

Grupo de genética de micobacterias

Jesús Gonzalo-Asensio, José Antonio Aínsa, Sofía Samper, Nacho Aguiló, Isabel Otal y Carlos Martín

Universidad de Zaragoza, IACS, CIBERES, IIS Aragón

carlos@unizar.es



Foto de grupo. De izda a dcha y de arriba abajo: Carlos Martín Montañés, Irene Pérez Sánchez, Alberto Cebollada Solanas, Sofía Samper Blasco, Samuel Álvarez Arguedas, Santiago Uranga Maiz, Carmen Lafoz Pueyo, Isabel Otal Gil, José Antonio Ainsa Claver, Jesús Gonzalo Asensio, Ana Picó Marco, Ana Belén Gómez Aguirre, Begonia Gracia Díaz, Nacho Aguiló Anento, Nedra Meftahi.

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas que causa mayor número de muertes en el mundo, junto con el SIDA y la malaria. En 2012 la epidemia de TB causó más de 1,3 millones de muertes y 8,4 millones de personas enfermaron de TB, siendo las formas pulmonares las responsables de la transmisión de la enfermedad. La aparición de cepas multirresistentes (TB-MDR) y extensamente resistentes (TB-XDR) a los fármacos constituye una nueva amenaza para el control de esta enfermedad. En su último informe, la OMS señala que los casos de TB-MDR aumentaron en la mayoría de países con alta incidencia de la enfermedad.

Nuestra investigación multidisciplinar del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) incluye el estudio de la epidemiología de la enfermedad, las bases moleculares de la resistencia y la búsqueda de nuevos fármacos y de nuevas vacunas como actuaciones fundamentales para avanzar en el control de la TB.

NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS Y ESTUDIO DE LA INMUNIDAD

Trabajamos desde hace más de 15 años en el desarrollo de la vacuna MTBVAC, una bacteria viva basada en la atenuación de *M. tuberculosis* mediante la eliminación de los genes *phoP* y *fadD26* (Arbués *et al.*, 2013). El grupo fue pionero en la identificación del gen *phoP* como un importante regulador de la virulencia en *M. tuberculosis* y recientemente ha descubierto que mutaciones en *phoP* han tenido un gran impacto en la evolución de *Mycobacterium* y su adaptación a diferentes hospedadores (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2014).

Hemos llevado a cabo una exhaustiva caracterización de la vacuna (lipidómica, transcriptómica (Solans *et al.*, 2014)

y proteómica (Solans *et al.*, 2014)) para comprender las propiedades de MTBVAC como vacuna a nivel molecular.

La pérdida de varios antígenos podría explicar la falta de protección inducida por la actual vacuna BCG. Por esto, pretendemos demostrar que la presencia de estos antígenos en MTBVAC conduce a una mayor inmunogenicidad, y también a una mejor protección de esta vacuna respecto a BCG.

Por otro lado, también estamos interesados en el estudio de mecanismos de patogenicidad de *M. tuberculosis*, concretamente en la inducción de apoptosis en la célula hospedadora como mecanismo de virulencia. Nuestras investigaciones demuestran que este fenotipo es un rasgo específico de cepas virulentas, que aprovechan el proceso de apoptosis para infectar nuevas células hospedadoras, (Aguiló *et al.*, 2013, Aguiló *et al.*, 2014).

TRANSPOSICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TB

Diversos polimorfismos como mutaciones puntuales, transposición o recombinación, influyen en la transmisibilidad y adaptación de *M. tuberculosis* al hospedador. El transposón *IS6110*, específico del CMT, tiene utilidad como marcador epidemiológico. Se han localizado las copias de *IS6110* en el genoma de cepas de alto interés para la población, facilitando así la identificación y diferenciación de estas cepas (Alonso *et al.*, 2011, Alonso *et al.*, 2013, Millan *et al.*, 2013).

Los estudios de tipificación genómica permiten diferenciar entre cepas del CMT y ofrecen la posibilidad de detectar brotes, diferenciar transmisión reciente de reactivación, realizar estudios poblacionales, y apoyar en la vigilancia epidemiológica. Desde 2004, en colaboración con el Depar-

tamento de Salud y Consumo del Gobierno de Aragón, y con el fin de disminuir la tasa de incidencia de tuberculosis, realizamos la caracterización molecular sistemática de las cepas del CMT de Aragón.

