

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Identificación de Proteínas Clave en la Captación de Hemo por *Pseudomonas aeruginosa* mediante Análisis *In Silico*: Nuevos Blancos Terapéuticos

Identification of Key Proteins in Heme Uptake by *Pseudomonas aeruginosa* by *In Silico* Analysis: New Therapeutic Targets

Authors/Autores: Gutiérrez-Cárdenas, E. M., Olivares-Trejo, J. de J., González-López, M.A.

ID: e1776

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1776>

Received/Fecha de recepción: October 17th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: May 21th 2025

Available online/Fecha de publicación: June 04th 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Gutiérrez-Cárdenas, E. M., Olivares-Trejo, J. de J., González-López, M.A. (2025). Identification of Key Proteins in Heme Uptake by *Pseudomonas aeruginosa* by *In Silico* Analysis: New Therapeutic Targets. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1776. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1776>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Identificación de Proteínas Clave en la Captación de Hemo por *Pseudomonas aeruginosa* mediante Análisis *In Silico*: Nuevos Blancos Terapéuticos

Identification of Key Proteins in Heme Uptake by *Pseudomonas aeruginosa* by *In Silico* Analysis: New Therapeutic Targets

Captación de Hemo en *P. aeruginosa*: Blancos Terapéuticos/

Heme Uptake in *P. aeruginosa*: Therapeutic Targets

Gutiérrez-Cárdenas, E. M.¹ (<https://orcid.org/0009-0001-2104-4868>), Olivares.-Trejo, J. de J.² (<https://orcid.org/0000-0002-4225-4493>), González-López, M.A.^{1*} (<https://orcid.org/0000-0001-9674-4730>)

¹ Departamento Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX.

² Posgrado en Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Unidad del Valle. S. Lorenzo 290, Col del Valle Sur, Benito Juárez, 03104 Ciudad de México, CDMX.

*Corresponding Author:

Marco Antonio González-López. Departamento Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX. Teléfono: 55 5483 7000 ext 5483. E-mail: marconyqfb@yahoo.com.mx

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria Gram negativa de gran relevancia clínica, responsable de infecciones nosocomiales graves, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Su capacidad para adquirir hierro es crucial para su patogenicidad, en este trabajo de investigación se buscó identificar proteínas de membrana clave involucradas en la captación del grupo hemo como posibles blancos terapéuticos. Para lograrlo, se realizó un análisis *in silico*, evaluando 47 proteínas de membrana potenciales mediante *Expasy BLAST*. Se identificaron siete proteínas de membrana candidatas que contienen los motivos conservados FRAP y NPFL, esenciales para la unión al hemo. Además, se analizó la presencia de secuencias *FurBox* en las regiones promotoras para evaluar su regulación por hierro. Nuestros hallazgos muestran que las proteínas de membrana encontradas contienen los motivos necesarios para permitir su interacción con el grupo hemo. Además, presentan secuencias *FurBox*, sugiriendo que son reguladas por hierro. En conclusión, estas proteínas representan prometedores blancos terapéuticos; su inhibición podría reducir la virulencia de *P. aeruginosa* al limitar la adquisición de hierro y la formación de biopelículas, sentando las bases para futuros estudios sobre inhibidores dirigidos a estas proteínas.

PALABRAS CLAVE:

P. aeruginosa, hemo, hierro, proteína, adquisición, patogenicidad.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative bacterium of significant clinical relevance, causing severe nosocomial infections, particularly in immunocompromised patients. Its ability to acquire iron plays a crucial role in its pathogenicity. This study aimed to identify key membrane proteins involved in heme uptake as potential therapeutic targets. To achieve this, we performed an *in-silico* analysis, assessing 47 potential membrane proteins using *Expasy BLAST*. This analysis identified seven candidate membrane proteins that contain the conserved FRAP and NPFL motifs, which are essential for heme binding. Additionally, we examined *FurBox* sequences in the promoter regions to determine their role in iron-dependent regulation. Our findings confirm that these membrane proteins possess the necessary motifs to facilitate interaction with the heme group. Moreover, their *FurBox* sequences suggest that iron regulates their expression. In conclusion, these proteins represent promising therapeutic targets. Inhibiting them could reduce *P. aeruginosa* virulence by limiting iron uptake and biofilm formation, providing a foundation for future research on inhibitors targeting these proteins.

KEY WORDS

P. aeruginosa, heme, iron, protein, acquisition, pathogenicity

Introducción

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria Gram negativa oportunista ampliamente conocida por su capacidad de causar infecciones nosocomiales, particularmente en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con fibrosis quística, quemaduras graves o que utilizan dispositivos médicos invasivos (Wunderink & Mendoza, 2007; Sathe *et al.*, 2023). Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son responsables de hasta el 15 % de las infecciones hospitalarias en todo el mundo (Alhazmi, 2015; Lopes *et al.*, 2022). Este patógeno es un desafío para los sistemas de salud debido a su resistencia a múltiples antibióticos y su capacidad para formar biopelículas, lo que le otorga una ventaja significativa en ambientes clínicos (Banin *et al.*, 2005; Thi *et al.*, 2020).

Uno de los factores más importantes que contribuyen a la patogenicidad de *P. aeruginosa* es su habilidad para adquirir hierro de su entorno. El hierro es un micronutriente esencial para casi todos los organismos vivos, interviene en procesos metabólicos vitales como la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA), la producción de energía a través de la respiración celular y la defensa contra el estrés oxidativo (Gozzelino & Arosio, 2015; Bradley *et al.*, 2020). En el cuerpo humano, el hierro está principalmente almacenado en proteínas como la hemoglobina, la ferritina, lactoferrina y la hemosiderina (Sánchez *et al.*, 1992; Page, 2019; Kontoghiorghes & Kontoghiorghes, 2020), esto limita el hierro libre evitando su potencial tóxico y generación de especies reactivas de oxígeno a través de la reacción de Fenton lo que podría causar daño celular (Krewulak & Vogel, 2008; Xiao *et al.*, 2024). Por otro lado, el grupo hemo libre puede tener actividad tipo oxigenasa o peroxidasa lo que podría causar daño a nivel de proteínas y DNA (Anzaldi & Skaar, 2010; Vlasova, 2018). Por

esta razón, el hierro libre es escaso, lo que dificulta que las bacterias lo adquieran (Wooldridge & Williams, 1993; Ullah & Lamg, 2023).

Debido a la escasez de hierro libre en el huésped, muchas bacterias patógenas, incluido *P. aeruginosa*, han desarrollado mecanismos altamente especializados para captar hierro (Hoffmann *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* puede hacerlo mediante la producción de sideróforos (Budzikiewicz, 2001; Bonneau *et al.*, 2020) o la captación de exosideróforos (Perraud *et al.*, 2020), moléculas que secuestran hierro del entorno, o a través de la captación directa de hemo, una fuente rica de hierro que se encuentra en la hemoglobina (Andrews *et al.*, 2003; Becker & Skaar, 2014). La capacidad de *P. aeruginosa* para captar hierro no sólo le permite sobrevivir en ambientes hostiles, sino que también es crucial para la formación de biopelículas, una de las principales estrategias de la bacteria para evadir el sistema inmunológico y resistir tratamientos antibióticos (Alhazmi, 2015; Tuon *et al.*, 2022).

El hemo, un complejo que contiene hierro es una fuente clave de este metal para muchos patógenos como *P. aeruginosa* (Anzaldi & Skaar, 2010; Schalk & Parraud, 2023). En el cuerpo humano, el hemo está presente en proteínas como la hemoglobina y la mioglobina. Durante una infección, *P. aeruginosa* utiliza exotoxinas y proteinasas para lisar las células del huésped y liberar hemo de estas proteínas (Reynolds & Kollef, 2021). Este hemo es posteriormente captado por proteínas específicas de membrana externa dependientes de *TonB* (Krewulak & Vogel, 2008; Silale & Van den Berg, 2023). Estas proteínas forman parte de tres sistemas principales de captación de hemo en *P. aeruginosa*: el sistema *Phu* (Captación de hemo en *Pseudomonas*), el sistema *Has* (Sistema de Asimilación de hemo) y el sistema *Hxu* (Ochsner *et al.*, 2000; Otero-Asman *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2022).

