Estudio de los sistemas de *quorum sensing* en *Stenotrophomonas maltophilia*, implicación en la virulencia y perspectivas en el diseño de fármacos antibacterianos

Daniel Yero, Pol Huedo, Sonia Martínez-Servat, Paula Martínez, Oscar Conchillo-Solé, Xavier Daura e Isidre Gibert

Grupo de Genética Molecular y Patogénesis Bacteriana
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina y Departament de Genètica i de Microbiologia.
Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici Mòdul B, Parc de Recerca UAB. Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona

Isidre.Gibert@uab.cat

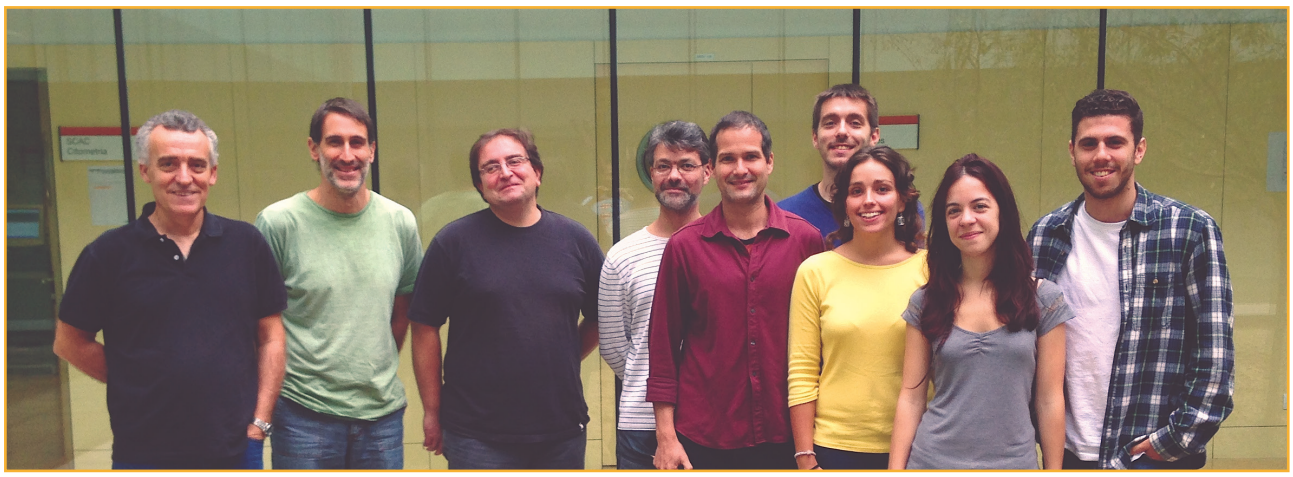


Foto de grupo. De izquierda a derecha: Isidre Gibert, Xavier Daura, Òscar Conchillo, Lionel Costerano, Daniel Yero, Michael Cristòfol, Sònia Martínez-Servat, Miriam Navarro, Sergi Arredondo, actuales integrantes del grupo.

INTRODUCCIÓN: ANTECEDENTES

En los últimos años *Stenotrophomonas maltophilia* ha emergido como patógeno nosocomial oportunista multirresistente que puede ocasionar importantes infecciones en pacientes inmunodeficientes y en inmunosuprimidos, aumentando cada año el número de aislamientos en todo el mundo (Brooke, 2014). Generalmente está asociada a infecciones del tracto respiratorio pero también puede causar bacteremia e infecciones localizadas. Los pacientes con fibrosis quística también son colonizados/infectados por *S. maltophilia*. En España existe poca información sobre el papel de esta bacteria en las infecciones nosocomiales pero un estudio retrospectivo relativamente reciente, mostró que *S. maltophilia* es uno de los 15 patógenos microbianos más comunes en infecciones nosocomiales (EPINE, 2013), aunque lo más alarmante de estos estudios es el incremento de cepas resistentes a múltiples drogas (MDR).

