

MI PROYECTO DE TESIS

Eliminación microbiana de histamina

José Luis Gómez Botrán

Área de Bioquímica. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León.

jl.gbotran@unileon.es

El grupo de investigación que dirige el profesor D. José María Luengo Rodríguez en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León, ha estudiado la rutas metabólicas responsables de la degradación microbiana de diferentes compuestos aromáticos entre los que se incluyen ciertas aminas biogénicas tales como la 2-feniletilamina, la tiramina y la dopamina. Como consecuencia de ese trabajo, estos científicos han descrito cinco rutas catabólicas nuevas (lo que implica la participación de más de cincuenta genes y enzimas diferentes) y han diseñado, y obtenido, distintas bacterias recombinantes (cepas modificadas genéticamente) que pueden ser utilizadas para la eliminación de esos compuestos de diferentes medios. Otra amina biogénica que participa, como las anteriores, en multitud de procesos celulares básicos es la histamina, por lo que el estudio de su ruta catabólica, la identificación de los genes que codifican las proteínas que la constituyen (enzimas implicados tanto en el transporte como su catabolismo), así como el establecimiento de los mecanismos responsables de su regulación, podrían tener importantes repercusiones clínicas y biotecnológicas (tratamientos eficaces para alergias mediante terapia génica, y control de la cantidad de histamina presente en ciertos alimentos).

La histamina juega un papel importante en la contracción del músculo liso, en la regulación neuroendocrina, en procesos alérgicos relacionados con hipersensibilidad y genésis de taquicardias, y actúa como neurotransmisor interviniendo en enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis múltiple. Recientemente, se ha comprobado que esta molécula está involucrada en diferentes procesos patológicos relacionados con tumores adrenocorticales (Szabó *et al*, 2009).

Esta amina suele aparecer en cantidades apreciables en ciertos alimentos (pescado, carne y huevos) y es particularmente abundante en aquéllos que se obtienen de la fermentación (quesos y otros derivados lácteos, bebidas, etc.). La presencia de histamina en el vino entraña más riesgo que en otros alimentos, ya que al interactuar con el alcohol, se van a afectar ciertos mecanismos detoxificadores que son utilizados por el organismo para eliminar la histamina (Buteau *et al*, 1984).

El estudio de la ruta catabólica responsable de la degradación de histamina se ha abordado en bacterias debido a su enorme versatilidad metabólica, a su crecimiento rápido y a la facilidad para realizar en ellas estudios genéticos y metabólicos. Dentro de los distintos microorganismos que eran capaces de utilizar histamina como fuente de carbono y de energía, hemos seleccionado la bacteria *Pseudomonas putida* U (Miñambres *et al.*, 1996; Olivera *et al.*, 1998), que es capaz de degradar numerosos compuestos y que había sido usada previamente por nuestro grupo para esclarecer las rutas responsables de la degradación de otras aminas biogénicas tal y como se ha indicado anteriormente (Arias *et al.*, 2008; Arcos *et al.*, 2010) (**Fig. 1**).

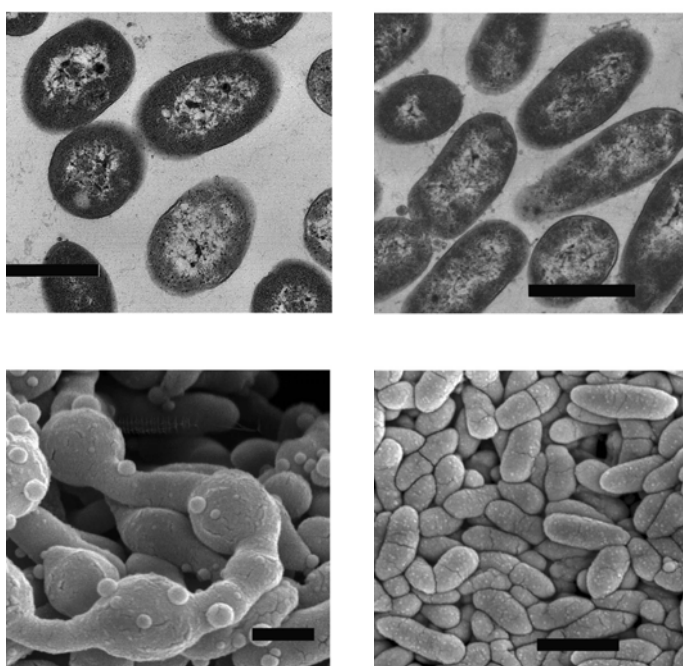


Figura 1. Microfotografías de la cepa *Pseudomonas putida* U.

La primera aproximación experimental, tuvo por objeto estudiar la velocidad de asimilación de histamina por esta bacteria, y a continuación procedimos a la obtención de mutantes incapaces de degradar este compuesto usando como elemento mutador el trasposón Tn5 (**Fig. 2**) (Norrander *et al.*, 1983)