El sistema *Phu* está compuesto por la proteína *PhuR*, que actúa como un receptor de hemo, capturándolo directamente y transportándolo a través de la membrana (Ochsner *et al.*, 2000). El sistema *Has* incluye la proteína hemóforo *HasAp*, que secuestra hemo y lo transfiere a un receptor en la membrana externa (Otero-Asman *et al.*, 2019). Finalmente, el sistema *Hxu*, el cual cuenta con la proteína *HuxA* la cual se expresa a altas concentración de hemo, que a su vez está regulada por las proteínas *Hxul* y *HxuR* que actúan como factores sigma. Mientras los sistemas *Phu* y *Has* están activos la función básica de *Hxu* es actuar como un sensor de hemo y un papel secundario es la adquisición del grupo hemo (Yang *et al.*, 2022), proporcionando redundancia en la capacidad de captación de hierro, lo que hace a *P. aeruginosa* extremadamente adaptable a su entorno (Ochsner *et al.*, 2000; Otero-Asman *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2022).

Las bacterias patógenas pueden captar hemo mediante proteínas de membrana externa que contienen los motivos conservados FRAP y NPNL, los cuales son críticos para la unión de este grupo (Smith & Wilks, 2012). Estos motivos permiten que las proteínas de membrana interaccionen con el hemo, facilitando su transporte al interior de la bacteriana (Smith & Wilks, 2012; Marson *et al.*, 2024). La arginina (R) en el motivo FRAP forma enlaces iónicos o puentes de hidrógeno con el grupo hemo, mientras que los residuos de prolina (P), asparagina (N) y leucina (L) en el motivo NPNL estabilizan la estructura y facilitan la unión al hemo (Smith & Wilks, 2012).

El empleo de estos sistemas captadores de hierro está mediado por el regulador *Fur* (Regulador de la captación de Hierro Férrico). En presencia de hierro, la proteína *Fur* se une a secuencias consenso conocidas como *FurBox* en las regiones promotoras de los genes relacionados con la captación de hierro, lo que inhibe su expresión (Griggs *et al.*, 1987; Escolar *et al.*, 1999; Cornelis, 2010; Lee, 2023). Sin embargo, cuando hay escasez de este metal, *Fur* deja de inhibir estos genes, lo que permite la síntesis de proteínas involucradas en la captación de hierro (Pasqua *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2024). Este mecanismo asegura que *P. aeruginosa* pueda adaptarse rápidamente a cambios en la disponibilidad de hierro en su entorno, un factor crucial para su supervivencia y virulencia en infecciones (Cornelis, 2010; Pasqua *et al.*, 2017).

Dada la importancia del hierro en la patogenicidad de *P. aeruginosa*, la identificación de proteínas clave involucradas en su captación es de gran interés para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (Hurdle *et al.*, 2011; Candel *et al.*, 2022). La inhibición de estas proteínas podría limitar la capacidad de la bacteria para adquirir hierro, reduciendo así su virulencia y su capacidad para formar *biopelículas* (Banin *et al.*, 2005; Wißbrock *et al.*, 2019). Estudios previos han demostrado que estas proteínas, al poseer los motivos FRAP y NPNL, facilitan la interacción con el hemo y su transporte (Louvel *et al.*, 2006; Wißbrock *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). Por lo tanto, en este estudio se realizó un análisis *in silico* del proteoma de *P. aeruginosa* para identificar proteínas con estos motivos conservados, utilizando herramientas bioinformáticas como *Expasy BLAST*, *Clustal Omega* y *Swiss-Model* (Paul *et al.*, 2020).

Material y Métodos

Búsqueda de Secuencias Conservadas

El objetivo fue identificar proteínas de *P. aeruginosa* que tuvieran una secuencia de aminoácidos similar a proteínas con la capacidad de unir el grupo hemo, un proceso clave en la captación de hierro por la bacteria. Para ello, se realizó una búsqueda en la base de datos *Expasy BLAST* (<https://www.uniprot.org/blast/>), utilizando como control las secuencias de *ChuA* de *E. coli* (Q7DB97_ECO57) y *FrpB2* de *H. pylori* (Q9ZKT4_HELPJ), las cuales se ha comprobado su unión al hemo de manera experimental. Sólo se seleccionaron secuencias con un porcentaje de identidad superior al 30 % (Pearson, 2013). La búsqueda se restringió al proteoma de *P. aeruginosa* PA01.

Alineamiento y Análisis de Motivos Conservados

Con el objetivo de confirmar la presencia de los motivos FRAP y NPNL, las secuencias obtenidas fueron alineadas para localizar estos motivos, se empleó el servidor *Clustal Omega* para tal fin (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Posteriormente, las secuencias fueron analizadas mediante el servidor de *KEGG Motif* (<https://www.genome.jp/tools/motif/>) para detectar regiones conservadas propias de las proteínas pertenecientes a la familia *TonB*.

Detección de Residuos de Aminoácidos Clave

El objetivo fue detectar residuos de histidina (H), tirosina (Y) y cisteína (C) que pudieran estar implicados en la unión del grupo hemo, complementando la identificación de los motivos FRAP y NPNL. Para ello, las secuencias obtenidas

fueron analizadas en el servidor *HemoQuest* (<http://131.220.139.55/SeqDHBM/>), este servidor permite identificar estos residuos en las proteínas seleccionadas.

Modelado Estructural de las Proteínas Seleccionadas

Con el propósito de analizar la conformación espacial y tridimensional de las proteínas seleccionadas. Estas fueron modeladas en el servidor *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) para así verificar la ubicación de los motivos FRAP y NPNL, y de los residuos de H, Y o C, dentro de la estructura tridimensional de las proteínas. Los modelos obtenidos fueron corridos con el programa *Chimera* (v1.18), permitiendo una visualización detallada de su estructura tridimensional y la posición de los motivos y aminoácidos necesarios para la unión del grupo hemo.

Identificación de Secuencias Codificantes y Análisis de la región Promotora

El objetivo fue determinar si los genes que codifican estas proteínas están regulados por el sistema *Fur*, lo que indicaría una respuesta a la disponibilidad de hierro en el entorno. Para esto, se buscaron las secuencias de nucleótidos correspondientes a las proteínas en la base de datos *KEGG* (<https://www.genome.jp/kegg/>), se seleccionaron 100 nucleótidos corriente arriba de cada secuencia. Estas regiones promotoras fueron analizadas para localizar la secuencia consenso *FurBox* (5'-GATAATGATAATCATTATC-3').

Visualización y Representación de Motivos Conservados

Con el fin de visualizar los patrones de conservación de aminoácidos y nucleótidos para destacar las posiciones clave dentro de las secuencias, se procesaron las secuencias en el software *JalView* (v2.11.3.3) y se generó una imagen representativa de los motivos conservados mediante el servidor *WebLogo* (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks *et al.*, 2004). Este análisis gráfico permitió identificar las regiones más conservadas en las secuencias seleccionadas.

Análisis de los datos

Cada una de las plataformas empleadas, con base a su algoritmo, da resultados estadísticamente significativos, por ejemplo, el programa *BLAST* compara secuencias de proteínas y calcula la significancia estadística de las coincidencias. Los alineamientos realizados en *Clustal Omega* mediante su algoritmo HMM, predice modelos probabilísticos y nos dice que tanto se relaciona una secuencia con otra. De esta manera trabajan la mayoría de los servidores bioinformáticos empleados en esta investigación, por lo que, nuestro análisis de la información fue descriptivo, siguiendo de manera rigurosa los parámetros mencionados en los diferentes servidores para considerar que el resultado obtenido fue significativo.

Resultados y Discusión

El presente estudio se centró en la identificación de proteínas clave implicadas en la captación de hemo por *P. aeruginosa* utilizando un enfoque *in silico*.

Las proteínas de membrana con la capacidad de unir grupos hemo poseen varias características en común: son proteínas *TonB* dependientes, presentan los motivos

FRAP, NPNL y residuos de H, Y o C; son reguladas por hierro y estructuralmente presentan los motivos expuestos para facilitar su interacción con el grupo hemo.

