

Grupo de Genética de Micobacterias

Carlos Martín¹, Jesús Gonzalo-Asensio¹, José Antonio Aínsa¹,
Santiago Ramón-García², Nacho Aguiló¹, Sofía Samper³ e Isabel Otal¹

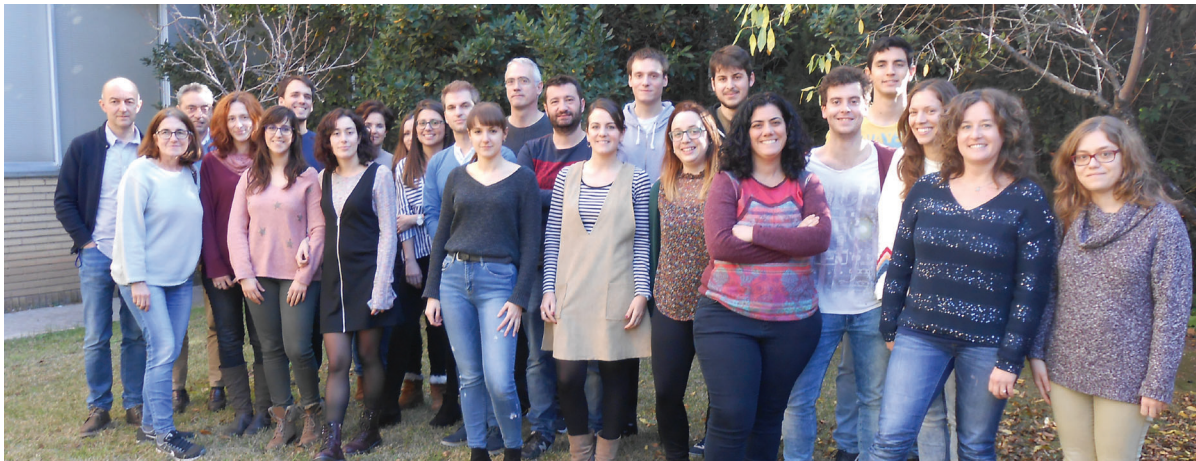
carlos@unizar.es
jagonzal@unizar.es
ainsa@unizar.es
santiramon@unizar.es
naguilo@unizar.es
ssamper.iacs@aragon.es
otali@unizar.es

¹Universidad de Zaragoza

²Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID)

³Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

De izquierda a derecha: José Antonio Aínsa, Sofía Samper, Carlos Martín, Ainhoa Lucia, Marta Gómara, Santiago Ramón-García, Lara Muñoz, Isabel Otal, Dessislava Marinova, Ana Cristina Millan, Jesús Gonzalo-Asensio, Elena Mata, Santiago Uranga, Nacho Aguiló, Clara Aguilar, José Manuel Ezquerro, Esther Broset, Eduardo Moreo, Begoña Gracia, Ernesto Anoz, Juan Calvet, Ana Picó, Ana Belén Gómez y Jessica Comín.



El Grupo de Investigación “Genética de Micobacterias” de la Universidad de Zaragoza, y perteneciente al CIBER de Enfermedades Respiratorias del Instituto de Salud Carlos III y al Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, está formado por cinco equipos de investigación coordinados e interdisciplinarios que trabajan en descifrar aspectos clave de la biología de *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria que causa la tuberculosis, y de otros microorganismos patógenos.

SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) ha sido a lo largo de la historia la enfermedad infecciosa más mortal, hoy lo sigue siendo al cobrarse 1,6 millones de vidas. Además, 1.700 millones de personas, la cuarta parte de la población mundial, está infectada de forma latente y tiene el riesgo de poder reactivarse en cualquier momento de la vida. Aún más alarmante es la aparición de cepas resistentes a los, ya de por sí escasos, fármacos antituberculosos que hacen que el tratamiento sea difícil o incluso imposible.

A este hecho hay que sumarle la dificultad para encontrar nuevos fármacos y la relativa facilidad con que la bacteria de la tuberculosis desarrolla resistencia a los mismos. La epidemia de la TB se mantiene a pesar de existir una vacuna, denominada BCG. Esto se debe a la eficacia de BCG en la prevención de la tuberculosis pulmonar en niños, pero a su gradual pérdida de eficacia en adolescentes y adultos (WHO 2018).

