



# **Caracterización molecular y bioquímica de la enzima Cisteína sintasa en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.**

Presentación de Proyecto de grado para optar al título de Bacterióloga y laboratorista Clínico

**Farfán Gómez Laura Nicole**

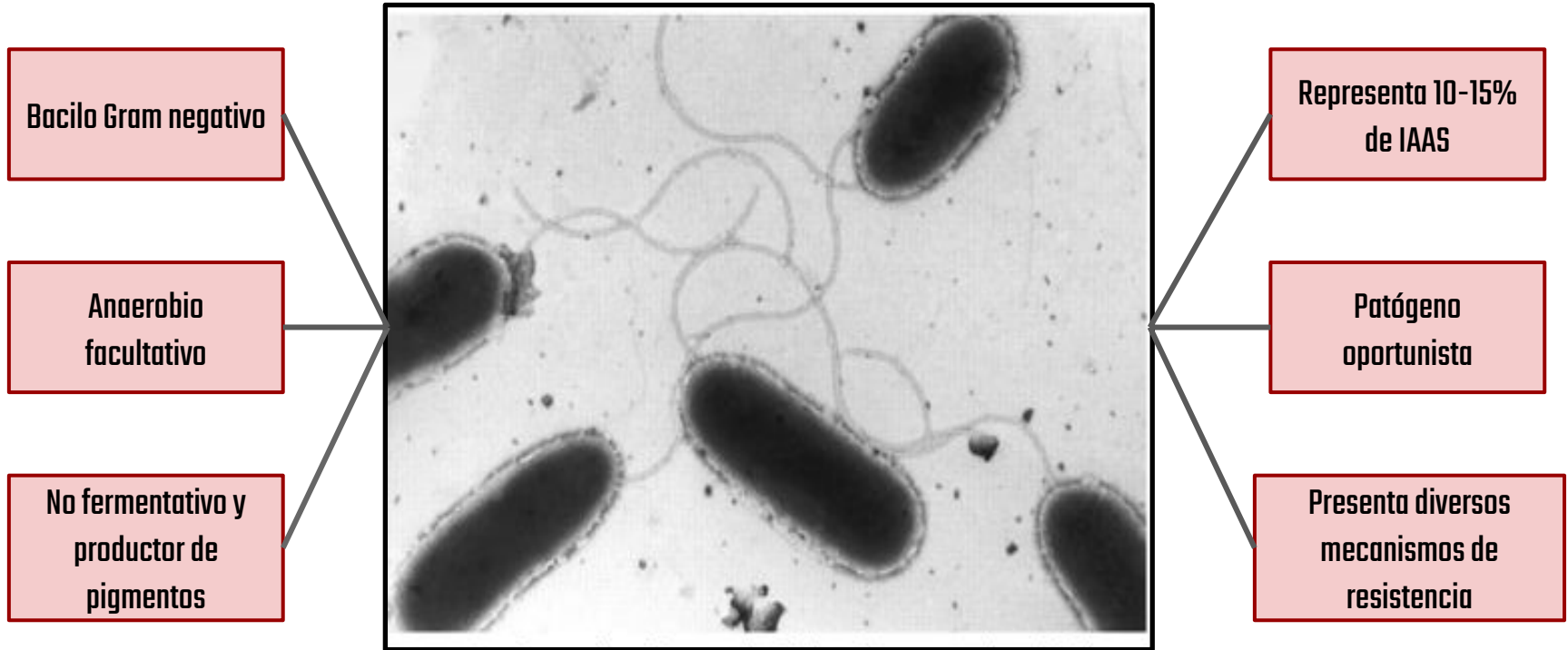
**Molina Serna Karen Tatiana**

Asesora interna:

**Ibeth Cristina Romero Calderón**

**Bacterióloga, MSc., PhD.**

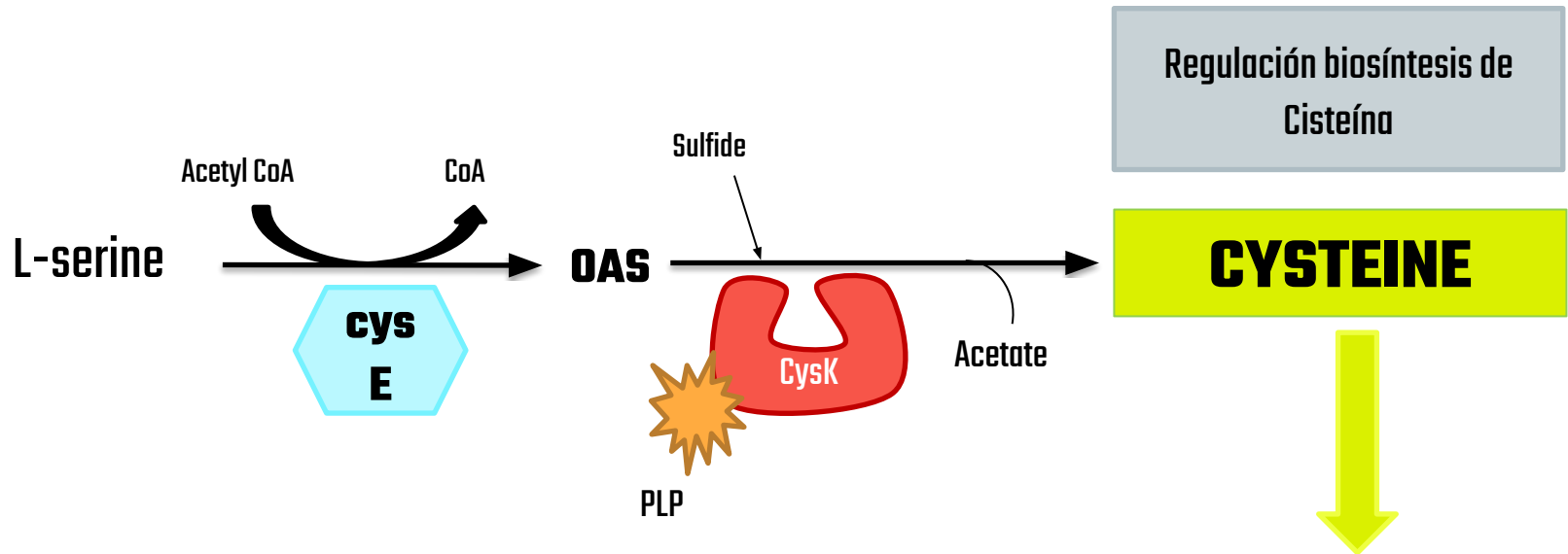
# ¿ Quien es *Pseudomonas aeruginosa* ?



Electromicrografía de *P. aeruginosa* en la que se aprecia el flagelo polar (Cabrera Y. 2016)

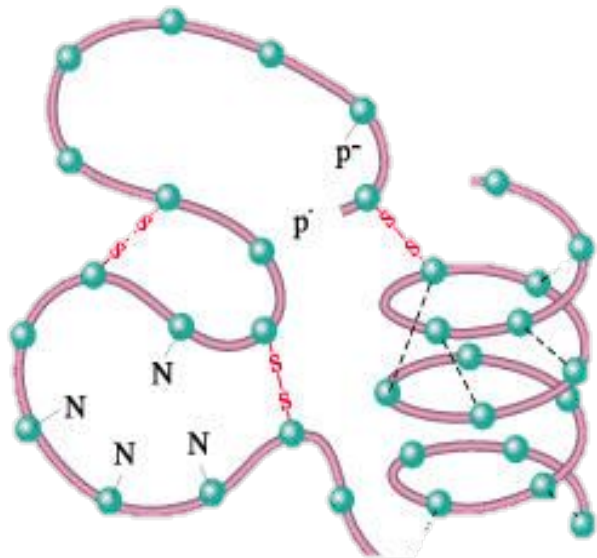
# ¿Por qué estudiar Cisteína Sintasa?

