

Potencialidad metabólica de *Pseudomonas aeruginosa*; Aproximación genómica y proteómica.



González-Molero Wendy, Rojas Ascanio y Acosta Héctor.

Centro Nacional de Cálculo Científico (CeCalCULA)

Universidad de los Andes

Merida/Venezuela

fabiolamg123@gmail.com, bioinfo.cecalcula@gmail.com, hectoracosta@ula.ve

1. Introducción

P. aeruginosa es un patógeno oportunista, con gran versatilidad metabólica que le permite crecer en diferentes ambientes. Es uno de los mayores responsables de infecciones nosocomiales, afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos y con fibrosis quística, causando infecciones respiratorias crónicas [1]. Esta especie se ha caracterizado por una alta resistencia a antibióticos y por usar diversos factores de virulencia para su supervivencia, que incluyen la colonización e infección (flagelos, pili y biopelículas), adquisición de nutrientes (fosfolipasas, exoproteasas, sideróforos) y moduladores de la respuesta inmune del hospedador [2]. La biología de sistemas integra los nuevos enfoques experimentales (ómicos) y computacionales para alcanzar el objetivo global de explicar y predecir comportamientos celulares complejos de los sistemas biológicos [3]. La reconstrucción de redes metabólicas en *P. aeruginosa* permitió una integración de datos disponibles en la Web, donde se encontraron diversos factores únicos que contribuyen al establecimiento, desarrollo y patogenicidad que podrían ser utilizados como blancos terapéuticos para combatir infecciones producidas por esta especie, como producción de las fenacinas, sideróforos, toxinas y biopelícula a partir de *Quorum sensing*. Se estableció como objetivo general, reconstruir modelos de redes metabólicas secundarias relacionadas a los mecanismos de patogenicidad a partir del genoma y proteoma de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Metodología

Se utilizó la secuencia de referencia (RefSeq) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica National Center for Biotechnology Information (NCBI) código de acceso NC 002516. Para los análisis comparativos con otras especies de *Pseudomonas* se utilizaron las secuencias de referencia de *Pseudomonas putida* KT2440 código de acceso NC 002947.4, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, código de acceso NC 007005.1 y *Pseudomonas fluorescens* F113 Bajo código de acceso NC 016830.1. Para comprobar la potencialidad genética y obtener modelos metabólicos más acertados, se realizó un análisis proteómico comparativo entre las cuatro especies de estudio, mediante la herramienta *Proteome Comparison* de la base de datos SYSTOMONAS genome DB, que utiliza el algoritmo de alineamiento de secuencias BLAST con un e-value máximo de 10⁻⁵, aquellas proteínas que muestren alta cobertura, identidad y bajo valores de e-value se anotaron como posibles secuencias homólogas. De esta manera se pudo obtener información sobre las proteínas únicas, y compartidas de *P. aeruginosa* con las demás especies. Para identificar la ruta metabólica a la que pertenece cada enzima, producto o sustrato, se hizo uso de las bases de datos, KEGG, Reactome, String, BioCyc y AmiGO. Estas búsquedas fueron corroboradas haciendo uso de PSI-BLAST que realiza comparaciones en búsqueda de homólogos con otros organismos. Finalmente se reconstruyeron rutas metabólicas centrales y secundarias, a partir de modelos disponibles en las bases de datos antes mencionadas y referencias bibliográficas. Donde se conectaron ambas rutas mediante metabolitos y enzimas. En algunos casos se propusieron nuevas aproximaciones teóricas de modelos metabólicos

3. Resultados

Se evaluaron 1.780 genes involucrados en rutas metabólicas centrales y secundarias. Se descargó de la base de datos de Systemonas genome DB un total de 5572 proteínas para *P. aeruginosa*, donde se determinó que 162 proteínas son únicas de esta especie.