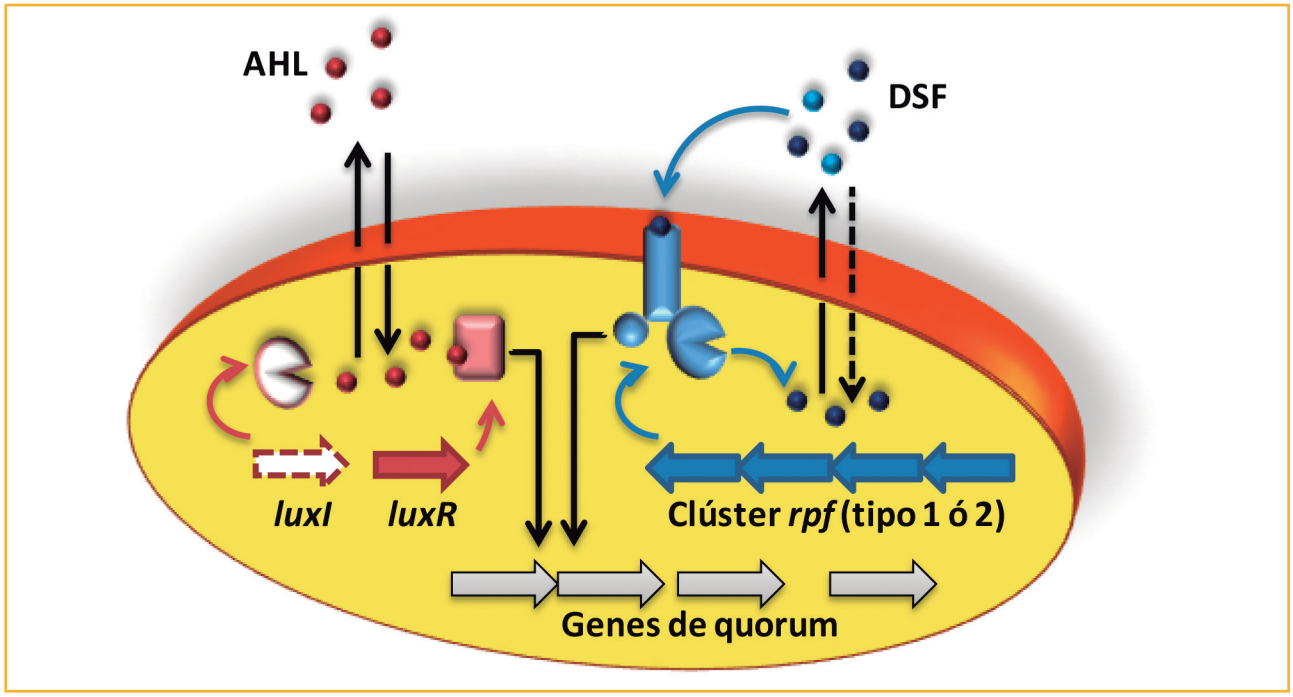
Actualmente se conoce poco acerca de los principales mecanismos de virulencia de *S. maltophilia* y, aunque comparte algunos factores de virulencia con *Pseudomonas aeruginosa,* el potencial de virulencia de las principales cepas circulantes se desconoce. Entre otros factores de virulencia expresa la fimbria tipo I y el flagelo produce y secreta un amplio rango de enzimas, incluyendo DNasa, RNasa, fibrolisina, lipasas, proteasas y esterasas (Crossman, 2008). La formación de biofilm por esta bacteria nosocomial es uno de sus principales mecanismos de virulencia y resistencia. Mucho más recientemente se ha identificado una molécula llamada *«diffusible signal factor»* (DSF) que parece asumir el control de la expresión de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana actuando como un señalizador del contacto célula-célula y sensor de la densidad celular (*quorum sensing,* QS). Tanto la formación de biofilm como la regulación de los mecanismos de QS influyen, además de en la virulencia, en el abanico de resistencias que cada vez más poseen estos organismos oportunistas.