## Ruta Biosintética *de novo*



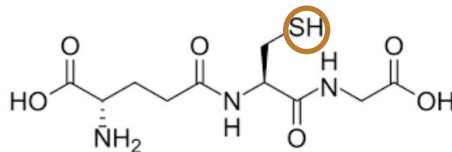
# Funciones de la Cisteína

Importante en plegado ensamblaje y estabilidad de proteínas

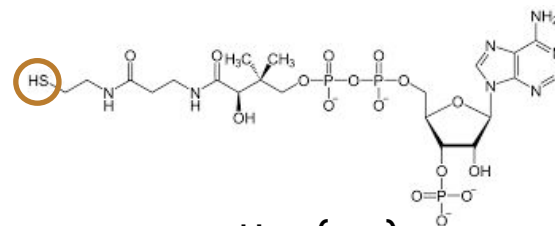


Bloque básico para la síntesis de tioles

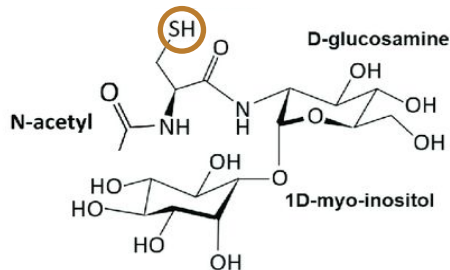
Glutathione (GSH)



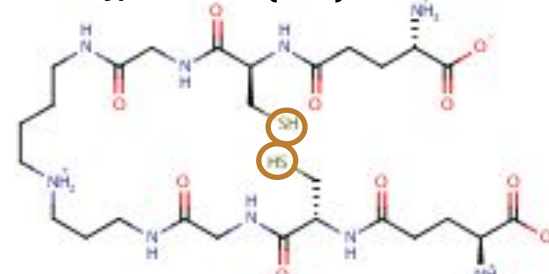
Coenzyme A (CoASH)



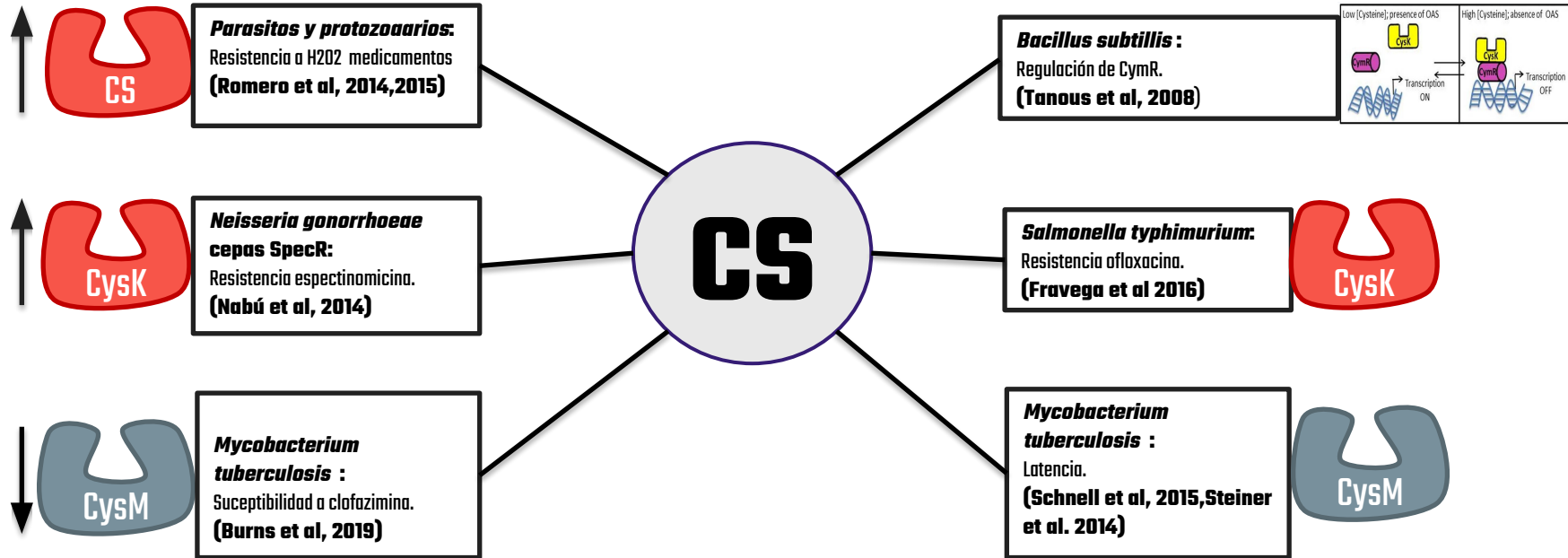
Mycothiol (MSH)



Trypanothione (TSH2)



# Cisteína sintasa en otros microorganismos



# Pregunta de investigación

¿ Cuáles son las características moleculares y bioquímicas *in silico* de Cisteína sintasa en *Pseudomonas aeruginosa* que permiten proponer a esta enzima como blanco terapéutico ?

# Objetivo general

Caracterizar molecular y bioquímicamente la enzima Cisteína Sintasa de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.

