



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

# **SIDERÓFOROS Y RECEPTORES ASOCIADOS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**Hernan Jover Martínez**

**Grado de Biología**

**Facultad de Ciencias**

**Año Académico 2020-21**

# **SIDERÓFOROS Y RECEPTORES ASOCIADOS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**Hernan Jover Martínez**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de las Illes Balears**

**Año Académico 2020-21**

Palabras clave del trabajo:

*Pseudomonas aeruginosa*, sideróforos, pioverdina, piochelina, FpvA, FptA, factores de virulencia

*Nombre Tutor/Tutora del Trabajo : Dr. Antonio Doménech Sánchez*

*Nombre Tutor/Tutora (si procede)*

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo polivalente capaz de colonizar gran variedad de ambientes. Todos los organismos vivos requieren de hierro para realizar todas sus funciones y *P. aeruginosa* cuenta con diversos mecanismos para captarlo. Uno de estos mecanismos son los denominados sideróforos, metabolitos capaces de quelar el hierro presente en el medio. Estos sideróforos son reconocidos e incorporados por la célula mediante receptores específicos denominados TBDRs (receptores dependientes de TomB). *P. aeruginosa* sintetiza 2 tipos de sideróforos, pioverdina (PVD) y piochelina (PCH). También expresa TBDRs específicos para cada sideróforo (FpvA/B y PtaA), además presenta la capacidad de expresar TBDRs capaces de reconocer e incorporar sideróforos de otros organismos. Estos compuestos y sus receptores juegan un papel importante en infecciones por *P. aeruginosa*, al actuar como factores de virulencia e inducir la expresión de otros.

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a polyvalent microorganism capable of colonizing a wide range of environments. All living organisms require iron to accomplish vital functions, *P. aeruginosa* possesses several mechanisms to obtain it. Siderophores are one of those mechanisms, metabolites that can chelate the environment's iron. Those siderophores are recognized and incorporated into the bacterial cell through a specific receptor called TBDRs (TonB dependent receptors). *P. aeruginosa* synthesizes 2 types of siderophore, pyoverdine (PVD) and pyochelin (PCH). Expresses specific TBDRs for each of the siderophores that can produce, it can also express TBDRs capable of recognizing and incorporating other organism's siderophores. Those metabolites and their receptors play an important role in *P. aeruginosa* infections, as they act as virulence factors and can induce the expression and production of more of them.

## Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Importancia del hierro.....	5
1.2. <i>Pseudomonas</i> .....	5
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
1.4. Sideróforos.....	6
1.5. Receptores asociados a sideróforos.....	8
2. Sideróforos endógenos primarios de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
2.1. Pioverdina (PVD).....	8
2.2. Clasificación PVDs de <i>P. aeruginosa</i> .....	9
2.3. Estructura específica y función de PVD de <i>P. aeruginosa</i> .....	10
2.4. Biosíntesis PVD.....	11
2.5. Secreción de PVD.....	14
2.6. Captación de hierro mediante PVD.....	14
2.7. Receptores asociados a PVDs.....	15
3. Sideróforo endógeno secundario de <i>P. aeruginosa</i> .....	18
3.1. Piochelina (PCH).....	18
3.2. Estructura de PCH.....	18
3.3. Biosíntesis de PCH.....	19
3.4. Secreción PCH.....	20
3.5. Captación de Hierro mediante PCH.....	20
3.6. Receptores asociados a PCH.....	20
4. Sideróforos exógenos.....	22
4.1. sideróforos bacterianos.....	22
4.2. Sideróforos fúngicos.....	23
5. Regulación de la expresión de sideróforos y sus receptores.....	23
5.1. Regulación de PVDs.....	23
5.2. Regulación de PCH.....	24
6. Factores de virulencia asociados a sideróforos.....	24
6.1. Factores de virulencia asociados a PVDs.....	24
6.2. Factores de virulencia asociados a PCH.....	25
7. Conclusiones.....	25
8. Metodología búsqueda bibliográfica.....	25
9. Bibliografía.....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo es estudiar la situación actual del conocimiento sobre los sideróforos expresados por *P. aeruginosa*, sus receptores y el papel de estos en la virulencia.

### 1.1. Importancia del hierro

El hierro es un elemento esencial para casi cualquier organismo, las bacterias no son la excepción a este hecho. Los valores de hierro necesarios en los sistemas biológicos se encuentran entre 0,4 y 4,0  $\mu\text{M}$  (Yamamoto & Shinoda, 1996). En los metabolismos bacterianos el hierro juega un papel importante en multitud de funciones al estar presente tanto en compuestos con FeS y grupos hemo (Cornelis, 2010). Este elemento está presente en la naturaleza en dos estados oxidativos que pueden fácilmente pasar de un estado al otro y viceversa, la forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}/\text{III}$ ), la cual presenta poca solubilidad para atravesar la membrana plasmática y la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}/\text{II}$ ) (Andrews et al., 2003; Johnstone & Nolan, 2015).

Las bacterias han desarrollado diversas estrategias para aumentar la solubilización de la forma férrica y así poder incorporar hierro a su metabolismo. Los principales métodos presentes en las bacterias son la incorporación de hierro mediante la reducción de la forma férrica a la forma ferrosa y su posterior transporte; la obtención de hierro a partir de compuestos del huésped en bacterias patógenas; y la incorporación de hierro mediante sideróforos (Cornelis, 2010; Krewulak & Vogel, 2008; Yamamoto & Shinoda, 1996).

Entre los mecanismos mencionados anteriormente, y uno de los temas centrales de esta revisión, están los sideróforos. Se trata de sustancias quelantes con gran afinidad por la forma férrica del hierro, las cuales son secretadas por gran variedad de organismos entre los cuales encontramos hongos, plantas y diversos grupos bacterianos Gram positivos como negativos (Johnstone & Nolan, 2015).

Un grupo de especial relevancia son las denominadas *Pseudomonas* fluorescentes, cuyo nombre viene dado por su capacidad de producir sideróforos fluorescentes denominados pioverdinas (Cornelis, 2010; Cornelis & Matthijs, 2002; Schalk et al., 2020).

### 1.2. Pseudomonas

El género *Pseudomonas* este compuesto por y proteobacteria Gram negativas conocidas por su gran versatilidad y adaptabilidad (Cornelis, 2010). Este género ha sido clasificado mediante dos criterios relevantes para el tema central de esta trabajo. (Cezard et al., 2014) :

Según si producen o no el pigmento fluorescente pioverdina:

- *Pseudomonas* fluorescentes: incluyen *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. plecoglossidica*, *P. simiae* y *P. syringa* entre otras.
- *Pseudomonas* no fluorescentes: como *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. fragi*, *P. mendocina*, *P. stutzeri* y *P. pseudoalcaligenes*.

La *Pseudomonas* fluorescentes a su vez se pueden dividir en dos grupos:

- Patógenos oportunistas en humanos :como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*
- Fitopatógenos: incluyen *P. syringae*, *P. viridi- flava* y *P. cichorii*.

### **1.3. Pseudomonas aeruginosa**

Fue aislada, por primera vez en 1882 por Carle Gessard, a partir de una herida infectada de un soldado, los vendajes de la cual habían adquirido colores azul y verde. (Moore et al., 2011)

*Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria bacilar Gram negativa aerobia facultativa con capacidad de crecer en anaerobiosis. Esta bacteria tiene la habilidad de utilizar más de 100 moléculas orgánicas como fuente de carbono y energía, lo que le confiere la capacidad de colonizar gran variedad de lugares. En situaciones de anaerobios es capaz de utilizar nitrato como aceptor final de electrones para realizar su respiración. Este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir en un amplio rango de temperaturas, pero su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en los 37 °C. Entre los lugares que es capaz de colonizar, encontramos diversos organismos donde reside como parte del microbiota comensal, entre ellos los humanos (Diggle & Whiteley, 2020).

En ciertos casos, como en personas inmunodeprimidas, *P. aeruginosa* puede actuar como patógeno oportunista y causar infecciones, siendo estas muy comunes en el ambiente hospitalario (Diggle & Whiteley, 2020). Una preocupación reciente es la aparición de cepas resistentes a gran número de antibióticos resultando en la cronificación de infecciones por dicho patógeno (K. Poole et al., 1993) .

Los sideróforos junto a otros sistemas de obtención de hierro mencionados anteriormente son un mecanismo de virulencia importante en infecciones de *P. aeruginosa*. (Cornelis & Dingemans, 2013)

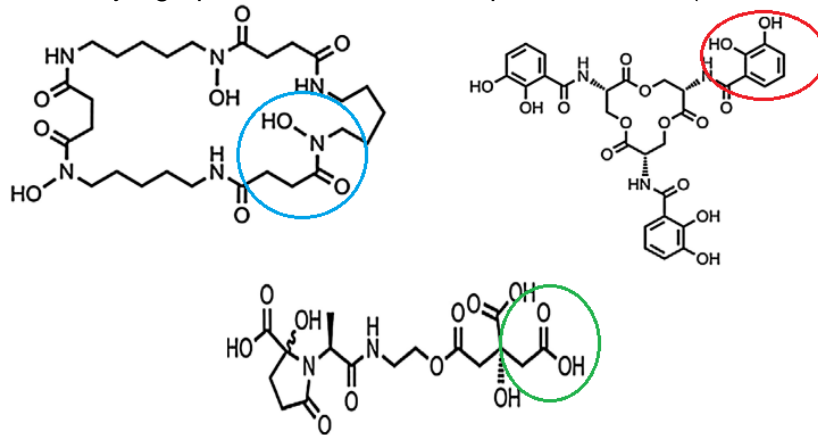
### **1.4. Sideróforos**

Estos compuestos quelantes tal como se ha especificado anteriormente son sintetizados por gran cantidad de organismos.