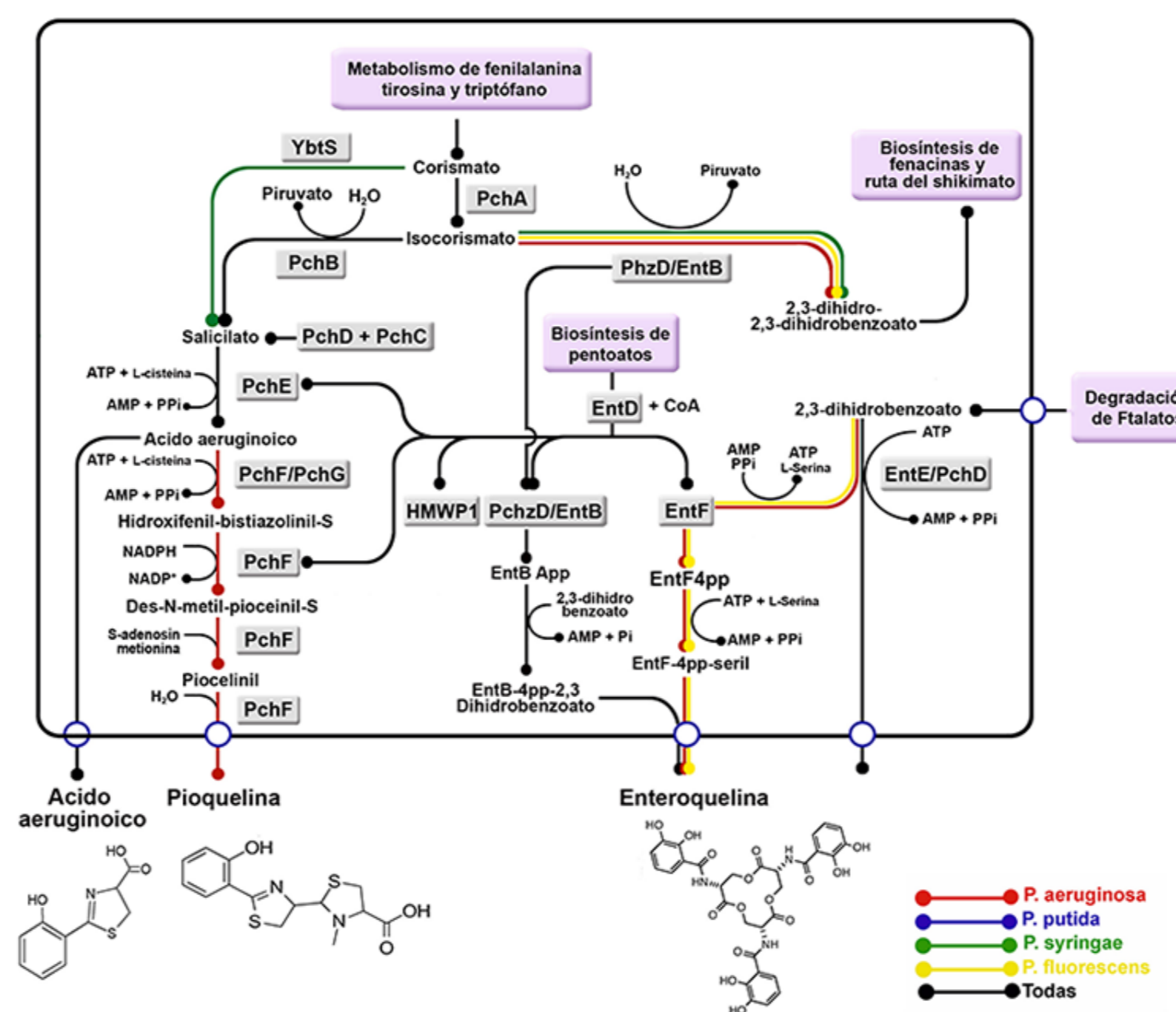


Figura 1: Síntesis de sideróforos.

Biosíntesis de Sideróforos: Los sideróforos son agentes quelantes que secuestran hierro férrico y los transportan al interior celular. Se encontró que las especies *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* poseen las enzimas involucradas en la biosíntesis de enterobactina, un sideróforo inicialmente caracterizado en enterobacterias. Asimismo, se encontró que todas las especies poseen los genes para la producción inicial del sideróforo Piocelina. Sin embargo, sólo *P. aeruginosa* posee el gen PchG que le permite el ensamblaje final de este compuesto (Figura 1). A pesar de ello, las demás bacterias tienen la posibilidad de producir ácido aeruginóico, que también es excretado y se cree que tiene propiedades de biocontrol [4]. Se ha determinado que los sideróforos juegan un papel fundamental en la virulencia de *P. aeruginosa*, pues además de permitir la captación de hierro y disminuir las concentraciones de este compuesto en el hospedador, también actúa como molécula de señal, desencadenando la producción de dos factores de virulencia extracelular, la proteasa PrpL y la exotoxina A [5]. En el caso de la piocelina, en infecciones crónicas, modula la respuesta inflamatoria y causa daño a los tejidos [2]