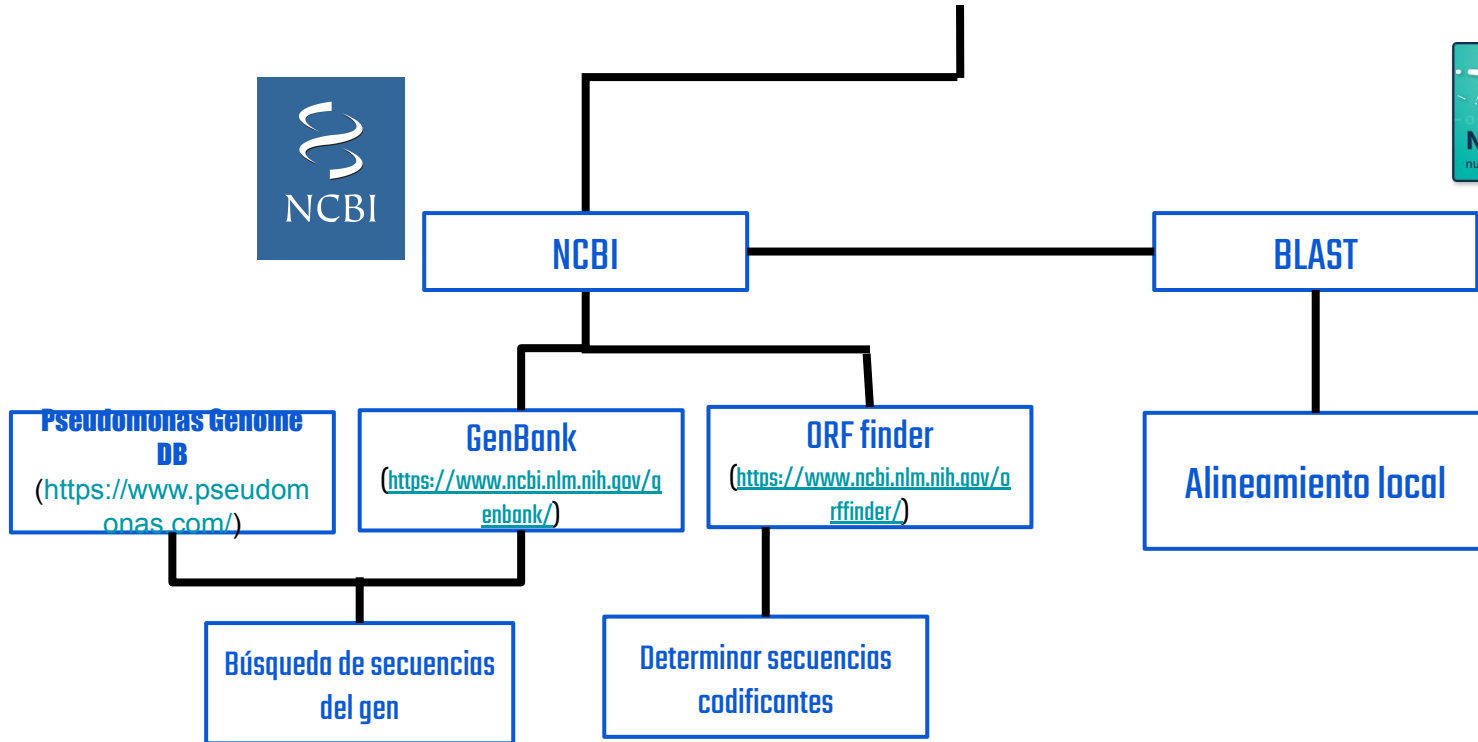


# Objetivos específicos

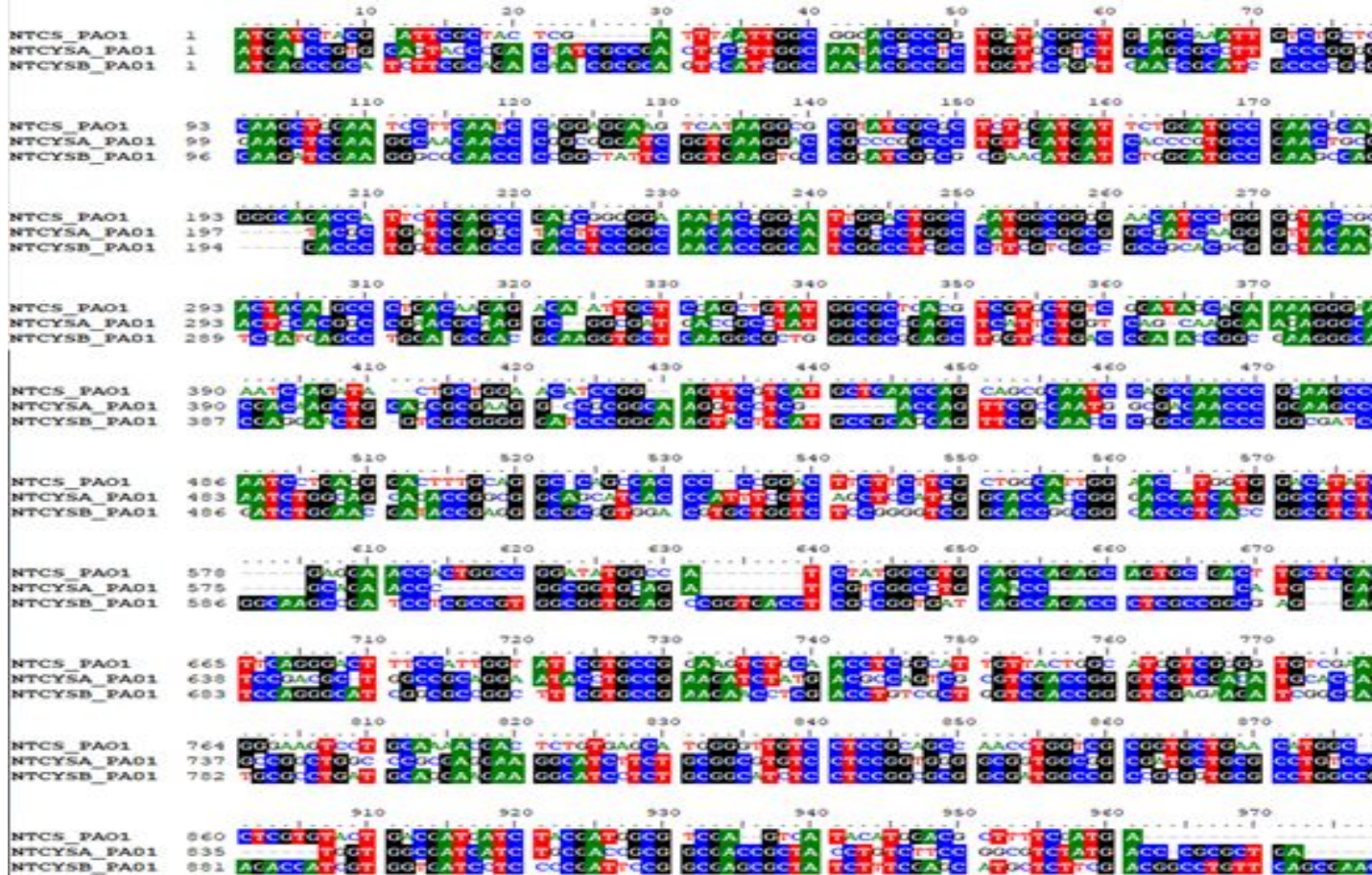
1. Identificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima Cisteína sintasa (CS) en *P. aeruginosa* y establecer la similitud que tiene con ortólogos.
2. Determinar la secuencia y características moleculares de la proteína CS de *P. aeruginosa*, mediante herramientas bioinformáticas
3. Analizar filogenéticamente las secuencias proteicas de CS en *P. aeruginosa* y establecer su evolución con respecto a las ortólogas presentes en otros organismos.
4. Predecir la estructura tridimensional de la proteína CS de *P. aeruginosa*, identificando los dominios y motivos de unión al sustrato natural.



