos y con su capacidad de invasión (Wang *et al.*, 2016). En *Xanthomonas citri*, la bomba de expulsión de la superfamilia ABC Ssu, implicada en el transporte de sulfonatos alifáticos también presenta un papel importante en la virulencia de este fitopatógeno (Tófoli De Araújo *et al.*, 2013).

Por último, en relación a los mutantes de los genes *A1S_1503* y *A1S_2063*, que codifican bombas de expulsión de la superfamilia PACE, estos no muestran alteraciones en su motilidad y, además, su virulencia tampoco muestra cambios con respecto a la cepa salvaje (Véanse Figuras 5 y 6 del Artículo 3). En cuanto a esta recientemente descubierta superfamilia de la que únicamente se han descrito la proteína Acel de *A. baumannii* y la codificada por el gen *A1S_1503* de esta misma especie, su implicación en la virulencia no había sido estudiada previamente en ningún microorganismo. En diversas especies patógenas se han identificado en su genoma genes homólogos a *acel*, además, en el caso de *P. aeruginosa* o *Burkholderia cenocepacia* tras tratar las células con clorhexidina aumenta su expresión (Hassan *et al.*, 2018). El alto grado de conservación de la proteína Acel entre bacterias patógenas podría indicar que no solo participa en la resistencia, sino que podría estar también implicada en otros procesos fisiológicos.

Pese a que existen evidencias de que algunas bombas de expulsión tienen un papel importante en la virulencia, los mecanismos que rigen este proceso no están esclarecidos del todo. Una de las posibles explicaciones a este fenómeno podría ser que estas proteínas contribuyen de manera activa al proceso de infección, por ejemplo, mediante la extrusión o la producción de factores de virulencia como ocurre en *V. cholerae*. En este patógeno la ausencia del transportador de tipo RND, VexB, afecta a la producción de la toxina del cólera (Bina *et al.*,

Discusión

2008a). Un caso similar es el transportador de la superfamilia ABC MacAB en *E. coli*, el cual participa en la secreción de la toxina termoestable II (Yamanaka *et al.*, 2008). En este microorganismo la bomba de expulsión de tipo MFS EntS es necesaria junto a ciertos transportadores RND para exportar el sideróforo enterobactina (Horiyama y Nishino, 2014). Además, en *E. coli*, el transportador ClbM, perteneciente a la superfamilia MATE, participa en el transporte de la molécula precursora de la toxina colibactina (Mousa *et al.*, 2016). También es posible que este tipo de transportadores puedan estar implicados en la expulsión de moléculas antimicrobianas derivadas del hospedador y en la protección frente al ataque de este (Coudeyras *et al.*, 2008). Un ejemplo de ello es la bomba de expulsión de tipo MFS FarAB de *N. gonorrhoeae* que permite la supervivencia de este patógeno a los ácidos grasos de cadena larga (Lee y Shafer, 1999). En bacterias que colonizan el tracto intestinal como *E. coli* o *Campylobacter jejuni* también se han descrito transportadores de la superfamilia RND como AcrAB o CmeABC, respectivamente, que participan en la expulsión de bilis, facilitando su supervivencia en este entorno (Ma *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2002). Por último, la implicación de las bombas de expulsión en la virulencia podría ser debida a la translocación de determinadas moléculas que modulan la fisiología de la bacteria, tal y como sucede en el caso del transportador de la superfamilia RND MexEF-OprN, que participa en el *quorum sensing* en *P. aeruginosa* (Lamarche y Déziel, 2011).

En el caso de las bombas de expulsión de *A. baumannii* con efecto en motilidad y virulencia estudiadas en este quinto objetivo, una posible explicación es que tuvieron un papel similar al de MexEF-OprN en *Pseudomonas*, ya que su disrupción tiene efectos tanto en la motilidad como en la virulencia. Una hipotética función de estas proteínas podría ser la translocación de surfactantes o moléculas relacionadas con la motilidad de tipo *surface-associated motility*, como por ejemplo el 1,3-diaminopropano, que se ha relacionado con este tipo de motilidad (Skiebe *et al.*, 2012). Asimismo, también cabe la posibilidad de que estos transportadores estén implicados en la expulsión de moléculas señal que participan en el *quorum sensing*. En *A. baumannii*, alteraciones en este fenómeno provocan un efecto en la motilidad. Por ejemplo, se ha observado que la adición de moléculas señal acil-homoserin lactonas no nativas favorece el ensamblaje de los *pili* y por tanto, incrementa la motilidad de tipo *twitching* (Luo *et al.*, 2015). Asimismo, la inhibición de estas moléculas señal mediante la adición de determinados ácidos grasos como el palmitoleico y el miristoleico resulta en una reducción de la motilidad en este patógeno nosocomial (Nicol *et al.*, 2018). En el caso de las bombas de expulsión, su ausencia podría provocar una reducción de la motilidad debido a cambios en la translocación de moléculas señal y, por tanto, una menor capacidad de colonización de hospedador, traduciéndose esto en una menor virulencia.

Así pues, es necesario destacar que las bombas de expulsión no sólo presentan un papel clave en la resistencia a agentes antimicrobianos, sino que algunas de ellas participan de manera bien directa o indirecta en la virulencia bacteriana. Por tanto, el desarrollo de inhibidores de las bombas de expulsión representa una importante área de investigación, tanto para restaurar la susceptibilidad de las cepas multirresistentes a ciertos antimicrobianos, como para reducir la habilidad de las bacterias de colonizar y sobrevivir en el hospedador. En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios en busca de compuestos no tóxicos que actúen como inhibidores de estas proteínas en diversas bacterias como *P. aeruginosa* (Lomovskaya *et al.*, 2001), *S. aureus* (Kalia *et al.*, 2012), *Enterobacter aerogenes* o *K. pneumoniae*, entre otras (Chevalier *et al.*, 2004) mostrando resultados prometedores.

5 CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que en *A. baumannii*:

1. Las sustituciones aminoacídicas Gln522→Lys y Ser540→Tyr en la subunidad β de la RNA polimerasa (RpoB), además de conferir resistencia a rifampicina, provocan una disminución de la motilidad de tipo *surface-associated motility* junto con una atenuación de la virulencia en mutantes espontáneos resistentes a rifampicina debido a cambios en sus perfiles transcripcionales.
2. La inactivación de los genes que codifican las enzimas metabólicas aldeído deshidrogenasa (*RS16805*) y dihidroxiácido deshidratasa (*RS17045*), así como el hipotético transportador de taurina (*RS14730*) y el hipotético transportador de membrana de tipo MFS (*RS17040*) provoca una disminución de la motilidad de tipo *surface-associated motility* y una atenuación de la virulencia.
3. La proteína AbaQ (*A. baumannii* *Quinolone resistance transporter*) perteneciente a la superfamilia MFS, codificada por el gen *AU097_RS17040*, no solo se encuentra relacionada con *surface-associated motility* y virulencia en *A. baumannii*, sino que además está implicada en la resistencia a ciprofloxacina, ácido nalidíxico, levofloxacina, trimetoprim y novobiocina.
4. La inactivación de los genes que codifican los componentes de las bombas de expulsión pertenecientes a las superfamilias RND (*A1S_2736*), MATE (*A1S_3371*), SMR (*A1S_0710*) y ABC (*A1S_1242* y *A1S_2622*) provoca una disminución de la motilidad de tipo *surface-associated motility* y una atenuación de la virulencia.
5. Las permeasas de bombas de expulsión pertenecientes a la superfamilia ABC codificadas por los genes *A1S_0027*, *A1S_0536*, *A1S_1057* y *A1S_1535* así como los miembros de la superfamilia PACE *A1S_1503* y *A1S_2063* no se encuentran implicados ni en la motilidad de tipo *surface-associated motility* ni en virulencia.

