



Caracterización *in silico* de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR)

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá D.C., 2022



Caracterización *in silico* de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR)

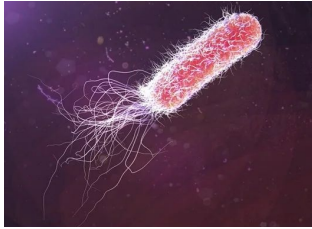
Estudiantes:

Laura Stephanie Mendieta Alarcón
Laura Marcela Navarro Guevara

Asesoras: Ibeth Cristina Romero
Ruth Mélida Sánchez

Características generales

Pseudomonas aeruginosa



Bacteria Gram negativa



Prevalencia en pacientes intrahospitalarios e inmunosuprimidos

Presente en suelo y agua

Infecciones generadas:

- Bacteriemia (infección en sangre)
- Infecciones de válvula del corazón
- Neumonía
- Queratitis ocular
- En tracto urinario
- En piel (por quemaduras)
- Otitis aguda

Tratamientos:

- Betalactámicos
- Aminoglucósidos (Tobramicina)
- Fluoroquinolonas
- Carbapenémicos
- Polimixinas (Colistina)
- combinación de betalactámicos y aminoglucósidos



Importancia de *P.aeruginosa* en Salud Pública

P. aeruginosa presenta tasas de resistencia a antibióticos cada vez más altas



Fenotipos
Multidrogoresistentes (MDR)

Prevalencia hasta el 2015
diferentes áreas oscilaba 15-30 %
Colombia INS 75,4 % (2012-2015)



2002-2013 prevalencia de 26 % de
P.aeruginosa resistente a carbapenémicos en
América Latina

Importancia de *P.aeruginosa* en Salud Pública

En Europa la tasa de resistencia >10 % en la mayoría de antimicrobianos bajo vigilancia



Tasa de mortalidad a nivel mundial del 42 % en pacientes intrahospitalarios

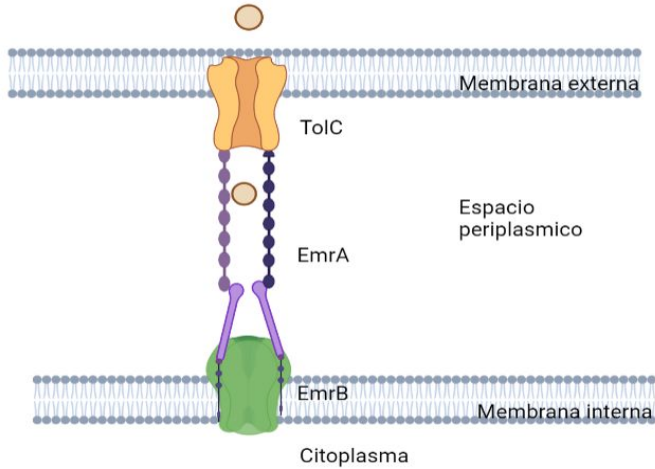


Diferentes genes implicados en resistencia a antibióticos

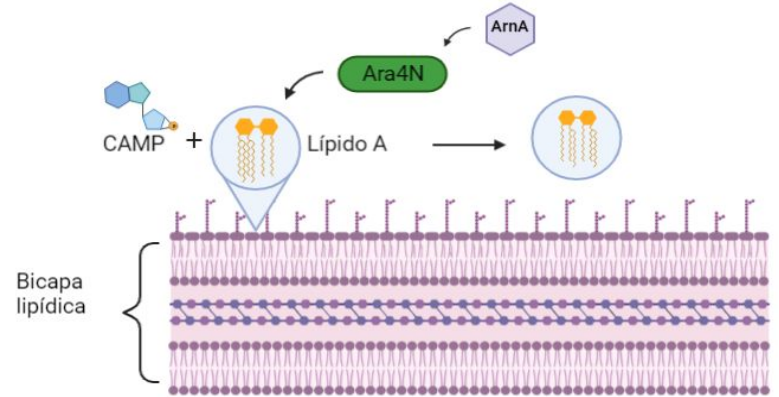


Genes de resistencia *emrA*, *arnA* y *marR*

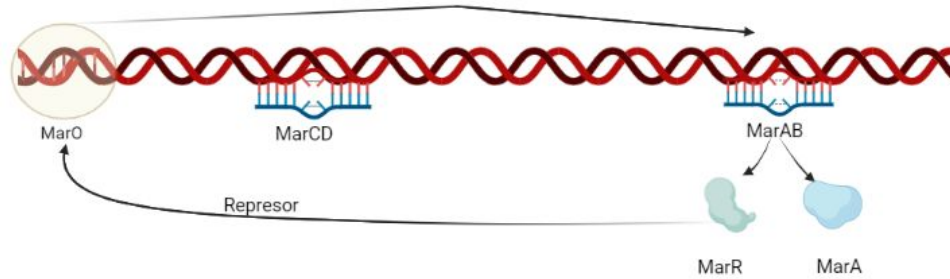
emrA



arnA



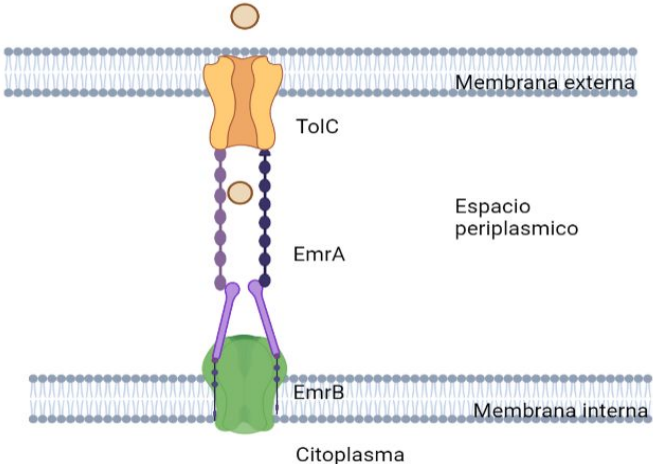
marR



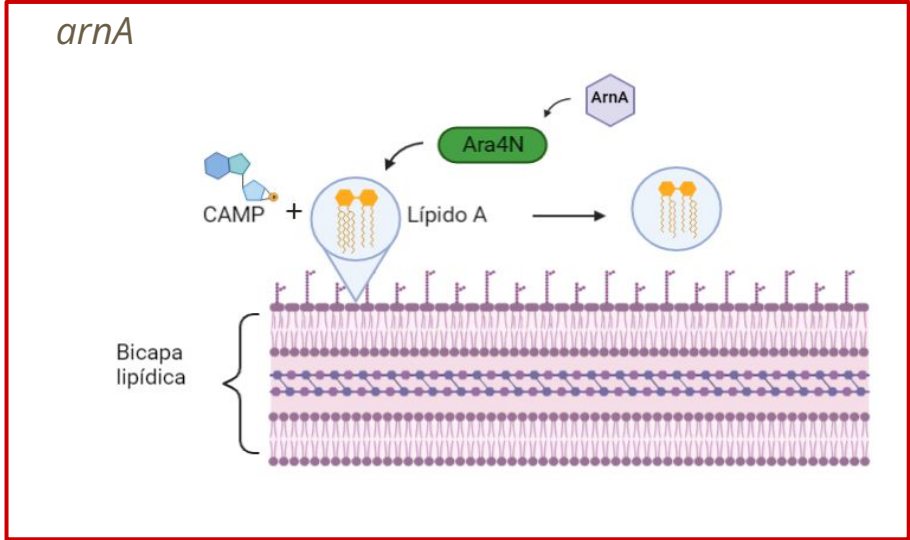
Castiblanco D, Mendieta L, Navarro L, 2022