# Metodología OBJ. 1



# Alineamiento múltiple (Secuencias de nucleótidos de CS en *P. aeruginosa*)



CYSA  
975 nt

CYSB  
900 nt

CS  
918 nt

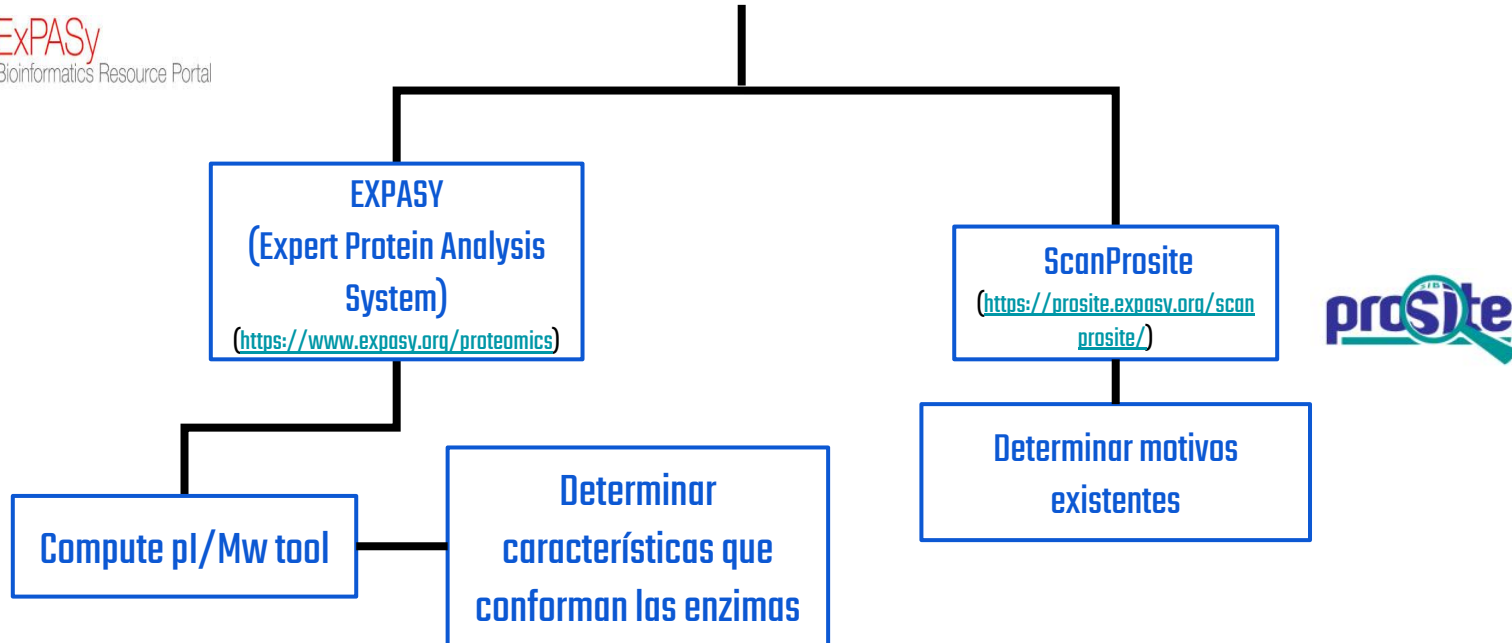
30% de  
similitud entre  
las secuencias

Campini et al (2005)  
Wael et al (2004)  
Agren et al (2009)

# Objetivos específicos

1. Identificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima Cisteína sintasa (CS) en *P. aeruginosa* y establecer la similitud que tiene con ortólogos.
2. Determinar la secuencia y características moleculares de la proteína CS de *P. aeruginosa*, mediante herramientas bioinformáticas
3. Analizar filogenéticamente las secuencias proteicas de CS en *P. aeruginosa* y establecer su evolución con respecto a las ortólogas presentes en otros organismos.
4. Predecir la estructura tridimensional de la proteína CS de *P. aeruginosa*, identificando los dominios y motivos de unión al sustrato natural.

# Metodología OBJ. 2



# Características generales para las enzimas CS, CysA y CysB

PARÁMETRO	RESULTADO		
	CS	CYSA	CYSB
NÚMERO DE AMINOACIDOS	305	324	299
PUNTO ISOELÉCTRICO TEÓRICO (pI)	5.84	6.24	5.54
PESO MOLECULAR (Da)	32753.69	34309.62	32447.98
No DE RESIDUOS CON CARGA NEGATIVA (Asp+Glu) %	30	35	38
No DE RESIDUOS CON CARGA POSITIVA (Arg+Lys) %	24	34	33
TOTAL DE ÁTOMOS	4617	4877	4550
ÍNDICE DE INESTABILIDAD	38.1	34.49	32.44
ÍNDICE ALIFÁTICO	102.62	94.57	86.82
GRAVY	0.094	-0.037	-0.268

Naturaleza ácida

Termoestables

Hidrofílicas y solubles

# Dominios típicos de las enzimas CysA, CysB y Cys

I found: 1 hit in 1 sequence


USERSEQ1 (324 aa)

```
MSRIFADNAQSIGNTPLVQINRIAPRGVITLAKIEGRNPGYSVKCRIGANMIDAEASGRLLKSGMT  
LVEPTSGNTGIGLAFVAAAARGYKLLITMPASMSLERRRVLRKALGAEVLVTEPAKGMKGAIQKAEEL  
VAGDPPGKYFMPQQFDNIPANPAIHEKTTGPEIIMDTEGAVDVLVSGVGTGGTLT  
ILAVAVEPVTSPVISQTLAGEEVKPAHKIQGGIGAGFVPKNLDLSLVDRVEKIGD  
QEEGILCGISSGAAMAAVRLAEEPNMQGKTIWVILPDSGERYLSMFLFDGLFSEQL
```

II found: 1 hit in 1 sequence

USERSEQ1 (299 aa)

```
MTVQYPTIADCVGNTPLVRLQRLPGETSNTLLVKLEGNIPAGSVKDRPALSMITRAELRGDIRPGD  
TLIEATSGNTGIALAMAAAIGKYKMLIMPONSTAERKAAMTYAGRELILVSKKEGMEGARDLADK  
LQREGRGKVLDDQFANGDINPEAHYHSTGPEIMQQTGGSIHFVSSMGTTGTIMGVSRYLKEQNPVAVQ  
IVGLQPMEGSAIPGIRRHQPQEYLPKIYDASRVDRVVDHMQDEAEDIHRRRLAREEGIFCGVSSGGAV  
AAMLRLSRELENAVLVAIICORGDORYLSSGVYDPR
```

III  ScanProsite Results Viewer

Output format: Graphical view - this view shows ScanProsite results together with ProRule-based pro

Hits for all PROSITE (release 2020\_01) motifs on sequence USERSEQ1 :

no hit!

CysA y Cys B  
muestran dominios  
típicos de PLP

**PXXSVKDR**

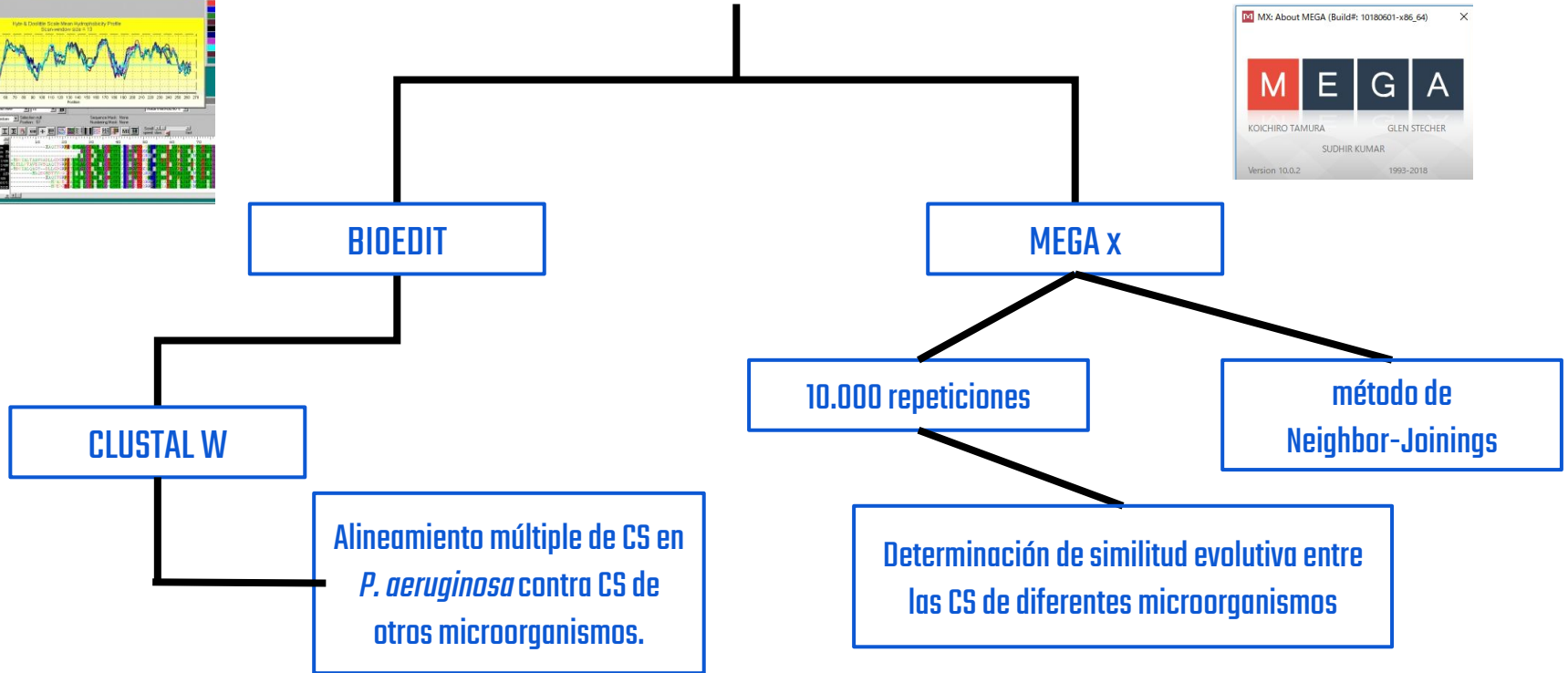
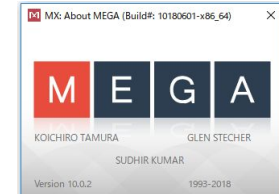
Cys no mostró  
ningún HIT