Según la naturaleza química del cromóforo son clasificados en las siguientes categorías (Figura 1) (Khan et al., 2018) :

- Sideróforos hidroxamatos : sideróforos hidrofílicos compuestos por alkyiaminas acetiladas o hidroxiladas, en hongos son los mismos compuestos basados en ornitina.
- Sideróforos de catecol: compuestos por grupos hidroxilo y catecol, el  $Fe^{3+}$  se adhiere al final de los anteriores grupos.
- Sideróforos carboxilatos : compuestos por grupos hidroxilos y carboxilos
- Existen organismos que sintetizan sideróforos de naturaleza mixta conteniendo grupos catecol y hidroxamato.

**Figura 1** :Estructura de los diferentes tipos de sideróforos según su naturaleza química. Azul: grupo hidroxamato; Rojo: grupo catecol; Verde: Grupo carboxilato. (Khan et al., 2018)



Por naturaleza química hacemos referencia a los grupos que interactúan con el hierro donando electrones para quelar el metal formando enlaces.

Según el organismo productor son clasificados en los siguientes grupos (Khan et al., 2018):

- Sideróforos fúngicos.
- Sideróforos bacterianos.
- Sideróforos cianobacterianos.
- Sideróforos de mamíferos.
- Sideróforos de plantas.

Los sideróforos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* son uno tipo principal, las pyoverdinas (PVD) y uno secundario, las piochelina. Se trata de compuestos quelantes con afinidad por hierro .El termino quelar, hace referencia a que estos compuestos secuestran el hierro (III) al donar 6 pares de electrones para formar enlaces con el ion en cuestión (Cezard et al., 2014; Ringel & Brüser, 2018).

Fueron descubiertas por C. Gessard en 1892, el cual las apodó “fluoresceínas” por sus cualidades fluorescentes. Su denominación actual de pioverdinas fue designada por A. Turfreiher (Moore et al., 2011; Ringel & Brüser, 2018).

Existen otros tipos con menor afinidad por el hierro denominados sideróforos secundarios . El ejemplo más estudiado de este tipo en *P. aeruginosa* es la piochelina (PCH) . El estudio de estos sideróforos secundarios resulta una tarea dificultosa al ser su producción enmascarada por la de PVD (Cornelis & Matthijs, 2002).

*P. aeruginosa* también tiene la capacidad de utilizar sideróforos sintetizados por otras especies de microorganismos, tal como *E. coli*. Son nombrados como sideróforos heterólogos, exosideróforos o xenosideróforos en la literatura existente (Cornelis, 2010; Cornelis & Dingemans, 2013;Poole & Mckay, 2003).

## **1.5. Receptores asociados a sideróforos**

Una vez el hierro del ambiente ha sido solubilizado por los sideróforos a formas solubles , estos han de ser incorporados por la célula . El primer paso de este proceso es llevado a cabo por unos receptores situados en la membrana exterior de la bacteria , estos son denominados receptores dependientes de TonB (TBDRs) . (Folschweiller et al., 2000)

Cada sideróforo cuenta con un receptor específico el cual reconoce y permite la entrada de los complejos férricos del mismo. Estos aparte de ser específicos para cada sideróforo lo son para cada especie de *Pseudomonas* (Cornelis & Matthijs, 2002; Youard et al., 2011).

Estos receptores funcionan también como transportadores, en conjunto con diversas proteínas presentes en el periplasma y la membrana, para incorporar el hierro en su citoplasma. Por esta razón se les conoce también como transportadores dependientes de TonB (Bonneau et al., 2020).

## **2. SIDERÓFORO ENDOGENO PRIMARIO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

### **2.1. Pioverdina (PVD)**

El término PVD, también nombrada como “pseudobactina” en ciertas cepas, no hace referencia a un solo tipo de sideróforo sino a un grupo de ellos (Ringel & Brüser, 2018; Visca et al., 2007).

Tal como se mencionó con anterioridad , se trata de pigmentos de coloración amarillo verdoso producido por todas las *Pseudomonas* fluorescentes y en grupos relacionados, como especies del género *Burkholderia* anteriormente clasificado dentro de *Pseudomonas*, que produce sideróforos que podrían ser clasificados dentro de este grupo (Poole & Mckay, 2003).

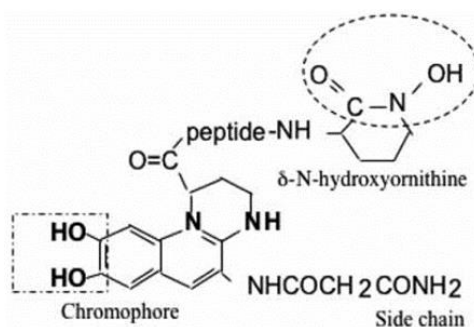
Dentro de la clasificación según la característica química expuesta en la introducción de esta revisión, las PVD pertenecerían a un grupo intermedio de sideróforos hidroxamatos y catecolato, al poseer ambos grupos (Ballouche et al., 2009; Khan et al., 2018).

La estructura que poseen en común, todos los sideróforos clasificados como PVDs, consta de 3 partes (Cezard et al., 2014; Visca et al., 2007) (Figura 2):

- Una parte altamente conservada y responsable por la fluorescencia del pigmento, compuesta por un cromóforo derivado de 2,3-diamino-6,7-dihydroxiquinolina . Este posee una alta afinidad por  $Fe^{3+}$  mediante el grupo catecol que posee.
- Un acilo como cadena lateral ( derivado de un ácido dicarboxílico) unida al grupo amino del cromóforo. Esta puede estar dependiendo de las condiciones de crecimiento en forma de succinato, amida, malato,  $\alpha$ -cetoglutarato o glutamato.
- Una cadena peptídica variable unida mediante un grupo amida al grupo carboxilo C1 (en ocasiones al C3) del cromóforo. Los aminoácidos que componen la cadena pueden tener quiralidad D o L y estándares o no estándares (proteogénicos o no proteogénicos). Esta parte del sideróforo puede tener una estructura cíclica o lineal e interactúa con  $Fe^{3+}$  mediante grupos hidroxamato y/o hidroxicarboxilato.



**Figura 2:** Estructura básica PVD. (Ballouche et al., 2009)



## 2.2. Clasificación PVDs de *P. aeruginosa*

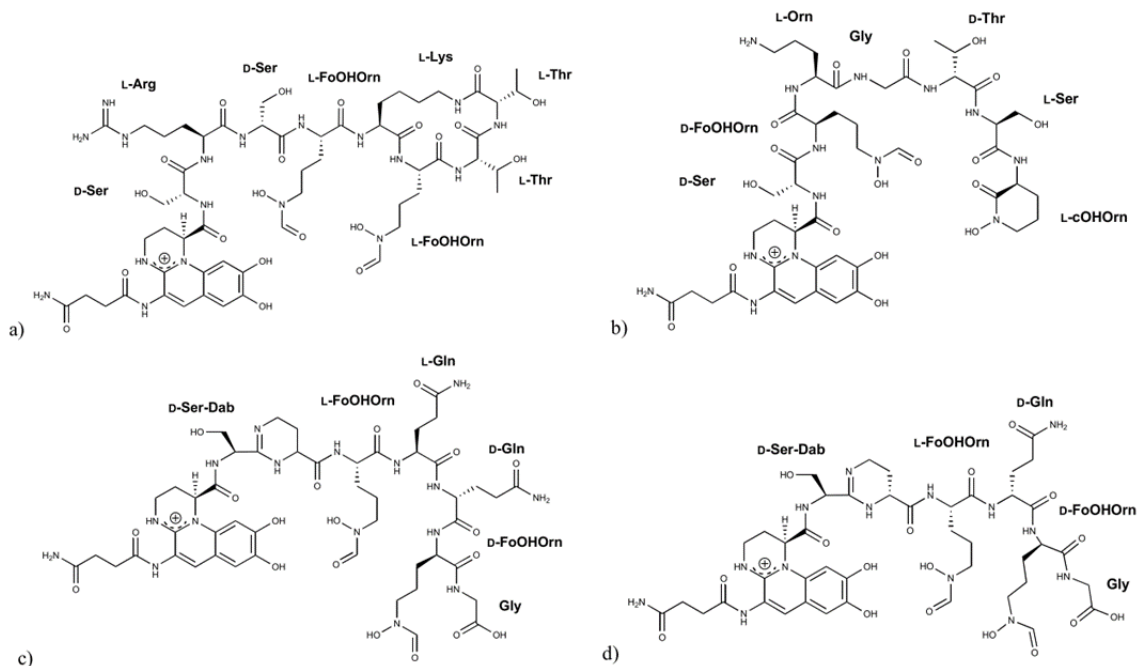
No existe un consenso a la hora de clasificar el gran número de PVDs diferentes en existencia. En el caso de *P. aeruginosa* se han propuesto diversos sistemas de clasificación de sus PVD, el primero de ellos en 1989 (Abdallah et al., 1989).

En el sistema propuesto en Abdallah et al., 1989 se dividieron las PVD en tres clases, correspondiendo a las tres estructuras diferentes que se habían identificado hasta entonces (Figura 3). La diferencia principal en dicha clasificación reside en la estructura de la cadena peptídica. Una cuarta clase fue añadida posteriormente (Ruangviriyachaia et al., 2001).

- Pioverdinas clase I (PVD I) : corresponde a la PVD con estructura igual o similar a la secretada por la cepa *P. aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1). Se caracteriza por poseer una parte peptídica cuyos últimos tres a cuatro aminoácidos forman un ciclo. Este ciclo es creado al producirse el enlace amida entre el grupo carbonilo terminal del aminoácido C-terminal y el grupo amino de un residuo de Lisina u Ornitina.
- Pioverdinas clase II (PVD II): corresponded a la PVD con estructura igual o similar a la secretada por la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 . Su cadena peptídica se caracteriza por ser una secuencia lineal que posee en su extremo C terminal el aminoácido N-hidroxiornitina.
- Pioverdinas clase III (PVD III): corresponde a la PVD con estructura igual o similar a la secretada por la cepa *P. aeruginosa* Pa6. Su cadena peptídica se caracteriza por ser una secuencia lineal que posee en su extremo C terminal el aminoácido N-hidoxiornitina.
- Pioverdinas clase IV (PVD IV): corresponded a la PVD con estructura igual o similar a la secretada por la cepa *P. aeruginosa* R' . Esta difiere de la estructura de la PVD III en que carece de un residuo de L-Gln.