La fotografía de las cepas circulantes entre nuestra población nos permite identificar los aislados más prevalentes, caracterizarlos y estudiar los polimorfismos genéticos que pudieran estar interviniendo en su comportamiento (Millan *et al*, 2013, Alonso *et al*, 2013, Villellas *et al*, 2013). Desde enero de 1998, coordinamos junto con el Instituto de Salud Carlos III, el Grupo Español de Trabajo sobre Tuberculosis MDR, una red que colabora con CNE en la vigilancia molecular de la TB-MDR en Europa, aportando los distintos patrones genéticos obtenidos en nuestro laboratorio (Gavin *et al*, 2012, de Beer *et al*, 2014).

BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA Y NUEVOS FÁRMACOS CONTRA TB

Hemos estudiado mecanismos de resistencia intrínseca a antibióticos, tales como enzimas modificantes de aminoglicósidos, y caracterizamos la proteína Rv1258c como la primera bomba de eflujo funcional de *M. tuberculosis*. Demostramos la contribución de las bombas de eflujo a la resistencia a fármacos (Rodrigues *et al*, 2013) y al estrés oxidativo, y a la supervivencia del bacilo mediada por la bomba Rv1258c (Ramón-García *et al*, 2012), en la que además descubrimos un polimorfismo específico de las cepas de la familia Beijing (Villellas *et al*, 2013).

La posibilidad de inhibir las bombas de eflujo es una opción terapéutica interesante (Rodrigues 2011) que ha orientado nuestro interés hacia el descubrimiento de nuevos fármacos contra TB. En colaboración con diversos grupos hemos descrito moléculas activas frente a *M. tuberculosis* (Familiar *et al*, 2010, Tizón *et al*, 2011, Luo *et al*, 2013), y hemos demostrado que la capacidad de la bomba Rv1258c para transportar las nuevas espectinamidas es un factor clave para su actividad antituberculosis (Lee *et al*, 2014).