Genes de resistencia *emrA*, *arnA* y *marR*

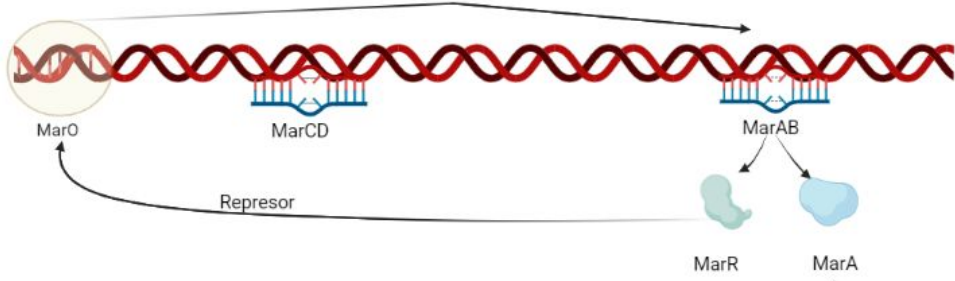
emrA



arnA



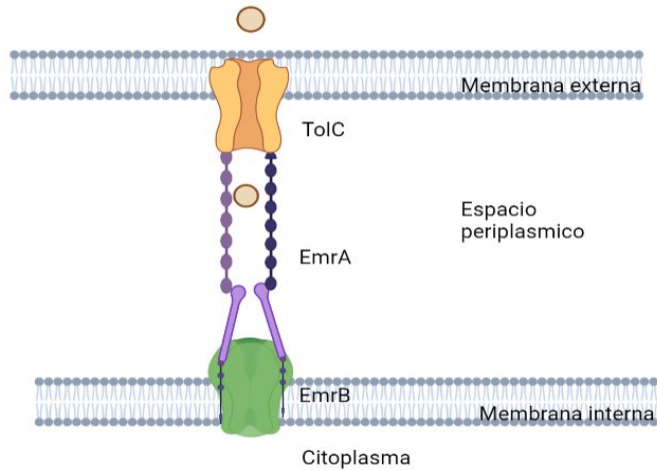
marR



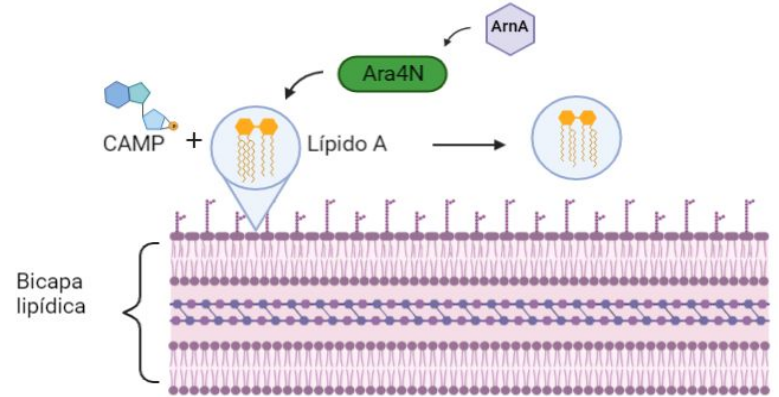
Castiblanco D, Mendieta L, Navarro L, 2022

Genes de resistencia *emrA*, *arnA* y *marR*

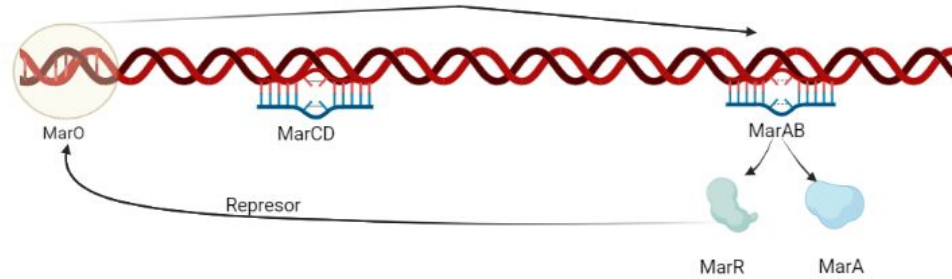
emrA



arnA



marR



Castiblanco D, Mendieta L, Navarro L, 2022

Objetivo general

Caracterizar *in silico* los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogoresistente (MDR).

Objetivos específicos

1.

Identificar las principales mutaciones asociadas a resistencia presentes en las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

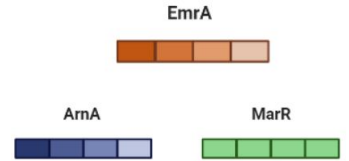
2.

Comparar las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR con secuencias de genes ortólogos en otras bacterias para entender su relación filogenética.

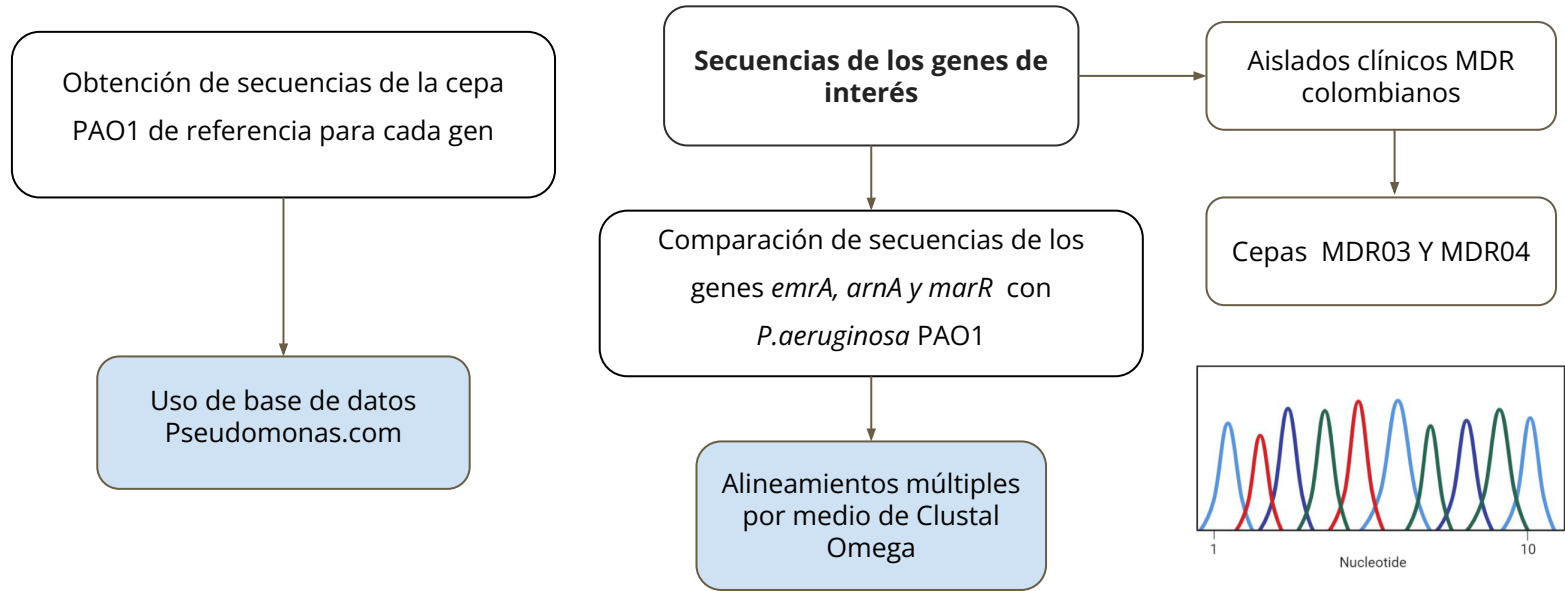
3.