A pesar de la existencia de diversos sistemas de clasificación de PVDs , el expuesto anteriormente es el utilizado con más frecuencia en la literatura existente. Cada una de las tres primeras clases de PVDs es reconocido por un receptor en específico (Cezard et al., 2014). Estos transportadores son denominados FpvAI, FpvAII, FpvAIII y FpvAIV (Schalk et al., 2020).

**Figura 3:** Estructura de diferentes clases de PVD. a) PVDI ; b) PVDII; c) PVDIII; d) PVDIV. (Cezard et al., 2014)

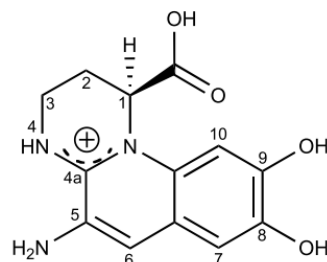


### 2.3. Estructura específica y función de PVD de *P. aeruginosa*

#### 2.3.1. Cromóforo

El cromóforo específico de todas las PVDs es el ácido (1S)-5-amino-2,3-dihidro-8,9-dihidroxi-1H-pirido-[1,2-a] quinolona-1-carboxílico. El grupo catecol mencionado con anterioridad, es uno de los tres sitios de unión del  $Fe^{3+}$ . Esta parte posee propiedades espectroscópicas al absorber en el espectro UV/Vis . Las propiedades fluorescentes que posee se manifiestan, a pH 6, al absorber a longitudes de onda de 360/380 nm y de emisión a 450 nm (Figura 4)(Cezard et al., 2014).

**Figura 4:** Estructura cromóforo. (Cezard et al., 2014)



#### 2.3.2. Cadena peptídica

Como previamente hemos comentado, se trata de un componente que posee una estructura específica para cada clase. Esta parte aporta dos lugares de unión a  $Fe^{3+}$ , mediante grupos hydroxymato y  $\alpha$ -hidroxicarboxilato, pudiendo estar presentes ambos a la vez o uno solo (Cezard et al., 2014).

PVDI	X – DSer – Arg – DSer – FoOHOrn – [ Lys – FoOHOrn – Thr – Thr ]
PVDII	X – DSer – DFoOHOrn – Orn – Gly – DThr – Ser – cOHOrn
PVDIII	X – (DSer-Dab) – FoOHOrn – Gln – DGLn – DFoOHOrn – Gly
PVDIV	X – (DSer-Dab) – FoOHOrn – Gln – DGLn – DFoOHOrn

**Tabla1** : secuencia peptídica de las diferentes clases de PVDs de *P. aeruginosa*. Acido  $\beta$ -hidroxi-Asp,  $\beta$ -hidroxi-His, 2,4-diaminobutirico (Dab), ornitina (Orn), ciclo-N-hidroxi-Orn (cOrn), N-formil-N-hidroxi-Orn (FoOHOrn), N-acetil-N-hidroxi-Orn (AcOHOrn) and N-hidroxibutiril-N-hidroxi-Orn. Adaptado de (Cezard et al., 2014).

### **2.3.3. Cadena dicarboxílica**

Las PVD contienen una cadena lateral variable pudiendo ser: succinamida, acido succínico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, malamida o acido málico. La función de esta cadena es la de estabilizar la PVD según el medio en el que se encuentre (Cezard et al., 2014; Schalk et al., 2020).

## **2.4. Biosíntesis pioverdina**

La mayoría del conocimiento sobre la síntesis biológica de PVD y PCH se basa evidencia genética existente, mediante el estudio de la expresión de los genes que codifican las enzimas involucradas en el proceso (Ochsner et al., 2002).

Dicha síntesis en el caso de las pioverdinas, es un proceso que requiere de diversos pasos. El ejemplo más estudiado es el de la biosíntesis de la PVDI propia de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (Cezard et al., 2014; Schalk & Guillon, 2013).

Esta misma evidencia genética indica que el mecanismo de biosíntesis en otras cepas debe ser análogo al de PVDI, debido a este hecho utilizaremos PVDI como ejemplo para explicar este fenómeno.

### **2.4.1. Maquinaria implicada**

La síntesis de PVD implica la acción coordinada de varias enzimas incluidas cuatro enzimas de síntesis de péptidos no ribosomales (NRPS), tres que generan aminoácidos atípicos presentes en la parte peptídica del sideróforo y varias enzimas involucradas en la maduración del sideróforo en el periplasma bacteriano antes de su secreción (Schalk et al., 2020).

Los NRPS son enzimas de gran tamaño (1000 aminoácidos) con una arquitectura multimodular, cada módulo se responsabiliza de la incorporación de un aminoácido o sustrato específico al péptido producto al cataliza la formación del enlace peptídico entre ellos. Son responsables de sintetizar la base, consistente en el futuro el cromóforo y la porción peptídica, del precursor citoplasmático del sideróforo (Schalk & Guillon, 2013). También son conocidos como sintetasa de péptidos ya que algunos de los que sintetizan son poco comunes y los ribosomas son incapaces de sintetizarlos (Visca et al., 2007).

Los principales NRPS identificados en la mayoría de *Pseudomonas* son PvdL, PvdI, PvdJ y PvdD, entre ellas PvdL se ha hallado que es único NRPS conservado en la mayoría de cepas

de *Pseudomonas* (Cezard et al., 2014). Estas enzimas están compuestas por de 2 a 4 módulos denominados M1 a M4 (Figura 4). Otras enzimas implicadas en la biosíntesis de PVDI son PvdA, PvdF y PvdH, cuya función es catalizar la síntesis de los aminoácidos, específicos de la cepa, de la cadena peptídica. Dicha síntesis se da del extremo N-Terminal al C-terminal (Bonneau et al., 2020; Schalk & Guillon, 2013; Visca et al., 2007).

Los módulos suelen contener tres dominios: un dominio de adenilación (A), un dominio de condensación (C) y un dominio de proteína portadora de péptidos (PCP). El funcionamiento del módulo es el siguiente:

- El dominio A reconoce un aminoácido específico y activa el ácido mediante una adenilación dependiente de ATP. A continuación, el ácido se transfiere a un tiol libre de un cofactor de fosfopanteteína unido covalentemente del dominio PCP adyacente mediante tioesterificación para formar un intermediario del dominio acilo-S-PCP. El dominio PCP también es conocido en la literatura existente como dominio de tiolación (T) por la función que cumple. Finalmente, el dominio C cataliza la condensación entre los sustratos tioesterificados de PCP superior e inferior, formando el enlace peptídico entre los dos aminoácidos. A parte de los dominios ya mencionados algunos módulos poseen un cuarto tipo cuya función es isomerizar, denominado dominio de epimerización (E) (Schalk et al., 2020; Visca et al., 2007).

Los enzimas PvdA, PvdF y PvdH se encargan de sintetizar aminoácidos “raros” a partir de modificaciones de otros. PvdH, una aminotransferasa se encarga de generar L-Dab (L-2,4-diaminobutirato) a partir de L-aspartato  $\beta$ -semialdehído (L-ASA). PvdA y PvdF sintetizan L-fOHOrn ( $N^5$ -formil- $N^5$ -hidroxiornitina) a partir de L-ornitina (L-fOrn) mediante una hidroxilación y formilación catalizada por los dos enzimas respectivamente (Schalk & Guillon, 2013).

#### **2.4.2. Biosíntesis citoplasmática**

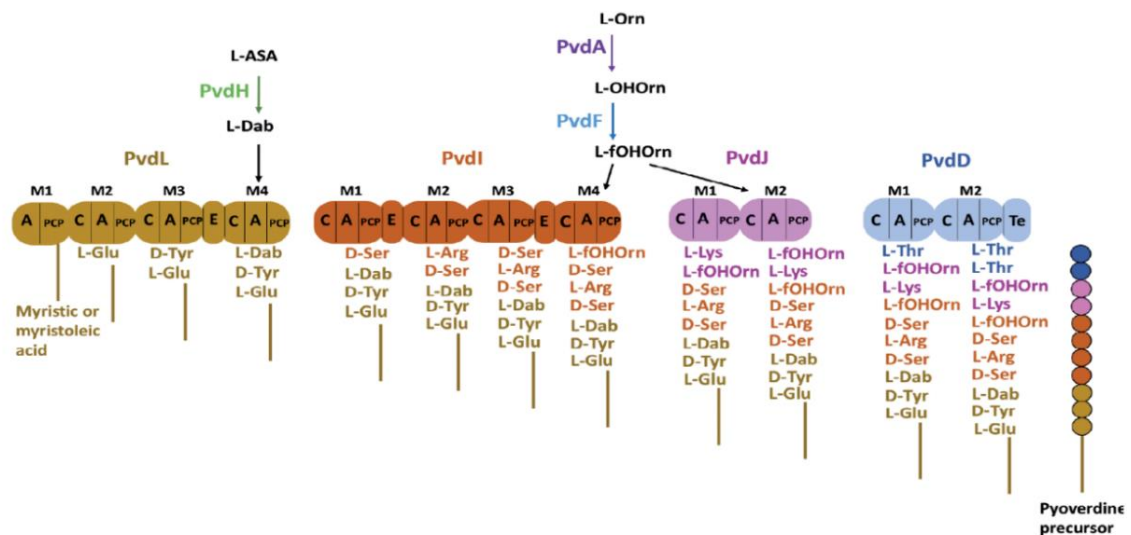
La biosíntesis de PVDI mediante NRPS se da en el citoplasma. El primer NRPS en actuar es PvdL, se está compuesto por 4 módulos. El primer módulo, el cual actúa de manera similar acyl coenzima A ligasa, une ácido graso miristato con coenzima A para dar lugar a una cadena de ácido mirístico o miristoleico (Visca et al., 2007). El mismo modulo cataliza la incorporación del ácido formado en el paso anterior al siguiente modulo donde se halla L-Glutamato (L-Glu). Los dos siguientes módulos añaden a L-Glu los aminoácidos, L-Tirosina(L-Tyr) y L-Dab (L-2,4-diaminobutirato) respectivamente, el tercero añade L-Tyr y lo isomeriza a su forma dextrógira (D-Tyr). Estos dos aminoácidos serán condensados en un anillo de tetrahidropirimidina, que será el precursor del cromóforo de dihidroxiquinolina (Schalk et al., 2020; Schalk & Guillon, 2013; Visca et al., 2007).