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiló **J**I, Alonso **H**, Uranga **S**, Marinova **D**, Arbués **A**, de Martino **A**, Anel **A**, Monzon **M**, Badiola **J**, Pardo **J**, Brosch **R**, Martín **C**. (2013) «ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*» *Cell Microbiol.* 15:1994-2005.
- Aguiló **N**, Uranga **S**, Marinova **D**, Martín **C**, Pardo **J**. (2014) Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Death Dis.* 17;5:e1343.
- Alonso **H**, Aguiló **J**I, Samper **S**, Caminero **J**A, Campos-Herrero **M**I, Gicquel **B**, Brosch **R**, Martín **C**, Otal **I**. Deciphering the role of IS6110 in a highly transmissible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain, GC1237. *Tuberculosis (Edinb).* (2011). 91:117-26.
- Alonso **H**, Samper **S**, Martín **C**, Otal **I**. (2013) Mapping IS6110 in high-copy number *Mycobacterium tuberculosis* strains shows specific insertion points in the Beijing genotype. *BMC Genomics.*14:422.
- Arbues **A**, Aguiló **J**I, Gonzalo-Asensio **J**, Marinova **D**, Uranga **S**, Puentes **E**, Fernandez **C**, Parra **A**, Cardona **P**J, Vilaplana **C**, Ausina **V**, Williams **A**, Clark **S**, Malaga **W**, Guilhot **C**, Gicquel **B**, Martín **C**. (2013) Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine.* 31:4867-73.
- De Beer **J**L, Kodmon **C**, van der Werf **M**J, van Ingen **J**, van Soolingen **D**; ECDC MDR-TB Molecular Surveillance Project Participants. (2014). Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. *Euro Surveill.* 19.
- Familiar **O**, Munier-Lehmann **H**, Aínsa **J**A, Camarasa **M**J, Pérez-Pérez **M**J. (2010) Design, synthesis and inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis* thymidine monophosphate kinase of acyclic nucleoside analogues with a distal imidazoquinolinone. *Eur J Med Chem.* 45:5910-8.
- Gavin **P**, Iglesias **M**J, Jiménez **M**S, Rodríguez-Valín **E**, Ibarz **D**, Lezcano **MA**, Revillo **M**J, Martín **C**, Samper **S**; Spanish Working Group on MDR-TB. (2012) Long-term molecular surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in Spain. *Infect Genet Evol.* 12:701-10.
- Gonzalo-Asensio **J**, Malaga **W**, Pawlik **A**, Astarie-Dequeker **C**, Passmar **C**, Moreau **F**, Laval **F**, Daffé **M**, Martín **C**, Brosch **R**, Guilhot **C**. (2014) Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *PNAS* 111:11491-6.
- Lee **RE**, Hurdle **J**G, Liu **J**, Bruhn **DF**, Matt **T**, Scherman **MS**, Vaddady **PK**, Zheng **Z**, Qi **J**, Akbergenov **R**, Das **S**, Madhura **DB**, Rathi **C**, Trivedi **A**, Villellas **C**, Lee **RB**, Rakesh, Waidyarachchi **SL**, Sun **D**, McNeil **MR**, Aínsa **J**A, Boshoff **HI**, Gonzalez-Juarrero **M**, Meibohm **B**, Böttger **EC**, Lenaerts **A**J. (2014) Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. *Nat Med.* 20:152-8.
- Luo **X**, Pires **D**, Aínsa **J**A, Gracia **B**, Duarte **N**, Mulhovo **S**, Anes **E**, Ferreira **M**J. (2013) *Zanthoxylum capense* constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis in vitro* and *ex vivo* within human macrophages. *J Ethnopharmacol.* 146:417-22.
- Millán-Lou **M**I, López-Calleja **A**I, Colmenarejo **C**, Lezcano **MA**, Vitoria **MA**, del Portillo **P**, Otal **I**, Martín **C**, Samper **S**. (2013). Global study of IS6110 in a successful *Mycobacterium tuberculosis* strain: clues for deciphering its behavior and for its rapid detection. *J Clin Microbiol.* 51:3631-7.
- Ramón-García **S**, Mick **V**, Dainese **E**, Martín **C**, Thompson **C**J, De Rossi **E**, Manganelli **R**, Aínsa **J**A. (2012) Functional and genetic characterization of the tap efflux pump in *Mycobacterium bovis* BCG. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:2074-83.
- Rodrigues **L**, Aínsa **J**A, Amaral **L**, Viveiros **M**. (2011) Inhibition of drug efflux in mycobacteria with phenothiazines and other putative efflux inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 6:118-27.
- Rodrigues **L**, Villellas **C**, Bailo **R**, Viveiros **M**, Aínsa **J**A. (2013) Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:751-7.
- Solans **L**, Aguiló **N**, Samper **S**, Pawlik **A**, Frigui **W**, Martín **C**, Brosch **R**, Gonzalo-Asensio **J**. A Specific Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Causes Differential ESAT-6 Expression and Identifies WhiB6 as a Novel ESX-1 Component. *Infect Immun.* 82:3446-56.
- Solans **L**, Gonzalo-Asensio **J**, Sala **C**, Benjak **A**, Uplekar **S**, Rougemont **J**, Guilhot **C**, Malaga **W**, Martín **C**, Cole **ST**. (2014) The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 10:e1004183
- Tizón **L**, Otero **J**M, Prazeres **V**F, Llamas-Saiz **AL**, Fox **GC**, van Raaij **M**J, Lamb **H**, Hawkins **AR**, Aínsa **J**A, Castedo **L**, González-Bello **C**. (2011) A prodrug approach for improving antituberculosis activity of potent *Mycobacterium tuberculosis* type II dehydroquinase inhibitors. *J Med Chem.* 54:6063-84.
- Villellas **C**, Aristimuño **L**, Vitoria **MA**, Prat **C**, Blanco **S**, García de Viedma **D**, Domínguez **J**, Samper **S**, Aínsa **J**A. (2013) Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J Clin Microbiol.* 51:2124-30.