Determinar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas predichas a partir de los genes *emrA*, *ernA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

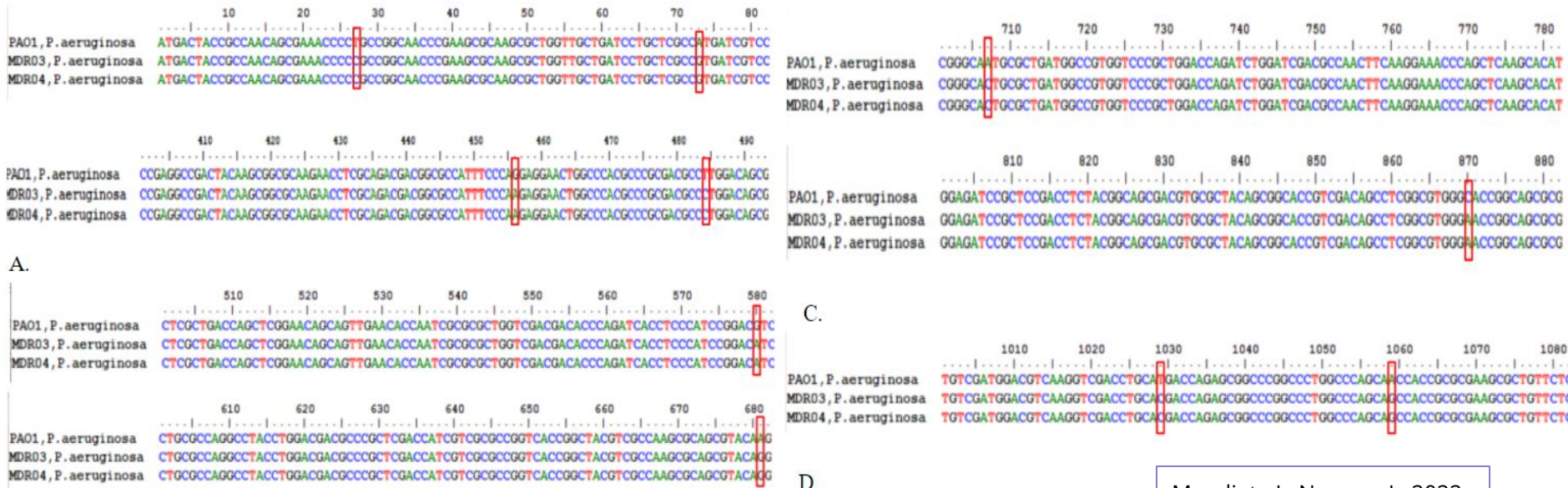
Identificación de mutaciones relacionadas a resistencia



1.



Alineamiento múltiple del gen *emrA* en cepas MDR y cepa de referencia PAO1 de *P.aeruginosa*



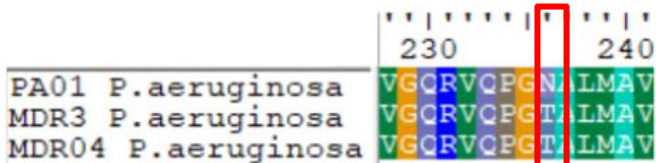
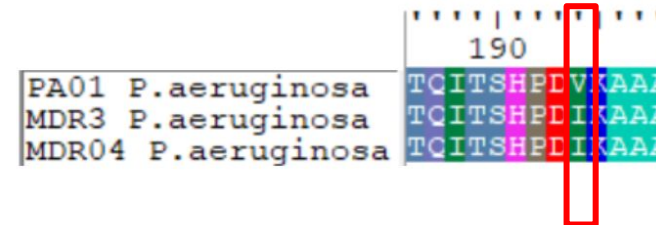
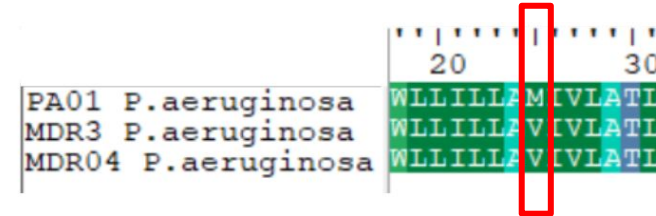
Mendieta L, Navarro L, 2022

Figura 1. Puntos de mutación en el alineamiento múltiple del gen *emrA*, cepas MDR y de referencia PAO1 de *P.aeruginosa*. Se muestran las mutaciones de tipo sustitución presentes entre los nucleótidos 1 a 490, (A), nucleótidos 491 a 682, (B) nucleótidos 682 a 880 (C), nucleótidos 881 a 1080 (D).

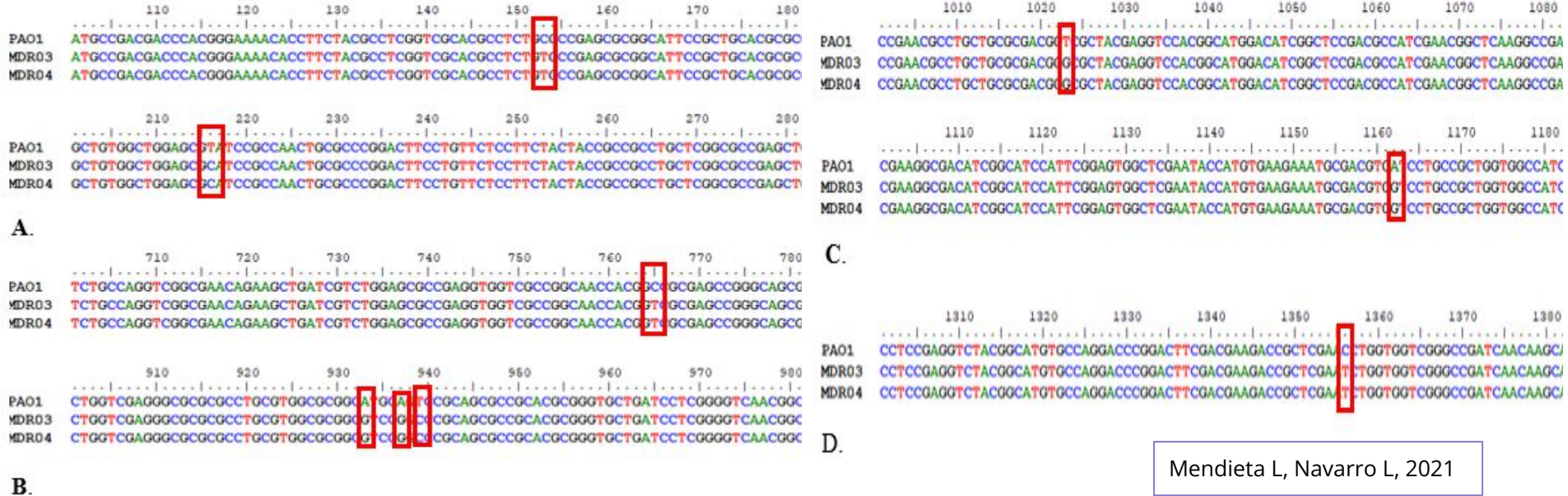
Mutaciones *Gen emrA*

Ubicación	Cambio	DNA	RNA	A.A	Tipo de mutación
27	T-C	CCC	CCC	Pro	Mutación silenciosa
73	A-G	GTG	GUG	Val	Mutación de cambio de sentido
456	G-A	CAA	CAA	Gln	Mutación silenciosa
484	T-C	CTG	CUG	Leu	Mutación silenciosa
580	G-A	ATC	AUC	Ile	Mutación de cambio de sentido conservativa
681	A-G	CAG	CAG	Gln	Mutación silenciosa
707	A-C	ACT	ACU	Thr	Mutación de cambio de sentido
870	C-A	GGA	GGA	Gly	Mutación Silenciosa
1029	T-C	CAC	CAC	His	Mutación Silenciosa
1059	A-G	CAG	CAG	Gln	Mutación Silenciosa