6 ANEXOS



Novobiocin Inhibits the Antimicrobial Resistance Acquired through DNA Damage-Induced Mutagenesis in *Acinetobacter baumannii*

Luis M. Jara,^a María Pérez-Varela,^a Jordi Corral,^a Marta Arch,^a Pilar Cortés,^a Germán Bou,^b Jesús Aranda,^a Jordi Barbé^a

Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Spain^a; Servicio de Microbiología-INIBIC, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), As Xubias s/n, A Coruña, Spain^b

***Acinetobacter baumannii*, a worldwide emerging nosocomial pathogen, acquires antimicrobial resistances in response to DNA-damaging agents, which increase the expression of multiple error-prone DNA polymerase components. Here we show that the aminocoumarin novobiocin, which inhibits the DNA damage response in Gram-positive bacteria, also inhibits the expression of error-prone DNA polymerases in this Gram-negative multidrug-resistant pathogen and, consequently, its potential acquisition of antimicrobial resistance through DNA damage-induced mutagenesis.**

Acinetobacter baumannii is a highly effective human colonizer in hospital settings worldwide. Its ability to acquire resistance to several extensively used antimicrobials has resulted in its emergence as a problematic nosocomial pathogen (1). As in other bacteria, *A. baumannii* achieves resistance against certain antimicrobials through single mutations in the corresponding target genes (i.e., point mutations in the *rpoB* gene can generate resistance to rifampin [2]). In previous works, we demonstrated that this bacterium contains multiple components of error-prone DNA polymerases, whose induction after DNA damage leads to the introduction of point mutations in the bacterial genome, including those conferring antibiotic resistance (3, 4).

Topoisomerase enzymes maintain the topological state of DNA and are critical regulators of protein translation and cell replication. Specifically, DNA gyrase (a type II topoisomerase) catalyzes the removal of the torsional stress that accumulates in bacterial chromosomes at sites preceding replication forks and transcriptional complexes by forming double-stranded breaks in the DNA (5). The formation of these double-stranded breaks and, therefore, of single-stranded DNA activates the bacterial SOS response, which results in mutagenic repair through the expression of mutagenic genes, especially those encoding error-prone DNA polymerases. This response guarantees DNA repair and cell survival but also results in some mutations that are able to confer antimicrobial resistance (2, 6). In *Escherichia coli* and other bacteria, the DNA damage response is regulated by the LexA repressor. However, *A. baumannii* lacks the LexA repressor, and the error-prone DNA polymerase (UmuDab) carries out its functional role (3, 4). Thus, the induction of this DNA repair response in *A. baumannii* also results in the introduction of point mutations, including those conferring antibiotic resistance.

DNA gyrase inhibitors such as quinolones take advantage of the potential of topoisomerases to fragment the genome and thereby cause cell death. These drugs bind noncovalently at the enzyme-DNA interface in the cleavage-ligation active site to block ligation (5). Further, because quinolones also cause SOS induction, they ultimately promote antimicrobial resistance. Thus, one approach to combat the increasing prevalence of antimicrobial-resistant infections is to prevent SOS activation. Antimicrobials such as novobiocin interfere with the ATPase activity of DNA gyrase, such that chromosomal integrity is maintained, and the DNA repair/replication processes initiated by double-strand

breaks are inhibited. Indeed, novobiocin was recently shown to be an effective inhibitor of the SOS response in *Staphylococcus aureus* (7). However, while the inhibition of DNA-damage-induced mutagenesis by novobiocin is well established in Gram-positive bacteria, whether this aminocoumarin also inhibits the mutagenic repair system of Gram-negative pathogens such as *A. baumannii* has yet to be determined. Therefore, in this study, we examined the effects of novobiocin on this microorganism and, specifically, on the expression of genes encoding error-prone DNA polymerases and on DNA-damage-induced mutagenesis.

In this work, *A. baumannii* strain ATCC 17978 was used as the reference strain. The MICs of this strain for the antimicrobials used (ciprofloxacin, tetracycline, and novobiocin) were 0.25, 6, and 10 mg/liter, respectively, and were determined by broth microdilution. However, in all cases, we used the maximal antimicrobial concentration that produced no more than a 50% reduction in *A. baumannii* viability after 2 h of treatment (MC2h): 0.0625 mg/liter ciprofloxacin and 1.5 mg/liter tetracycline and novobiocin (8). UV treatments were performed as previously described (4). After irradiation of the samples (except the negative controls), the cultures were centrifuged, and the cells in the pellets were resuspended in 20 ml of LB broth with or without the MC2h of novobiocin and were incubated for 2 h in the dark to prevent photoreactivation of pyrimidine dimers. Ten milliliters of each culture was used for RNA extraction in order to determine the expression of genes belonging to the UmuDab regulon of *A. baumannii* as previously described (3, 8). The relative mRNA concentrations of the studied genes were determined according to a standard curve generated by amplifying an internal fragment of the *rpoB* gene, which is not induced with any of the treatments used in this study (3, 9). The remaining 10 ml was washed twice and centri-

Received 27 July 2015 Returned for modification 6 September 2015

Accepted 18 October 2015

Accepted manuscript posted online 26 October 2015

Citation Jara LM, Pérez-Varela M, Corral J, Arch M, Cortés P, Bou G, Aranda J, Barbé J. 2016. Novobiocin inhibits the antimicrobial resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:637–639. doi:10.1128/AAC.01810-15.

Address correspondence to Jesús Aranda, jesus.aranda@uab.cat.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Jara et al.

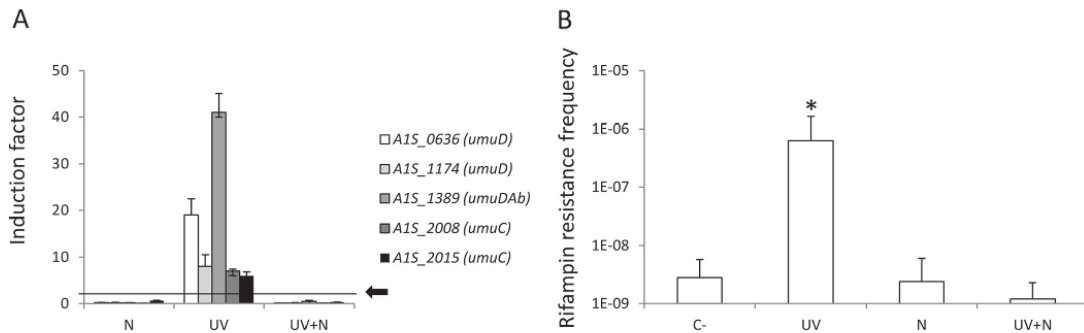


FIG 1 (A) Expression of genes encoding components of error-prone DNA polymerase V in cultures of *A. baumannii* strain ATCC 17978 treated with novobiocin (N), UV irradiation (UV), or novobiocin after UV irradiation (UV+N) compared to expression in nontreated cultures (negative controls). Error bars represent the standard deviations of the means from at least two independent experiments, each carried out in duplicate. A value of ≥ 2 (black arrow) was considered to indicate induction. (B) Frequency of the occurrence of rifampin resistance mutants in *A. baumannii* strain ATCC 17978 cultures treated with UV irradiation, novobiocin, or novobiocin after UV irradiation. C-, negative control. Error bars represent the standard deviations of the means of the results of at least three independently tested cultures. The data were analyzed using a two-tailed, one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for *post hoc* multiple group comparisons. *, $P < 0.01$ compared to nontreated *A. baumannii* strain ATCC 17978 (C-).

fused again. The cells in the pellets were resuspended with fresh LB broth and were incubated for 24 h, after which the frequency of mutagenesis was evaluated as previously described (8). The results obtained showed that, after UV irradiation, all of the studied genes encoding components of the error-prone DNA polymerase V of *A. baumannii* were induced (Fig. 1A), as similarly reported by Norton et al. (2). However, in UV-irradiated and nonirradiated cultures, the expression of these genes was lower in those treated with novobiocin (Fig. 1A). In contrast, none of the treatments had any effect on the expression of the negative-control gene *dinB* (data not shown), which is not inducible after DNA damage in *A. baumannii* (2). Expression of the genes encoding the DNA polymerase V components correlated clearly with the frequency of the occurrence of rifampin resistance mutants (Fig. 1B). Thus, the frequency of mutagenesis was higher only in the UV-irradiated cultures, whereas in those treated with no-

viocin, whether UV-irradiated or not, there was no significant difference compared to the negative control (Fig. 1B).