El segundo NRPS en actuar será PvdI, el cual este compuesto por 4 módulos. Su función principal es la de añadir los aminoácidos D-Ser, L-Arg, D-Ser y L-hfOrn al péptido generado por PvdL. D-Ser se genera a partir de una L-Ser que sufre una isomerización catalizada por el módulo de epimerización. L-hfOrn es modificada, como fue mencionado con anterioridad, a L-fOHOrn por PvdA y PvdF.

Finalmente, PvdJ y PvdD, los cuales cuentan con 2 modulos cada uno, se encargan de añadir los aminoácidos L-Lisina (L-Lys) y L-hfOrn y dos L-Treonina (L-Thr) respectivamente. El ultimo módulo de PvdD contiene un módulo tioesterasa que cataliza la hidrolisis para separar el péptido generado del NRPS, dando así por finalizada la síntesis del precursor citoplasmático de la PVDI. El compuesto resultante de este proceso también conocido como precursor citoplasmático de PVDI (Cezard et al., 2014; Schalk et al., 2020).

Al finalizar los procesos explicados, el producto obtenido ha de ser exportado al periplasma donde se darán las modificaciones finales necesarias al sideróforo. La exportación se realiza mediante un transportador ABC denominado PvdE (Cezard et al., 2014).

**Figura 4:** NRPS implicados en la síntesis de PVD, resaltando los módulos que los forman. (Schalk et al., 2020)



### 2.4.3. Biosíntesis periplasmática

El precursor creado en el citoplasma carece de fluorescencia ya que el cromóforo no está del todo formado. Para obtener el cromóforo, el producto generado en el citoplasma sufrirá una serie de procesos de maduración en el periplasma en los cuales están implicadas las siguientes enzimas: PvdQ, PvdP, PvdO, PvdN and PtaA (Cezard et al., 2014; Schalk et al., 2020; Schalk & Guillon, 2013).

El primero de los enzimas en actuar, PvdQ se encarga de eliminar el ácido mirístico o miristoleico mediante una deacetilación. El producto resultante es un precursor denominado ferrobactina (Schalk et al., 2020; Schalk & Guillon, 2013).

La segunda modificación es realizada al entrar la ferrobactina en una cascada de ciclación oxidativa que causa la ciclación de L-Dab y D-Tyr para formar el cromóforo. Esta modificación es catalizada por PvdP, una tirosina quinasa, y se da en diversos pasos los cuales. Los pasos para transformar ferrobactina en dihidropioverdina son (Nadal-Jimenez et al., 2014; Schalk et al., 2020):

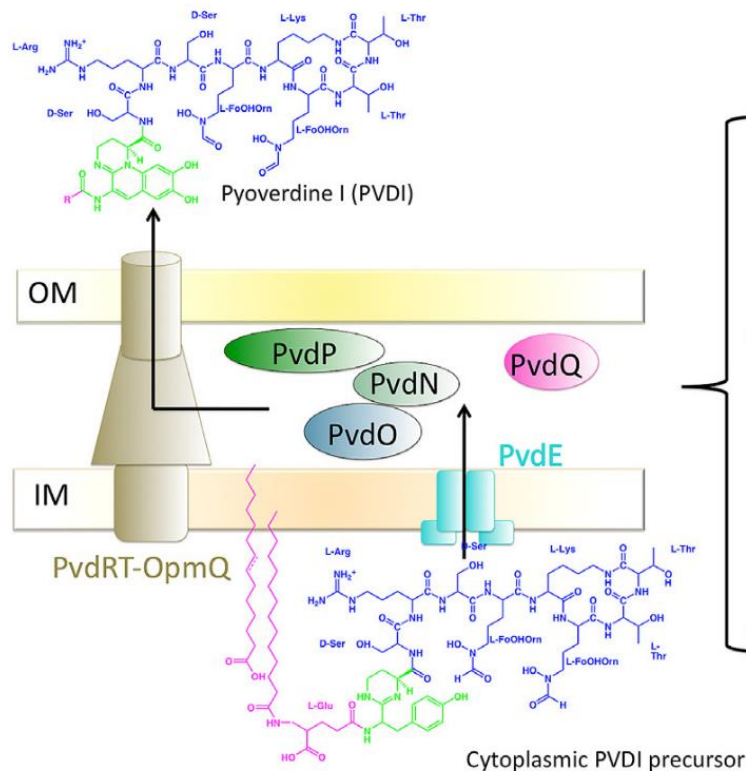
- Hidroxilación del residuo D-Tyr del anillo de tetrahydropirimidina, para formar el grupo funcional catecolato.
- Formación de tercer anillo del cromóforo.
- Restauración de la funcionalidad del grupo catecol.

La siguiente enzima en actuar, PvdO, se encarga de oxidar la dihidropioverdina a PVDI. La función de esta enzima se descubrió por experimentos realizados *Pseudomonas fluorescens* A506 que también presenta dicha enzima en la síntesis de su PVD (Ringel et al., 2018).

L-Glu de la cadena peptídica también sufre una variedad de modificaciones, pudiendo ser transformada en succinamida, ácido succínico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, malamida y ácido málico

entre otros. Todos estos compuestos son intermediarios del ciclo de Krebs, cuya función se cree es la de adaptar la PVDI a las condiciones del ambiente, dando lugar diferentes isoformas de PVDI. Estas transformaciones son catalizadas por PvdN o PtaA, siendo ambas enzimas transaminasas dependientes de fosfato de piridoxal, las cuales se cree transforman L-Glu en derivados de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y succinamida respectivamente (Schalk et al., 2020).

**Figura 5:** Proteínas implicadas en la maduración periplásmica y exportación de PVDI. (Schalk & Guillon, 2013)



## 2.5. Secreción de PVDI

Una vez PVDI se ha formado puede ser almacenado en el periplasma o ser secretado al exterior. Este proceso es llevado a cabo por un transportador denominado bomba de flujo PvdRT-OpmQ. Dicha bomba está compuesta por una proteína situada en la membrana interna (PvdT), una proteína adaptadora periplásmica (PvdR) y una porina con estructura de barril beta insertado en la membrana externa (OpmQ) (Schalk et al., 2020; Schalk & Guillon, 2013).

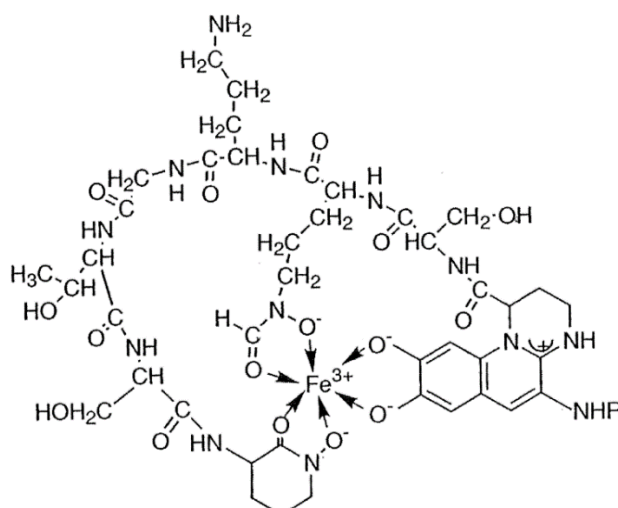
Mecanismos alternativos para la secreción de sideróforos existen en cepas de otras especies de *Pseudomonas*, por lo cual se sospecha que también pueden estar presentes en *P. aeruginosa* (Schalk & Guillon, 2013).

## 2.6. Captación de hierro mediante PVD

Las PVDs poseen una alta afinidad por hierro(III), esta viene causada por la alta densidad de carga, pequeño radio y baja polaridad que posee el ion hierro haciendo que pueda considerarse como un ácido duro de Lewis, los cuales se unen fuertemente a bases duras como los iones óxido. El hierro (III) al ser un ion metálico con una configuración electrónica  $d^5$ , prefiere una configuración electrónica con número de coordinación 6. Esto indica que el átomo central en este caso el hierro necesita 12 electrones dados por otros compuestos para

completar el orbital  $p^6$ . Los electrones necesarios son dados por residuos bidentados (pueden dar 2 electrones cada uno), siendo estos átomos de oxígeno del cromóforo y de dos residuos de derivados de ornitina (L-FoHOrn en caso de PVDI). Las PVD quelan hierro férrico con estequiometría 1:1 al unirse al hierro de manera hexacoordinada (6 pares de electrones dados por PVD/ ion Hierro(III)) adoptando una geometría octaédrica (Figura 6) (Cezard et al., 2014; Del Olmo et al., 2003).

**Figura 6:** Unión de PVD a hierro(III). (Del Olmo et al., 2003)



A parte de hierro las PVDs son capaces de quelar otros metales tales como  $Ag^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , aunque poseen una afinidad más alta por iones hierro (Braud et al., 2009).

## 2.7. Receptores asociados a PVDs

### 2.7.1. Receptores FpvA y FpvB

Como se ha explicado con anterioridad, cada PVD tiene asociado un receptor específico. Estos receptores actúan como porinas que reconocen e introducen el complejo PVD-Fe al interior de la célula. Este proceso requiere de energía, por lo que los receptores actúan en conjunto con proteínas TonB que aportan la energía necesaria (Bonneau et al., 2020).