Mutaciones presentes en el alineamiento de aminoácidos



Alineamiento múltiple del gen *arnA* en cepas MDR y cepa de referencia PA01 de *P.aeruginosa*



Mendieta L, Navarro L, 2021

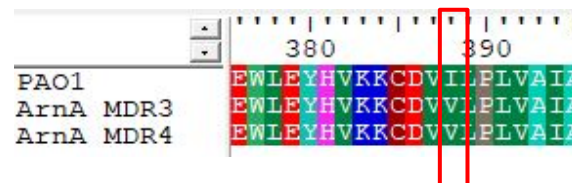
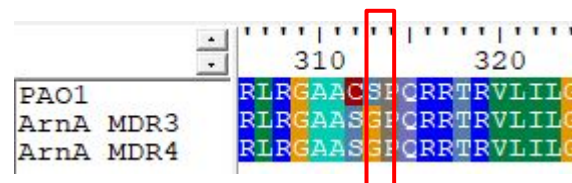
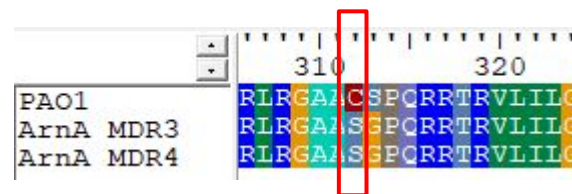
Fig 2. Puntos de mutación en el alineamiento múltiple del gen *arnA*, cepas MDR 03 y 04 y de referencia PA01 de *P. aeruginosa*. Se muestran las mutaciones de tipo sustitución presentes entre los nucleótidos los nucleótidos 1 a 290 (A), nucleótidos 710 a 790 (B), nucleótidos 1010 a 1190 (C), nucleótidos 1310 a 1390 (D).

Mutaciones Gen *ArnA*

Ubicación	Cambio	ADN	ARN	A.A.	Tipo de mutación
153	C-T	TGT	UGU	Cys	Mutación silenciosa
216	T-C	CGC	CGC	Arg	Mutación silenciosa
765	C-T	GGT	GGU	Gly	Mutación silenciosa
933	A-G	GCG	GCG	Ala	Mutación silenciosa
935	G-C	TCC	UCC	Ser	Mutación de cambio de sentido
937	A-G	GGC	GGC	Gly	Mutación de cambio de sentido
939	A-G	GGC	GGC	Gly	Mutación de cambio de sentido
1023	T-G	GGG	GGG	Gly	Mutación silenciosa
1162	A-G	GTC	GUC	Val	Mutación de cambio de sentido conservativa
1356	C-T	AAT	AAU	Asn	Mutación silenciosa

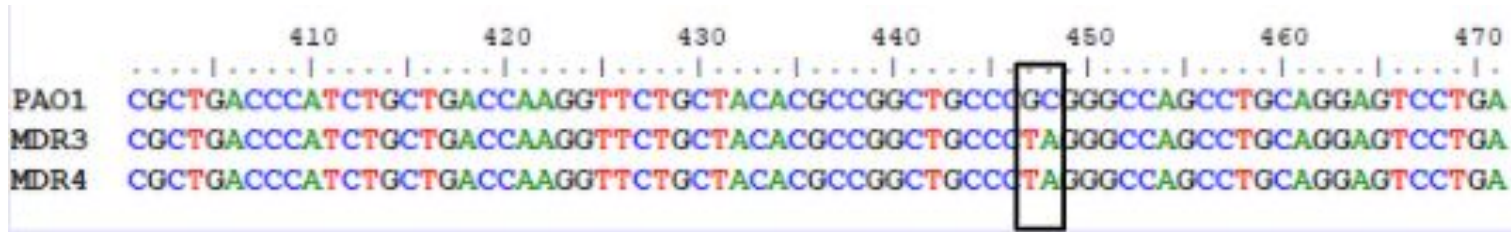
Tabla 2. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen *arnA* de cepas MDR 03 y MDR 04 en comparación con la cepa de referencia PAO1 de *P.aeruginosa*.

Mutaciones presentes en el alineamiento de aminoácidos



Mendieta L, Navarro L, 2022

Alineamiento múltiple del gen *marR* en cepas MDR y cepa de referencia PA01 de *P.aeruginosa*

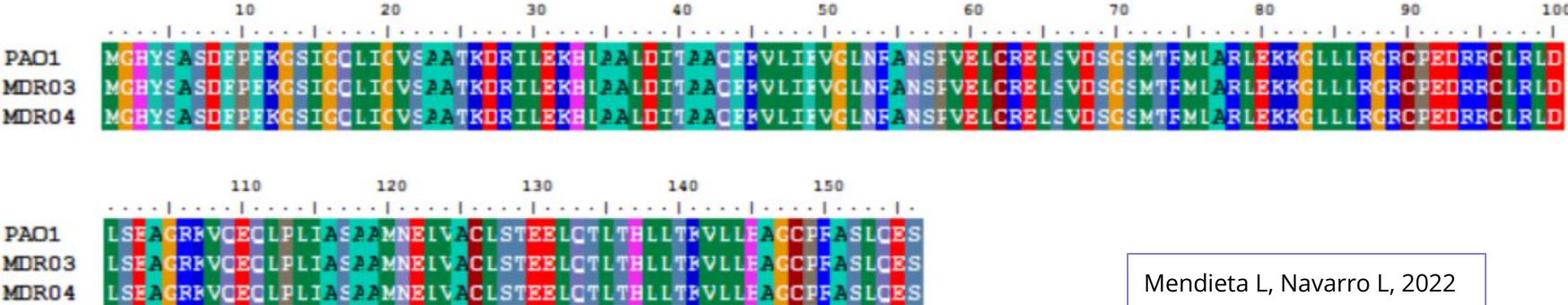


Puntos de mutación en el alineamiento múltiple del gen *marR*, cepas MDR 03 y 04 y de referencia PAO1 de *P. aeruginosa*. En el recuadro negro se evidencia la sustitución de nucleótidos en la posición 447 y 448.

Ubicación	Cambio	DNA	RNA	A.A	Tipo de mutación
447	G-T	CCT	CCU	Pro	mutación silenciosa
448	C-A	AGG	AGG	Arg	mutación silenciosa

Tabla 3. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen *marR* de cepas MDR 03 y MDR 04 en comparación con la cepa de referencia PAO1 de *P.aeruginosa*.

Alineamiento múltiple de la proteína MarR en cepas MDR y cepa de referencia PA01 de *P.aeruginosa*



Mendieta L, Navarro L, 2022

Fig 3. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la proteína marR de cepas MDR 03 y 04 y cepa de referencia PA01 de *P.aeruginosa* (Fenotipo sensible).