EQUIPO “NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS” IP: CARLOS MARTÍN

Después de casi 20 años de descubrimiento, caracterización y desarrollo preclínico, MTBVAC es la única vacuna viva atenuada basada en el patógeno humano (*M. tuberculosis*) que ha entrado en ensayos clínicos como vacuna preventiva contra la tuberculosis (TB). Nuestros estudios están enfocados a descifrar los mecanismos moleculares de atenuación y protección de MTBVAC, tratando de identificar posibles biomarcadores de protección que puedan ayudar a acelerar los ensayos de eficacia. Tras los buenos resultados sobre seguridad

en adultos en Suiza (Fase clínica 1a) (Spertini *et al.*, 2015), se ha demostrado que MTBVAC es además una vacuna segura y más inmunogénica que BCG en recién nacidos en un país endémico de TB como Sudáfrica (Fase 1b) (Tameris *et al.*, 2019). En 2019, MTBVAC han comenzado dos Fases clínicas 2a en recién nacidos y adolescentes en Sudáfrica y esperamos que en 2021 MTBVAC puedan comenzar los ensayos de eficacia de Fase 3.

Completa el equipo Dessislava Marinova.

EQUIPO “EVOLUCIÓN PATO-ADAPTATIVA DEL COMPLEJO M. TUBERCULOSIS A SU HOSPEDADOR” IP: JESÚS GONZALO-ASENSIO

La TB afecta a humanos pero también a varias especies de mamíferos. Sus agentes causales se engloban dentro del Complejo *M. tuberculosis* (MTBC). El MTBC comprende 8 linajes con una homología mayor al 99.95% a nivel genómico. Esto unido a la ausencia de factores de virulencia “clásicos” o la falta de eventos de transferencia genética horizon-

tal, hace que comprender los mecanismos de adaptación patógeno-hospedador sea un reto. Nuestro equipo ha descifrado como un polimorfismo en el sistema de virulencia PhoPR ocasiona su pérdida de funcionalidad en la bacteria causante de la TB bovina (*M. bovis*) respecto al patógeno humano (*M. tuberculosis*) (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2014). Paralelamente hemos observado cómo la dinámica de transposición del transposón IS6110 es específica de cada linaje del MTBC (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2018). Ambos hallazgos nos han permitido descifrar las bases moleculares de la adaptación de una extraña cepa de *M. bovis* capaz de transmitirse entre humanos.

Completan el equipo Irene Pérez, Juan Calvet, Elena Campos y Ana Picó.

EQUIPO “D²AMR: DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE ANTIMICROBIANOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA” IPS: JOSÉ ANTONIO AÍNSA CLAVER Y SANTIAGO RAMÓN-GARCÍA

Una de las formas efectivas de hacer frente a las enfermedades infecciosas es mediante la administración de terapias antimicrobianas, aunque la aparición de bacterias resistentes a antimicrobianos está poniendo en peligro esta opción terapéutica. Las principales líneas de investigación del equipo D²AMR incluyen la caracterización de mecanismos de resistencia intrínseca a antimicrobianos, descubrimiento y desarrollo pre-clínico de compuestos bio-activos como nuevos antimicrobianos, reposicionamiento de fármacos con aplicaciones antimicrobianas basado en el sinergismo, nanopartículas como vehículos de fármacos antimicrobianos y el desarrollo de modelos farmacológicos dinámicos para el estudio de la actividad de los antimicrobianos (Gómara *et al.*, 2019; Aguilar-Pérez *et al.*, 2018)

Nuestras investigaciones se centran principalmente en *M. tuberculosis*, en micobacterias no-tuberculosas como *M. abscessus*, *M. kansasii* y *M. ulcerans*, y en bacterias Gram-positivas o Gram-negativas con resistencia múltiple a antibióticos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y *Klebsiella pneumoniae*, entre otras.

Completan el equipo Ainhoa Lucía, Begoña Gracia, Ernesto Anoz, Lara Muñoz, Ana

Cristina Millán, Marta Gómara, José Manuel Ezquerro, y M^a Pilar Arenaz.

