Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*

Félix J Sangari y Juan M García Lobo.

Instituto de Biomedicina y Biotecnología. Universidad de Cantabria-CSIC

sangarif@unican.es

Foto de grupo. De izquierda a derecha, Félix J. Sangari, Juan M. García Lobo, Asunción Seoane, Candela Gonzaléz-Riancho e Íñigo Pariza.

La brucelosis es una zoonosis producida por diversas bacterias del género *Brucella,* como *B. melitensis, B. abortus* y *B. suis*. En los animales que constituyen su hospedador natural, como vacas, cabras u ovejas, dan lugar a abortos e infertilidad principalmente, mientras que en los humanos la enfermedad se manifiesta como un síndrome febril que puede progresar a una fase crónica caracterizada por la aparición de severas complicaciones como endocarditis, artralgia, epididimitis o neurobrucelosis. Si no se trata, la brucelosis crónica representa una amenaza, especialmente en áreas endémicas, como América Central y Sudamérica, Oriente Próximo, los países mediterráneos, el norte de Africa y los países del Caúcaso y Asia Central. Se maneja la cifra de unos 500.000 casos humanos nuevos cada año, aunque probablemente esta cifra esté infravalorada y sea 4 ó 5 veces superior. Una de las peculiaridades de este género bacteriano, y que explica en gran manera su éxito, es que carece de factores de virulencia clásicos, y más bien ha desarrollado una estrategia furtiva de modificación de sus patrones moleculares asociados a patógenos para evitar ser reconocido en primera instancia por el sistema inmune innato, y lograr éxito en la infección.

Nuestro trabajo sobre *Brucella* se inició con el desarrollo de métodos para la manipulación genética del género. Utilizamos de forma pionera la mutagénesis por trasposición en *Brucella* y fruto de aquellos esfuerzos obtuvimos varios mutantes sobre los que hemos desarrollado muchos de nuestros proyectos posteriores. Sin dudas, de todos ellos el que realmente perseguíamos y consideramos uno de nuestros mejores logros fue un mutante que era sensible al eritritol. *Brucella* es uno de los pocos géneros bacterianos capaces de utilizar eritritol como fuente de carbono y además se estableció una relación muy sugerente entre la presencia de eritritol en la placenta de los ungulados y la capacidad abortiva de *B. abortus*. Otro

argumento que animaba nuestro trabajo, era que la cepa vacunal de *B. abortus* S19 era era también sensible al eritritol. La caracterización de nuestro mutante *ery* nos llevó a describir un operón que contiene genes para el catabolismo del eritritol dentro de un agrupamiento mayor que contiene genes para transporte del eritritol y otros genes del metabolismo de carbohidratos, todos ellos inducibles por la presencia de eritritol en el medio de cultivo. Sorprendentemente encontramos que la cepa vacunal S19, sensible a eritritol, ha sufrido una deleción que afecta a dos genes esenciales del operón.

El trabajo de caracterización genética se complementaba con experimentos de infección en cultivos celulares y en ratones tratando de establecer el lazo de conexión entre el metabolismo del erirtritol y la virulencia de *Brucella*. Concretamente uno de los sistemas más correlacionados con la virulencia de *Brucella* ha resultado ser un sistema de secreción de tipo IV, que se conoce como el operón *vir* de *Brucella*. La regulación por eritritol del operón *vir,* y por ende de la virulencia de *Brucella* ha sido una de nuestras hipótesis más perseguidas.

En una vertiente más aplicada, hemos tratado de explotar nuestros hallazgos, primero en el desarrollo de procedimientos diagnósticos de identificación de la cepa vacunal S19, basados en nuestros datos de secuencia, que resolvieran el problema de la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados.