Castiblanco D, Mendieta L, Navarro L, 2022

Comparación genes de interés

	<i>Gen emrA</i>	<i>Gen arnA</i>	<i>Gen marR</i>
Porcentajes de Identidad con la cepa PAO1	99,16 %	99,5 %	99,58 %
Tipo de Sustitución	80 % Sustitución por transición 20 % Sustitución por transversión	80 % Sustitución por transición 20 % Sustitución por transversión	100 % Sustitución por transversión
Mutaciones	70 % mutaciones silenciosas 30 % mutaciones de cambio de sentido.	60 % mutaciones silenciosas 40 % mutaciones cambio de sentido	100 % mutación silenciosa

Tabla 4. Comparación de características encontradas en el análisis de secuencias de los genes de interés *emrA*, *arnA*, *marR* en cuanto al porcentaje de identidad con la cepa PAO1 y el tipo de mutaciones encontradas.

Objetivos específicos

1.

Identificar las principales mutaciones asociadas a resistencia presentes en las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

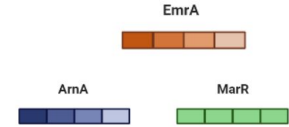
2.

Comparar las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR con secuencias de genes ortólogos en otras bacterias para entender su relación filogenética.

3.

Determinar las principales características bioquímicas in silico que presentan las proteínas predichas a partir de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

Comparación de secuencias



2.

Búsqueda de ortólogos relacionados a cada gen

Por medio de la aplicación GenBank y BlastN

Alineamiento de secuencias en nucleótidos de ortólogos

por medio de Clustal Omega

Análisis árbol filogenético

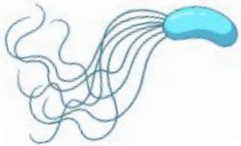
MegaX

Determinación de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes *emrA*, *arnA* y *marR*

ORFfinder y ExpASy

Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de ortólogos

por medio de Clustal Omega



Comparación de secuencias de los genes de interés con sus ortólogos en otras especies

	Gen EmrA	Gen ArnA	Gen MarR
Porcentajes de Identidad	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 68,37 % <i>Proteus mirabilis</i> 47,24 %	<i>Aeromonas hydrophila</i> 75 % <i>Proteus mirabilis</i> 58,27 %	<i>Cronobacter malonaticus</i> 49,77% <i>Burkholderia ambifaria</i> 40,62 %

Tabla 5. Comparación de porcentajes de identidad *Pseudomonas aeruginosa* y ortólogos

Análisis Filogenético

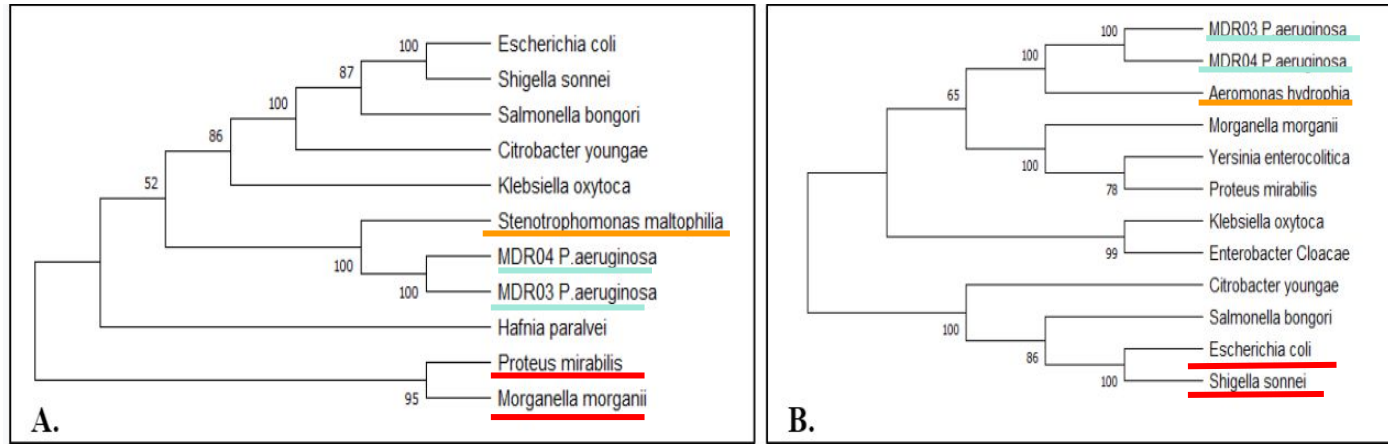
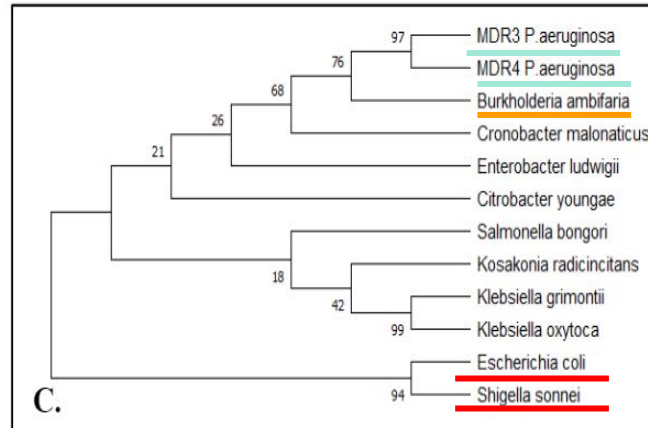


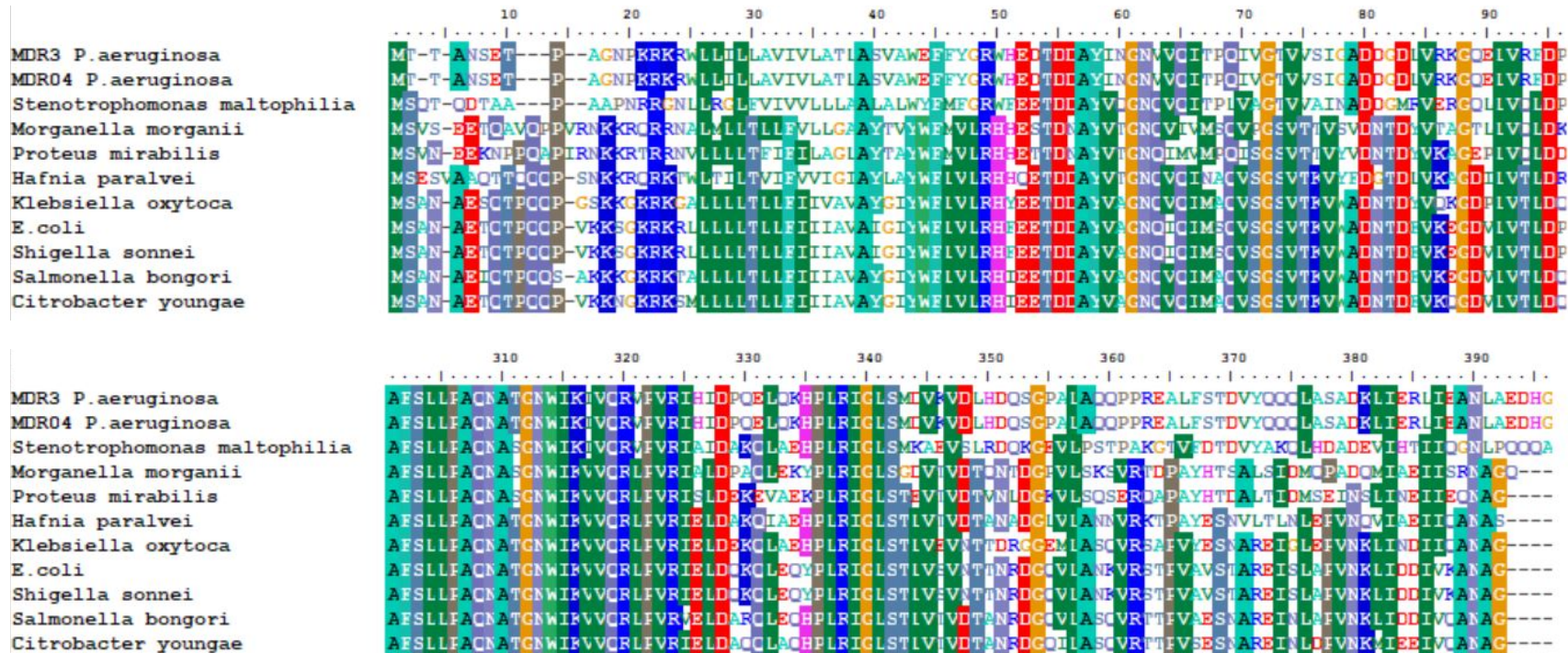
Fig 7. Árboles filogenéticos de secuencias de los genes *emrA*, *arnA*, *marR* de *P.aeruginosa* con relación a otras bacterias ortólogas (A,B,C) respectivamente