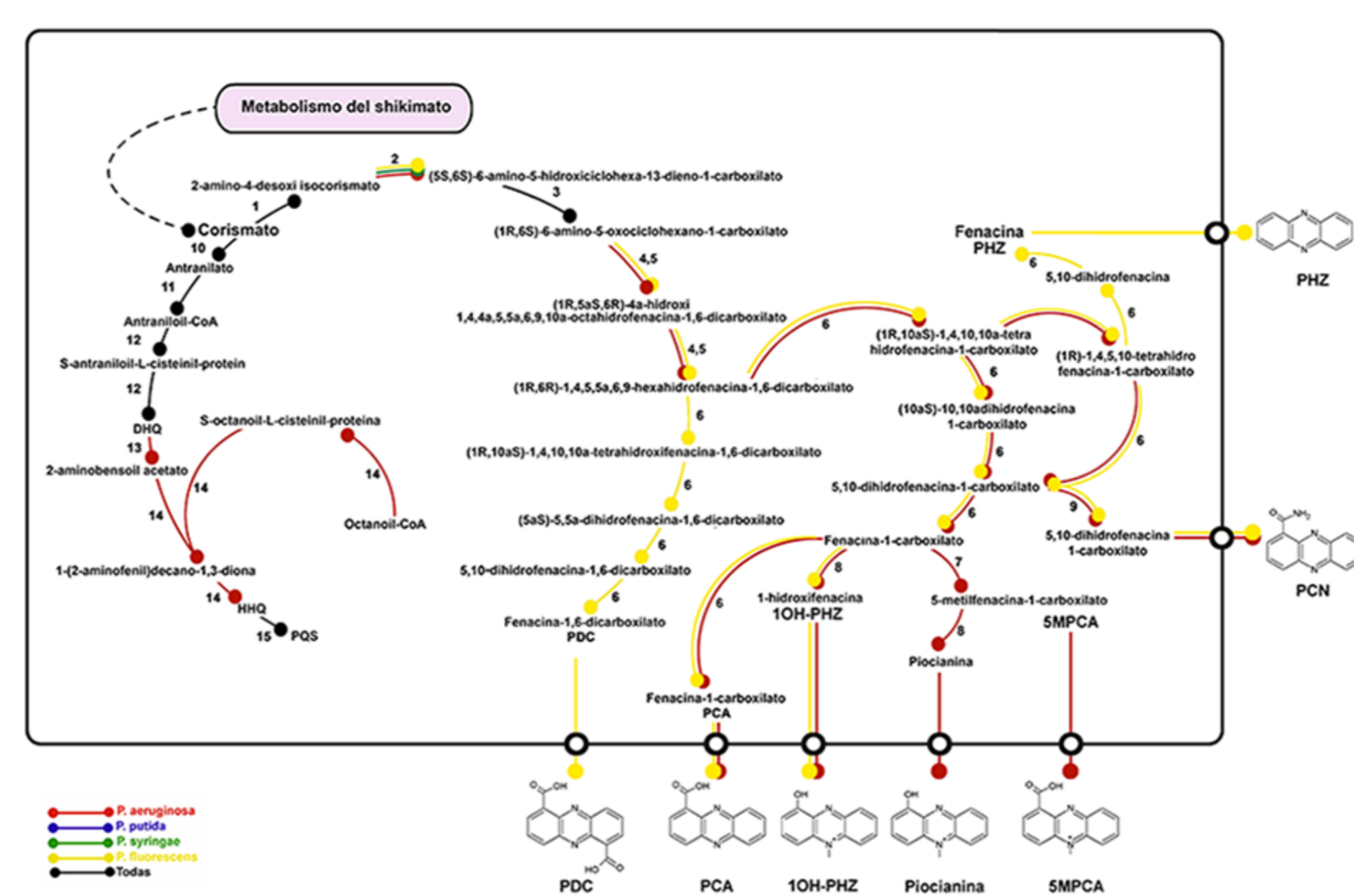


Figura 2: Síntesis de Fenacinas.