El sistema de QS descrito con anterioridad para *S. maltophilia,* se fundamenta en el DSF, un ácido graso, como molécula señal (Deng *et al,* 2011). La sintasa de DSF es la RpfF, una enoil-CoA hidratasa incluida en el clúster *rpf*. Este clúster codifica para todos los componentes necesarios para la síntesis y la detección del DSF, como la proteína RpfC, que tiene un dominio sensor de DSF y un dominio efector. Este complejo bloquea la producción de DSF tanto a nivel de DNA, controlando la expresión de *rpfF,* como a nivel de proteína, bloqueando el dominio catalítico de la RpfF a través del dominio REC de la proteína RpfC (Figura). Sin embargo, los mecanismos implicados en la regulación del sistema DSF en *S. maltophilia* son poco conocidos. Además, el mecanismo de QS más estudiado en las proteobacterias, que utiliza como molécula señal las llamadas N. acil homoserina lactonas (AHLs), no había sido descrito con anterioridad en *S. maltophilia*.

RESULTADOS CIENTÍFICOS DEL GRUPO

Nuestro grupo está inmerso en un proyecto que se propone la búsqueda y estudio de determinantes de virulencia en *S. maltophilia,* profundizando en el conocimiento funcional de los procesos de patogénesis de esta bacteria. En particular, nos enfocamos en procesos fisiológicos no esenciales y de elementos reguladores de la expresión génica como determinantes intrínsecos de virulencia, teniendo el fenómeno de *quorum sensing* como objetivo principal. Con un enfoque pan-genómico pretendemos descubrir nuevos factores de virulencia que si bien no pertenezcan a procesos celulares esenciales, estén conservados en todas las cepas, para un futuro diseño de estrategias antimicrobianas de amplio espectro.

A partir de los genomas de *S. maltophilia* disponibles en las bases de datos, y secuencias genómicas parciales de



Sistemas de *quorum sensing* en *Stenotrophomonas maltophilia*. En rojo se muestra el sistema basado en la molécula AHL (el gen para una AHL-sintasa no ha sido descrito aún) y en azul el sistema basado en la molécula DSF. Ambos sistemas, mediante moléculas reguladoras, modifican la expresión de genes específicos de QS, muchos de ellos involucrados en fenotipos relacionados con la virulencia. Las células pueden tener el clúster *rpf* de tipo 1 o de tipo 2, con distintos pares de genes *rpfF/rpfC* (ver texto). En la membrana se representa el complejo formado por RpfC y RpfF y la proteína reguladora RpfG. Probablemente ambos sistemas *rpf* estén involucrados en la síntesis, percepción o la regulación de moléculas señalizadoras diferentes.

aislados clínicos obtenidas por nuestro grupo (Huedo *et al,* 2014a), hemos observado, en primer lugar, la presencia de dos variantes distintas del la sintasa RpfF, RpfF-1 y RpfF-2 (Huedo *et al,* 2014b). De las cepas analizadas hasta el momento, aproximadamente el 60 % contienen la RpfF-1 mientras que el 40 % restante posee la RpfF-2. Además, cada variante RpfF tiene asociada una RpfC. Utilizando un bioensayo con una cepa reportera, hemos constatado que sólo las cepas pertenecientes al grupo con la variable RpfF/C-1 presentan actividad DSF (Huedo *et al,* 2014b). La caracterización fenotípica realizada en los aislados hospitalarios sugiere que la pertenencia a una población con una variante u otra (RpfF/C-1 o RpfF/C-2) tiene implicaciones en la virulencia. Esto se ha validado en ensayos de infección en pez cebra *(Danio rerio)* así como con el gusano *Caenorhabditis elegans,* dos modelos animales que han sido estandarizados en nuestros laboratorios para *S. maltophilia* (Huedo *et al,* 2014b y Ferrer-Navarro *et al,* 2013). Mediante el uso de mutantes específicos se ha confirmado la implicación de dicho sistema en la virulencia, en la motilidad bacteriana y en la formación de biofilm. Además hemos demostrado que la represión de la síntesis de DSF en las cepas con la variante RpfF/C-2 se debe a que su RpfC solo se activa cuando detecta el propio DSF. Sin embargo, en las cepas del tipo RpfF/C-1, RpfC es más promiscua. La diversidad del sistema de QS basado en DSF en *S. maltophilia* abre la puerta a la idea de que posiblemente ambas variantes RpfF sinteticen moléculas distintas, e impliquen una regulación propia. En este supuesto, estaríamos delante de un nuevo sistema de comunicación celular basado en moléculas lipídicas tipo DSF.