El análisis realizado nos permitió identificar siete proteínas con características que indican su probable participación en la captación de hierro mediante la unión del grupo hemo.

***P. aeruginosa* posee varias proteínas hipotéticas de unión al grupo hemo.**

Con la finalidad de localizar proteínas con la capacidad de unir grupos hemo se realizó una búsqueda en el proteoma de *P. aeruginosa* PA01 a través de *Expasy BLAST*.

Se obtuvieron un total de 47 secuencias con una identidad entre el 22.4 % y 99 %. Al aplicar el algoritmo *BLAST*, buscamos que las proteínas encontradas, para su posterior análisis, tuvieran una identidad mayor a 30 %, un *bit* mayor a 50 y un valor $E < 10^{-6}$ con las proteínas de referencia (Pearson, 2013) (Tabla 1).

Los valores de corte, para la selección de proteínas con posible capacidad de unión de grupos hemo, se basan en el algoritmo *BLAST*, bajo este argumento, las proteínas obtenidas tienen una buena identidad con respecto a la proteína de referencia. Estos valores son considerados con significancia estadística (Pearson, 2013). Veintiún proteínas cumplieron con estos parámetros.

Tabla 1. Secuencias obtenidas

Secuencias con alineamientos significativos				Bits	Score E
1.	TR:Q9HV88	Q9HV88_PSEAE	Receptor de membrana externa Hemo/Hemoglobina	182	1e-49
2.	TR:Q9HYJ7	Q9HYJ7_PSEAE	Receptor de membrana externa captador de hemo	145	9e-37
3.	TR:Q9I442	Q9I442_PSEAE	Probable proteína que utiliza hemo OS=Pseudo..	142	8e-36
4.	TR:Q9I2I2	Q9I2I2_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom.	114	5e-27
5.	TR:Q9I473	Q9I473_PSEAE	Probable receptor tonB-dependiente OS=Pseudom.	91.3	8e-20
6.	SP:Q9I527	PIRA_PSEAE	Receptor de enterobactina férrica PirA OS=Pseudomo	84.3	2e-17
7.	TR:Q9I3X9	Q9I3X9_PSEAE	Probable receptor para sideróforo OS=Pseudomona.	82.8	5e-17
8.	SP:Q05098	PFEA_PSEAE	Receptor de enterobactina férrica OS=Pseudomonas	81.3	1e-16
9.	TR:Q9HUR6	Q9HUR6_PSEAE	Proteína con dominio corto amino Secretina/TonB	71.2	2e-13
10.	TR:Q9I1I6	Q9I1I6_PSEAE	Receptor TonB-dependiente OS=Pseudomonas aeru..	69.7	6e-13
11.	TR:Q9I1I6	Q9I1I6_PSEAE	Receptor de ferroxamina FoxA OS=Pseudomonas a...	69.3	8e-13
12.	TR:Q9HVC0	Q9HVC0_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	67.8	2e-12
13.	TR:Q9HZT6	Q9HZT6_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	63.5	5e-11
14.	TR:Q9HYX3	Q9HYX3_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	57.0	5e-09
15.	TR:Q9HXB2	Q9HXB2_PSEAE	Proteína transportadora de hierro dicitrato FecA	55.5	2e-08
16.	TR:Q9I5F7	Q9I5F7_PSEAE	Receptor TonB-dependiente OS=Pseudomonas aeru...	55.1	2e-08
17.	TR:Q9I648	Q9I648_PSEAE	Receptor Ferricromo FiuA OS=Pseudomonas aeru...	54.7	3e-08
18.	TR:Q9I0P7	Q9I0P7_PSEAE	Proteína con dominio corto amino secretina TonB.	53.9	5e-08
19.	TR:Q9I6Y1	Q9I6Y1_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	53.1	8e-08
20.	TR:Q9I3A9	Q9I3A9_PSEAE	Receptor TonB-dependiente OS=Pseudomonas aeru...	51.6	2e-07
21.	TR:Q9I226	Q9I226_PSEAE	Proteína con dominio corto amino secretina TonB.	51.6	2e-07
22.	TR:Q9I422	Q9I422_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	49.7	9e-07
23.	SP:P48632	FPVA_PSEAE	Receptor de Ferripioverdina OS=Pseudomonas aerug..	49.7	9e-07
24.	TR:Q9I683	Q9I683_PSEAE	Receptor TonB-dependiente OS=Pseudomonas aeru...	48.1	3e-06
25.	TR:Q9I245	Q9I245_PSEAE	Receptor TonB-dependiente OS=Pseudomonas aeru...	47.8	4e-06
26.	TR:Q9I258	Q9I258_PSEAE	Receptor TonB-dependiente OS=Pseudomonas aeru...	46.6	9e-06
27.	TR:G3XD89	G3XD89_PSEAE	Porina de membrana transportadora de cobre OprC.	44.7	3e-05
28.	TR:Q9I1E3	Q9I1E3_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	40.4	7e-04
29.	TR:Q9HWL3	Q9HWL3_PSEAE	Segundo receptor de ferripioverdina FpvB OS=P...	40.4	7e-04
30.	SP:Q9HUX3	CNTO_PSEAE	Receptor Metallo-pseudopalina CntO OS=Pseudomon...	38.9	0.002
31.	SP:A0A0H2ZI93	CNTO_PSEAB	Receptor Metallo-pseudopalina CntO OS=Pseud...	38.5	0.003
32.	SP:G3XCY8	PIUA_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente para sideróforo	36.6	0.010
33.	TR:Q9I6U2	Q9I6U2_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	36.6	0.010
34.	SP:P42512	FPTA_PSEAE	Receptor de Fe(3+)pioquelina OS=Pseudomonas aeru...	35.8	0.017
35.	TR:Q9I2J4	Q9I2J4_PSEAE	Receptor micobactina férrica FemA OS=Pseudom...	35.4	0.023
36.	TR:Q9I0X7	Q9I0X7_PSEAE	Porina para tirosina OpdT OS=Pseudomonas aerugi.	30.8	0.55
37.	SP:Q02PW7	IHFB_PSEAB	Subunidad beta del factor integrador al huésped...	26.6	3.6
38.	SP:B7VAL8	IHFB_PSEA8	Subunidad beta del factor integrador al huésped...	26.6	3.6
39.	SP:A6V2R4	IHFB_PSEA7	Subunidad beta del factor integrador al huésped...	26.6	3.6
40.	SP:Q51473	IHFB_PSEAE	Subunidad beta del factor integrador al huésped...	26.6	3.6
41.	TR:Q9HWM5	Q9HWM5_PSEAE	Probable receptor TonB-dependiente OS=Pseudom...	27.7	5.4
42.	TR:Q9I3A5	Q9I3A5_PSEAE	Probable enzima de unión a AMP OS=Pseudomonas...	27.3	6.9
43.	TR:G3XD90	G3XD90_PSEAE	MotD OS=Pseudomonas aeruginosa (cepa ATCC...	26.9	7.7
44.	SP:Q02F80	PURA_PSEAB	Adenilosuccinato sintasa OS=Pseudomonas aerugi...	26.9	8.6
45.	SP:B7V201	PURA_PSEA8	Adenilosuccinato sintasa OS=Pseudomonas aerugi...	26.9	8.6
46.	TR:Q9HUM6	PURA_PSEAE	Adenilosuccinato sintasa OS=Pseudomonas aerugi...	26.9	8.6
47.	TR:Q9HWU4	Q9HWU4_PSEAE	Usher CupB3 OS=Pseudomonas aeruginosa (cepa...	26.9	9.6

Empleando las secuencias *Chua* de *E. coli* y *FrpB2* de *H. pylori* como referencia, se identificaron 47 secuencias en el proteoma de *P. aeruginosa* PA01, se muestran los *bits* y *score-E* obtenidos. Fuente: Elaboración propia.

Las secuencias de proteínas de *P. aeruginosa* localizadas son TonB dependientes.

Las secuencias localizadas poseen nombres hipotéticos basados en su identidad con las secuencias patrón empleadas, en términos generales encontramos proteínas catalogadas como "Captación de hemo/hemoglobina", "Probable receptor

dependiente de *TonB*”, “Receptor dependiente de *TonB*”, “Receptor de enterobactina férrica” y “Probable receptor de sideróforos” entre otros (Tabla 1).