EQUIPO “INMUNO-PATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS” IP: NACHO AGUILÓ

Además del desarrollo de nuevas vacunas de tuberculosis, existe en el campo un interés por estudiar nuevas rutas de inoculación para hacer más efectivas las vacunas existentes. En este sentido, la vía de inoculación pulmonar ha demostrado en diferentes modelos animales ser más efectiva que la intradérmica, que es la utilizada en la actualidad con la BCG. El hecho de mimetizar con la vacunación la vía de infección de tuberculosis hace que se estimulen en los pulmones diferentes mecanismos inmunes a nivel local que frenan eficientemente la infección. Nuestro grupo ha estudiado en modelos de ratón el uso de vacunas vivas atenuadas, como BCG o MTBVAC, administradas por vía intranasal, observando que esta vía de administración estimula en los pulmones una respuesta inmune local que no se obtiene cuando los ratones se vacunan por vía intradérmica, destacando el papel de la IL17 y las inmunoglobulinas secretoras (Aguilo *et al.*, 2014; Aguilo *et al.*, 2016). Estos resultados fueron recientemente demostrados en un modelo de tuberculosis en primates no humanos.

Completan el equipo Santiago Uranga, Raquel Tarancón, Elena Mata, Eduardo Moreo, Claudia Guerrero y Ana Belén Gómez.

EQUIPO “EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS Y MECANISMOS DE LATENCIA” IPS: SOFÍA SAMPER E ISABEL OTAL

Mediante estudios moleculares somos capaces de diferenciar las distintas cepas del MTBC (tipificación genómica), clasificarlas en distintos linajes y analizar su evolución. Esto tiene numerosas aplicaciones como los estudios de brotes, diferenciar transmisión reciente de reactivación, estudios poblacionales y vigilancia epidemiológica. Con el fin último de disminuir la tasa de incidencia de la TB, colaboramos con las autoridades sanitarias tipificando las cepas aisladas en Aragón y coordinamos la red “Grupo Español de Trabajo sobre Tuberculosis Multirresistente”, destinada a detectar la posible difusión de la

multirresistencia en España en colaboración con la Unión Europea. Aquellas cepas que presentan mayor transmisibilidad, que permanecen en estado de latencia y se reactivan, y aquellas que presentan resistencia son objeto de un estudio detallado (Pérez-Lago *et al.*, 2019). Utilizando la mutagénesis por transposición para detectar genes implicados en latencia, hemos podido aislar un mutante con características fenotípicas nuevas y diferencialmente expresadas en fase estacionaria y en crecimiento en colesterol como única fuente de carbono (Otal *et al.*, 2017).

Completan el equipo Jessica Comín, María José Iglesias y Daniel Ibarz.

REFERENCIAS

- Aguilar-Pérez, C., B. Gracia, L. Rodrigues, A. Vitoria, R. Cebrián, N. Deboosère, O.R. Song, P. Brodin, M. Maqueda, and J.A. Ainsa.** (2018) “Synergy between circular bacteriocin AS-48 and ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*”. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(9): e00359-18.
- Aguilo N, A.M. Toledo, E.M. Lopez-Roman, E. Perez-Herran, E. Gormley, J. Rullas-Trincado, I. Angulo-Barturen and C. Martin** (2014). “Pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers dose-dependent superior protection compared to that of subcutaneous vaccination”. *Clin Vaccine Immunol.* Apr;21(4):594-7.
- Aguilo N., S. Alvarez-Arguedas, S. Uranga, D. Marinova, M. Monzón, J. Badiola and C. Martin** (2016). “Pulmonary but Not Subcutaneous Delivery of BCG Vaccine Confers Protection to Tuberculosis-Susceptible Mice by an Interleukin 17-Dependent Mechanism”. *J Infect Dis.* Mar 1;213(5):831-9.
- Gómara, M., and S. Ramón-García.** (2019) “The FICI paradigm: correcting flaws in antimicrobial *in vitro* synergy screens at their inception”. *Biochem Pharmacol.* 163:299-307.
- Gonzalo-Asensio, J., I. Perez, N. Aguilo, S. Uranga, A. Pico, C. Lampreave, A. Cebollada, I. Otal, S. Samper and C. Martin** (2018). “New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages.” *PLoS Genet* 14(4): e1007282.
- Gonzalo-Asensio, J., W. Malaga, A. Pawlik, C. Astarrie-Dequeker, C. Passemar, F. Moreau, F. Laval, M. Daffe, C. Martin, R. Brosch and C. Guilhot** (2014). “Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(31): 11491-11496.
- Otal I., E. Pérez-Herrán, L. García-Morales, M.C. Menéndez, J.A. Gonzalez-Y-Merchand, C. Martín and M.J. García** (2017). “Detection of a Putative TetR-Like Gene Related to *Mycobacterium bovis* BCG Growth in Cholesterol Using a gfp-Transposon Mutagenesis System”. *Front Microbiol.* Mar 6;8:315.
- Pérez-Lago, L., M.I. Campos-Herrero, F. Cañas, R. Copado, L. Sante, B. Pino, M. Lecuona, O.D. Gil,**