Satendra *et al* (2013)  
Romero *et al* (2014)

# Objetivos específicos

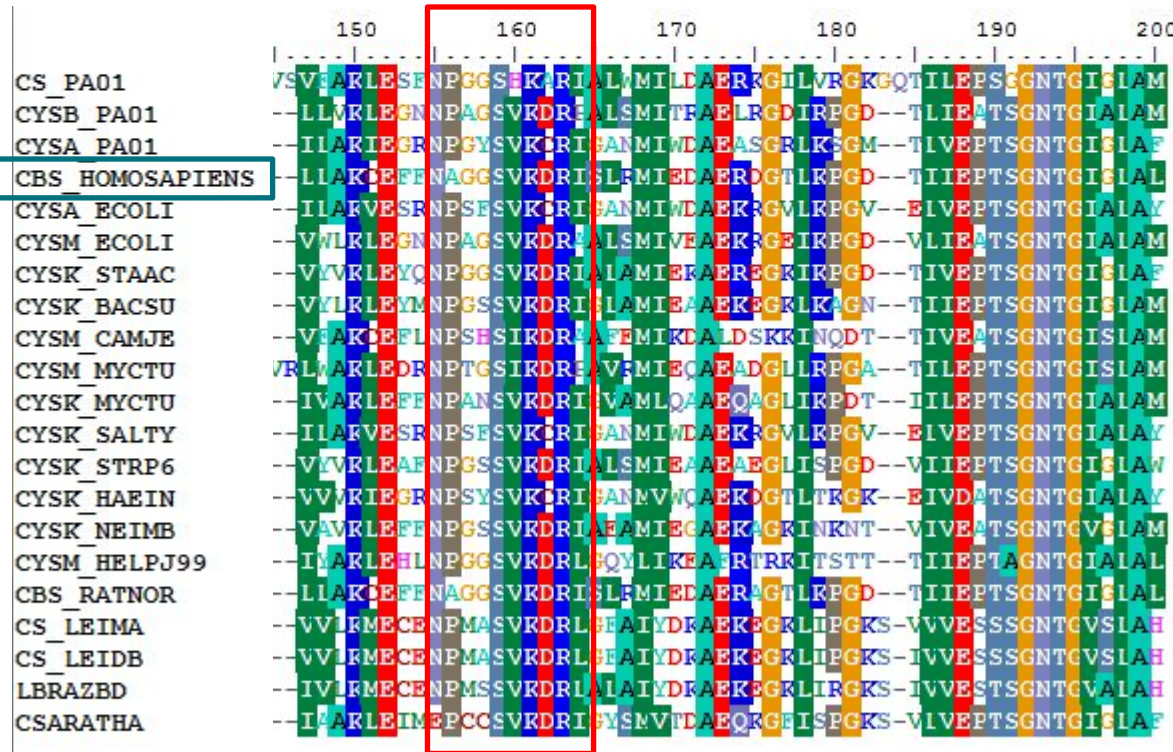
1. Identificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima Cisteína sintasa (CS) en *P. aeruginosa* y establecer la similitud que tiene con ortólogos.
2. Determinar la secuencia y características moleculares de la proteína CS de *P. aeruginosa*, mediante herramientas bioinformáticas
3. Analizar filogenéticamente las secuencias proteicas de CS en *P. aeruginosa* y establecer su evolución con respecto a las ortólogas presentes en otros organismos.
4. Predecir la estructura tridimensional de la proteína CS de *P. aeruginosa*, identificando los dominios y motivos de unión al sustrato natural.

# Metodología OBJ. 3



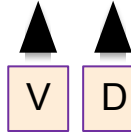


# Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de CS de *Pseudomonas aeruginosa* y otros organismos



Motivo de unión a fosfato de piridoxal-PLP (PXSVKDR)

CS

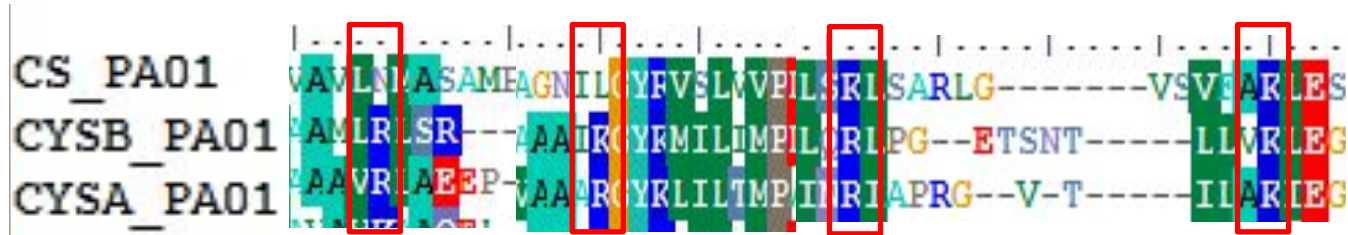


CS *Pa* VS cs ORTOLOGOS > 70%

CS *Pa* VS cβs humana < 30%

Satendra *et al* (2013)  
Katharina *et al* (2016)  
Guedon *et al* (2017)

# Alneamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de CS de *Pseudomonas aeruginosa* y otros organismos



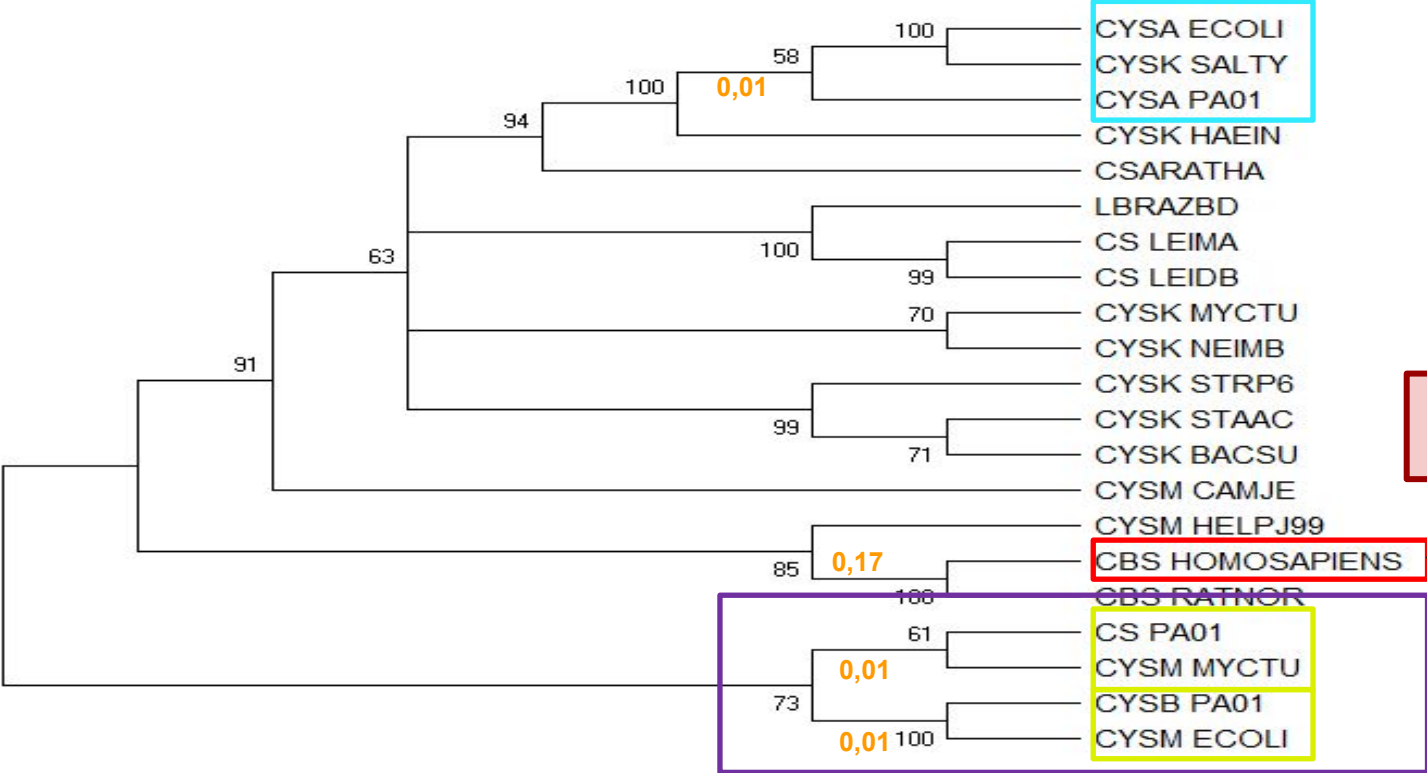
Residuos de lisina

CS

2 DE LOS 4  
RESIDUOS

Romero *et al* (2014)

# ¿ Se relaciona el gen de Cs de *P. aeruginosa* con el gen de Cs en otros microorganismos?

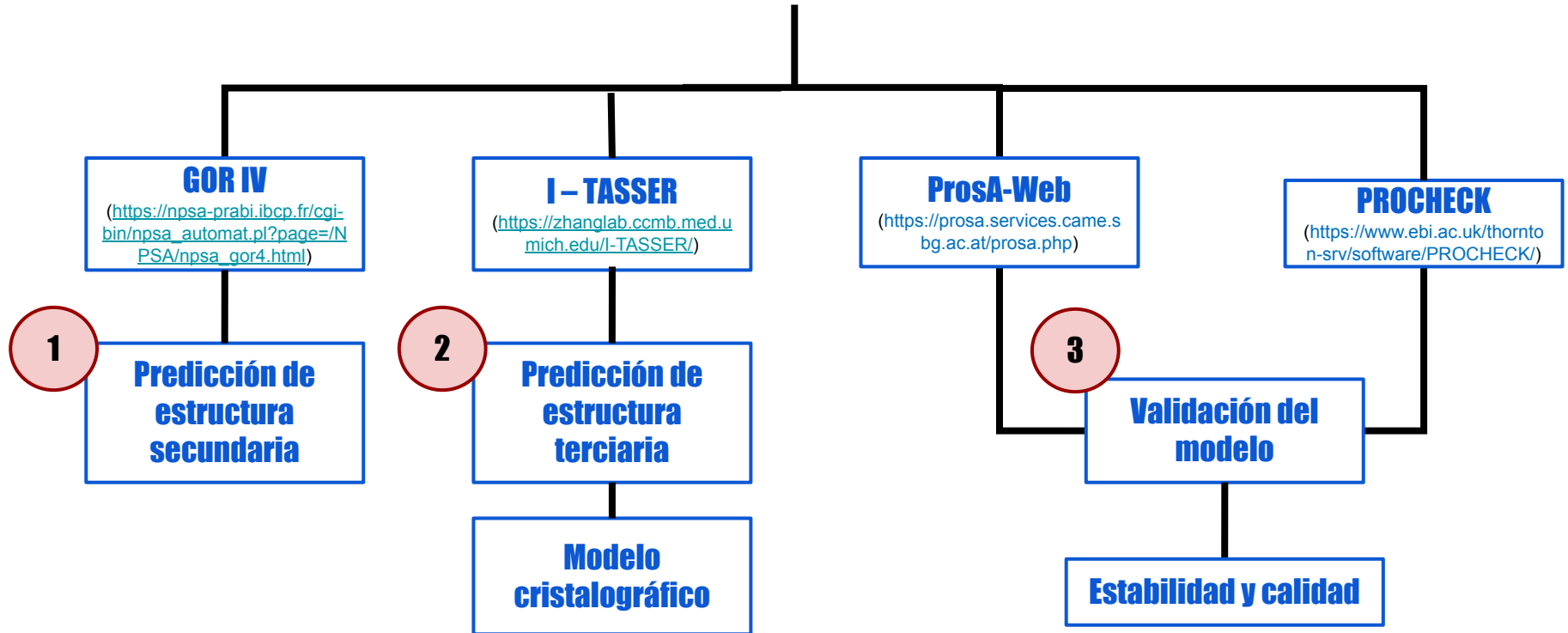


No se relaciona con ninguna

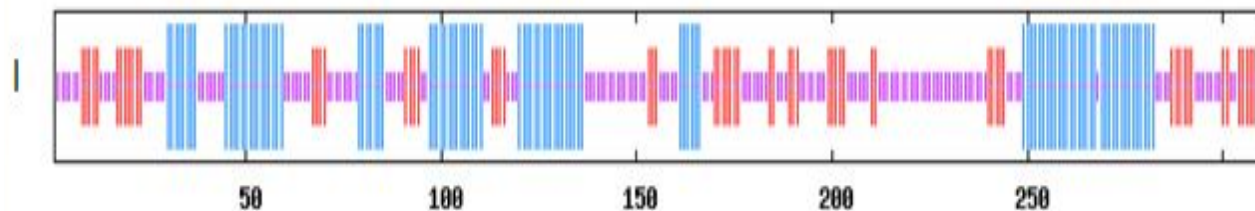
# Objetivos específicos

1. Identificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima Cisteína sintasa (CS) en *P. aeruginosa* y establecer la similitud que tiene con ortólogos.
2. Determinar la secuencia y características moleculares de la proteína CS de *P. aeruginosa*, mediante herramientas bioinformáticas
3. Analizar filogenéticamente las secuencias proteicas de CS en *P. aeruginosa* y establecer su evolución con respecto a las ortólogas presentes en otros organismos.
4. Predecir la estructura tridimensional de la proteína CS de *P. aeruginosa*, identificando los dominios y motivos de unión al sustrato natural.