Existen dos tipos de transportadores para el sideróforo PVD, FpvA y FpvB, siendo el primero el tipo más estudiado y caracterizado conociéndose su estructura en profundidad (Braud et al., 2009). En el caso de FpvA se conocen 3 subtipos correspondientes a las PVDs I-III, siendo el primer de ellos el más investigado (Cezard et al., 2014).

La presencia del receptor FpvB fue reportada en Ghysels et al., 2004. La estructura de este receptor aún no está caracterizada, se cree que es similar a la presentada por FpvA y que está implicada en la captación de otros compuestos como pirocianina (Ghysels et al., 2004).

A parte de funcionar como transportadores del complejo PVD-Fe, también están involucrados en transducción de señales que afectan a la regulación de la expresión de PVD y su receptor (Schalk et al., 2009)

### 2.7.2. Estructura de FpvA

La estructura básica de FpvA, está constituida por 4 dominios (Cezard et al., 2014; Schalk et al., 2009):

- Un dominio barril beta ( $\beta$ ), compuesto por 600 aminoácidos repartidos en 22 láminas  $\beta$  antiparalelas, con 11 anillos extracelulares que las unen.
- Un dominio globular N terminal denominado “tapón”, compuesto por 150 residuos organizados en 4 láminas que obstruyen el poro que forma el barril  $\beta$ . Se trata de un dominio altamente móvil y se encuentra implicado en las rutas de señalización mediante PVD.
- Una secuencia señal compuesta por unos 90 aminoácidos localizada en el espacio periplásmico, que recorre del extremo N-terminal al C-terminal y que está formada por dos hélices  $\alpha$  rodeadas por dos laminas  $\beta$ .
- La caja TonB, una secuencia de aminoácidos localizados en el dominio N-terminal del “tapón”. Su función es interactuar con las proteínas de TonB. Es únicamente visible cuando FpvA-apo (receptor sin PVD unida) está en forma cristalizada.

### **2.7.3. Transporte de PVD-Fe mediado por receptor FpvA**

La célula utiliza este mecanismo de transporte para incorporar PVD (Denominado Apo-PVD) solamente o cargada con hierro ( PVD-Fe) o alguno de los metales que pueden ser quelados por esta (Cezard et al., 2014).

El proceso de importación de PVD-Fe empieza en la porción extracelular de FpvA, se trata de una zona compuesta en su mayoría de aminoácidos aromáticos de los dominios barril y tapón (Schalk et al., 2009).

El reconocimiento por parte de FpvA de la PVD depende de diversos factores (Cezard et al., 2014):

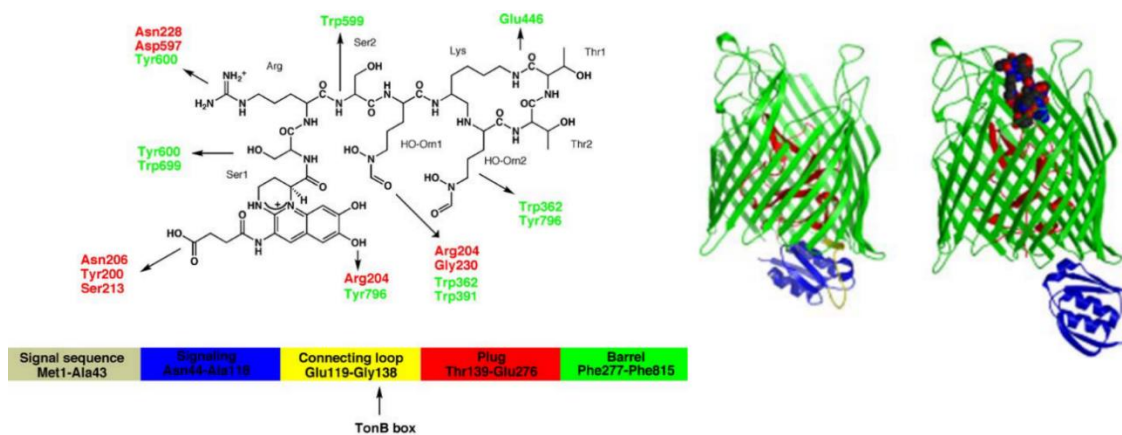
- El sideróforo en sí, refiriendo a si es una PVD u otro tipo diferente
- La geometría y quiralidad de la estructura central.
- La geometría y quiralidad del centro metálico.
- La naturaleza y longitud de la cadena lateral.

En situación de limitación de hierro, el receptor se encuentra cargado con apo-PVD. Para cargar PVD-Fe es necesario desplazar la apo-PVD. El complejo PVD-Fe se une al dominio tapón a través del cromóforo. Los residuos de Ser y Arg de la cadena peptídica se doblan rodeando el cromóforo, mientras que el resto del péptido se dobla sobre este. La cadena peptídica, que como se ha especificado varias veces determina la especificidad de la PVD, interactúa con el dominio del barril  $\beta$  y los aros extracelulares (Bouvier et al., 2015; Schalk et al., 2009).

La entrada de PVD-Fe está controlada aparentemente mediante un mecanismo con 2 “puertas”, la primera siendo los anillos extracelulares del barril  $\beta$  y la segunda el dominio “tapón”. Una vez se ha cargado la PVD-Fe a importar se ha atravesado la primera puerta. Para abrir la segunda, es necesario un aporte energético. FpvA sufre una serie de cambios, sobre todo en la zona N terminal, para permitir la interacción entre la TonB box con TonB del complejo TonB-ExbB-ExbD, situado en la membrana interior, el cual será el encargado de realizar dicho aporte de energía. La energía liberada causa un cambio conformacional en el dominio tapón que permite el paso a del complejo PVD-Fe al espacio periplasmático (Cezard et al., 2014; Schalk et al., 2009).



El mismo mecanismo utilizado para importar PVD-Fe , puede ser usado para importar PVD sin utilizar para su reciclaje y posterior secreción (Bonneau et al., 2020).



**Figura 7** : lugares de unión de PVD al receptor FpvA y estructura 3D de estos. Verde: barril beta; Rojo: dominio tapón; Azul: secuencia señal. (Schalk et al., 2009)

#### 2.7.4. Importación del hierro al citoplasma por vía PVDs

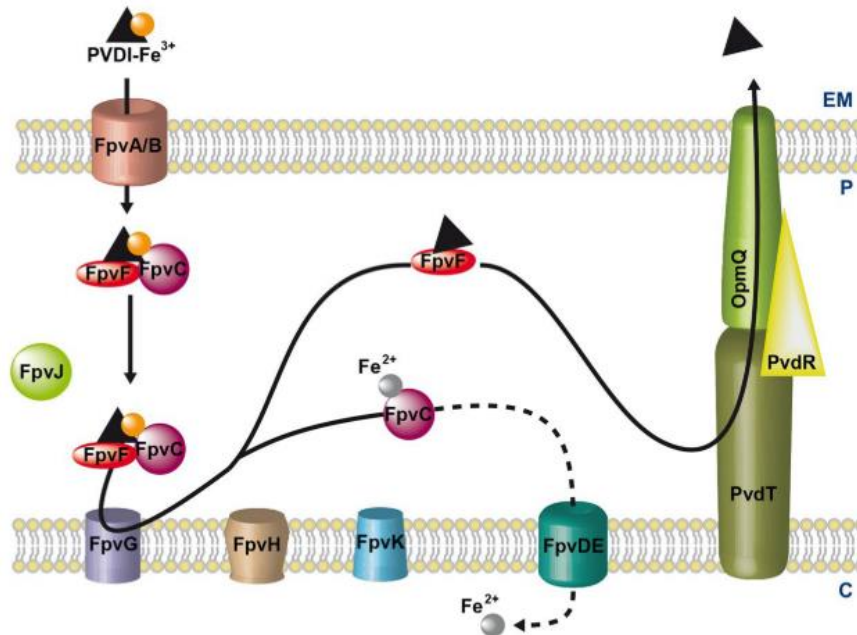
La liberación del hierro de PVD se da en el periplasma , en este proceso están implicadas diversas proteínas periplasmáticas (Fpv G/H/J/K/C/DE/F) (Bonneau et al., 2020) .

Una vez el complejo PVD-Fe se localiza en el espacio periplasmático, se le unen las proteínas FpvC y FpvF. La proteína FpvG localizada en la membrana interna, posee actividad reductasa actuando sobre el hierro(III) reduciéndolo a hierro(II), permitiendo así liberación de este de PVD. FpvC posee capacidad de captar el hierro(II) por su capacidad quelante y lo transporta hasta FpvDE, un transportador ABC, para ser importada al citoplasma (Bonneau et al., 2020; Ganne et al., 2017).

La proteína FpvF capta la PVD y la transporta hasta la bomba de eflujo PvdRT-OpmQ (Figura 8), para volver a ser secretada al exterior. También puede captar la apo-PVD incorporada para su reutilización. Se trata de un mecanismo de reciclaje de PVD (Bonneau et al., 2020).

El papel de diversas proteínas implicadas en el proceso, como FpvJ, aún no se conoce con exactitud (Bonneau et al., 2020).

**Figura 8:** Proteínas implicadas en la importación de hierro al citoplasma mediante PVD. (Bonneau et al., 2020)



### 3. SIDERÓFORO ENDOGENO SECUNDARIO DE *P. AERUGINOSA*

#### 3.1. Piochelina (PCH)

Por su menor afinidad por el hierro se clasifica como sideróforo secundario y es secretado por todas las cepas de *P. aeruginosa* (Schalk et al., 2020).

A pesar de la denominación de secundario, está demostrado que PCH, por su menor complejidad y menor número de genes involucrados en su síntesis, es el sideróforo que se produce primero cuando se requiere hierro. PVDs se secretan en condiciones donde los niveles de hierro son muy bajos (Cornelis & Dingemans, 2013).