In recent work, we showed that ciprofloxacin and tetracycline induce SOS-mediated mutagenesis in *A. baumannii* (8). To determine whether novobiocin reduces the SOS response induced under these conditions, we analyzed its effect on the expression of *umuDC* genes and on the frequency of mutagenesis in *A. baumannii* treated with either ciprofloxacin or tetracycline. DNA damage mutagenesis was induced with the MC2h of either ciprofloxacin or tetracycline (8). The antimicrobial treatments, the gene expression determination, and the mutagenesis assays were performed as previously described (8) in the presence or absence of the corresponding antimicrobials with or without the MC2h of novobiocin for 2 h. Data obtained showed that after 2 h, in the presence or absence of novobiocin, gene expression

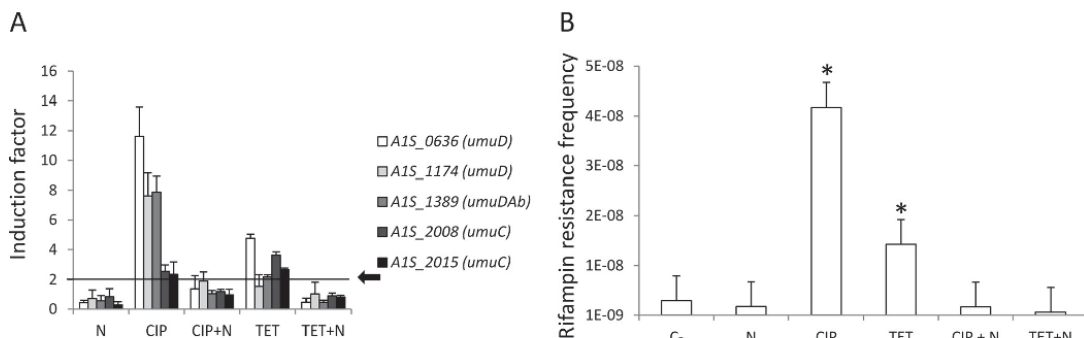


FIG 2 (A) Expression of genes encoding components of error-prone DNA polymerase V in cultures of *A. baumannii* strain ATCC 17978 treated with novobiocin (N), ciprofloxacin (CIP), ciprofloxacin plus novobiocin (CIP+N), tetracycline (TET), or tetracycline plus novobiocin (TET+N) compared to expression in nontreated cultures (negative controls). Error bars represent the standard deviations of the means from at least two independent experiments, each carried out in duplicate. A value of ≥ 2 (black arrow) was considered to indicate induction. (B) Frequency of the occurrence of rifampin resistance mutants in *A. baumannii* strain ATCC 17978 cultures treated with novobiocin, ciprofloxacin, tetracycline, ciprofloxacin plus novobiocin, or tetracycline plus novobiocin. C-, negative control. Error bars represent the standard deviations of the means of the results of at least three independently tested cultures. The data were analyzed by a two-tailed, one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for *post hoc* multiple group comparisons. *, $P < 0.01$ compared to nontreated *A. baumannii* strain ATCC 17978 (C-).

(Fig. 2A) and mutagenesis (Fig. 2B) shared the same behavior when ciprofloxacin or tetracycline was used instead of UV irradiation as the DNA damage inducer.

In *A. baumannii*, DNA damage induces error-prone repair mechanisms, leading to mutations that confer antimicrobial resistance (2). Our results clearly show that, in the presence of novobiocin, expression of genes encoding mutagenic DNA polymerases is not induced, and, consequently, there is no increase in the mutagenesis frequency rates even in the presence of direct (UV irradiation and ciprofloxacin) or indirect (tetracycline) mediated DNA damage inducers. The recognition and removal of DNA damage may require unwinding the DNA by DNA gyrase, which is the target of novobiocin. Therefore, a possible mechanism underlying the observed effects due to novobiocin activity may be a reduction in the generation of single-strand DNA regions and in the number of DNA strand breaks made during the excision repair process, of which DNA gyrase (the novobiocin target) is an essential component (10). In conclusion, our data show that aminocoumarins such as novobiocin may reduce the risk of resistance development through error-prone DNA polymerase induction, thereby offering new perspectives in anti-infective therapy not only against Gram-positive but also against Gram-negative pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the efforts of Joan Ruiz (UAB) and Susana Escribano (UAB) for excellent technical assistance. We also thank Pau Obregón (undergraduate UAB student) for his helpful support.

We declare that we have no conflicts of interest.

FUNDING INFORMATION

Ministerio de Ciencia e Innovación de España provided funding to Jordi Barbé under grant number BFU2011-23478.

This work was also funded by Departament d'Innovació, Universitat i Empresa, Generalitat de Catalunya (DIUE), under grant number 2014SGR572.

REFERENCES

1. Pérez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3471–3484. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01464-06>.
2. Norton MD, Spilkić AJ, Godoy VG. 2013. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195:1335–1345. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.02176-12>.
3. Aranda J, Poza M, Shingu-Vázquez M, Cortés P, Boyce JD, Adler B, Barbé J, Bou G. 2013. Identification of a DNA-damage-inducible regulon in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195:5577–5582. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00853-13>.
4. Aranda J, López M, Leiva E, Magán A, Adler B, Bou G, Barbé J. 2014. Role of *Acinetobacter baumannii* UmuD homologs in antibiotic resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1771–1773. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02346-13>.
5. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53:1565–1574. <http://dx.doi.org/10.1021/bi5000564>.
6. Little JW, Mount DW. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29:11–22. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90085-X](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(82)90085-X).
7. Schröder W, Goerke C, Wolz C. 2013. Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 68:529–538. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks456>.
8. Jara LM, Cortés P, Bou G, Barbé J, Aranda J. 2015. Differential roles of antimicrobials in the acquisition of drug resistance through activation of the SOS response in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4318–4320. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04918-14>.
9. Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158:41–64.
10. Collins A, Johnson R. 1979. Novobiocin; an inhibitor of the repair of UV-induced but not X-ray-induced damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 7:1311–1320. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/7.5.1311>.

7 REFERENCIAS

- Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3628–3634.
- Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:583–588.
- Al Naiemi N, Duim B, Savelkoul PHM, Spanjaard L, De Jonge E, Bart A, Vandenbroucke-Grauls CM, De Jong MD. 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: Implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol* 43:4862–4864.
- Albiger B, Johansson L, Jonsson AB. 2003. Lipooligosaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* shows altered *pilus*-associated characteristics. *Infect Immun* 71:155–162.
- Alifano P, Palumbo C, Pasanisi D, Talà A. 2015. Rifampicin-resistance, *rpoB* polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *J Biotechnol* 202:60–77.
- Álvarez-Fraga L, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. 2015. Draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *Acinetobacter baumannii* clinical strain MAR002. *Genome Announc* 3:e00824-15.
- Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289:321–331.
- Anbazhagan D, Mansor M, Yan GOS, Yusof MYM, Hassan H, Sekaran SD. 2012. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One* 7:e36696.
- Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. 2002. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol* 40:685–686.
- Antunes LCS, Imperi F, Towner KJ, Visca P. 2011a. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol* 162:279–284.

Referencias

- Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A, Visca P. 2011b. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One 6:e22674.
- Aranda J, Bardina C, Beceiro A, Rumbo S, Cabral MP, Barbé J, Bou G. 2011. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. J Bacteriol 193:3740–3747.
- Aranda J, López M, Leiva E, Magán A, Adler B, Bou G, Barbé J. 2014. Role of *Acinetobacter baumannii* UmuD homologs in antibiotic resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis. Antimicrob Agents Chemother 58:1771–1773.
- Baharoglu Z, Mazel D. 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. FEMS Microbiol Rev 38:1126-1145.
- Bakour S, Alsharapy SA, Touati A, Rolain JM. 2014. Characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates carrying *bla*_(OXA-23) carbapenemase and 16S rRNA methylase *armA* genes in Yemen. Microb Drug Resist 20:604–609.
- Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. 1968. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 95:1520–1541.
- Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2011. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. Antimicrob Agents Chemother 55:3370–3379.
- Beijerinck M. 1911. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl K Akad Wetensch Amsterdam 19:1092–1103.
- Bentancor L V., Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litrán T. 2012. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 194:3950–3960.
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 9:148-165.
- Bhatnagar N, Getachew E, Straley S, Williams J, Meltzer M, Fortier A. 1994. Reduced virulence of rifampicin-resistant mutants of *Francisella tularensis*. J Infect Dis 170:841–847.

- Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH. 1999. Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1866–1869.
- Bina XR, Lavine CL, Miller MA, Bina JE. 2008. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol Lett* 279:226–233.
- Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. 2008. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun* 76:3595–3605.
- Bisson GP, Mehaffy C, Broeckling C, Prenni J, Rifat D, Lun DS, Burgos M, Weissman D, Petros CK, Dobosc K. 2012. Upregulation of the phthiocerol dimycocerosate biosynthetic pathway by Rifampin-resistant, *rpoB* mutant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 194:6441–6452.
- Blair DF. 1995. How bacteria sense and swim. *Annu Rev Microbiol* 49:489–522.
- Bogomolnaya LM, Andrews KD, Talamantes M, Maple A, Ragoza Y, Vazquez-Torres A, Andrews-Polymeris H. 2013. The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from oxidative stress. *MBio* 4:e00630-13.
- Boll JM, Tucker AT, Klein DR, Beltran AM, Brodbelt JS, Davies BW, Trent MS. 2015. Reinforcing lipid acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *MBio* 6:e00478-15.
- Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. 2013. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:571–583.
- Bou G, Martínez-Beltrán J. 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:428–432.
- Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. 2000. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1556–1561.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 48:1–12.

Referencias

- Boutte CC, Crosson S. 2013. Bacterial lifestyle shapes the regulation of stringent response activation. *Trends Microbiol* 21:174–180.
- Bouvet PJ, Grimont PA. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. *Int J Syst Bacteriol* 36:228–240.
- Bouvet PJ, Jeanjean S. 1989. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* 140:291–299.
- Briggs S, Ellis-Pegler R, Raymond N, Thomas M, Wilkinson L. 2004. Gram-negative bacillary meningitis after cranial surgery of trauma in adults. *Scand J Infect Dis* 36:165-173.
- Brisou J, Prevot A. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann Inst Pasteur* 88:722–728.
- Brown DG, Swanson JK, Allen C. 2007. Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl Environ Microbiol* 73:2777–2786.
- Bunikis I, Denker K, Östberg Y, Andersen C, Benz R, Bergström S. 2008. An RND-Type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. *PLoS Pathog* 4:e1000009.
- Burdman S, Bahar O, Parker JK, de la Fuente L. 2011. Involvement of type IV *pili* in pathogenicity of plant pathogenic bacteria. *Genes (Basel)* 2:706–735.
- Burrows LL. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV *pili* in action. *Annu Rev Microbiol* 66:493–520.
- Burse A, Weingart H, Ullrich MS. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:43–54.
- Busch A, Waksman G. 2012. Chaperone-usher pathways: diversity and *pilus* assembly mechanism. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 367:1112–1122.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969-976.

- Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. 2005. Bacterial cell shape. *NatRevMicrobiol* 3:601–610.
- Cai XC, Xi H, Liang L, Liu JD, Liu CH, Xue YR, Yu XY. 2017. Rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects. *Front Microbiol* 8:178.
- Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. 2010. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog* 6:e1000834.
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104:901–912.
- Caroff M. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 338:2431–2447.
- Carr EL, Kämpfer P, Patel BK, Gürtler V, Seviour RJ. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:953–963.
- Carretero-Ledesma M, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Pulido MR, Pachón J MM. 2018. Phenotypic changes associated with colistin resistance due to lipopolysaccharide loss in *Acinetobacter baumannii*. *Virulence* 9:930–942.
- Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson RS. 2013. *Acinetobacter baumannii* utilizes a Type VI Secretion System for bacterial competition. *PLoS One* 8:e59388.
- Chatnaparat T, Li Z, Korban SS, Zhao Y. 2015. The stringent response mediated by (p)ppGpp is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and its survival on tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:776–789.
- Chau SL, Chu YW, Houang ETS. 2004. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4054–4055.
- Chen C-H, Young T-G, Huang C-C. 2006. Predictive biomarkers for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with bla(TEM-1), AmpC-type bla and integrase 1 genotypes. *J Microbiol Immunol Infect* 39:372–379.
- Chen M-Z. 2001. Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 120:1072–1077.

Referencias

- Chen R, Lv R, Xiao L, Wang M, Du Z, Tan Y, Cui Y, Yan Y, Luo Y, Yang R, Song Y. 2017. A1S_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *Microbiologyopen* 6.
- Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Malléa M, Barbe J, Pagès JM. 2004. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1043–1046.
- Chiku K, Tsunemi K, Yamamoto M, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Ishii T, Taguchi F, Iwaki M, Ichinose Y, Ono H. 2013. Defects in D-rhamnosyl residue biosynthetic genes affect lipopolysaccharide structure, motility, and cell-surface hydrophobicity in *Pseudomonas syringae* Pathovar *glycinea* race 4. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:505–510.
- Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. 2009. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:185–190.
- Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. 2009. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 191:5953–5963.
- Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC. 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7:1127–1138.
- Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. 2008. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 8:216.
- Chu YW, Chau SL, Houang ETS. 2006. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. *J Med Microbiol* 55:477-478.
- Cirz RT, Romesberg FE. 2007. Controlling mutation: Intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42:341-354.
- Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 8:687–693.

- Claeys G, Verschraegen G, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Identification of *Acinetobacter* genomic species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *J Clin Microbiol* 33:11–15.
- Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 157:2534–2544.
- Cogan NG, Harro JM, Stoodley P, Shirtliff ME. 2016. Predictive computer models for biofilm detachment properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 7:e00815-16.
- Coil DA, Anné J. 2009. Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* 293:271–277.
- Colicchio R, Pagliuca C, Pastore G, Cicatiello AG, Pagliarulo C, Tala A, Scaglione E, Sammartino JC, Bucci C, Alifano P, Salvatore P. 2015. Fitness cost of rifampin resistance in *Neisseria meningitidis*: *In vitro* study of mechanisms associated with *rpoB* H553Y mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7637–7649.
- Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. 2013. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J* 7:59–71.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.
- Coudeyras S, Nakusi L, Charbonnel N, Forestier C. 2008. A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. *Infect Immun* 76:4633–4641.
- Cox MM. 1999. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63:311–366.
- Coyne S, Courvalin P, Perichon B. 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 55:947–953.
- Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4389–4393.

Referencias

- Crimmins GT, Mohammadi S, Green ER, Bergman MA, Isberg RR, Meccas J. 2012. Identification of MrtAB, an ABC transporter specifically required for *Yersinia pseudotuberculosis* to colonize the mesenteric lymph nodes. *PLoS Pathog* 8:e1002828.
- Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:557–562.
- De Gregorio E, Del Franco M, Martinucci M, Roscetto E, Zarrilli R, Di Nocera PP. 2015. Biofilm-associated proteins: News from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 16:933.
- De Knecht GJ, Bruning O, Ten Kate MT, De Jong M, Van Belkum A, Endtz HP, Breit TM, Bakker-Woudenberg IAJM, De Steenwinkel JEM. 2013. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 93:96–101.
- De Silva PM, Kumar A. 2018. Effect of sodium chloride on surface-associated motility of *Acinetobacter baumannii* and the role of AdeRS two-component system. *J Membr Biol* 251:5–13.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951.
- Ditty JL, Harwood CS. 1999. Conserved cytoplasmic loops are important for both the transport and chemotaxis functions of PcaK, a protein from *Pseudomonas putida* with 12 membrane-spanning regions. *J Bacteriol* 181:5068–5074.
- Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. 2007. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4209–4210.
- Drawz SM, Babic M, Bethel CR, Taracila M, Distler AM, Ori C, Caselli E, Prati F, Bonomo RA. 2010. Inhibition of the class C β -lactamase from *Acinetobacter* spp.: Insights into effective inhibitor design. *Biochemistry* 49:329–340.
- Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF. 2014. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509:512–515.
- Du D, van Veen HW, Murakami S, Pos KM, Luisi BF. 2015. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Curr Opin Struct Biol* 33:76-91.