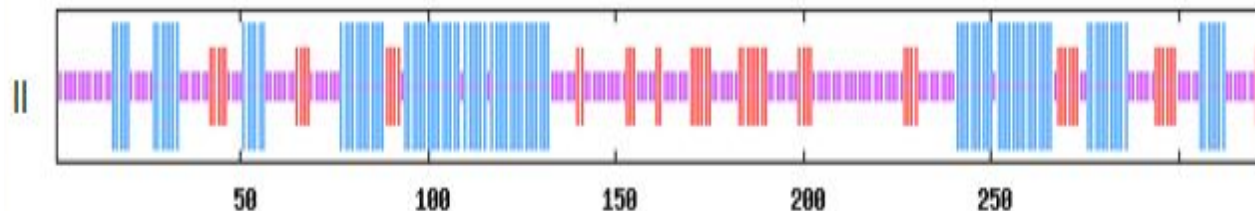
# Metodología OBJ. 4



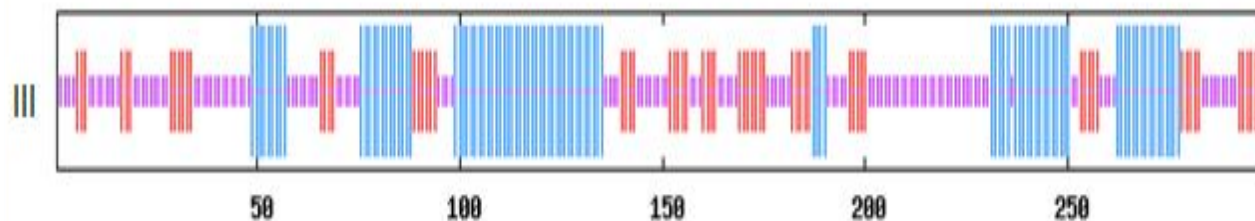
# Predicción de estructura secundaria CysA, CysB y Cys



Cys A  
33,95% hélices Alfa  
17,28 % láminas Beta



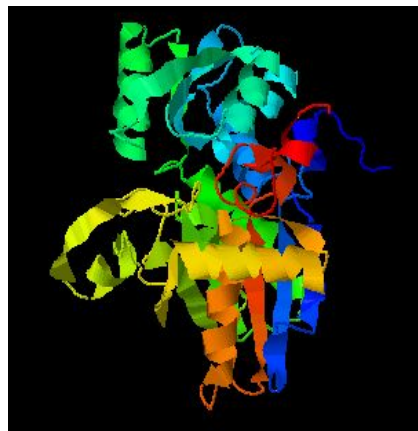
Cys B  
32,78% hélices Alfa  
22,74 % láminas Beta



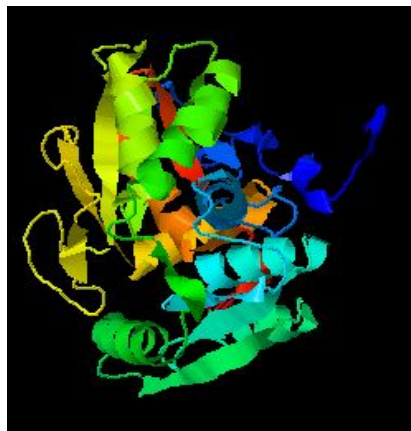
Cys  
32,26% hélices Alfa  
20,65% láminas Beta

# Modelo 3D de Cisteína sintasa en *P. aeruginosa*

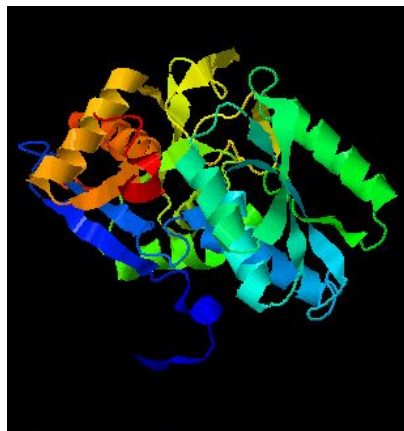
CysA



CysB



CS



C-SCORE

-5 a 2

TM-SCORE

>0,5

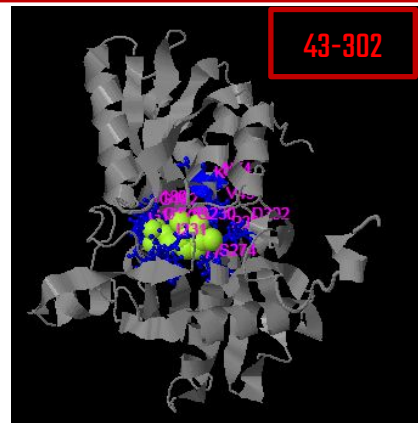


CysA: C-score: 1,65  
TM-score: 0.95

CysB: C-score: 1,35  
TM-score: 0.90

Cys: C-score: 1,81  
TM-score: 0.97

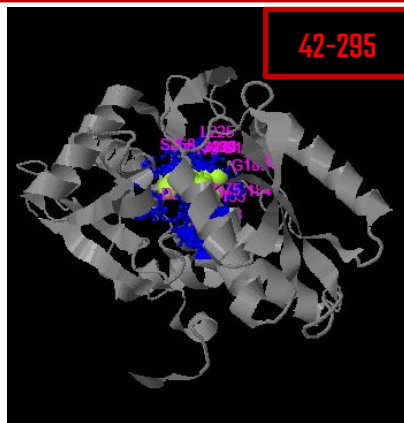
43-302



44-285



42-295



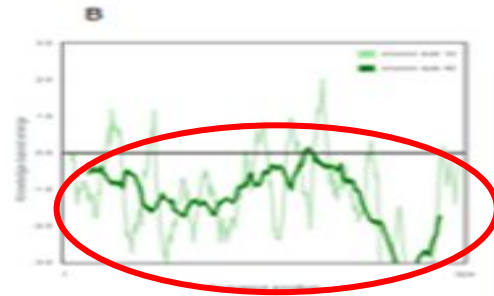
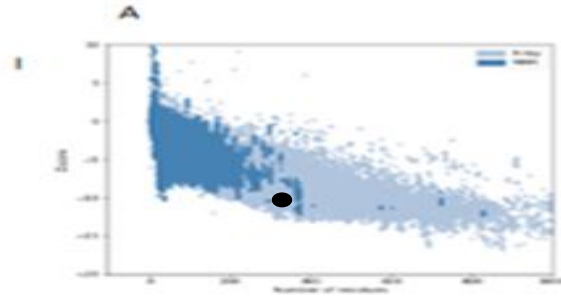
*al*(2013)

Romero *et al* (2014,2015)