Fue aislada por primera vez en 1970 a partir de un cultivo de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (Cox & Graham, 1979). Se trata de un sideróforo poco soluble en agua, con afinidad para hierro férrico inferior a PVD. También tiene la capacidad de unirse a otros metales como Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mo<sup>6+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Tl<sup>+</sup>, y Zn<sup>2+</sup>, estando implicada en la obtención de Co<sup>2+</sup> y Mo<sup>6+</sup> (Poole & Mckay, 2003; Youard et al., 2011).

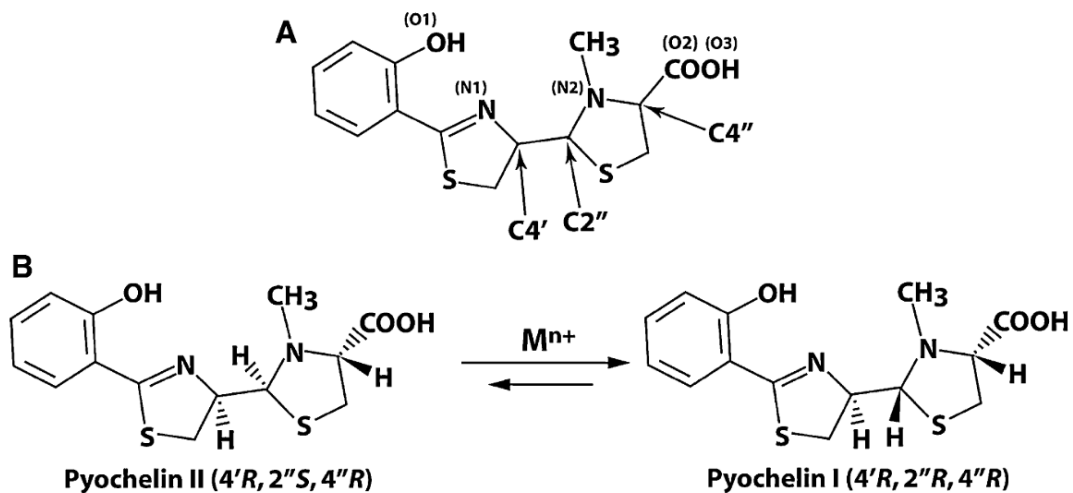
Solo se conoce una clase de PCH secretada por *P. aeruginosa*, cuya estructura química fue determinada como ácido 2-(2-o-hidroxifenil-2-thiazolin-4-il)-3-metilthiazolidina-4-carboxílico. Dentro de la clasificación expuesta según sus características químicas, PCH corresponde al grupo de sideróforos carboxilatos. PCH se une a hierro tanto con estequiometría 2:1, como con 1:1 (Youard et al., 2011).

#### 3.2. Estructura de PCH

PCH se forma a partir de un salicilato y dos moléculas cisteínas cicladas modificadas. Se trata de un compuesto con 3 centros quirales que es extraído de la cepa PAO1 en forma de una mezcla de dos diastereoisómeros interconvertibles entre ellos. La configuración de cada uno ha sido determinada como 4'R, 2''R, 4''R (PCH I) y 4'R, 2''S, 4''R (PCH II). La forma PCH II es

adquirida al unirse a  $\text{Fe}^{3+}$ , ya que esto provoca un cambio de configuración en  $\text{C2}''$  de S a R (Youard et al., 2011).

**Figura 10:** Estructura PCH y sus diastereoisómeros PCH I y PCH II . (Youard et al., 2011)



### 3.3. Biosíntesis de PCH

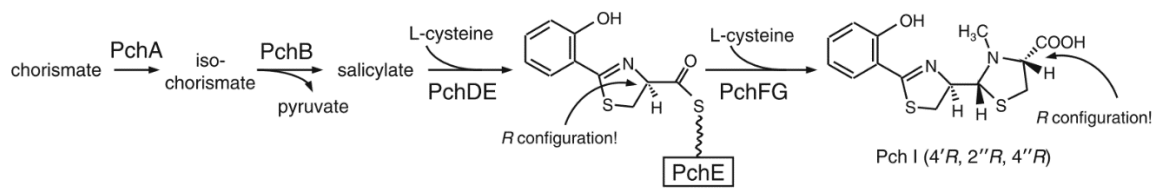
PCH deriva de la unión de 3 precursores: una molécula de salicilato, un hidroxiácido y dos moléculas de cisteína. Igual que las PVDs, la síntesis de esta catalizada por diversos NRPS (Ronnebaum & Lamb, 2018).

La biosíntesis es iniciada por las enzimas auxiliares PchA y PchB, que generan el hidroxiácido, salicilato. PchA convierte el corismato en isocorismato mediante su actividad isocorismato sintasa y PchB separa el isocorismato en salicilato y piruvato mediante su actividad isocorismato-piruvato liasa. El salicilato y la L-cisteína(L-cys) son activado por PchD y PchE mediante una adenilación. A continuación, ambos precursores son cargados en PchE mediante un enlace tioester gracias a dos fosfo-panteteinilo que actúa como grupos prostéticos. PchE cataliza las reacciones de condensación y ciclación generando hidroxifenil-tiazolina como intermediario. La misma PchE cataliza la epimerización de la L-cys a D-Cys. Una segunda L-cys es activada mediante una adenilación por PchF, para luego ser condensada por esta misma enzima con el intermediario del paso anterior y formar un segundo anillo thiazolin.

Para finalizar el proceso de síntesis, PCH sufre dos modificaciones. Una de ellas es una reducción catalizada por PchG, generando un anillo tiazolina. La otra modificación final es una N-metilación del anillo de tiazolina causada por PchF. Finalmente se da una hidrólisis para liberar la PCH (Ronnebaum & Lamb, 2018; Youard et al., 2011).

Se cree que este proceso no se da por todo el citoplasma sino en zonas concretas, asociadas a la membrana interna localizadas en los polos de la bacteria (Cunrath et al., 2015).

**Figura 10:** Ruta biosíntesis PCH. (Youard et al., 2011)



### 3.4. Secreción PCH

Los genes *pchH* y *pchI* codifican para transportadores ABC que pueden estar involucrados en la exportación de PCH. En mutantes que no expresan dichos genes la secreción de PCH no es interrumpida, por lo tanto debe existir otros métodos de exportación de PCH que por el momento se desconocen (Poole & McKay, 2003; Youard et al., 2011).

### 3.5. Captación de Hierro mediante PCH

El mecanismo y estructura de la forma natural de la unión de Hierro con PCH no es del todo conocida. Actualmente se han reportado dos modelos de unión de PCH con hierro(III). El primero de ellos lo denominamos PCH-Fe 2:1 y el segundo PCH-Fe 1:1.

En el modelo PCH-Fe 2:1, cuatro de los seis lugares de coordinación octaédricos (similar al formado en PVD) del hierro(III) están ocupados por el fenolato y el oxígeno carboxilato (O1 y O3, respectivamente) y por los dos átomos de nitrógeno N1 y N2 de la primera molécula de PCH. Los dos sitios de coordinación restantes pueden acomodar O1 y N1 o N2 y O3 de la segunda molécula de Pch (Youard et al., 2011).

En el modelo 1:1 PCH-Fe, los mismos cuatro primeros lugares de coordinación son ocupados por la PVD con los dos restantes siendo ocupados por otras moléculas. En caso de encontrarse en el espacio extracelular estas moléculas son agua o hidróxidos (Tseng et al., 2006).

Según Tseng et al., 2006, la forma que probablemente sería predominante en condiciones normales sería 1:1 ya que para que se dé la unión 2:1 requeriría grandes concentraciones de PCH (Tseng et al., 2006).

### 3.6. Receptores asociados a PCH

Al igual que PVD, PCH posee unos receptores específicos que la reconocen y transportan al interior celular. En este caso se trata del transportador, dependiente de TonB, FptA. Este se encuentra repartido por toda la superficie de la célula (Cunrath et al., 2015; Youard et al., 2011).

Este receptor también actúa como transductor para diversas señales, entre ellas las necesarias para inducir la expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en la síntesis y regulación de PCH y receptor (Cunrath et al., 2015).

#### 3.6.1. Estructura de FptA

FptA corresponde al mismo tipo de receptor que FpvA y FpvB, por lo cual posee una estructura similar a estos. Dicha estructura está formada por dos dominios (Manzoor et al., 2021):

- Un dominio C terminal que está formado por un barril  $\beta$  constituido de 22 láminas  $\beta$  unidas entre ellas por anillos extracelulares.
- Un dominio N terminal formado por una mezcla de cuatro laminas  $\beta$ , dos hélices  $\alpha$  y dos laminas  $\beta$ , dobladas de forma que bloquean el poro formado por el barril. Este dominio recibe el nombre de “tapón”

### 3.6.2. Transporte de PVD-Fe mediado por receptor FptA

El complejo PCH-Fe se une al lugar específico de unión de FptA, una zona compuesta por residuos hidrofóbicos y aromáticos. Una vez reconocido, PCH-Fe induce cambios conformacionales ,que alteran el radio del poro en el receptor, permitiendo su incorporación en el periplasma. Este cambio es inducido por la forma PCH-Fe1:1, indicando una vez mas que es la forma predominante en estado natural (Manzoor et al., 2021; Youard et al., 2011).