- Dupont M, Pagès JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. 2005. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 4:2386–2390.
- Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. 2011a. Development of a high-throughput cloning strategy for characterization of *Acinetobacter baumannii* drug transporter proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20:211–219.
- Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. 2011b. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics* 12:126.
- Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Elbourne LDH, Paulsen IT, Brown MH. 2013. H-NS Plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun* 81:2574–2583.
- Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. 2011. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 323:44–51.
- Elhosseiny NM, Attia AS. 2018. *Acinetobacter*: An emerging pathogen with a versatile secretome review-article. *Emerg Microbes Infect* 7:33.
- Erill I, Campoy S, Barbé J. 2007. Aeons of distress: An evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* 31:637-656.
- Espinal P, Martí S, Vila J. 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect* 80:56–60.
- Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2:40-61.
- Fernández L, Hancock R. 2012. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 25:661–681.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 51:565–574.

Referencias

- Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie J-M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2:e7.
- Fraser GM, Hughes C. 1999. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* 2:630-635.
- Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. 2012. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606^T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun* 80:1015-1024.
- Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 77:3150–3160.
- Gallego L, Towner KJ. 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *J Med Microbiol* 50:71–77.
- Gao W, Cameron DR, Davies JK, Kostoulias X, Stepnell J, Tuck KL, Yeaman MR, Peleg AY, Stinear TP, Howden BP. 2013. The RpoB H481Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 207:929–939.
- García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez FJ, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar E, Gili-Miner M. 2001. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis* 33:939–946.
- Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez De Ilarduya Ó, Bou G. 2014. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 13:460–476.
- Gebreyes WA. 2008. Novel Secondary Active Transporters Conferring Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter baumannii* with Broad Substrate Specificity. Available from: idsa.confex.com/idsa/2008/webprogram/Paper27595.html [14-09-18].
- Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. 1991. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 37:405–412.

- Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 29:277–282.
- Gerner-Smidt P. 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 30:2680–2685.
- Giannouli M, Di Popolo A, Durante-Mangoni E, Bernardo M, Cuccurullo S, Amato G, Tripodi MF, Triassi M, Utili R, Zarrilli R. 2012. Molecular epidemiology and mechanisms of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from Italy. *Int J Antimicrob Agents* 39:58–63.
- Gliniewicz K, Wildung M, Orfe LH, Wiens GD, Cain KD, Lahmers KK, Snekvik KR, Call DR. 2015. Potential mechanisms of attenuation for rifampicin-passaged strains of *Flavobacterium psychrophilum*. *BMC Microbiol* 15:179.
- Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ. 2003. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 47:434–443.
- Hamidian M, Nigro SJ, Hartstein RM, Hall RM. 2017. RCH51, a multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* ST1031P isolate, carries resistance genes in three plasmids, including a novel potentially conjugative plasmid carrying *oxa235* in transposon Tn6252. *J Antimicrob Chemother* 72:1907–1910.
- Händel N, Hoeksema M, Freijo Mata M, Brul S, ter Kuile BH. 2015. Effects of stress, reactive oxygen species, and the SOS response on de novo acquisition of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1319–1327.
- Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. 2017. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 16:91–102.
- Harding CM, Kinsella RL, Palmer LD, Skaar EP, Feldman MF. 2016. Medically Relevant *Acinetobacter* species require a Type II Secretion System and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLoS Pathog* 12:e1005391.

Referencias

- Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. 2013. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV *pili* which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* 4:e00360-13.
- Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57:249–273.
- Hassan KA, Brzoska AJ, Wilson NL, Eijkelkamp BA, Brown MH, Paulsen IT. 2011. Roles of DHA2 family transporters in drug resistance and iron homeostasis in *Acinetobacter* spp. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20:116–124.
- Hassan KA, Elbourne LDH, Li L, Gamage HKAH, Liu Q, Jackson SM, Sharples D, Kolstø A-B, Henderson PJF, Paulsen IT. 2015. An ace up their sleeve: a transcriptomic approach exposes the AceL efflux protein of *Acinetobacter baumannii* and reveals the drug efflux potential hidden in many microbial pathogens. *Front Microbiol* 6:333.
- Hassan KA, Jackson SM, Penesyan A, Patching SG, Tetu SG, Eijkelkamp BA, Brown MH, Henderson PJF, Paulsen IT. 2013. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc Natl Acad Sci* 110:20254–20259.
- Hassan KA, Liu Q, Elbourne LDH, Ahmad I, Sharples D, Naidu V, Chan CL, Li L, Harborne SPD, Pokhrel A, Postis VLG, Goldman A, Henderson PJF, Paulsen IT. 2018. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Res Microbiol* 2:S0923-2508(18)30009-3.
- Hassan KA, Liu Q, Henderson PJF, Paulsen IT. 2015. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceL transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *MBio* 6:e01982-14.
- Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13:298-309.
- Hentuchsen J, Blom J. 1975. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol* 83:103–115.

- Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4174–4179.
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 12:123–130.
- Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5035–5038.
- Hola V, Peroutkova T, Ruzicka F. 2012. Virulence factors in *Proteus* bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:343–349.
- Hölscher T, Kovács ÁT. 2017. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ Microbiol* 19:2537–2545.
- Horiyama T, Nishino K. 2014. AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. *PLoS One* 9:e108642.
- Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3:243–250.
- Hugh R, Reese R. 1967. Designation of the type strain for *Bacterium anitratum* Schaub and Hauber 1948. *Int J Syst Bacteriol* 17:245–254.
- Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, Thomson JM, Anderson VE, Barlow M, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA. 2005. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: Defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2941–2948.
- Inga V, Leus, Jon W. Weeks, Vincent Bonifay, Lauren Smith, Sophie Richardson HIZ. 2018. Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* p16:JB.00049-18.
- Ishikawa M, Yoshimoto S, Hayashi A, Kanie J, Hori K. 2016. Discovery of a novel periplasmic protein that forms a complex with a trimeric autotransporter adhesin and peptidoglycan. *Mol Microbiol* 101:394–410.

Referencias

- Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman PM. 2010. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun* 78:1952–1962.
- Jacobs AC, Sayood K, Olmsted SB, Blanchard CE, Hinrichs S, Russell D, Dunman PM. 2012. Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:403–412.
- Janion C. 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* 4:338-344.
- Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L. 1997. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 47:1179–1187.
- Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. 1994. Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* 32:2353–2358.
- Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 36:1938–1941.
- Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, Jeong BC, Lee SH. 2015. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci* 16:9654-9692.
- Jin JS, Kwon S-O, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim S II, Lee JC. 2011. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One* 6:e17027.
- Juni E. 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J Bacteriol* 112:917–931.
- Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. 2011. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother* 66:1260–1262.

- Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S, Khan IA. 2012. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 67:2401–2408.
- Kazmierczak BI, Schniederberend M, Jain R. 2015. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: The intimate relationship between flagella, *pili* and virulence. *Curr Opin Microbiol* 28:78-82.
- Kearns DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8:634-644.
- Khosravi AD, Sadeghi P, Shahraki AH, Heidarieh P, Sheikhi N. 2015. Molecular methods for identification of *Acinetobacter* species by partial sequencing of the *rpoB* and 16S rRNA genes. *J Clin Diagnostic Res* 9:9–13.
- Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim JM, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. 2009. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* 301:224–231.
- Knight DB, Rudin SD, Bonomo RA RP. 2018. *Acinetobacter nosocomialis*: Defining the role of efflux pumps in resistance to antimicrobial therapy, surface motility, and biofilm formation. *Front Microbiol* 9:1902.
- Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:5639–5644.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130:797–810.
- Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 23:345–354.
- Kolappan S, Tracy EN, Bakaletz LO, Munson RS, Craig L. 2012. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of PilA from the nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV *pilus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68:284–287.