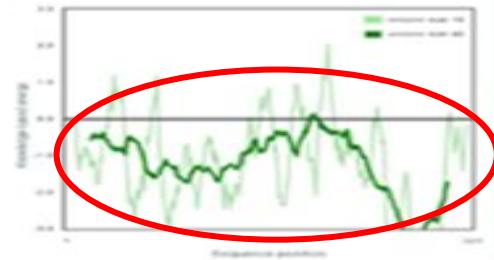
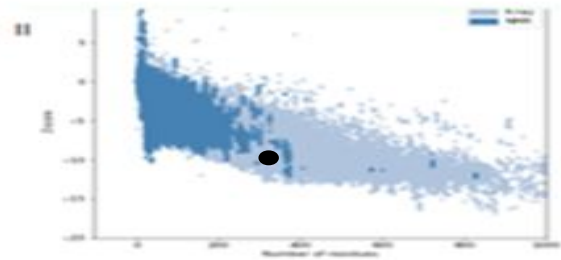
# Validación del modelo mediante ProSA-web

Z-Score CS  
-9.48



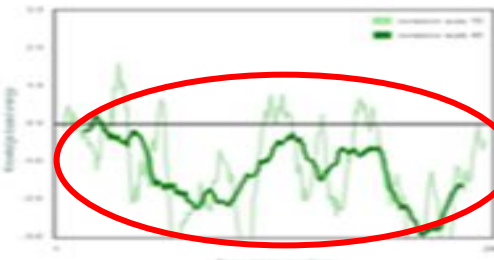
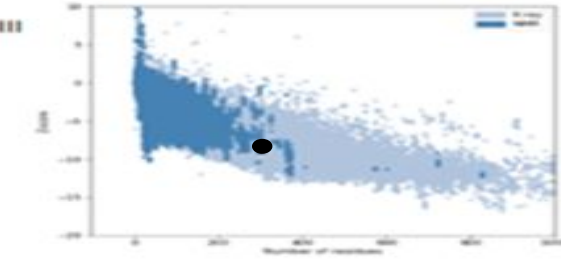
Puntaje dentro del rango

Z-Score CSA  
-10.04



Energías de residuos negativas

Z-Score CSB  
-8,97

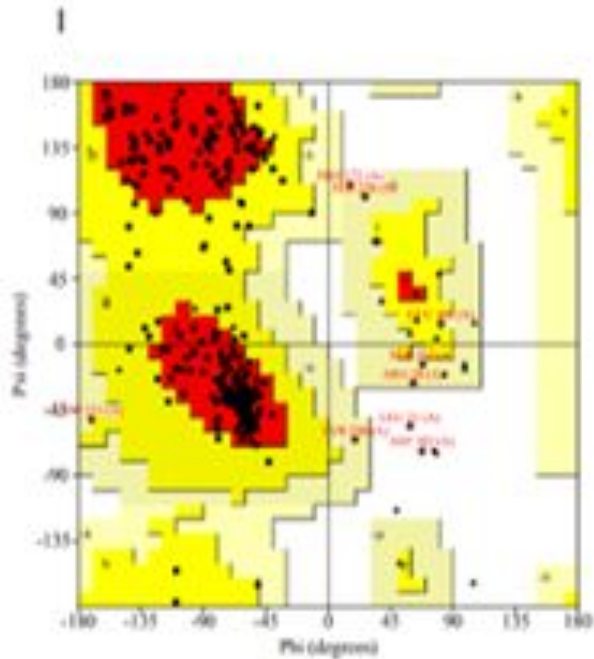


Los modelos tienen una calidad razonablemente buena

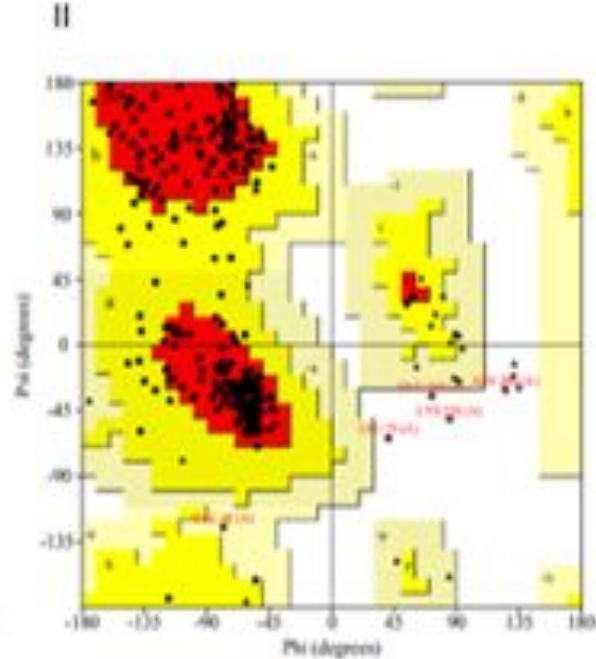
Benoni *et al* (2017)  
Wiederstein *et al* (2007)



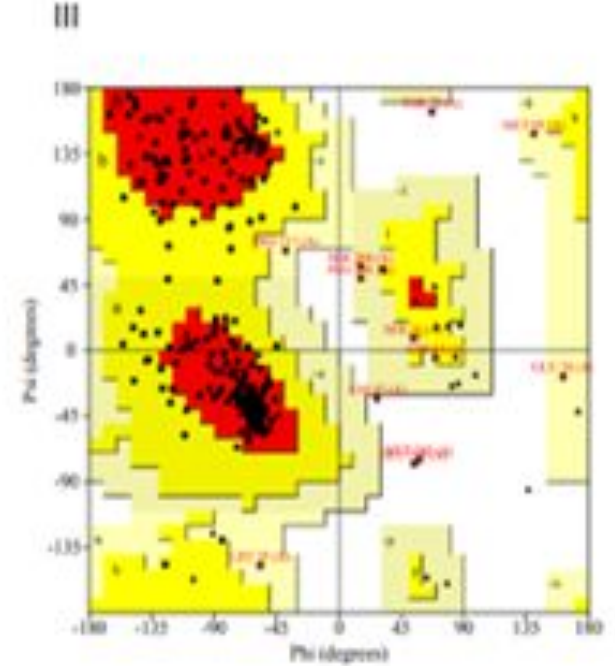
# ¿ Cisteína sintasa en *P. aeruginosa* es estable?



Regiones favorables  
Cys- 82,7%



Regiones favorables  
CysA- 85,8%



Regiones favorables  
CysB- 80,2%

# Conclusiones

**1.** El análisis bioinformático comparativo de la enzima Cisteína Sintasa en la bacteria *P. aeruginosa*, indicó que está puede tener una alta estabilidad y funcionalidad en este microorganismo, sugiriendo que la vía biosintética de Novo está presente en este microorganismo como vía para la síntesis de Cisteína.

**2.** Cisteína sintasa tiene una gran proyección como blanco farmacológico, pues presenta todas las características estructurales descritas en otros microorganismos, además porque la similitud con respecto a su homólogo más cercano en el humano la CBS es muy baja.

**3.** La búsqueda y caracterización de blancos farmacológicos a partir de la bioinformática abre una ventana de posibilidades, para el desarrollo de nuevas terapias ya que permite conocer las características moleculares y bioquímicas del blanco, además predecir y orientar, como pueden interaccionar los candidatos farmacológicos y sus respectivos sitios de unión a una proteína.

# PERSPECTIVAS A FUTURO

Diseño racional de  
medicamentos



Base sobre la cual se pueden generar  
nuevos estudios bioinformáticos por  
ejemplo búsqueda de inhibidores por  
medio de Docking molecular

Abrir una línea de investigación a  
cargo de área de biotecnología a nivel  
de biología molecular

LLEVAR LA CARACTERIZACION  
INSILICO A IN VITRO