Además, nuestro laboratorio está trabajando también en el estudio de sistemas de QS basado en AHLs en *S. maltophilia*. Así, y contrariamente a lo reportado en la bibliografía, hemos sido capaces de detectar la producción de moléculas tipo AHL a partir de concentrados de sobrenadantes de cultivos. Mediante bioensayos con cepas reporteras y posterior análisis químico, hemos identificado más de un tipo de molécula de AHL. Este descubrimiento supone un avance importante y un buen punto de partida para determinar la posible implicación de este nuevo sistema de comunicación celular en la regulación de la virulencia en *S. maltophilia*. Así, *S. maltophilia* se suma al grupo de bacterias que presentan ambos sistemas de QS: el basado en las moléculas DSF y el basado en moléculas AHL (Figura). Actualmente, y mediante la combinación del análisis *in silico* de los genomas secuenciados con la caracterización de mutantes en genes específicos, se buscan las posibles sintasas que participan en la producción de estas AHLs.

Paralelamente al estudio de los sistemas de QS, nuestro grupo, en colaboración con diferentes hospitales, participa en la caracterización fenotípica y genotípica de aislados clínicos de *S. maltophilia*. Los perfiles genéticos (datos de MLST) y datos clínicos de las cepas se correlacionan con sus fenotipos relacionados con la resistencia y la virulencia, en particular el mecanismo de QS. De este modo se seleccionan cepas modelo para posteriores estudios comparativos. Por ejemplo, la comparación proteómica de tres cepas clínicas de *S. maltophilia* con una cepa atenuada identificó posibles nuevos factores de virulencia dentro de los que se incluyó Ax21, una proteína regulada por el QS (Ferrer-Navarro *et al,* 2013). Además contamos con plataformas bioinformáticas que permiten hacer estudios de genómica comparada para la búsqueda de nuevas dianas de drogas antibacterianas (Panjkovich, 2014) o proteínas inmunogénicas. Mediante genómica comparada hemos identificado 357 genes exclusivos de una cepa clínica virulenta de *S. maltophilia,* entre los que se encuentran posibles factores de virulencia (Huedo *et al,* 2014a).

PERSPECTIVAS FUTURAS

La caracterización molecular y funcional de nuevos factores de virulencia en *S. maltophilia* deben sentar las bases que permitan desarrollar estrategias eficaces en el control de las infecciones causadas por este patógeno emergente. La busca de inhibidores de los diferentes sistemas de QS forma parte de las estrategias actuales de diseños de drogas antibacterianas. Esto ha abierto las puertas al diseño de drogas «inteligentes» que afecten la virulencia de los patógenos pero que no creen resistencias. El uso de la genómica comparada permitirá también descubrir mecanismos nuevos de resistencia a drogas antibacterianas, que es también unos de los objetivos principales de nuestro grupo.

BIBLIOGRAFÍA

Brooke JS. (2014). New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia:* a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. Expert Rev Anti Infect Ther. 12:1-4.

Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebaihia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream M-A, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR y Avison MB. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biol. 9:R74

Deng Y, Wu J, Tao F y Zhang LH. (2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. Chem Rev. 111:160-73.

EPINE. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene (2013). Estudio de prevalencia de las infecciones nasocomiales en los hospitales españoles. EPINE-2013., p. 38 pp.

Ferrer-Navarro M, Planell R, Yero D, Mongiardini E, Torrent G, Huedo P, Martínez P, Roher N, Mackenzie S, Gibert I y Daura X. (2013). Abundance of the Quorum-Sensing Factor Ax21 in Four Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* Correlates with Mortality Rate in a New Zebrafish Model of Infection. PLoS One 8:e67207.

Huedo P, Conchillo-Solé O, Yero D, Martínez-Servat S, Daura X y Gibert I. (2014a). Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain M30, Isolated from a Chronic Pressure Ulcer in an Elderly Patient. Genome Announc. 2:e00576-14.

Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, Estibariz I, Planell R, Martínez P, Ruyra A, Roher N, Roca I, Vila J, Daura X y Gibert I. (2014b). Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. J Bacteriol. 196:2431-42.

Panjkovich A, Gibert I y Daura X. (2014). antibacTR: dynamic antibacterial-drug-target ranking integrating comparative genomics, structural analysis and experimental annotation. BMC Genomics 15:36.