Con el propósito de delimitar los hallazgos, se realizó un análisis más puntual de las veintiún proteínas localizadas para determinar si pertenecen a la familia de proteínas *TonB* dependientes. Para ello, las secuencias de aminoácidos obtenidas fueron analizadas en el servidor *KEGG Motif*.

La información obtenida nos dice que las veintiún proteínas localizadas pertenecen a la Familia *TonB* dependientes (Tabla 2). Estas proteínas son esenciales para la captación de hierro a través del grupo hemo (Balhasteros *et al.*, 2017; Schalk & Perraud, 2023). Estas tienen una estructura de barril β formada por hojas β antiparalelas, que crean un canal altamente selectivo para moléculas como el grupo hemo, asegurando su transporte eficiente al interior de la bacteria (Noinaj *et al.*, 2010). Además de su función de transporte, esta configuración estructural confiere estabilidad a la membrana externa bacteriana, adaptándose a su entorno hostil (Sajeev-Sheeja *et al.*, 2023). Dentro del barril β , un *tapón* interno regula el paso de moléculas al bloquear el canal en ausencia de un sustrato específico. Este tapón contiene sitios específicos, como residuos de H, Y y C, que interactúan directamente con el sustrato, asegurando la especificidad del transporte (Noinaj *et al.*, 2013).

El transporte a través de las proteínas *TonB* dependientes implica un mecanismo de interacción mecánica, durante la fijación del ligando en el tapón, se activa un mecanismo de cizallamiento o tracción que interrumpe redes de interacciones electrostáticas en la cara interna del barril β , permitiendo cambios conformacionales cruciales (Mouriño & Wilks, 2021). La unión del ligando al receptor en la cara extracelular del tapón extiende la caja *TonB* en la región periplásmica, facilitando su interacción con el sistema *TonB* (Mouriño & Wilks, 2021). Este sistema, que utiliza energía derivada de la fuerza protón-motriz, desbloquea el tapón de forma temporal, permitiendo el paso del hemo hacia el espacio periplásmico (Mey & Payne, 2001; Noinaj *et al.*, 2013).

Este proceso integrado es crucial para que las bacterias transporten hierro desde los grupos hemo al interior de la célula. La señalización y el transporte del hemo requieren una interacción precisa entre los receptores *TonB* y las proteínas de membrana externa, lo que subraya la importancia de sus características estructurales (Sheldon *et al.*, 2016).

Las veintiún proteínas encontradas además de ser *TonB* dependientes, tienen forma de barril β y cuentan con un tapón (Tabla 2). De igual manera las proteínas que usamos como control cuentan con esta forma y el dominio tapón.

Tabla 2. Motivos presentes en las proteínas localizadas.

Proteína	Motivos
<i>P. aeruginosa</i> _phuR	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _HasR	M-TonB, M-β, M-plug, M, S-TonB
<i>P. aeruginosa</i> _Hxu	M-TonB, M-β, M-plug, M, S-TonB, F-P
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I2I2	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I473	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I527	M-TonB, M-β, M-plug, F-L
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I3X9	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q05098	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9HUR6	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I1I6	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I116	M-TonB, M-β, M-plug, SpF
<i>P. aeruginosa</i> _Q9HVC0	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9HZT6	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9HYX3	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9HXB2	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I5F7	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I648	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I0P7	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I6Y1	M-TonB, M-β, M-plug, T3SS
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I3A9	M-TonB, M-β, M-plug
<i>P. aeruginosa</i> _Q9I226	M-TonB, M-β, M-plug
<i>H. pylori</i> _FrpB2	M-TonB, M-β, M-plug
<i>E. coli</i> _ChuA	M-TonB, M-β, M-plug

El análisis de las secuencias obtenidas reveló la presencia de dominios como: Motivo del receptor *TonB* (M-TonB), Estructura de barrilβ (S-β), Motivo tapón (M-plug), Motivo del receptor *TonB* y secretina (M, S-TonB), Familia de peptidasas (F-P), Familia de laterosporulina (F-L), Sistema pili F (SpF) Sistema de secreción tipo III (T3SS).

Fuente: Elaboración propia.

Las secuencias de proteínas de *P. aeruginosa* poseen los motivos necesarios para unir el grupo Hemo

No solamente las proteínas con capacidad de unir grupos hemo son *TonB* dependientes, deben de contar con los motivos de unión FRAP y NPFL. Para comprobar la presencia de estos motivos, se realizó un alineamiento de las veintinueve proteínas anteriormente seleccionadas en *Clustal Omega*.

Se obtuvieron un total de siete proteínas que conservaban los motivos FRAP y NPFL o variantes de este (Q9HV88 (PhuR), Q9HYJ7 (HasR), Q9I442 (Hxu), Q9I2I2, Q9I527, Q05098 y Q9I473) (Figura 1). Es interesante resaltar que dentro de nuestra

búsqueda fueron localizadas las secuencias PhuR, HasR y Hxu, cuya capacidad de unir grupos hemo ya ha sido previamente caracterizada, (Ochsner *et al.*, 2000; Otero-Asman *et al.*, 2019; Kümmerli, 2023), lo que valida nuestra metodología para localizar proteínas con esta capacidad.

La conservación de los motivos FRAP y NPNL es importante para que estas proteínas puedan unir los grupos hemo. Sin embargo, se ha documentado que al variar los aminoácidos de estos motivos no se pierde totalmente dicha capacidad (Bracken *et al.*, 1999; Nienaber *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2002; Louvel *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2021). Observar estos motivos en las proteínas seleccionadas es un indicativo de que las siete proteínas son, en teoría, capaces de unir los grupos hemo.

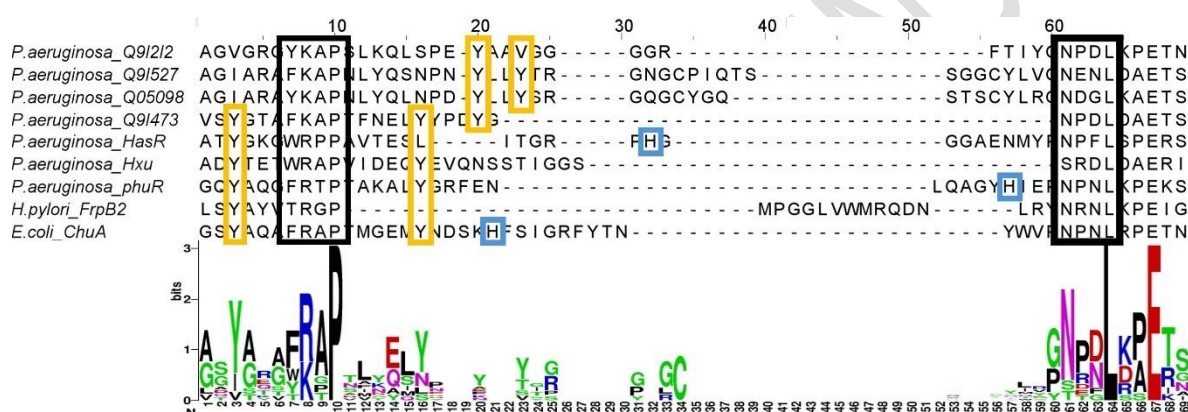


Figura 1. Alineamiento de las secuencias consenso FRAP y NPNL. Se alinearon proteínas del proteoma de *P. aeruginosa*, junto con secuencias de referencia de *E. coli* y *H. pylori*, para identificar los motivos FRAP y NPNL, así como los residuos H y Y potencialmente involucrados en la unión del grupo hemo. Se muestra el logotipo de la secuencia, donde las letras más grandes representan los residuos mejor conservados. A la izquierda, el nombre de la cepa bacteriana va seguido del número o nombre de la proteína analizada. La imagen muestra un fragmento de la secuencia de la proteína.

Fuente: Elaboración propia.