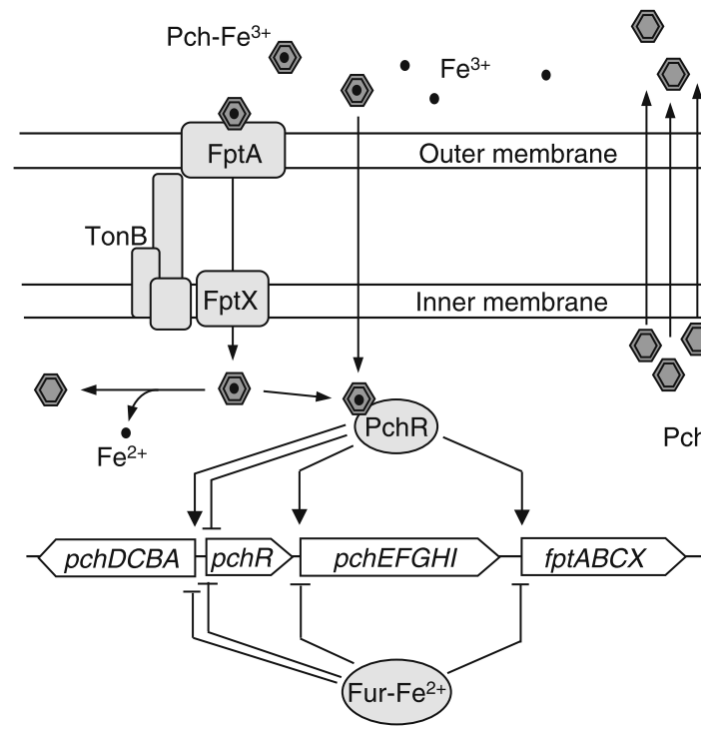
### 3.6.3. Importación de hierro al citoplasma por vía de PCH

FptX es una permeasa que permite el paso del complejo PCH-Fe al interior del citoplasma. El proceso exacto de cómo se realiza es actualmente desconocido (Cunrath et al., 2015; Youard et al., 2011).

Una vez en el citoplasma PCH se disocia del hierro que porta mediante una reducción, aun que como ocurre el proceso es desconocido (Manzoor et al., 2021).

El operón se *fptABCX* codifica proteínas involucrada en el proceso de transporte mediante el receptor FptA, aunque su función específica es desconocida (Youard et al., 2011).

**Figura 11:** Ruta y proteínas implicadas en importación de hierro mediante PCH. (Youard et al., 2011)



## **4. SIDERÓFOROS EXOGENOS**

*P. aeruginosa* es capaz de incorporar hierro mediante sideróforos generados por otras especies de microorganismos. Este fenómeno es posible al poseer *P. aeruginosa* unos 30 genes que codifican para TBDTs, algunos de estos son homólogos a los que codifican receptores capaces de incorporar a los sideróforos de esas especies (Cornelis & Dingemans, 2013).

### **4.1. Sideróforos bacterianos**

#### **4.1.1. PVDs de otras *Pseudomonas***

Debido a la similitud estructural que comparten todas la PVDs, ciertas cepas de *P. aeruginosa* son capaz de incorporar este sideróforo mediante sus receptores FpvA, reconociendo la PVD secretado por otras *Pseudomonas* (Cornelis & Matthijs, 2002).

Como ejemplo de este fenómeno, la cepa *P.aeruginosa* PAO1 presenta la capacidad de incorporar la PVD secretada por la *P. fluorescens* ATCC 13525 mediante su receptor FpvAll. La eficiencia con la que incorpora la PVD exógena es menor que con la propia, aun así este hecho le aporta una ventaja (Meyer et al., 1999).

#### **4.1.2. Citrato**

El citrato actúa como un sideróforo catecol quelando el hierro. Ciertos microorganismos, como *E. coli* son capaces de incorporar el complejo citrato-Fe mediante el receptor FeC,(Poole & Mckay, 2003).

*P. aeruginosa* es capaz de reconocer la presencia de este compuesto en el medio y utilizarlo para obtener hierro al contar con un gen homologo al que codifica para FeC en *E. coli*, (Marshall et al., 2009).

#### **4.1.3. Enterobactina**

Se trata de un sideróforo catecolato secretado por *E. coli* y otras especies de la familia Enterobacteriaceae (Keith Poole & Mckay, 2003). *P. aeruginosa* es capaz de incorporarlo al expresar dos receptores específicos para este sideróforo : PfeA y PirA (Cornelis & Bodilis, 2009).

#### **4.1.4. Ferrioxamine B**

Es un sideróforo hidroxamato secretado por *Streptomyces pilosus*, utilizado como medicamento para tratar la hemocromatosis (Khan et al., 2018; Larcher et al., 2013). *P. aeruginosa* es capaz de incorporar este compuesto mediante el receptor FoxA, el cual también está presente en *E.coli* .

#### **4.1.5. Vibriobactin**

Es un sideróforo catecolato secretado por *Vibrio cholerae*. *P.aeruginosa* lo incorpora mediante el receptor FbvA que es capaz de expresar (Elias et al., 2011).

#### **4.1.6. Mycobactin y carboximycobactin**

Son dos sideróforos hidroximatos secretados por especies del género *Mycobacterium* (Khan et al., 2018). *P. aeruginosa* los incorpora mediante el receptor FemA (Cornelis & Dingemans, 2013).

#### **4.1.7. Aerobactin, rhizobactin 1021 y schizokinen**

Se trata de tres sideróforos citrato-hidroximato secretados por *E. coli*, *Sinorhizobium meliloti* 2011 y *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *P. aeruginosa* los incorpora mediante el receptor ChtA, al poseer los tres sideróforos una estructura similar (Cuív et al., 2006).

### **4.2. Sideróforos fúngicos**

#### **4.2.1. Ferricromo**

Es un sideróforo hidroximato secretado por diversos géneros de hongos, entre ellos *Apergillus* (Khan et al., 2018). *P. aeruginosa* incorpora ferricromo mediante el receptor FiuA (Hannauer et al., 2010).

## **5. REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE SIDERÓFOROS Y SU RECEPTORES**

La captación de hierro es un proceso altamente controlado en *P. aeruginosa*. Fur (Ferric uptake repressor), una proteína altamente conservada, juega un papel importante en la regulación de este proceso. Su función es la de detectar los niveles de hierro(II) en el citoplasma (Cornelis et al., 2009).

En situaciones en las que hay exceso de hierro, Fur se une a hierro(II) el cual actúa como represor de este. El complejo Fur-Fe<sup>2+</sup> actúa como represor de los genes involucrados en la regulación de síntesis de sideróforos, TDBRs y proteínas implicadas en procesos de obtención de hierro, inhibiendo la producción de estos (Figura 10) (Schalk et al., 2020).

En la explicación del TBDR FpvA, resaltamos la capacidad del dominio de señalización que esta posee para transducir señales. Esta característica es compartida por un grupo específico de TBDRs denominados TBDT (*TonB dependent transducers*). Estos receptores en presencia del ligando específico, su sideróforo generalmente, pueden activar rutas que inducen la expresión de genes implicados en la obtención de hierro (Cornelis & Dingemans, 2013).

### **5.1. Regulación de PVDs**

En situaciones de ausencia de hierro, la proteína Fur deja de reprimir los genes que codifican las proteínas FpvR, Fpvl y PvdS, implicadas en la regulación de la obtención de hierro mediante PVD (Ringel & Brüser, 2018).

FpvR es una proteína situada en la membrana interna cuya función es la de inactivar Fpvl y PvdS. Estas dos proteínas, inactivadas por FpvR, son dos factores sigma ( $\sigma$ ) requeridos para la expresión de los genes implicados en la expresión de FpvA y la ruta de biosíntesis de PVD respectivamente (Ringel & Brüser, 2018; Schalk et al., 2020).

FpvR se autodegrada a cierto grado, para mantener un nivel de actividad basal de Fpvl y PvdS, permitiendo que PVD y FpvA se expresen (Ringel & Brüser, 2018).

El reconocimiento de PVD-Fe por parte de FpvA, causa que FpvR sufra mayores niveles de degradación, liberando a su vez más Fpvl y PvdS, formando un loop de retroalimentación positiva al inducir la síntesis de más PVD y FpvA (Ringel & Brüser, 2018).

## **5.2. Regulación de PCH**

Como hemos especificado con anterioridad, limitación de hierro provoca que Fur deje de reprimir los genes implicados en la producción de PCH y su receptor, permitiendo que se generen niveles basales de estos .

PchR es una proteína que regula la expresión de los operones implicados en la síntesis y funcionamiento de PCH y FtpA, actuando como un inductor de estos. El complejo PCH-Fe en el citoplasma, puede actuar como inductor de la síntesis de PchR, generando una mayor expresión de PCH y FtpA (Schalk et al., 2020; Youard et al., 2011).

## **6. FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A SIDERÓFOROS**

En la introducción de este trabajo se estableció que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de actuar como patógeno (Minandri et al., 2016). En esta situación, el patógeno tiene la capacidad de expresar diversos factores de virulencia que permiten la infección y colonización del huésped (Cornelis & Dingemans, 2013).

### **6.1. Factores de virulencia asociados a PVDs**

Dentro del organismo huésped, PVD es capaz de competir con la proteína lactoferrina para la captación de hierro(III), pero es incapaz de arrebatárselo directamente (Cezard et al., 2014; Cornelis & Dingemans, 2013) .

El sideróforo PVD puede ser considerado un factor de virulencia de *P. aeruginosa*. Es directamente responsable de la inducción de muchos factores de virulencia, siendo indispensable su presencia para dar lugar a la infección (Cezard et al., 2014; Minandri et al., 2016).

Los factores  $\sigma$  Fpvl y PvdS, son liberados al darse la degradación de FpvR inducida por la unión de PVD al receptor FpvA. Los factores  $\sigma$  inducen la producción de la PVD en sí ,y de otros dos factores de virulencia (Lamont et al., 2002):

- Endotoxina A , una toxina que inhibe la síntesis proteica al inhibir EF2 (Yates & Merrill, 2004).
- Proteasa PrpL, una proteasa que hidroliza lactoferrina, liberando el hierro contenido en esta (Cezard et al., 2014).

PVD no está directamente implicada en la producción de biofilms en *P.aeruginosa*, sin embargo hay constancia de que la incorporación de hierro es necesario para que dé lugar este proceso (Cezard et al., 2014).

Finalmente, PVD es una molécula “*quorum sensing*” ,que actúa induciendo la misma expresión génica en todos los individuos de una población. Mediante este mecanismo se regula la producción de factores de virulencia de la población para facilitar la infección (Cornelis & Dingemans, 2013; Lamont et al., 2002).