Mendieta L, Navarro L, 2021

- Ortólogo más cercano
- MDR03 y MDR04
- Ortólogo más alejado

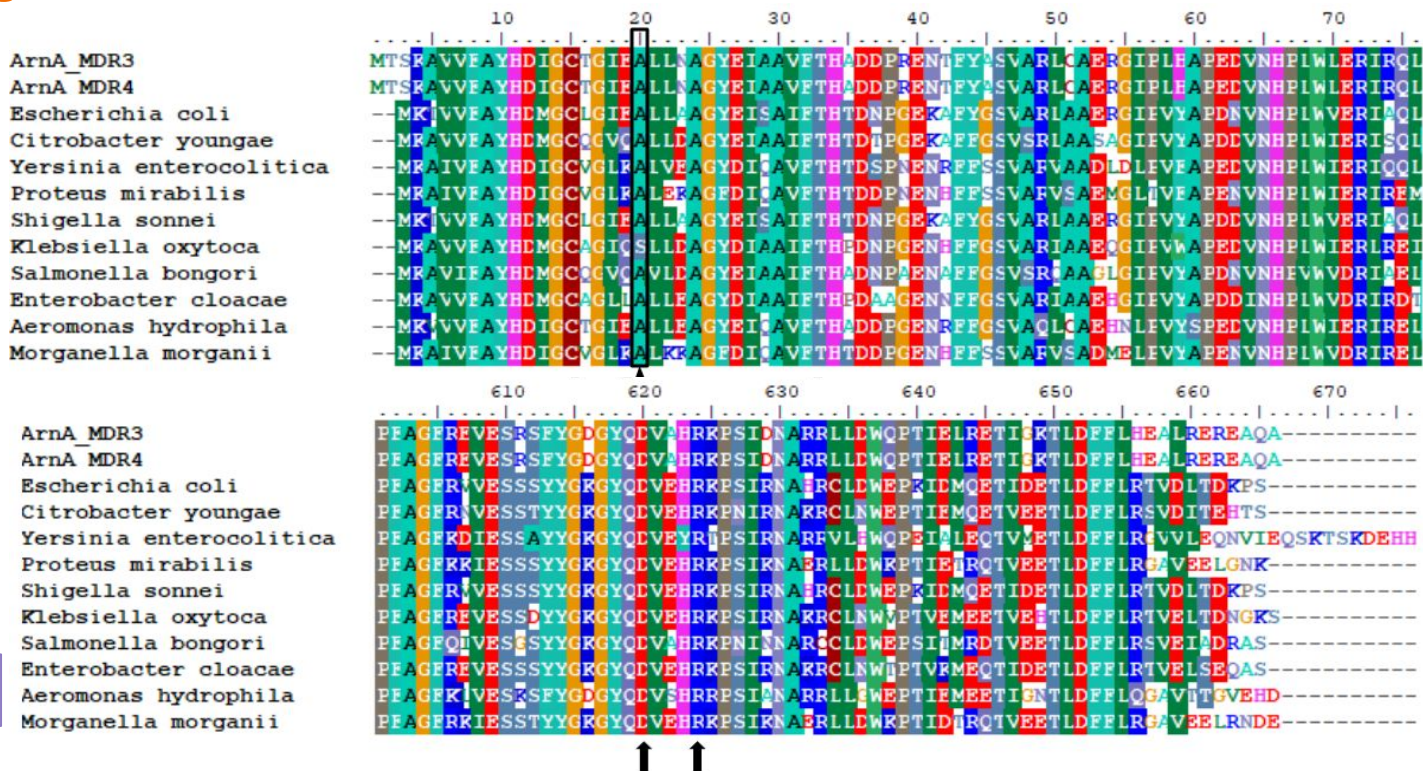
Alineamiento múltiple de la proteína EmrA en cepas MDR y bacterias ortólogas



Mendieta L, Navarro L, 2021

Fig 8. Representación del alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de *emrA* de *Pseudomonas aeruginosa*, MDR03, MDR04 y otros organismos ortólogos.

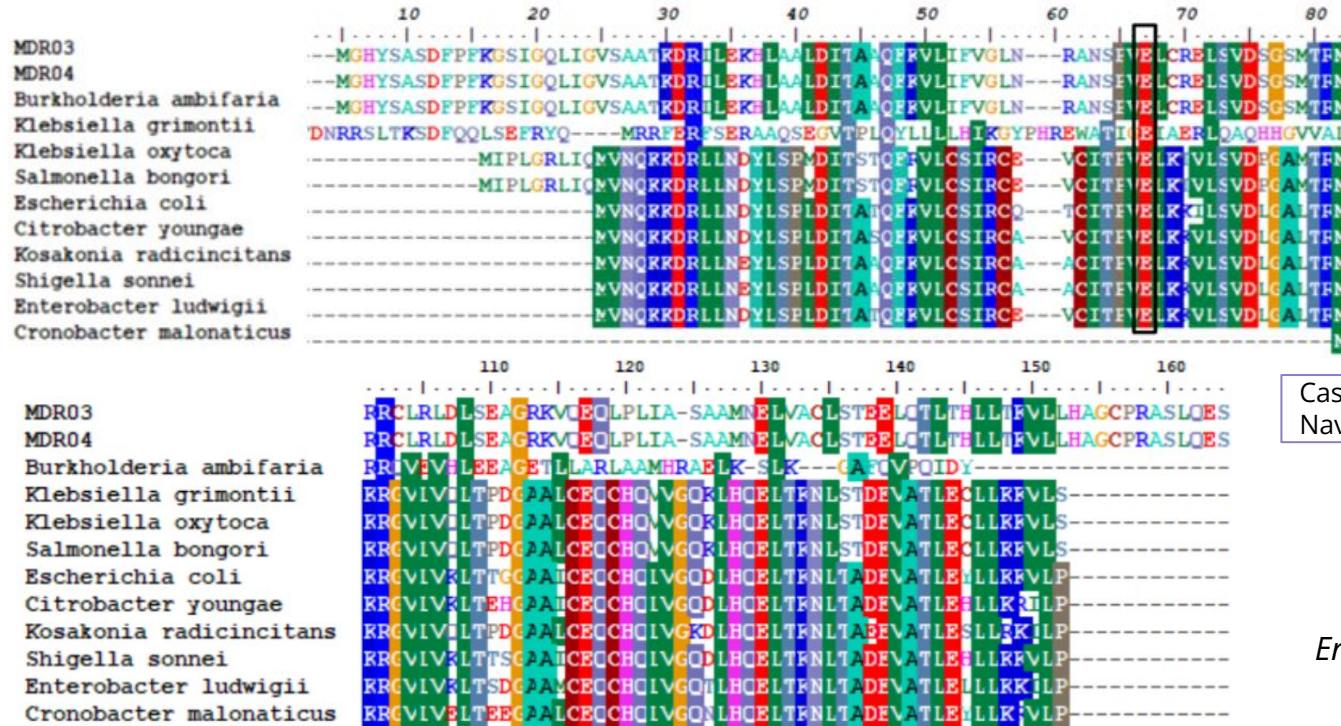
Alineamiento múltiple de la proteína ArnA en cepas MDR y bacterias ortólogas