En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación demostramos que la proteína FrpB2 de *H. pylori* es capaz de unir el grupo hemo contenido en la hemoglobina. Se puede apreciar que los motivos FRAP y NPNL tiene pequeñas variaciones (Figura 1), pero a pesar de ello conserva dicha capacidad de unión (Mey & Payne, 2001; González-López & Olivares-Trejo, 2009; Liu *et al.*, 2021).

Por otro lado, algunos autores sugieren que la presencia de una H entre ambos motivos facilita la unión al grupo hemo (Hare, 2017), esto se puede apreciar en la proteína HemR, de *Y. enterocolitica* (Bracken *et al.*, 1999). No obstante, en la proteína FrpB2 de *H. pylori* no presenta esta H, pero si su capacidad de unión (González-López & Olivares-Trejo, 2009). Así mismo, otros investigadores han demostrado que la unión del grupo hemo no sólo depende de una sola H, sino que pueden participar otros aminoácidos como la Y (Allen & Schmitt, 2011; Draganova *et al.*, 2015) y C (Wißbrock *et al.*, 2019). Con base a esto realizamos un análisis en el servidor

HemoQuest de las secuencias para localizar residuos de H, Y o C con la capacidad de unir el grupo hemo.

En las siete proteínas candidatas se localizaron residuos tanto de H como de Y con la capacidad de unirse al grupo hemo (Tabla 3). *HemoQuest* estima esta capacidad de unión basándose en la constante de disociación (K_D), estos valores se obtienen a partir de datos estructurales experimentales y modelos biofísicos que consideran la accesibilidad al solvente y la polaridad local del sitio de unión al grupo hemo (Chen & Zhou, 2005). Las afinidades de unión se predicen comparando secuencias con perfiles de proteínas conocidas, ajustándose con simulaciones computacionales y acoplamiento molecular. (Paul *et al.*, 2020). Además, los residuos deben tener una carga positiva para facilitar la unión con el grupo hemo (Wißbrock *et al.*, 2019).

Tabla 3. Aminoácidos con la capacidad de unir el grupo hemo.

Bacteria-proteína	Residuo	Carga neta	K_D (μ M)	Bacteria-proteína	Residuo	Carga Neta	K_D (μ M)
<i>P. aeruginosa_Q9I2I2</i>	H313	+3	1.16	<i>P. aeruginosa_Q9I527</i>	Y2	+1	13.92
	H415	+1	11.51		Y319	+1	3.74
	C497	+1	1.91		H667	+2	1.47
	C501	+2	0.36	<i>P. aeruginosa_Q9I473</i>	H247	+1	16.21
<i>P. aeruginosa_Q05098</i>	Y335	+1	3.8	<i>P. aeruginosa_Hxu</i>	H442	+2	8.67
	Y664	+3	2.53		H553	+2	3.17
	Y666	+2	7.48		Y555	+1	6.77
	H667	+1	12.31		Y560	+1	5.29
					H617	+2	0.53
					H718	+1	0.47
<i>P. aeruginosa_HasR</i>	H348	+3	2.31	<i>P. aeruginosa_phuR</i>	H484	+3	3.11
	H624	+2	15.77		Y564	+2	2.21
					Y628	+2	12.3
<i>H. pylori_FrpB2</i>	Y558	+1	2.7	<i>E. coli_Chua</i>	H353	+1	0.53
	H737	+3	9.55		H448	+1	0.14
	H739	+3	1.03		H596	+1	5.15
	Y756	+4	0.44				

La tabla muestra los aminoácidos y su posición dentro de la proteína con la capacidad de unirse al grupo hemo, se muestra su carga neta, así como su constante de disociación (K_D). Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, localizar una H entre los motivos FRAP y NPNL, sólo se observó en dos de las siete proteínas (HasR y phuR). Las otras proteínas candidatas, con base al análisis de *HemoQuest*, poseen residuos de Y con la capacidad de unir el grupo hemo (Tabla 3). De manera interesante las proteínas Q9I2I2, Q9I527, Q9I473, Q05098 poseen una Y entre estos motivos. La proteína Hxu (ya caracterizada *in vitro* su capacidad de unir el grupo hemo) no conserva la H central, pero sí una Y entre estos motivos (Otero-Asman *et al.*, 2019, Yang *et al.*, 2022) (Figura 1).

Con base a los resultados obtenidos, las proteínas candidatas poseen los motivos y residuos necesarios para unir el grupo hemo. Además, las proteínas que se usaron como control poseen características similares lo que sustenta su posible función en la adquisición de hierro a partir de grupos hemo.

Los motivos de unión al grupo hemo están expuestos

Los motivos FRAP y NPNL, así como los residuos de H y/o Y deben estar espacialmente expuestos para poder interaccionar con el grupo hemo. Con la finalidad de observar la disposición tridimensional de estos aminoácidos se procedió a modelar las proteínas.

Mediante el uso del servidor *Swiss-Model*, obtuvimos la estructura tridimensional de las siete proteínas candidatas. Al observar las estructuras tridimensionales pudimos verificar que los motivos FRAP y NPNL, junto con los residuos clave identificados por HemoQuest, se encuentran expuestos (Figura 2).

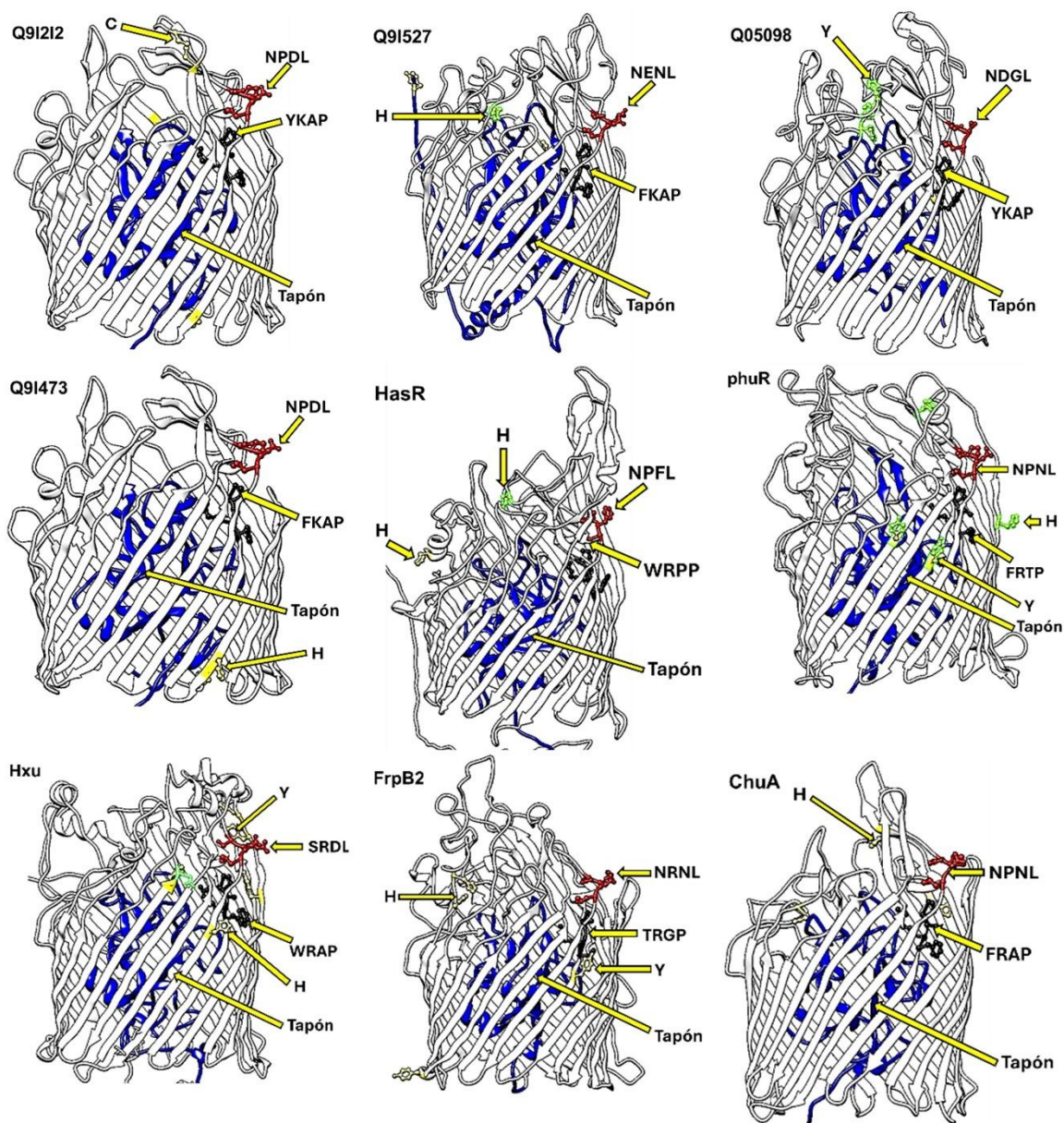


Figura 2. Modelado de proteínas. Se muestra el modelaje tanto las proteínas identificadas como las secuencias de referencia (ChuA de *E. coli* y FrpB2 de *H. pylori*) para observar sus estructuras espaciales. En todos los modelos, los motivos FRAP y NPNL conservados se localizan en la parte superior y se encuentran expuestos en la superficie externa de la proteína. Todas las proteínas presentan una estructura en forma de barril □, la estructura tapón se

