

## RESUMEN

Las bacterias resistentes a múltiples antibióticos, como el Enterococo resistente a vancomicina (ERV), son un problema creciente en los pacientes hospitalizados, por lo que se necesitan estrategias alternativas para combatir estos patógenos. Las infecciones causadas por ERV suelen comenzar con la colonización del tracto intestinal, un paso crucial que se ve afectado por la presencia de la microbiota. Sin embargo, los antibióticos alteran la microbiota y esto promueve la colonización de ERV. Una vez que el patógeno ha colonizado el intestino, alcanza niveles muy altos pudiendo diseminarse a otros órganos y pacientes. A pesar de su importancia, se sabe muy poco sobre los genes que codifican para colonizar el intestino y sobre el mecanismo por el cual la microbiota suprime su colonización intestinal, siendo los dos objetivos principales.

En primer lugar hemos utilizado una metodología previamente descrita (Zhang et al., 2017, BMC Genomics), basada en la generación de una librería de mutantes por transposición junto a secuenciación masiva, con el fin de identificar los genes codificados por ERV necesarios para la colonización del intestino en ratones. Además, hemos realizado análisis metatranscriptómicos para identificar aquellos genes más expresados. El análisis ha identificado genes cuya interrupción reduce significativamente la colonización intestinal en el intestino grueso. Los genes que más afectaron a la colonización codifican proteínas relacionadas con la absorción o el transporte de diversos nutrientes como los carbohidratos (subunidad EIIAB del transportador PTS de manosa, el regulador transcripcional de la familia LacI, ácido N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa) o iones (proteína transportadora dependiente de ATP (ABC) y proteínas del grupo [Fe-S]). El papel de estos genes en la colonización se ha confirmado mediante experimentos de mutagénesis directa y de competición con la cepa salvaje. Además, estos genes afectan a la colonización intestinal con diferentes antibióticos (clindamicina y vancomicina). Para identificar el mecanismo molecular por el cual cada gen afecta a la colonización, hemos realizado experimentos *in vitro* y *ex vivo* además del análisis transcriptómico. Los experimentos *in vitro* confirman que las proteínas del grupo [Fe-S] están involucradas en el transporte de iones de hierro, principalmente  $Fe^{3+}$ . Por otra parte, los genes de la subunidad EIIAB del transportador de manosa y del ácido N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa son necesarios para la utilización de la manosa y el ácido N-acetilmurámico, respectivamente, azúcares que suelen estar presentes en el intestino. También confirmamos que el regulador transcripcional de la familia LacI es un represor que afecta a proteínas transportadoras ABC, probablemente implicadas en la absorción de carbohidratos. Además, algunos de estos genes están codificados principalmente por cepas clínicas de *E. faecium* y en menor medida por cepas comensales.

En segundo lugar, estudiamos los mecanismos de protección de un consorcio de cinco bacterias comensales, que anteriormente se había demostrado que disminuían la colonización intestinal por ERV en ratones. Mediante transcriptómica, metabolómica y los ensayos *in vivo* observamos que el consorcio bacteriano inhibe el crecimiento de ERV mediante la reducción de nutrientes, concretamente fructosa. Por último, el análisis

ARN-Seq *in vivo* de cada aislado en combinación con los ensayos *ex vivo* e *in vivo* demostraron que una sola bacteria (*Olsenella* sp.) proporciona protección.

En conjunto, los resultados obtenidos han identificado la función de genes específicos requeridos por ERV para colonizar el intestino. Además, hemos identificado un mecanismo mediante el cual la microbiota confiere protección. Estos resultados podrían conducir a nuevos enfoques terapéuticos para prevenir las infecciones causadas por este patógeno multiresistente a los antibióticos.