Biosíntesis de Fenacinas: Las fenacinas son compuestos heterocíclicos nitrogenados que tienen la capacidad de interferir en diversas funciones biológicas involucradas en la patogenicidad y competencia, que contribuyen al óptimo desarrollo de las especies con capacidad de sintetizar estos compuestos a partir de la ruta del Shikimate. *P. aeruginosa*, puede producir Piocianina (PYO), 5-metil-fenacina-1-carboxilato (5MPCA), fenacina-1-carboxilato (PCA) y 1-hidroxifenacina (1-OH-PHZ) (Figura 2). La enzima que produce PYO y 5MPCA, es exclusiva de esta especie, lo que lo hace muy interesante objeto de estudio, ya que se ha demostrado que PYO y 5MPCA, generan diversos efectos fisiopatológicos que alteran el sistema inmune, observado en las vías respiratorias infectadas por *P. aeruginosa* [6]. También se ha demostrado que la piocianina puede interactuar de forma sinérgica con el sideróforo piocelina y con la

transferrina, escindida por proteasas secretadas tanto por *P. aeruginosa* como por neutrófilos en pulmones infectados, para catalizar la formación del radical hidroxilo altamente citotóxico (OH), que daña el endotelio pulmonar [7].

Quórum Sensing y Biopelícula: El sistema *Quorum sensing* de *P. aeruginosa* es altamente complejo y está controlado por los sistemas de acil-homoserinalactona (AHL, que varían según el número de carbonos), sintetizadas (LasI-Las) y Rhil-RhIR- LasR, presente en otras especies de *Pseudomonas* y el sistema mediado por las señalización de quinolona único para esta especie, que produce a partir del corismato, los autoinductores 2-heptil-4-quinolona (HHQ) y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) [8], que también representan un excelente blanco de estudio en la virulencia de esta especie, debido a que se sabe que además este sistema regula la producción de sideróforos y fenacinas mencionadas anteriormente. Estos sistemas han sido el foco de esfuerzos para crear antagonistas de QS que podrían inhibir las infecciones producidas por *P. aeruginosa*. En esta investigación no sólo se evaluaron los genes y proteínas asociados a los factores de virulencia, también se analizó la producción de estos compuestos ligados al metabolismo central, de esta manera se pueden identificar blancos terapéuticos que inhiban solo los factores de virulencia y no que afecten el crecimiento y desarrollo de la especie. Esto resulta de gran importancia, debido a que *P. aeruginosa*, no sólo es una especie patógena, también posee características útiles para la biorremediación y biocontrol de patógenos en plantas convirtiendo a esta especie en un excelente microorganismo para el uso biotecnológico si se elimina su actividad patogénica.

4. Conclusión

Nuestro estudio indica que con el uso de ciencias ómicas, biología computacional y enfoques en biología de sistemas se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* posee tres rutas metabólicas con enzimas y proteínas únicas (fenacinas, sideróforos y Quórum sensing) que actúan como mecanismos de infección y virulencia, que representan un excelente blanco de estudio para controlar esta especie en pacientes con infecciones intrahospitalarias, fibrosis quística e inmunocomprometidos.

Referencias

- [1] Stover et al., (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964.2000
- [2] Lyczak et al., (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *MicrobesInfect.* 2: 1051–1060.
- [3] Hyde et al., (2013). Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism. *MolBiosyst.* 167–174. doi:10.1039/c2mb25453k
- [4] Serino, et al.,(1997) Biosynthesis of Pyochelin and Dihydroaeruginic Acid Requires the Iron-Regulated pchDCBA Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, p. 248–257 Vol. 179, No. 10021
- [5] Lamont, et al.,(2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. NatlAcadSci. Estados Unidos* . 99, 7072-7077. doi: 10.1073/pnas.092016999
- [6] Mavrodi, et al.,(2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 183(21):6454-6465.
- [7] Britigan, et al.,(1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect. Immun.* 65:1071–1076.
- [8] Whitehead, et al., (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS MicrobiolRev* 25:365-404.