muestra en azul, el motivo FRAP y sus variantes en negro, el motivo NPNL y sus variantes en rojo, y los residuos H e Y se muestran en amarillo. Fuente: Elaboración propia.

Es evidente que para que se lleve a cabo la interacción con el grupo hemo, se necesita un trabajo coordinado entre los motivos FRAP, NPNL y los residuos de H, Y o C a lo largo de la proteína (Mayfield *et al.*, 2011; Smith & Wilks, 2012; Brewitz *et al.*, 2017; Naoe *et al.*, 2017; Marson *et al.*, 2024).

En la zona del promotor se localiza la secuencia consenso *FurBox*.

Un criterio adicional para delimitar las proteínas candidatas a unir el grupo hemo fue, determinar si son reguladas por la presencia de hierro. Las proteínas que son reguladas por este metal poseen en su región promotora la secuencia consenso *FurBox* (Escolar *et al.*, 1999; Fillat, 2014; Kang *et al.*, 2024).

Tras analizar las regiones promotoras encontramos que los siete genes codificantes poseen en esta región la secuencia *FurBox* (Figura 3). Los nucleótidos predominantes en esta zona deben ser adenina y timina (Fillat, 2014). Observamos variaciones en la similitud con la secuencia consenso, pero en ningún caso el contenido de estos nucleótidos fue menor al 50 %, lo que sugiere que la regulación de estas proteínas podría ser diferencial y depender de la disponibilidad de hierro en el ambiente (Ochsner *et al.*, 2000, Fillat, 2014).

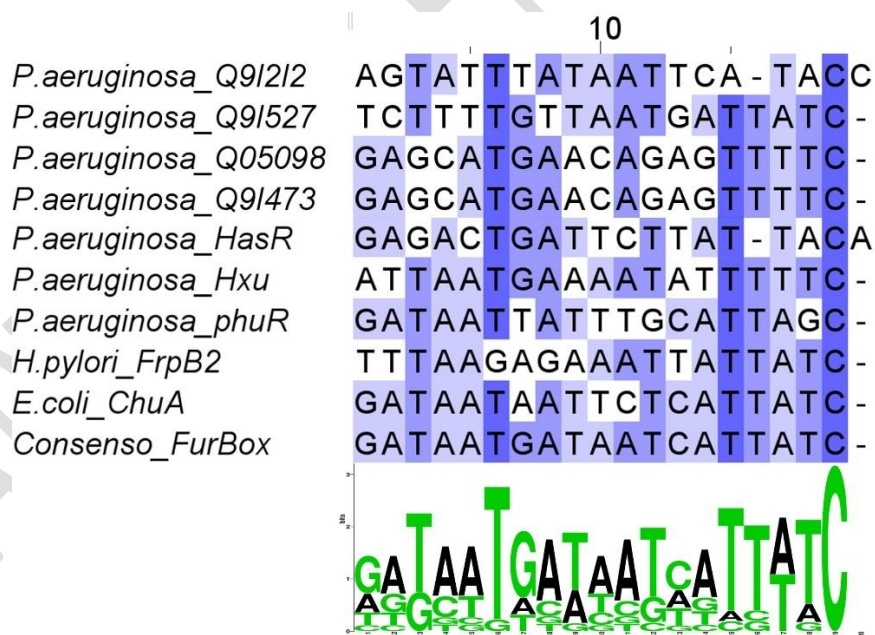


Figura 3. Alineamiento de la secuencia consenso *FurBox*. Se muestra la secuencia consenso de *FurBox*, destacando su conservación en diferentes secuencias promotoras que codifican las proteínas localizadas. En la parte inferior de la figura, el logotipo de la secuencia muestra los nucleótidos conservados; las letras más grandes representan los nucleótidos más conservados. La imagen muestra solamente un fragmento de la secuencia nucleotídica completa. Fuente: Elaboración propia.

La localización de secuencias *FurBox* en las regiones promotoras refuerza la hipótesis de que, estas proteínas juegan un papel importante en la respuesta de *P. aeruginosa* a las condiciones de deficiencia de hierro y asegura que esta bacteria sólo exprese los genes necesarios para la captación de hierro cuando este metal es escaso. Esto refleja la capacidad de *P. aeruginosa* para adaptarse a diferentes fuentes de hierro (Pasqua *et al.*, 2017).

La adquisición de hierro es crucial para la patogenicidad de *P. aeruginosa*, especialmente en la formación de biopelículas (Banin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2021), la cual está asociada a cepas multirresistentes (Alhazmi, 2015), causantes de infecciones en pacientes hospitalizados, como aquellos con fibrosis quística y problemas pulmonares (Tuon *et al.*, 2022). Limitar el acceso de esta bacteria al hierro podría reducir significativamente estas afecciones, podría hacer que la bacteria sea más susceptible a los antibióticos convencionales, reduciendo la presión evolutiva hacia la resistencia. (Post *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2020).

Nuestro estudio representa un avance significativo en la lucha contra *P. aeruginosa*. Al identificar proteínas clave involucradas en la captación de hierro, hemos encontrado posibles blancos terapéuticos contra su patogenicidad. Estas proteínas al ser inhibidas podrían disminuir tanto su virulencia como su capacidad de supervivencia, al interrumpir un proceso esencial para su desarrollo (Rosas & Lithgow, 2022; Sánchez_Jiménez *et al.*, 2023).

La existencia de múltiples proteínas con afinidad por el grupo hemo amplía las opciones terapéuticas (Hamad *et al.*, 2022). La metaloterapéutica, nació como una alternativa para el tratamiento del cáncer, pero ha tomado relevancia en el ámbito antimicrobiano debido al aumento de cepas resistentes a fármacos, los compuestos basados en metales pueden interrumpir las rutas de utilización de metales esenciales en las bacterias, afectando su supervivencia y virulencia (Centola *et al.*, 2020).

P. gingivalis no es capaz de sintetizar la protoporfirina IX, indispensable para su metabolismo, por lo que debe obtenerla del medio ambiente. El grupo hemo, que contiene protoporfirina IX, es captado a través del receptor de membrana HA2. Basándose en este conocimiento, se diseñó un conjugado de deuteroporfirina-metronidazol, conocido como "caballo de Troya". Este conjugado demostró una eficacia significativamente mayor contra *P. gingivalis* en comparación con los fármacos gentamicina y metronidazol. La incubación con deuteroporfirina-metronidazol durante 4 horas eliminó completamente *P. gingivalis* a una concentración de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ye *et al.*, 2017).

Otro grupo de investigación diseñó el conjugado porfirina-nitroimidazol contra *P. gingivalis* el cual tiene una eficacia similar al metronidazol a una concentración de 4 μM . Los autores mencionan que este conjugado fue diseñado tomando en cuenta las uniones a aminoácidos que suceden a nivel de la proteína H2A (Dingsdag *et al.*, 2015).

Aunque la coexistencia de vías para la captación de hierro y hemo supone un desafío para el éxito terapéutico a largo plazo, estas rutas representan objetivos prometedores para el desarrollo de estrategias antimicrobianas innovadoras, que

aprovechan los diferentes sistemas de captación de hierro bacterianos para la administración dirigida de antibióticos.