Otra aplicación de este trabajo contempla el desarrollo de vacunas para la brucelosis bovina construidas introduciendo de forma controlada mutaciones en los genes del eritritol y el operon de la ureasa, otro de los factores de virulencia que hemos caracterizado en *Brucella*. La ureasa, de modo similar a lo que ocurre en *Helicobacter pylori,* le sirve a *Brucella* para sobrevivir al pH ácido del estómago, e infectar al huésped por vía gastrointestinal, como es el caso más habitual de infección en humanos. Un mutante *Δure Δery* debería tener por un lado abolida la capacidad de producir abortos mediada por el uso del eritritol y al mismo tiempo ser más segura para el hombre al disminuir la capacidad de producir una enfermedad en el hombre cuando se ingiere la bacteria a través de productos lácteos contaminados. En la actualidad estamos tratando de utilizar mutantes *Δery* para producir una vacuna basada en *B. melitensis* que sería protectora para cabras.

La secuenciación de genomas y el desarrollo de diferentes «ómicas» ha dado una nueva dimensión a nuestro trabajo. En esta línea comenzamos corrigiendo la anotación del genoma de *B. melitensis* 16M y la nueva anotación la utilizamos para construir el ORFeoma de *Brucella,* una colección ordenada de plásmidos conteniendo todos los ORF's del genoma (Dricot *et al,* 2004). Con el ORFeoma construimos un microarray que fue utilizado para un primer análisis transcripcional de la respuesta de al eritritol (Rodríguez *et al,* 2012) así como para el análisis de la respuesta transcripcional de los mutantes en el sistema de dos componentes BvrR/S (Viadas *et al,* 2010). Posteriormente hemos incorporado la caracterización del transcriptoma por secuenciación profunda de mRNA. Con esta tecnología completamos el análisis transcriptómico de la respuesta al eritritol lo que reveló profundos cambios en el metabolismo de carbohidratos en respuesta a este compuesto que deben estar en la base de la observada asociación con la inducción de abortos por *Brucella* en rumiantes. También colaboramos en el proceso de secuenciación del genoma de *Brucella ovis* (Tsolis *et al,* 2009), la especie que causa brucelosis en ovejas y carneros que tiene un gran interés entre otras cosas por ser una especie «rugosa» pero aún patógena para animales. Además esta especie muestra una actividad demostrable de una secuencia de inserción denominada IS*711* (Ocampo-Sosa y García-Lobo, 2008), de la que existen unas 25 copias en contraposición de las 5-7 copias que se encuentran en las especies patógenas para el hombre.

Recientemente hemos llevado a cabo el análisis transcripcional por RNAseq direccional, lo que nos ha permitido identificar una colección de posibles RNAs pequeños (sRNA) que probablemente jueguen un papel importante en la regulación de la expresión en *Brucella*. En concreto estamos caracterizando dos de estos sRNAs que por su localización pudieran estar regulando la expresión del sistema de secreción tipo IV de *Brucella,* lo que de alguna manera nos vuelve a enfrentar a nuestra vieja hipótesis de la relación entre virulencia y eritritol a través de la regulación del operón *vir* de *Brucella*.

El grupo de «Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*» desarrolla su actividad investigadora desde Agosto de 2013 en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) (http://web.unican.es/ibbtec/), a donde se trasladó tras estar localizado durante más de 20 años en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. En este nuevo entorno disponemos de más infraestructuras, más espacio, además de estar rodeados por grupos afines con los que compartimos metodología y equipamiento científico similares.

REFERENCIAS

Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, Dupuy D, Hao T, Lambert C, Hallez R, Delroisse JM, Vandenhaute J, *et al.* (2004). Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. Genome Res. 14:2201–2206.

Ocampo-Sosa AA, and García-Lobo JM. (2008). Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. BMC Microbiol. 8:17.

Rodríguez MC, Viadas C, Seoane A, Sangari FJ, López-Goñi I, García-Lobo JM. (2012). Evaluation of the Effects of Erythritol on Gene Expression in *Brucella abortus*. PloS One *7,* e50876.

Sangari FJ, Pérez-Gil J, Carretero-Paulet L, García-Lobo JM, Rodríguez-Concepción M. (2010). A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:14081–14086.

Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL, Sangari FJ, Lobo JMG, de Jong MF, Ren Q, Myers G, Brinkac LM, Nelson WC, *et al.* (2009). Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. PloS One 4:e5519.

Viadas C, Rodríguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, García-Lobo JM López-Goñi I. (2010). Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. PLoS ONE 5:e10216.