Mendieta L,
Navarro L, 2021

Fig 9. Representación del alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de gen *arnA* de *Pseudomonas aeruginosa* (MDR 03 y 04 y organismos ortólogos). En el recuadro negro se señala el cambio de aminoácidos (S18A) en la posición 20 del alineamiento (Masood K. et al) . Con flechas negras se señalan los aminoácidos conservados (Sonwane K. et al).

Alineamiento múltiple de la proteína MarR en cepas MDR y bacterias ortólogas



Castiblanco D, Mendieta L, Navarro L, 2021

Warner D, et al



Enterobacter, E.coli

Fig 10. Representación del alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de gen *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* (MDR 03 y 04) y otros organismos ortólogos. En el recuadro negro, se señalan el cambio de aminoácido en la posición 63 del alineamiento.

Objetivos específicos

1.

Identificar las principales mutaciones asociadas a resistencia presentes en las secuencias de los genes *EmrA*, *ArnA* y *MarR* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

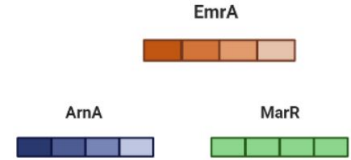
2.

Comparar las secuencias de los genes *EmrA*, *ArnA* y *MarR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR con secuencias de genes ortólogos en otras bacterias para entender su relación filogenética.

3.

Determinar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas predichas a partir de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

Predicción de proteínas



3.

Predicción de estructura secundaria y terciaria de las proteínas



Uso de plataformas GOR IV e I-TASSER

Verificación de estructuras proteicas



Utilizando ProSA-web

Predicción de estructura secundaria

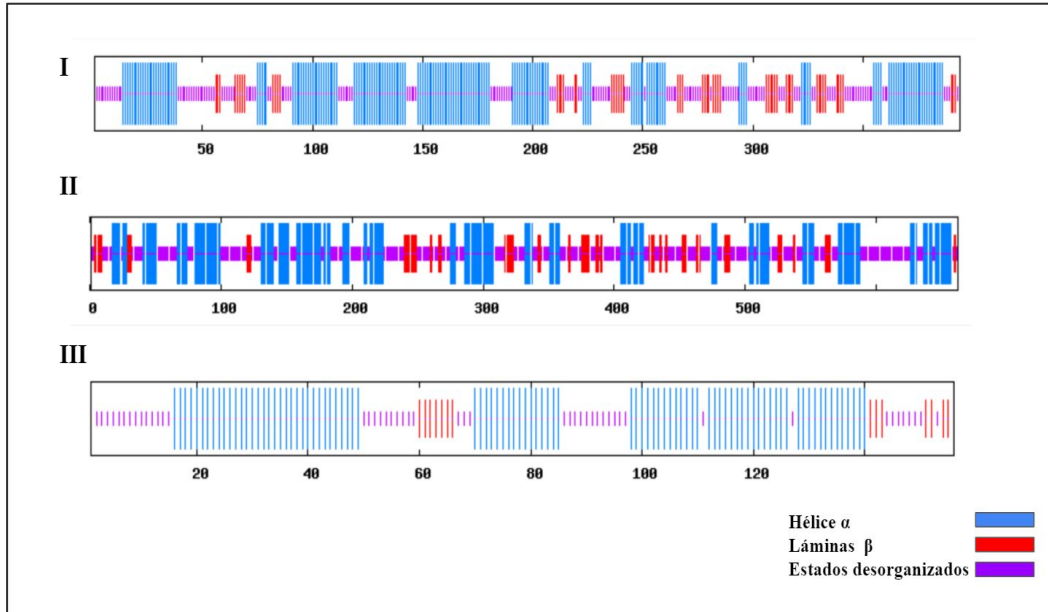


Fig 11. Método de predicción de estructura secundaria GOR IV, EmrA (I), ArnA (II), MarR (III) (visualización gráfica de la predicción); azul: hélice α ; rojo: cadena extendida (cadena β); violeta: otros estados (desorganizados) para las proteínas EmrA (I), ArnA (II), MarR (III) de *P.aeruginosa* MDR03 y MDR04.

	EmrA	ArnA	MarR
Hélice α	46,19 %	36,40 %	58,33 %
Cadena β	14,47 %	12,99 %	8,97 %

Mendieta L, Navarro L, 2022

EmrA

Dominio periplásmico compuesto por hélice α (88-210) intercalado por cadena β



Hélice α 96-213 intercalado por cadena β en *E.coli* (Borges, et al)

MarR

Dominio al ADN globular en los residuos (36-97) compuesto por hélice α



Estudio en *E.coli* por Warner D, et al.

Predicción de estructura terciaria

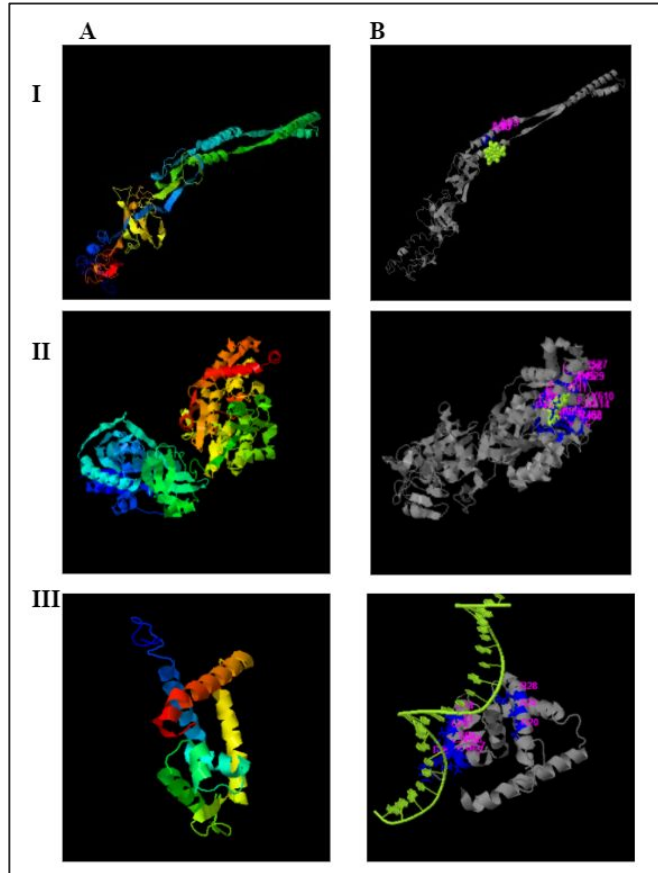


Fig 12. Modelo tridimensional de las proteínas deducidas de EmrA, ArnA y MarR de *P.aeruginosa* MDR03 y MDR04 predicho por medio de la herramienta I-TASSER.