Limitaciones del Estudio y Perspectivas Futuras

El análisis *in silico* proporciona una sólida base para identificar proteínas clave en la captación del grupo hemo, es crucial realizar validaciones experimentales que confirmen su funcionalidad. Los estudios *in vitro* deben evaluar la capacidad de estas proteínas para unirse al grupo hemo y su potencial como blancos terapéuticos. Además, probar inhibidores específicos en modelos animales de infección podría complementar los tratamientos actuales, especialmente frente a cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*.

Conclusiones

Esta investigación *in silico* ha identificado siete proteínas de membrana en *P. aeruginosa* con los motivos conservados FRAP y NPFL, esenciales para la captación de hierro a través del grupo hemo. Estas proteínas, incluidas PhuR, HasR y Hxu, se presentan como prometedores blancos terapéuticos. Inhibirlas podría reducir la virulencia de la bacteria, afectando su capacidad para formar biopelículas y colonizar al huésped.

El análisis reveló secuencias *FurBox* en los genes que codifican estas proteínas, indicando que su expresión está regulada por la disponibilidad de hierro. El modelado estructural confirmó la exposición de los motivos FRAP y NPFL en la superficie proteica, facilitando la interacción con el grupo hemo, mientras que *HemoQuest* identificó residuos adicionales clave para la captación de hierro.

Este estudio proporciona una base sólida para futuros ensayos *in vitro*, sugiriendo que la inhibición de la captación de hierro en *P. aeruginosa* podría ser una estrategia efectiva contra infecciones resistentes a múltiples fármacos.

Una perspectiva a corto plazo es comprobar, mediante ensayos *in vitro*, la funcionalidad de estas proteínas a través de ensayos basados en ingeniería genética.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, MAGL; desarrollo de la metodología, EMGC, MAGL; manejo de software, MAGL, JJOT; análisis de resultados, MAGL, EMGC, JJOT; Manejo de datos, MAGL, EMGC, JJOT; escritura y preparación del manuscrito, MAGL, EMGC, JJOT.; redacción, revisión y edición MAGL, EMGC, JJOT.; adquisición de fondos, MAGL, EMGC.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Parte de esta investigación fue financiada por la Universidad Autónoma Metropolitana, a través del proyecto número 98.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* - Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.5539/IJB.V7N2P44>
- Allen, C. E., & Schmitt, M. P. (2011). Novel heme binding domains in the *Corynebacterium diphtheriae* HtaA protein interact with hemoglobin and are critical for heme iron utilization by HtaA. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5374–5385. <https://doi.org/10.1128/JB.05508-11>
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quinones, 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)
- Anzaldi, L. L., & Skaar, E. P. (2010). Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infection and immunity*, 78(12), 4977–4989. <https://doi.org/10.1128/IAI.00613-10>
- Balhesteros, H., Shipelskiy, Y., Long, N. J., Majumdar, A., Katz, B. B., Santos, N. M., Leaden, L., Newton, S. M., Marques, M. V., & Klebba, P. E. (2017). TonB-Dependent Heme/Hemoglobin Utilization by *Caulobacter crescentus* HtaA. *Journal of bacteriology*, 199(6), e00723-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00723-16>
- Banin, E., Vasil, M. L., & Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11076–11081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102>
- Becker, K. W., & Skaar, E. P. (2014). Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS microbiology reviews*, 38(6), 1235–1249. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12087>
- Bonneau, A., Roche, B., Roche, B., Schalk, I. J., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-56913-X>
- Bracken, C. S., Baer, M. T., Abdur-Rashid, A., Helms, W., & Stojiljkovic, I. (1999). Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *Journal of bacteriology*, 181(19), 6063–6072. <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.6063-6072.1999>
- Bradley, J. M., Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Hemmings, A. M., Moore, G. R., & Le Brun, N. E. (2020). Bacterial iron detoxification at the molecular level. *The Journal of biological chemistry*, 295(51), 17602–17623. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.007746>
- Brewitz, H. H., Hagelueken, G., & Imhof, D. (2017). Structural and functional diversity of transient heme binding to bacterial proteins. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1861(3), 683–697. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.021>
- Budzikiewicz H. (2001). Siderophores of the human pathogenic fluorescent pseudomonads. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.2174/1568026013395560>
- Candel, F. J., Santerre Henriksen, A., Longshaw, C., Yamano, Y., & Oliver, A. (2022). In vitro activity of the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, in Gram-negative pathogens in Europe by site of infection. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(3), 447.e1–447.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.018>
- Centola, G., Xue, F., & Wilks, A. (2020). Metallotherapeutics development in the age of iron-clad bacteria. *Metallomics : integrated biometal science*, 12(12), 1863–1877. <https://doi.org/10.1039/d0mt00206b>
- Chen, H., & Zhou, H. X. (2005). Prediction of solvent accessibility and sites of deleterious mutations from protein sequence. *Nucleic acids research*, 33(10), 3193–3199. <https://doi.org/10.1093/nar/gki633>
- 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>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Dingsdag, S. A., Yap, B. C., Hunter, N., & Crossley, M. J. (2015). Amino acid-linked porphyrin-nitroimidazole antibiotics targeting *Porphyromonas gingivalis*. *Organic & biomolecular chemistry*, 13(1), 98–109. <https://doi.org/10.1039/c4ob01841a>
- Draganova, E. B., Akbas, N., Adrian, S. A., Lukat-Rodgers, G. S., Collins, D. P., Dawson, J. H., Allen, C. E., Schmitt, M. P., Rodgers, K. R., & Dixon, D. W. (2015). Heme Binding by *Corynebacterium diphtheriae* HmuT: Function and Heme Environment. *Biochemistry*, 54(43), 6598–6609. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00666>
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6223–6229. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6223-6229.1999>
- Fillat, M. F. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of biochemistry and biophysics*, 546, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.029>
- González-López, M. A., & Olivares-Trejo, J. J. (2009). The gene frpB2 of *Helicobacter pylori* encodes an hemoglobin-binding protein involved in iron acquisition. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 22(6), 889–894. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9240-5>
- Gozzelino, R., & Arosio, P. (2015). The importance of iron in pathophysiologic conditions. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00026>
- Griggs, D. W., Tharp, B. B., & Konisky, J. (1987). Cloning and promoter identification of the iron-regulated cir gene of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5343–5352. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5343-5352.1987>