C. Martín, P. Muñoz, D. García-de-Viedma and S. Samper (2019). "A *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain persists at high rates and extends its geographic boundaries 20 years after importation". *Sci Rep. Mar* 18;9(1):4687.

Spertini, F., R. Audran, R. Chakour, O. Karoui, V. Steiner-Monard, A. C. Thierry, C. E. Mayor, N. Rettby, K. Jaton, L. Vallotton, C. Lazor-Blanchet,

J. Doce, E. Puentes, D. Marinova, N. Aguilo and C. Martín (2015). "Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial." *Lancet Respir Med* 3(12): 953-962.

Tameris, M., H. Mearns, A. Penn-Nicholson, Y. Gregg, N. Bilek, S. Mabwe, H. Geldenhuys, J. Shenje, A. K. K. Luabeya, I. Murillo, J. Doce, N. Aguilo,

D. Marinova, E. Puentes, E. Rodriguez, J. Gonzalo-Asensio, B. Fritzell, J. Thole, C. Martín, T. J. Scriba, M. Hatherill and M. C. T. Team (2019). "Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial." *Lancet Respir Med* 7(9): 757-770.

WHO (2018). "Global Tuberculosis Report 2018."

RNAs reguladores de cianobacterias

Alicia M. Muro Pastor



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla)



De izquierda a derecha: Manuel Brenes Álvarez, Alicia M. Muro Pastor, Agustín Vioque Peña, Elvira Olmedo Verd e Isidro Álvarez Escribano.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos fotosintéticos con requerimientos nutricionales muy reducidos y una enorme capacidad de adaptación a entornos cambiantes, por lo que son objeto de interés biotecnológico para la producción sostenible de distintos compuestos, incluyendo biocombustibles. Los mecanismos de adaptación de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno están controlados por el regulador transcripcional NtcA, que regula el uso de distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo en última instancia la posibilidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) mediante la nitrogenasa, una enzima extremadamente sensible al oxígeno cuya actividad es incompatible con

la fotosíntesis oxigénica. En cianobacterias complejas, como nuestro organismo modelo *Nostoc* sp. PCC 7120, esta incompatibilidad se resuelve confinando la nitrogenasa en unas células especializadas denominadas heterocistos. En condiciones de fijación de nitrógeno los filamentos se comportan como organismos pluricelulares con división de tareas entre dos tipos celulares interdependientes, las células vegetativas y los heterocistos (figura 1) (Muro-Pastor & Hess 2012). La diferenciación de heterocistos, que está en última instancia controlada por NtcA, depende también de HetR, un regulador específico de diferenciación celular. Nuestro trabajo se centra en el estudio de la partici-

pación de RNAs reguladores, tanto pequeños RNAs (sRNAs) como RNAs antisentido en los procesos de adaptación al estrés de carencia de nitrógeno y la diferenciación de heterocistos.

Hemos definido el "paisaje transcripcional" de nuestro organismo modelo mediante una metodología de RNASeq que evidenció abundante transcripción no codificante. La inclusión de una estirpe mutante *hetR*, que no es capaz de diferenciar heterocistos, nos permitió clasificar las respuestas transcripcionales a la deficiencia de nitrógeno en dos grandes regulones, el regulón NtcA, de respuestas globales, y el regulón HetR, que