Referencias

- Kumarasamy K, Thirunarayan MA, Padma K. 2010. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 65:2253–2254.
- Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim S II. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett* 297:150–156.
- Lai C, Xu J, Tozawa Y, Okamoto-Hosoya Y, Yao X, Ochi K. 2002. Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 148:3365–3373.
- Lai CC, Hsu HL, Tan CK, Tsai HY, Cheng A, Liu CY, Huang YT, Liao CH, Sheng WH, Hsueh PR. 2012. Recurrent bacteremia caused by the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 50:2982–2986.
- Lamarche MG, Déziel E. 2011. MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One* 6:e24310.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1584–1590.
- Lautrop H. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1974.
- Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha C-J, Jeong BC, Lee SH. 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol* 7:55.
- Lee EH, Shafer WM. 1999. The *farAB*-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Mol Microbiol* 33:839–845.
- Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 14:49–54.

- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. 2005. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4485–4491.
- Leong CG, Bloomfield RA, Boyd CA, Dornbusch AJ, Lieber L, Liu F, Owen A, Slay E, Lang KM, Lostroh CP. 2017. The role of core and accessory type IV *pilus* genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi*. *PLoS One* 12:e0182139.
- Li H, Tan H, Hu Y, Pan P, Su X, Hu C. 2017. Small protein A and phospholipase D immunization serves a protective role in a mouse pneumonia model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Mol Med Rep* 16:1071–1078.
- Li L, Hassan KA, Brown MH, Paulsen IT. 2016. Rapid multiplexed phenotypic screening identifies drug resistance functions for three novel efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 71:1223–1232.
- Lin J, Overbye Michel L, Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2124–2131.
- Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Baquir B, Tomaras A, Montgomery JI, Reilly U, Barbacci EG, Hujer K, Bonomo RA, Fernandez L, Hancock REW, Adams MD, French SW, Buslon VS, Spellberg B. 2012. Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. *MBio* 3:e00312-12.
- Lin M-F, Lin Y-Y, Lan C-Y. 2017. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol* 55:130–136.
- Lin YT, Huang YW, Chen SJ, Chang CW, Yang TC. 2015. The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4067–4073.
- Lippolis JD, Brunelle BW, Reinhardt TA, Sacco RE, Thacker TC, Looft TP, Casey TA. 2016. Differential gene expression of three mastitis-causing *Escherichia coli* strains grown under planktonic, swimming, and swarming culture conditions. *mSystems* 1:e00064-16.
- Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. 2008. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* 190:1036–1044.

Referencias

- Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45:105–116.
- Longo F, Vuotto C, Donelli G. 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 37:119–127.
- Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, Cox AD, Michael F, Vinogradov E V., Campagnari AA. 2010. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun* 78:2017–2023.
- Luna CM, Aruj PK. 2007. Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. *Respirology* 12:787-791.
- Luo LM, Wu LJ, Xiao YL, Zhao D, Chen ZX, Kang M, Zhang Q, Xie Y. 2015. Enhancing *pili* assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiol* 15:62.
- Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16:45–55.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281.
- Magnet S, Courvalin P, Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3375–3380.
- Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3298–3304.

- Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual Á, Ribera A, Rodríguez-Baño J, Bou G, Cisneros JM, Pachón J, Martínez-Martínez L, Vila J. 2006. Prevalence of the *tetA* and *tetB* genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24:77–80.
- Mattick JS. 2002. Type IV *pili* and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56:289–314.
- McBride MJ. 2001. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* 55:49–75.
- McConnell MJ, Actis L, Pachón J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37:130–155.
- McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J. 2011. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine* 29:5705–5710.
- McQueary CN, Actis LA. 2011. *Acinetobacter baumannii* biofilms: Variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol* 49:243–250.
- McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, Zurawski D V. 2012. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol* 50:434–443.
- Meenakshi S, Munavar MH. 2018. Evidence for up and down regulation of 450 genes by *rpoB12* (*rif*) mutation and their implications in complexity of transcription modulation in *Escherichia coli*. *Microbiol Res* 212–213:80–93.
- Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. 2007. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: Clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* 60:197-199.
- Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. 1994. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:805–811.
- Mo CY, Manning SA, Roggiani M, Culyba MJ, Samuels AN, Sniegowski PD, Goulian M, Kohli RM. 2016. Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics. *mSphere* 1:e00163-16.

Referencias

- Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St. Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4971–4977.
- Mousa JJ, Yang Y, Tomkovich S, Shima A, Newsome RC, Tripathi P, Oswald E, Bruner SD, Jobin C. 2016. MATE transport of the *E. coli*-derived genotoxin colibactin. *Nat Microbiol* 1:15009.
- Murray GL, Tsyganov K, Kostoulias XP, Bulach DM, Powell D, Creek DJ, Boyce JD, Paulsen IT, Peleg AY. 2017. Global gene expression profile of *Acinetobacter baumannii* during bacteremia. *J Infect Dis* 215:S52–S57.
- Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, Actis LA. 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol* 192:6336–6345.
- Mutlu Yilmaz E, Sunbul M, Aksoy A, Yilmaz H, Guney AK, Guvenc T. 2012. Efficacy of tigecycline/colistin combination in a pneumonia model caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 40:332–336.
- Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* 42:3978–3984.
- Nait Chabane Y, Mlouka M Ben, Alexandre S, Nicol M, Marti S, Pestel-Caron M, Vila J, Jouenne T, Dé E. 2014. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 14:62.
- Nan B, Zusman DR. 2016. Novel mechanisms power bacterial gliding motility. *Mol Microbiol* 101:186-193.
- Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, Fuchs RP. 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J* 19:6259–6265.
- Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1891–1899.

- Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, van der Reijden TJK, Ježek P, Vaneechoutte M. 2003. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1563–1567.
- Nemec A, Dolzani L, Brisse S, Van Den Broek P, Dijkshoorn L. 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 53:1233–1240.
- Neri A, Mignogna G, Fazio C, Giorgi A, Schininà ME, Stefanelli P. 2010. *Neisseria meningitidis* rifampicin resistant strains: Analysis of protein differentially expressed. *BMC Microbiol* 10:246.
- Nicol M, Alexandre S, Luizet JB, Skogman M, Jouenne T, Salcedo SP, Dé E. 2018. Unsaturated fatty acids affect quorum sensing communication system and inhibit motility and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Mol Sci* 19:E214.
- Nishino K, Latifi T, Groisman EA. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 59:126–141.
- Nishiyama SI, Takahashi Y, Yamamoto K, Suzuki D, Itoh Y, Sumita K, Uchida Y, Homma M, Imada K, Kawagishi I. 2016. Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. *Sci Rep* 6:20866.
- Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2008. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 190:3386–3392.
- Norton MD, Spilkia AJ, Godoy VG. 2013. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195:1335–1345.
- Okada U, Yamashita E, Neuberger A, Morimoto M, Van Veen HW, Murakami S. 2017. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. *Nat Commun* 8:1336.
- Ophir T, Gutnick DL. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol* 60:740-745.
- Osada Y, Une T, Nakajo M, Ogawa H. 1973. Virulence of rifampicin-resistant mutants of *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli* with special reference to their cell invasiveness. *Jpn J Microbiol* 17:243–249.

Referencias

- Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54:177–183.
- Partridge JD, Harshey RM. 2013. Swarming: Flexible roaming plans. *J Bacteriol* 195:909-918.
- Pasupuleti S, Sule N, Cohn WB, MacKenzie DS, Jayaraman A, Manson MD. 2014. Chemotaxis of *Escherichia coli* to norepinephrine (NE) requires conversion of NE to 3,4-dihydroxymandelic acid. *J Bacteriol* 196:3992–4000.
- Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB, Miles RS, Amyes SGB. 1993. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2:81–87.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:538–582.
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:297-308.
- Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, Ohneck EJ, Mateos J, Fernández-Puente P, Actis LA, Poza M, Bou G. 2017. The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12o-A2 strain. *Virulence* 8:959–974.
- Pérez A, Poza M, Fernández A, Del Carmen Fernández M, Mallo S, Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G. 2012. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2084–2090.
- Petersen K, Riddle MS, Danko JR, Blazes DL, Hayden R, Tasker SA, Dunne JR. 2007. Trauma-related infections in battlefield casualties from Iraq. *Ann Surg* 245:803–811.
- Petrosino JF, Galhardo RS, Morales LD, Rosenberg SM. 2009. Stress-induced β -lactam antibiotic resistance mutation and sequences of stationary-phase mutations in the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* 191:5881–5889.
- Piddock LJ V. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:629–636.