- Hamad, A. S., Edward, E. A., Sheta, E., Aboushleib, H. M., & Bahey-El-Din, M. (2022). Iron Acquisition Proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as Potential Vaccine Targets: In Silico Analysis and In Vivo Evaluation of Protective Efficacy of the Hemophore HasA. *Vaccines*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010028>
- Hare, S. A. (2017). Diverse structural approaches to haem appropriation by pathogenic bacteria. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1865(4), 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.006>
- Hoffmann, H., Hornef, M. W., Schubert, S., & Roggenkamp, A. (2001). Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 291(3), 227–230. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00123>
- Hurdle, J. G., O'Neill, A. J., Chopra, I., & Lee, R. E. (2011). Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nature reviews. Microbiology*, 9(1), 62–75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2474>
- Jiang, Y., Geng, M., & Bai, L. (2020). Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms*, 8(8), 1222. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081222>
- Kang, S. M., Kang, H. S., Chung, W. H., Kang, K. T., & Kim, D. H. (2024). Structural Perspectives on Metal Dependent Roles of Ferric Uptake Regulator (Fur). *Biomolecules*, 14(8), 981. <https://doi.org/10.3390/biom14080981>
- Kontoghiorghes, G. J., & Kontoghiorghes, C. N. (2020). Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases. *Cells*, 9(6), 1456. <https://doi.org/10.3390/cells9061456>
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(9), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.07.026>
- Kümmerli, R. (2023). Iron acquisition strategies in pseudomonads: mechanisms, ecology, and evolution. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 36(4), 777–797. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00480-8>
- Lee, J. W. (2023). Bacterial Regulatory Mechanisms for the Control of Cellular Processes: Simple Organisms' Complex Regulation. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 61(3), 273–276. <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00036-6>
- Liu, M., Liu, S., Huang, M., Wang, Y., Wang, M., Tian, X., Li, L., Yang, Z., Wang, M., Zhu, D., Jia, R., Chen, S., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Huang, J., Ou, X., Mao, S., Gao, Q., ... Cheng, A. (2021). An Exposed Outer Membrane Hemin-Binding Protein Facilitates Hemin Transport by a TonB-Dependent Receptor in *Riemerella anatipestifer*. *Applied and environmental microbiology*, 87(15), e0036721. <https://doi.org/10.1128/AEM.00367-21>
- Lopes, J. A., Rghei, A. D., Thompson, B., Susta, L., Khursigara, C. M., & Wootton, S. K. (2022). Overcoming Barriers to Preventing and Treating *P. aeruginosa* Infections Using AAV Vected Immunoprophylaxis. *Biomedicines*, 10(12), 3162. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123162>
- Louvel, H., Bommezzadri, S., Zidane, N., Boursaux-Eude, C., Creno, S., Magnier, A., Rouy, Z., Médigue, C., Saint Girons, I., Bouchier, C., & Picardeau, M. (2006). Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. *Journal of bacteriology*, 188(22), 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/JB.00711-06>
- Marson, N. A., Gallio, A. E., Mandal, S. K., Laskowski, R. A., & Raven, E. L. (2024). In silico prediction of heme binding in proteins. *The Journal of biological chemistry*, 300(5), 107250. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107250>
- Mayfield, J. A., Dehner, C. A., & DuBois, J. L. (2011). Recent advances in bacterial heme protein biochemistry. *Current opinion in chemical biology*, 15(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.002>
- Mey, A. R., & Payne, S. M. (2001). Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Molecular microbiology*, 42(3), 835–849. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02683.x>
- Mouriño, S., & Wilks, A. (2021). Extracellular haem utilization by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* and its role in virulence and pathogenesis. *Advances in microbial physiology*, 79, 89–132. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2021.07.004>
- Murphy, E. R., Sacco, R. E., Dickenson, A., Metzger, D. J., Hu, Y., Orndorff, P. E., & Connell, T. D. (2002). BhuR, a virulence-associated outer membrane protein of *Bordetella avium*, is required for the acquisition of iron from heme and hemoproteins. *Infection and immunity*, 70(10), 5390–5403. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5390-5403.2002>
- Naoe, Y., Nakamura, N., Rahman, M. M., Tosha, T., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., Shiro, Y., & Sugimoto, H. (2017). Structural basis for binding and transfer of heme in bacterial heme-acquisition systems. *Proteins*, 85(12), 2217–2230. <https://doi.org/10.1002/prot.25386>
- Nienaber, A., Hennecke, H., & Fischer, H. M. (2001). Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular microbiology*, 41(4), 787–800. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02555.x>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual review of microbiology*, 64, 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Gumbart, J. C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N. C., Lithgow, T., & Buchanan, S. K. (2013). Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature*, 501(7467), 385–390. <https://doi.org/10.1038/nature12521>
- Normant, V., Kuhn, L., Munier, M., Hammann, P., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2022). How the Presence of Hemin Affects the Expression of the Different Iron Uptake Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *ACS infectious diseases*, 8(1), 183–196. <https://doi.org/10.1021/acsfeddis.1c00525>
- Ochsner, U. A., Johnson, Z., & Vasil, M. L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 1), 185–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-185>
- Otero-Asman, J. R., García-García, A. I., Civantos, C., Quesada, J. M., & Llamas, M. A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environmental microbiology*, 21(12), 4629–4647. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14773>

- Page, M. G. P. (2019). The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(Suppl 7), S529–S537. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>
- Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., & Imperi, F. (2017). Ferric Uptake Regulator Fur Is Conditionally Essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00472-17>
- Paul George, A. A., Lacerda, M., Syllwasschy, B. F., Hopp, M. T., Wißbrock, A., & Imhof, D. (2020). HeMoQuest: a webserver for qualitative prediction of transient heme binding to protein motifs. *BMC bioinformatics*, 21(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3420-2>
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 3, 3.1.1–3.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V., Kuhn, L., Hammann, P., Mislin, G. L. A., Ehret-Sabatier, L., Schalk, I. J., & Schalk, I. J. (2020). Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Molecular & Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA119.001829>
- Post, S. J., Shapiro, J. A., & Wuest, W. M. (2019). Connecting iron acquisition and biofilm formation in the ESKAPE pathogens as a strategy for combatting antibiotic resistance. *MedChemComm*, 10(4), 505–512. <https://doi.org/10.1039/c9md00032a>
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Rosas, N. C., & Lithgow, T. (2022). Targeting bacterial outer-membrane remodelling to impact antimicrobial drug resistance. *Trends in microbiology*, 30(6), 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.11.002>
- Sajeev-Sheela, A., Smorodina, E., & Zhang, S. (2023). Structural bioinformatics studies of bacterial outer membrane beta-barrel transporters and their AlphaFold2 predicted water-soluble QTY variants. *PloS one*, 18(8), e0290360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290360>
- Sánchez, L., Calvo, M., & Brock, J. H. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of disease in childhood*, 67(5), 657–661. <https://doi.org/10.1136/adc.67.5.657>
- Sánchez-Jiménez, A., Marcos-Torres, F. J., & Llamas, M. A. (2023). Mechanisms of iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* and emerging therapeutics directed to disrupt this vital process. *Microbial biotechnology*, 16(7), 1475–1491. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14241>
- Sathe, N., Beech, P., Croft, L., Suphioglu, C., Kapat, A., & Athan, E. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment "Knowing the enemy" the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. *Infectious medicine*, 2(3), 178–194. <https://doi.org/10.1016/j.imi.2023.05.003>
- Schalk, I. J., & Perraud, Q. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environmental microbiology*, 25(4), 811–831. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16328>
- Sheldon, J. R., Laakso, H. A., & Heinrichs, D. E. (2016). Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogens. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0010-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0010-2015>
- Silale, A., & van den Berg, B. (2023). TonB-Dependent Transport Across the Bacterial Outer Membrane. *Annual review of microbiology*, 77, 67–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032421-111116>
- Smith, A. D., & Wilks, A. (2012). Extracellular heme uptake and the challenges of bacterial cell membranes. *Current topics in membranes*, 69, 359–392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00013-6>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Ullah, I., & Lang, M. (2023). Key players in the regulation of iron homeostasis at the host-pathogen interface. *Frontiers in immunology*, 14, 1279826. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1279826>
- Vlasova, I. I. (2018). Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10), 2561. <https://doi.org/10.3390/molecules23102561>
- Wißbrock, A., Paul George, A. A., Brewitz, H. H., Kühl, T., & Imhof, D. (2019). The molecular basis of transient heme-protein interactions: analysis, concept and implementation. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20181940. <https://doi.org/10.1042/BSR20181940>
- Wooldridge, K. G., & Williams, P. H. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(4), 325–348. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00026.x>
- Wunderink, R. G., & Mendoza, D. L. (2007). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Unit. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34406-3_20
- Xiao, J., Guo, S., Wang, D., & An, Q. (2024). Fenton-Like Reaction: Recent Advances and New Trends. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 30(24), e202304337. <https://doi.org/10.1002/chem.202304337>
- Yang, F., Zhou, Y., Chen, P., Cai, Z., Yue, Z., Jin, Y., Cheng, Z., Wu, W., Yang, L., Ha, U. H., & Bai, F. (2022). High-Level Expression of Cell-Surface Signaling System Hxu Enhances *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection. *Infection and immunity*, 90(10), e0032922. <https://doi.org/10.1128/iai.00329-22>
- Ye, P., Chang, J., Foo, L. F., & Yap, B. C. (2017). An early report: a modified porphyrin-linked metronidazole targeting intracellular *Porphyromonas gingivalis* in cultured oral epithelial cells. *International journal of oral science*, 9(3), 167–173. <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.31>
- Zhang, Y., Pan, X., Wang, L., & Chen, L. (2021). Iron metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the involved iron-targeted anti-biofilm strategies. *Journal of drug targeting*, 29(3), 249–258. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1824235>