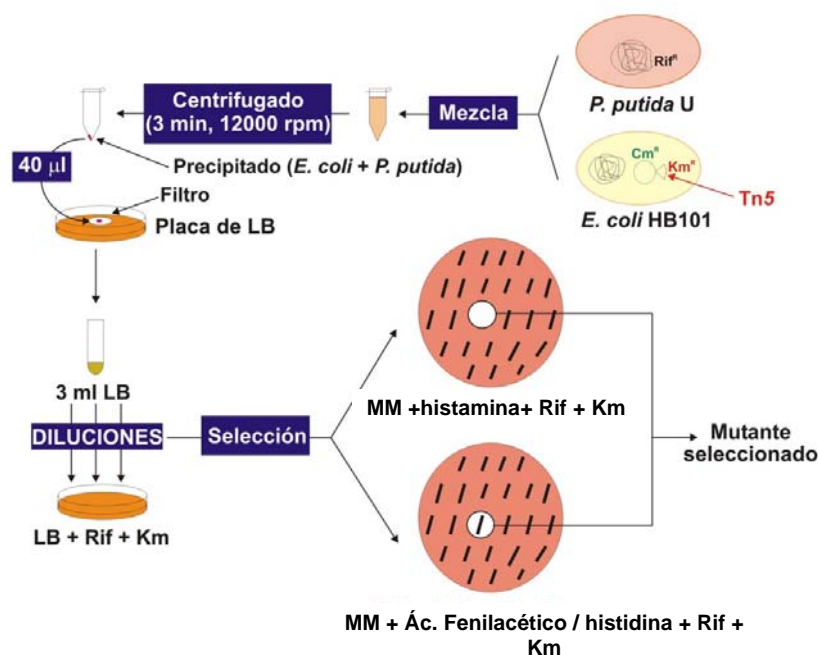


Figura 2. Esquema del proceso de mutación basado en la inserción del transposón Tn5 en *P. putida* U.

Hasta el momento actual, se han obtenido y caracterizado seis mutantes (Hin1-Hin6). En cinco de ellos los estudios genéticos han revelado que el transposón Tn5 se había insertado en genes que codifican una deshidrogenasa (Hin1), una monooxigenasa (Hin2), un transportador (Hin4), una liasa (Hin5) y un regulador (Hin6), mientras que en el otro mutante (Hin3), los resultados mostraron que el transposón se había insertado en una secuencia intergénica que se encuentra delante del gen que codifica un regulador transcripcional. Los estudios realizados acerca de la cinética de crecimiento de estos mutantes han revelado que todos crecen de modo semejante a como lo hace la cepa silvestre cuando las fuentes de carbono empleadas son la feniletilamina, tiramina y dopamina. Estos resultados ponen de manifiesto que la degradación de histamina no está relacionada con la de otras aminas, y que por lo tanto, para degradar esta amina biogénica, la cepa *P. putida* U utiliza una ruta metabólica diferente, y que ésta no posee etapas comunes con las requeridas para la degradación de otros compuestos similares.

Cuando los mutantes se cultivaron en un medio de composición definida (medio mínimo) en el que la fuente de carbono era un derivado de histamina, el ácido imidazolacético (ImAA), se observó que algunos mutantes (Hin1, Hin4, Hin6) crecían, siguiendo una cinética similar a la de la cepa silvestre *P. putida* U cuando se cultivaba en el mismo medio, mientras que otros (Hin2, Hin3, Hin5) no podían crecer. Estos datos indicaban que las actividades enzimáticas afectadas en Hin1, Hin4 e Hin6 catalizan etapas de la ruta catabólica anteriores

a la formación del ImAA, mientras que los genes alterados en Hin2, Hin3 e Hin5 codifican enzimas que catalizan reacciones implicadas en la transformación de ImAA en intermediarios catabólicos centrales. Estos datos demuestran inequívocamente que el ImAA se genera como intermediario catabólico en la degradación de histamina.

Aplicaciones

Cuando caractericemos la ruta completa y dispongamos de la información genética requerida podremos:

1. Utilizar estos genes como sondas para identificar otros similares en bacterias ácido lácticas con objeto de emplear esos microorganismos como “*starters*” (cultivos iniciadores) en la elaboración de alimentos fermentados.
2. Clonar todos los genes responsables de la degradación de histamina y transferirlos como un único *cluster* a otros microorganismos (bacterias ácido lácticas) y así obtener cepas recombinantes capaces de eliminar la histamina de diferentes medios (incluyendo alimentos fermentados). Todas esas construcciones, que poseerán un indudable valor biotecnológico, serán protegidas por las correspondientes patentes.
3. Usar esas construcciones en terapia génica (tratamiento de alergias y de algunas de las enfermedades neurodegenerativas anteriormente citadas).

Bibliografía

- Arcos, M., Olivera, E.R., Arias, S., Naharro, G., Luengo, J.M. 2010. The 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida* U. Environ. Microbiol. 12: 1684-704.
- Arias, S., Olivera, E.R., Arcos, M., Naharro, G., Luengo, J.M. 2008. Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. Environ. Microbiol. 10: 413-432.
- Buteau, C., Duitschaever, C.L., Ashton G.C. 1984. A study of the biogenesis of amines in a villard noir wine. Am. J. Enol. Vitic. 35: 228-235.
- Miñambres, B., Martínez-Blanco, H., Olivera, E.R., García, B., Díez, B., Barredo, J.L., Moreno, M.A., Schleissner, C., Salto, F., Luengo, J.M. 1996. Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* U phenylacetyl-CoA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. J. Biol. Chem. 271: 33531-33538.

- Norrander, J., Kempe, T., Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106.
- Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muniz, C., Moreno, M.A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J.L., Luengo, J.M. 1998. Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6419-6424.
- Szabó, P.M., Wiener, Z., Tombol, Z., Kovacs, A., Pocza, P., Horanyi J. 2009. Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors. *Virchows Arch.* 455: 133-142.

Galería de fotos



Grupo de investigación al que pertenece el autor de la Tesis. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Álvaro Barrientos Castañeda, Elías Rodríguez Olivera, José Ignacio Obeso Rodríguez, Joaquín Rodríguez Fernández, José Luis Gómez Botrán (autor de este trabajo), José María Luengo Rodríguez (director del grupo de investigación) y Estefanía Merino García.