- Piddock LJV. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19:382-402.
- Piechaud M, Second L. 1951. Etude de 26 souches de *Moraxella lwoffii*. *Ann Inst Pasteur* 88:97–99.
- Piepenbrink KH, Lillehoj E, Harding CM, Labonte JW, Zuo X, Rapp CA, Munson RS, Goldblum SE, Feldman MF, Gray JJ, Sundberg EJ, Sundberg EJ. 2016. Structural diversity in the type IV *pili* of multidrug-resistant *Acinetobacter*. *J Biol Chem* 291:22924–22935.
- Plachouras D, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kentepozidis N, Baziaka F, Karagianni V, Giamarellou H. 2007. *In vitro* postantibiotic effect of colistin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:419–422.
- Pogue JM, Mann T, Barber KE, Kaye KS. 2013. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, surveillance and management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:383-393.
- Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, Faccone D, Galas M, Drugeon H, Cattoir V, Nordmann P. 2007. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2179–2184.
- Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:202–208.
- Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 41:3542–3547.
- Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12:826–836.
- Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. 2011. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5946–5948.
- Proft T, Baker E. 2009. *Pili* in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 66:613–635.

Referencias

- Qi Liu, Karl A. Hassan, Heather E. Ashwood, Hasinika K. A. H. Gamage, Liping Li BCM and, Paulsen IT. 2018. Regulation of the Acel multidrug efflux pump gene in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 73:1492-1500.
- Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. 2010. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65:1919–1925.
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O. 2009. ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:218-227.
- Reynolds MG. 2000. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics* 156:1471–1481.
- Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. 2003a. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 52:477–480.
- Ribera A, Ruiz J, Vila J. 2003b. Presence of the tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2310–2312.
- Rifat D, Campodónico VL, Tao J, Miller JA, Alp A, Yao Y, Karakousis PC. 2017. In vitro and in vivo fitness costs associated with *Mycobacterium tuberculosis* RpoB mutation H526D. *Future Microbiol* 12:753–765.
- Roca I, Espinal P, Vila-Fanés X, Vila J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol* 3:148.
- Roca I, Marti S, Espinal P, Martínez P, Gibert I, Vila J. 2009. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4013–4014.
- Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, Pascual A, Martínez-Martínez L, McQueary C, Actis L a, Vila J. 2008. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 14:276–278.

- Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Périchon B. 2012. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2504–2510.
- Rossau R, Van Landschoot A, Gillis M, De Ley J. 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol* 41:310–319.
- Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. 2005. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 56:856–860.
- Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G. 2011. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3084–3090.
- Rumbo C, Tomás M, Moreira EF, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, Beceiro A, Romero A, Bou G. 2014. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun* 82:4666–4680.
- Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, Rodríguez-Ezpeleta N, Fullaondo A, Valle J, Tomás M, Bou G, Poza M. 2013. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-Sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One* 8:e72968.
- Rumbo-Feal S, Pérez A, Ramelot TA, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, Ohneck EJ, Arivett BA, Merino M, Fiester SE, Kennedy MA, Actis LA, Bou G, Poza M. 2017. Contribution of the *A. baumannii* A1S_0114 gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:108.
- Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, Schultz LW, Umland TC, Campagnari AA. 2010. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun* 78:3993–4000.
- Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. 2007. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother* 59:1001–1004.

Referencias

- Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. 2013. Microbial siderophores: A mini review. *J Basic Microbiol* 53:303–317.
- Saier MH, Paulsen IT. 2001. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 12:205–213.
- Sampedro I, Parales RE, Krell T, Hill JE. 2015. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol Rev* 39:17–46.
- Sanders LH, Rockel A, Lu H, Wozniak DJ, Sutton MD. 2006. Role of *Pseudomonas aeruginosa* dinB-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis. *J Bacteriol* 188:8573–8585.
- Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S, Lindler L, Mancuso J, Milstrey E, Bautista CT, Patel J, Ewell A, Hamilton T, Gaddy C, Tenney M, Christopher G, Petersen K, Endy T, Petrucci B. 2007. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US Military Health Care System associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis* 44:1577–1584.
- Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. 1993. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 279:544–552.
- Seifert H, Strate A, Pulverer G. 1995. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Med (United States)* 74:340–349.
- Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhando T, Pathania R. 2017. Fosfomicin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother* 72:68–74.
- Siroy A, Molle V, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, Dé E. 2005. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4876–4883.
- Siryaporn A, Kuchma SL, O’Toole G a., Gitai Z. 2014. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:16860–16865.
- Skaar EP. 2010. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* 6:e1000949.

- Skerker JM, Berg HC. 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV *pili*. Proc Natl Acad Sci 98:6901–6904.
- Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, Hammer B, Zimmermann O, Ziesing S, Wichelhaus TA, Hunfeld KP, Borgmann S, Gröbner S, Higgins PG, Seifert H, Busse HJ, Witte W, Pfeifer Y, Wilharm G. 2012. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. Int J Med Microbiol 302:117–128.
- Smani Y, Domínguez-Herrera J, Pachón J. 2013. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dis 208:1561–1570.
- Smith C a, Baker EN. 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. Curr Drug Targets Infect Disord 2:143–160.
- Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, Snyder M. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev 21:601–614.
- Songer JG. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol 5:156–161.
- Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes WA. 2009a. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. Ann Clin Microbiol Antimicrob 8:21.
- Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. 2009b. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 53:5312–5316.
- Srinivasan VB, Rajamohan G. 2013. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 57:4449–4462.

Referencias

- Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, Blackwell HE. 2012. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native N -acyl homoserine lactones. *ACS Chem Biol* 7:1719–1728.
- Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Averhoff B. 2015. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS One* 10.
- Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. 2005. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4362–4364.
- Subhadra B, Kim J, Kim DH, Woo K, Oh MH CC. 2018. Local repressor AcrR regulates AcrAB efflux pump required for biofilm formation and virulence in *Acinetobacter nosocomialis*. *Front Microbiol* 8.
- Tipton KA, Dimitrova D, Rather PN. 2015. Phase-variable control of multiple phenotypes in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol* 197:2593–2599.
- Tipton KA, Farokhyfar M, Rather PN. 2017. Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *Microbiologyopen* 6.
- Tipton KA, Rather PN. 2017. An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol* 199.
- Tjernberg I, Ursing J. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 97:595–605.
- Tófoli De Araújo F, Bolanos-Garcia VM, Pereira CT, Sanches M, Oshiro EE, Ferreira RCC, Chigardze DY, Gonçalves Barbosa JA, Ferreira LCDS, Benedetti CE, Blundell TL, Balan A. 2013. Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*. *PLoS One* 8.
- Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher *pili* assembly system. *Microbiology* 149:3473–3484.

- Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. 2008. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* 154:3398–3409.
- Tomás M del M, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martínez-Beltrán J, Bou G. 2005. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob AGENTS Chemother* 49:5172–5175.
- Towner KJ. 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 73(4):355-363.
- Tremblay J, Déziel E. 2010. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11:587.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 19:9.
- Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. 2006. The role of *ISAbal1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 258:72–77.
- Vahaboglu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M. 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2265–2269.
- Vallejo JA, Beceiro A, Rumbo-Feal S, Rodríguez-Palero MJ, Russo TA, Bou G. 2015. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 46:1.
- Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Médigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: Three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 3.
- Vedel G, Picard B, Paul G, Philippon A, Gilly L, Krishnamoorthy R, Nénot P. 1989. The analysis of five carbenicillin-hydrolysing enzymes by electrophoretic methods. *Res Microbiol* 140:579–590.