I): EmrA , (II): ArnA y (III) : MarR A. Modelo 3D seleccionado B. Sitios de unión a los ligandos

	EmrA	ArnA	MarR
C-Score	-2.22	1.11	0.07
TM-score	0.45±0.15	0.87±0.07	0.72±0.11

Validación del modelo tridimensional

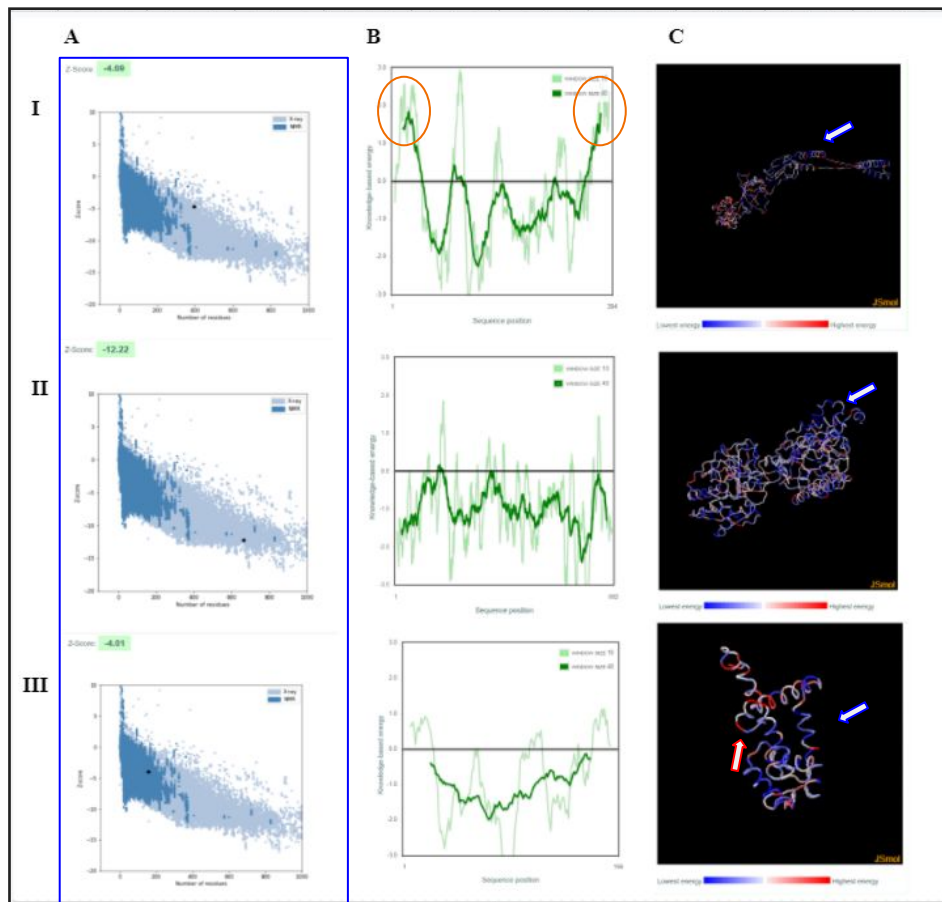


Fig A	ErmA	ArnA	MarR
Z-Score	-4.09	-12.22	-4.69

Proteína transportadora ABC de multidrogas
Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (
Wiederstein, et al.)

Residuos de energía positiva

Mendieta L, Navarro L, 2022

Residuos de energía negativa

Fig 13. Validación local, global y estructural de los modelos tridimensionales de EmrA(I), ArnA(II) y MarR(III) mediante ProSA-web. Gráficos de puntuación Z (A). Gráfico de energía de residuos (B). Representación visual de la energía en las estructuras tridimensionales mediante Jmol (C).

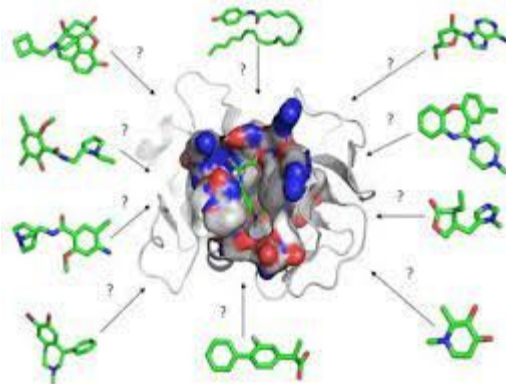
Conclusión

Las secuencias analizadas presentan un alto porcentaje de identidad con respecto a la cepa de referencia (PAO1), sin embargo, tienen mutaciones, lo que podría justificar la resistencia presentada relacionada a los genes estudiados en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Según el análisis de secuencias de los nucleótidos y proteínas, los genes estudiados no son conservados ya que muestra un amplio rango de diferencia, basados en los porcentajes de identidad obtenidos en el alineamiento, entre *Pseudomonas aeruginosa* y los ortólogos estudiados en cada caso.

Perspectivas

- De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las proteínas codificadas por los genes de interés se consideran posibles blancos terapéuticos. Teniendo en cuenta lo anterior, se podría dar continuación al estudio realizando Docking molecular para identificar moléculas que puedan inhibir dichas proteínas. Relacionado a esto, se puede complementar con un estudio a nivel *in vitro* donde se pueda continuar en el laboratorio la búsqueda de nuevos fármacos.



Agradecimientos y dedicatoria

Nuestros más sinceros agradecimientos:

- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Amigos y familiares por todos sus consejos
- Ruth Mélida Sánchez Mora por sus correcciones y participación
- Ibeth Cristina Romero Calderón

Este trabajo va dedicado a todas las personas que hicieron parte de este proceso, a nuestra familia siempre dispuesta a acompañarnos en las noches de desvelo, brindar su ayuda incondicional y fortalecernos en todo momento. A nuestros amigos, quienes nos acompañaron en este camino sin titubear. Especialmente, va dedicado a nuestra compañera y amiga Dayanna, que fue protagonista junto a nosotras de esta ilusión llamada proyecto desde el momento cero, quien ahora nos acompaña desde otro espacio del universo.

Referencias

1. Contributions of mutations in *acrR* and *marR* genes to organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. Watanabe R, Doukyu N. *AMB Expr* [online]. 2012; 58. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-58>
2. Lipid A-Ara4N as an alternate pathway for (colistin) resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Pakistan. Masood K, Umar S, Hasan Z et al. *BMC Res Notes* [online]. 2021; 449 (14). [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05867-3>
3. Gatzeva-Topalova P, May A, Sousa M. Crystal structure of *Escherichia coli* ArnA (PmrI) decarboxylase domain. A key enzyme for lipid A modification with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and polymyxin resistance. *Biochemistry* [online]. 2004 Oct 26; 43(42): 13370-9. [Cited 2021 Aug 23]. Available in: doi: 10.1021/bi048551f
4. Rhoda Nsen B, Marie Christine F, Wilfred Fon M. Whole-genome sequence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains UY1PSABAL and UY1PSABAL2 isolated from human broncho-alveolar lavage, Yaoundé, Cameroon [online]. 2020. [Cited 2021 Jul 19]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32886694/>
5. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang P, Andersson D. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2020; 75 (2): 300-308. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz434>
6. Heacock-Kang Y, Sun Z, Zarzycki-Siek J, et al. Two Regulators, PA3898 and PA2100, Modulate the *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistance MexAB-OprM and EmrAB Efflux Pumps and Biofilm Formation. *Antimicrob Agents Chemother*. [online]. 2016. [Cited 2021 Aug 23]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6256797/>