## **6.2. Factores de virulencia asociados a PCH**

PCH , igual que PVD, es capaz de competir por hierro(III) con lactoferrina. Actualmente se conocen pocos mecanismos de virulencia que impliquen PCH . Esta descrito que en conjunto con piocianina ,PCH puede causar daño oxidativo al tejido pulmonar en casos de fibrosis quística, favoreciendo la inflamación (Cornelis & Dingemans, 2013).

## **7. CONCLUSIONES**

*P. aeruginosa* es un microorganismo ampliamente estudiado, de gran relevancia por la versatilidad que presenta.

El funcionamiento y estructura de los sideróforos y receptores que posee, en particular PVDs han sido caracterizados de manera exhaustiva. PCH al haber sido descubierto más recientemente, está aún bajo estudio a pesar de la aparente sencillez que presentan en comparación a PVD.

*P. aeruginosa* presenta multitud de genes que posiblemente codifiquen para nuevos TBDR correspondiendo a receptores aun no identificados en esta especie. Esto aumentaría de manera exponencial la versatilidad de sideróforos que puede captar y utilizar.

Los receptores de ambos, especialmente FpvA de PVD, están implicados de manera importante en rutas de señalización y regulación de la captación de hierro, así como diversos factores de virulencia . PCH parece no tener un papel tan relevante como mecanismo de virulencia.

El papel que juegan PVD y su receptor FpvA, en los procesos infecciosos de *P. aeruginosa*, provee de conocimiento importante para desarrollar estrategias para combatir dichas infecciones. Estrategias basadas en el uso de los receptores como ruta de entrada de antibióticos conjugados con metales, denominados “Trojan horse” , son planteados diversas veces en la literatura y aparenta ser una ruta de estudio prometedora (Mislin & Schalk, 2014). PCH y su receptor, al presentar una expresión basal sin necesidad de estar en situaciones de escasez de hierro, sería una diana ideal para este modelo de antibiótico.

## **8. METODOLOGIA BUSQUEDA BIBLIOGRAFICA**

Este trabajo se ha basado en una exhaustiva revisión de la literatura existente de sideróforos y receptores expresados por *P. aeruginosa*.

La búsqueda bibliográfica se realizó, del consultando revisiones obtenidas al introducir las palabras claves en la base de dato *PubMed*: “*Pseudomonas aeruginosa*” , “siderophore” y “receptor” . A partir de las revisiones se obtuvo un conocimiento general del tema a tratar que fue expandido posteriormente con artículos más específicos .

Las palabras clave para la búsqueda específicos fueron:

- Pyoverdine and *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas aeruginosa* and FpvA
- *Pseudomonas aeruginosa* and FpvB
- Pyochelin and *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas aeruginosa* and FptA
- *Pseudomonas aeruginosa* and virulence factor
- Pyoverdine and virulence factor
- Pyochelin and virulence factor

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abdallah, M. A., Pfestorf, M., & Döring, G. (1989). Pseudomonas aeruginosa pyoverdinin: structure and function. *Antibiotics and Chemotherapy*, 42, 8–14. <https://doi.org/10.1159/000417597>
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Ballouche, M., Cornelis, P., & Baysse, C. (2009). Iron Metabolism: A Promising Target for Antibacterial Strategies. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 4(3), 190–205. <https://doi.org/10.2174/157489109789318514>
- Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>
- Bouvier, B., Cézard, C., & Sonnet, P. (2015). Selectivity of pyoverdine recognition by the FpvA receptor of Pseudomonas aeruginosa from molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(27), 18022–18034. <https://doi.org/10.1039/c5cp02939b>
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the Pseudomonas aeruginosa pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1079–1091. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x>
- Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2014). Chemistry and Biology of Pyoverdines, Pseudomonas Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 165–186. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624>
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1637–1645. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2550-2>
- Cornelis, P., & Bodilis, J. (2009). A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environmental Microbiology Reports*, 1(4), 256–262. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00041.x>
- Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). Pseudomonas aeruginosa adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>
- Cornelis, P., & Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: Not only pyoverdines. *Environmental Microbiology*, 4(12), 787–798. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00369.x>
- Cornelis, P., Matthijs, S., & Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa. *BioMetals*, 22(1), 15–22. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9193-0>
- Cox, C. D., & Graham, R. (1979). Isolation of an iron binding compound from Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, 137(1), 357–364. <https://doi.org/10.1128/jb.137.1.357-364.1979>
- Cuív, P. Ó., Clarke, P., & O'Connell, M. (2006). Identification and characterization of an iron-regulated gene, chtA, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, 152(4), 945–954. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28552-0>
- Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimann, C., Guillon, L., & Schalk, I. J. (2015). A cell

- biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 17(1), 171–185. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12544>
- Del Olmo, A., Caramelo, C., & SanJose, C. (2003). Fluorescent complex of pyoverdine with aluminum. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(4), 384–387. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00316-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00316-7)
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
- Elias, S., Degtyar, E., & Banin, E. (2011). FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 157(7), 2172–2180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044768-0>
- Folschweiller, N., Schalk, I. J., Celia, H., Kieffer, B., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2000). The pyoverdine receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa* (Review). *Molecular Membrane Biology*, 17(3), 123–133. <https://doi.org/10.1080/09687680050197356>
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., & Schalk, I. J. (2017). Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chemical Biology*, 12(4), 1056–1065. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01077>
- Ghysels, B., Dieu, B. T. M., Beatson, S. A., Pirnay, J. P., Ochsner, U. A., Vasil, M. L., & Cornelis, P. (2004). FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 150(6), 1671–1680. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27035-0>
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L. A., Shanzer, A., & Schalk, I. J. (2010). The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1212–1220. <https://doi.org/10.1128/JB.01539-09>
- Johnstone, T. C., & Nolan, E. M. (2015). Beyond Iron: Non-Classical Biological Functions of Bacterial Siderophores. *Dalton Transactions*, 44(14), 6320–6339. <https://doi.org/10.1039/c4dt03559c>
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, 212–213(November 2017), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7072–7077. <https://doi.org/10.1073/pnas.092016999>
- Larcher, G., Dias, M., Razafimandimby, B., Bomal, D., & Bouchara, J. P. (2013). Siderophore Production by Pathogenic Mucorales and Uptake of Deferoxamine B. *Mycopathologia*, 176(5–6), 319–328. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9693-5>
- Manzoor, S., Ahmed, A., & Moin, S. T. (2021). Iron coordination to pyochelin siderophore influences dynamics of FptA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular dynamics simulation study. *BioMetals*, 0123456789(lii). <https://doi.org/10.1007/s10534->

- Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J. M., & Poole, K. (2009). Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology*, *155*(1), 305–315. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023531-0>
- Meyer, J. M., Stintzi, A., & Poole, K. (1999). The ferripyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recognizes the ferripyoverdines of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. fluorescens* ATCC 13525. *FEMS Microbiology Letters*, *170*(1), 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00537-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00537-0)
- Minandri, F., Imperi, F., Frangipani, E., Bonchi, C., Visaggio, D., Facchini, M., Pasquali, P., Bragonzi, A., & Visca, P. (2016). Role of iron uptake systems in *pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. *Infection and Immunity*, *84*(8), 2324–2335. <https://doi.org/10.1128/IAI.00098-16>
- Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2014). Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics*, *6*(3), 408–420. <https://doi.org/10.1039/c3mt00359k>
- Moore, N. M., Flaws, M. L., Flaws, M. L., Si, S. M. A., & Univer-, R. (2011). Introduction : *Pseudomonas aeruginosa*. *American Society for Clinical Laboratory Science*, *24*(1), 41–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.29074/ascls.24.1.41>
- Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Reis, C. R., Muntendam, R., Raj, H., Margot Jeronimus-Stratingh, C., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2014). PvdP is a tyrosinase that drives maturation of the pyoverdine chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *196*(14), 2681–2690. <https://doi.org/10.1128/JB.01376-13>
- Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Molecular Microbiology*, *45*(5), 1277–1287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03084.x>
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., & Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology*, *175*(22), 7363–7372. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7363-7372.1993>
- Poole, Keith, & Mckay, G. A. (2003). Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *8*(4), 661–686. <https://doi.org/10.2741/1051>
- Ringel, M. T., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell*, *5*(10), 424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
- Ringel, M. T., Dräger, G., & Brüser, T. (2018). PvdO is required for the oxidation of dihydropyoverdine as the last step of fluorophore formation in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(7), 2330–2341. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000121>
- Ronnebaum, T. A., & Lamb, A. L. (2018). Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. *Current Opinion in Structural Biology*, *53*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.015>
- Ruangviriyachaia, C., Fernandezb, D. U., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., & Meyer, J. M. (2001). A New Pyoverdin from *Pseudomonas aeruginosa* R'. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *56*(11–12), 933–938. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-11-1203>

- Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
- Schalk, I. J., Lamont, I. L., & Cobessi, D. (2009). Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals*, 22(4), 671–678. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9203-2>
- Schalk, I. J., Rigouin, C., & Godet, J. (2020). An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1447–1466. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14937>
- Tseng, C. F., Burger, A., Mislin, G. L. A., Schalk, I. J., Yu, S. S. F., Chan, S. I., & Abdallah, M. A. (2006). Bacterial siderophores: The solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(4), 419–432. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0088-7>
- Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
- Yamamoto, S., & Shinoda, S. (1996). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *Nippon Saikingaku Zasshi. Japanese Journal of Bacteriology*, 51(2), 523–547. <https://doi.org/10.3412/jsb.51.523>
- Yates, S. P., & Merrill, A. R. (2004). Elucidation of eukaryotic elongation factor-2 contact sites within the catalytic domain of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemical Journal*, 379(3), 563–572. <https://doi.org/10.1042/BJ20031731>
- Youard, Z. A., Wenner, N., & Reimann, C. (2011). Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *BioMetals*, 24(3), 513–522. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9399-9>