Referencias

- Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, Anandan S, Balaji V, Biswas I. 2016. Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Front Public Heal* 4:105.
- Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 59:1210–1215.
- Vila J, Ruiz J, Goñi P, De Anta TJ. 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 39:757–762.
- Vila J, Ruiz J, Goni P, Marcos A, De Anta TJ. 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1201–1203.
- Visca P, Seifert H, Towner KJ. 2011. *Acinetobacter* infection-an emerging threat to human health. *IUBMB Life* 63:1048–1054.
- Vogt SL, Green C, Stevens KM, Day B, Erickson DL, Woods DE, Storey DG. 2011. The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun* 79:4094–4104.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18:306-325.
- Wang Z, Bie P, Cheng J, Lu L, Cui B, Wu Q. 2016. The ABC transporter YejABEF is required for resistance to antimicrobial peptides and the virulence of *Brucella melitensis*. *Sci Rep* 6:31876.
- Warskow AL, Juni E. 1972. Nutritional requirements of *Acinetobacter* strains isolated from soil, water, and sewage. *J Bacteriol* 112:1014–1016.
- Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL, Salmond GPC. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:365-404.
- Wieland K, Chhatwal P, Vonberg RP. 2018. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. *Am J Infect Control* 46:643-648.

- Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. 2013. DNA Uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol* 195:4146–4153.
- Wilkens S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7:14.
- Williams & Wilkins. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore.
- Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1119–1134.
- Wood CR, Ohneck EJ, Edelmann RE, Actis LA. 2018. A light-regulated type I *pilus* contributes to *Acinetobacter baumannii* biofilm, motility and virulence functions. *Infect Immun* 86.
- Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldaña Z, Ledesma MA, Puente JL, Girón JA. 2009. The type 4 *pili* of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J Bacteriol* 91:411–421.
- Xu J, Tozawa Y, Lai C, Hayashi H, Ochi K. 2002. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Genet Genomics* 268:179–189.
- Yamaguchi A, Nakashima R, Sakurai K. 2015. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front Microbiol* 6:327.
- Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. 1994. Isolation and structure elucidation of acinetobactin., a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol* 162:249–254.
- Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K. 2008. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* 190:7693–7698.
- Yoon EJ, Balloy V, Fiette L, Chignard M, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. 2016. Contribution of the Ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 7.
- Yoon EJ, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. 2013. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: Major role for AdeABC overexpression and aders mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2989–2995.

Referencias

- Yum JH. 2002. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the blaVIM-2 gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 49:837–840.
- Zhao WH, Hu ZQ. 2011. IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: Distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol* 37:214-226.
- Zhou YN, Jin DJ. 1998. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like “stringent” RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2908–2913.
- Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ. 2011. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* 50:43–61.
- Zuo Y, Wang Y, Steitz TA. 2013. The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol Cell* 50:430–436.

8 **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimientos

En el final de esta etapa quiero agradecer a muchas personas la ayuda, colaboración y apoyo que me han prestado a lo largo de estos intensos años.

En primer lugar, darles las gracias a mis dos directores de tesis. Al Dr. Jordi Barbé, por compartir conmigo tus conocimientos y por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la ciencia. Gracias a mi director y tutor, el Dr. Jesús Aranda, por tu gran apoyo y dedicación. Gracias por siempre resolver mis dudas (que no han sido pocas), por hacerme pensar y por todas tus correcciones, especialmente en los últimos meses. Gracias también por tu infinita paciencia, creo que no se podría medir ni con un inexistente metro de sesenta minutos ni con un inventado minuto de cien centímetros. Gracias por confiar en mí y sin duda, gracias por haberme enseñado tantas cosas. A las doctoras Pilar Cortés, Susana Campoy y Montserrat Llagostera, gracias por vuestros útiles consejos y también por vuestro asesoramiento siempre que lo he necesitado.

Gracias a Susana Escribano y a Joan Ruiz. Por vuestra siempre disponibilidad para ayudarme, por los miles de medios y pedidos, pero, sobre todo, porque con vosotros el trabajo diario se ha hecho más llevadero. Gracias por vuestras enriquecedoras opiniones. ¡Vuestro apoyo y cariño han sido imprescindibles todo este tiempo!

A mis compañeros de laboratorio, quienes creo que son las personas con las que más tiempo he pasado estos últimos años, podría pasarme eones dándoos las gracias. Lo peor de acabar esta etapa es lo raro que se me hará no veros... Hemos trabajado mucho y compartido momentos de desesperación, locura y agobio; pero también hemos vivido muy buenos ratos juntos. Los días de mil horas en el labo se han hecho más agradables gracias a la música de Máxima (pd. no, pero te quiero igual), los olvidos que acababan siendo risas y a los refranes en castellano antiguo. De estos años, me llevo grandes recuerdos a vuestro lado, tanto en el laboratorio como fuera. Gracias por haberos convertido en grandes amigos. A las compañeras que ya no están en el labo por entenderme en temas de meigas y ayudarme cuando llegué. Muchas gracias también a los alumnos de prácticas que me han ayudado en la realización de este trabajo: Pau, Dani, Paula y Marc. Además, tampoco me olvido de mis compañeros del Departamento, por hacer la hora de comer más divertida y por siempre tener un momento para preguntarme cómo iba todo.

Cuando llegué a Barcelona no conocía a nadie, sin embargo, aquí encontré a muy buenos amigos que me han animado con este trabajo. A Ana, gracias por tu apoyo constante, por tus consejos y, sobre todo, por estar siempre. Creo que todo lo que podría decirte se quedaría corto. A Marcos, Esther e Irene gracias por siempre tener un hueco para mí (independientemente del día o de la hora), por ayudarme a desconectar, por vuestra confianza en mí y vuestros ánimos. A Isita y a todos los del piso de Conchita Supervía, por los momentos de desconexión, los conciertos y, sobre todo, las risas. A Eneko y a Laia porque con vosotros guardo muy buenos momentos en Andoain, L'Ametla y Chantada. A Ferran y sus locuras. A Núria y Ángela, ¡cuántas horas nos hemos pasado en el piso hablando de la vida! Gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme.

Sin duda, no me puedo olvidar de toda la gente que, pese a estar literalmente a mil kilómetros, ha estado conmigo todo este tiempo. A mis amigos de Chantada, simplemente gracias por todo, más allá de la tesis. A mi amigo del alma Andrés que me ha ayudado y apoyado durante toda mi vida, gracias por seguir aguantándome. A mi gran amiga Rocío por, pese a no vernos a menudo, entenderme como si estuviéramos todos los días juntas. A Astrid, por su sigilosa risa y por compartir juntas nuestro primer año en Barcelona. A Carlos, por ofrecerme siempre una visión alternativa de la vida. A Jose, porque empezamos juntos en el mundo de la ciencia y, sin duda, eres una de las personas que más me entiende. A Paulo, gracias por tu sinceridad y por transmitirme tu tranquilidad en los momentos de agobio. Gracias por estar, de una manera u otra, siempre a mi lado.

Gracias a mis amigos de Santiago por, aunque no haya sido físicamente, también estar a mi lado. A Maru, a Mateo, a Lago, a Sus... gracias porque siempre que he ido de vacaciones a Galicia habéis sacado un rato para vernos y contarnos las penas y alegrías de todo el año. A Sandra, Lore, Aldara y Sheila, porque con nuestros viajes y conversaciones estos años se han hecho más llevaderos. Gracias por vuestro apoyo.

A mi padre y a mi madre por enseñarme a ser fuerte y a nunca renunciar a mis sueños. Gracias por todo. A mi hermano Gabriel, por su apoyo y su irónico humor. También, gracias a mi familia de A Coruña, a mi abuela y a mi tía porque, aunque nos veamos pocas veces siempre os llevo conmigo. Gracias también a toda la gente que, sin ser de mi familia, habéis sido siempre como si lo fuerais. Isa, Sandra, Zhoé, Hor y Antonio, por cuidarme y siempre estar ahí para tenderme una mano. Por último, a los que no están. Especialmente a mi abuelo Homero, gracias por ser un ejemplo de dedicación y esfuerzo. Ojalá estuvieras aquí.

¡Gracias a todos!