

Memoria Técnica

Título del proyecto: ESTUDIO DEL EFECTO DEL OZONO Y EL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LOS PERFILES PROTEICOS DE *Staphylococcus aureus*: UN POSIBLE MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Equipo investigador:

José Carlos Diez-Masa. *Instituto de Química Orgánica General (C.S.I.C.)*

Mercedes de Frutos Gómez. *Instituto de Química Orgánica General (C.S.I.C.)*

Ramón González García. *Instituto de Fermentaciones Industriales (C.S.I.C.)*

ANTECEDENTES E HIPÓTESIS DE TRABAJO:

A mediados de los años 50, Denhan Herman propuso una teoría del envejecimiento celular debido a radicales libres (Herman D, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *Journal of Gerontology* 1957;2:298-300). En ella se especulaba que las células generaban oxígeno radicalario que daba lugar a alteraciones metabólicas y, en último término, a daño celular. La identificación en la década de los 60 de la superóxido dismutasa, enzima cuya misión parecía estar relacionada con la eliminación de los aniones superóxidos, dio una base mecanística a dicha teoría. Cada vez existen más evidencias de la relación que existe entre oxidantes, estrés oxidativo y envejecimiento celular (Finkel T, Holbrook NJ, *Nature* 2000;408:239-247), que se traduce en alteraciones neurológicas, oftalmológicas y cardiovasculares, así como posiblemente en algunas neoplasias (Moncevicute-Erngiene E, Neoplastic growth: The consequence of evolutionary malignant resistance to chronic damage for survival cells (review of a new theory of the origin of cancer). *Medical Hypothesis* 2005;65: 595-604).

El conocimiento de las diferentes causas del estrés celular y de los mecanismos en él implicados tiene un enorme interés tanto para la prevención de éste como en el desarrollo de posibles terapias para paliar el envejecimiento. Por esto, es necesario disponer de modelos y metodologías analíticas capaces de estudiar de manera rápida y sencilla los efectos del estrés en los sistemas vivos.

Es conocido que los gases oxidantes, como el ozono y el óxido nítrico, poseen actividad antimicrobiana. En el caso del óxido nítrico, además de múltiples funciones como señal reguladora del sistema inmunitario, se considera que éste juega un papel importante como consecuencia de su acción directa frente a los patógenos (Liew FY, Cox FEG. Nonspecific defence mechanism: The role of nitric oxide. *Immunology Today* 1991;12 (3 Immunopar. Today):A17-A21; Proud D. Nitric oxide and the common cold. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005;5:37-42). El ozono es otro gas oxidante utilizado para la descontaminación microbiana de superficies e instrumentos quirúrgicos, así como de materiales y equipos utilizados en la industria alimentaria o de los propios alimentos (Clark JP. Ozone - cure for some sanitation problems. *Food Technology* 2004;58:75-76).

Staphylococcus aureus, a la vez un patógeno alimentario y un patógeno clínico, dispone como todos los microorganismos de sistemas de respuesta a estrés que le permiten sobrevivir en condiciones adversas, mediante la expresión de genes de respuesta a estrés. Se ha demostrado que la activación de los genes de respuesta a estrés oxidativo puede ser un importante factor de virulencia, al permitir a la bacteria eludir la acción de los neutrófilos humanos (Weber H, Engelmann S, Becher D, Hecker M. Oxidative stress triggers thiol oxidation in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Staphylococcus aureus*. *Molecular*

Microbiology 2004;52:133-140; Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Saïd-Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *Journal of Immunology* 2005;175:3907-3919), y esta activación está también implicado en la supervivencia al tratamiento con diferentes agentes oxidantes en condiciones de laboratorio (Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 1998;180:1750-1758). El conocimiento de los mecanismos puestos en juego por esta bacteria para sobrevivir a gases tóxicos como el óxido nítrico y el ozono puede ser relevante para el establecimiento de las condiciones y tratamientos más adecuados para combatirla.

Diversos estudios recientes han permitido identificar algunos de los mecanismos implicados en la respuesta a estrés oxidativo de *S. aureus* (Weber H, Engelmann S, Becher D, Hecker M. Oxidative stress triggers thiol oxidation in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 2004;52:133-140; Uziel O, Borovok I, Schreiber R, Cohen G, Aharonowitz Y. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. *Journal of Bacteriology* 2004;186:326-334; Abid N, Maalej S, Rouis S. Morphological and physiological changes of *Staphylococcus aureus* exposed to hypochlorous acid. *Letters in Applied Microbiology* 2004;38:245-250; Singh VK, Moskovitz J. Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: Expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology* 2003;149:2739-2747). Sin embargo, la información de que se dispone hasta este momento es muy parcial, y en la mayor parte de los casos se trata de estudios sobre agentes oxidantes en soluciones acuosas.

En este proyecto se plantea un estudio exploratorio de la respuesta de *S. aureus* al tratamiento con gases oxidantes, con el fin de contribuir a un mejor conocimiento del estrés oxidativo. Dicho estudio se llevará a cabo mediante la determinación de las “huellas dactilares proteicas” de dicho microorganismo por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (CE-LIF), técnica que se ha demostrado de utilidad en el estudio de perfiles proteicos de bacterias (Zang Z, Carpenter E, Puyan X, Dovichi NJ. Manipulation of protein fingerprint during on-column fluorescent labeling: Protein fingerprints of six *Staphylococcus* species by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001;22:1127-1132).

Hipótesis del trabajo.

- 1) Los gases oxidantes, tales como el ozono y el óxido nítrico, son capaces de modificar la síntesis y degradación de determinadas proteínas en *S. aureus*. Dicha alteración está relacionada con la respuesta al estrés oxidativo producido por los mencionados gases en este microorganismo.
- 2) Los perfiles proteicos de *S. aureus* determinados por CE-LIF reflejan las alteraciones causadas en el microorganismo por la acción del estrés oxidativo.

OBJETIVO DEL PROYECTO:

En este proyecto se pretende explorar por CE-LIF los perfiles proteicos de *S. aureus* como herramienta rápida y sensible para detectar alteraciones metabólicas de las proteínas originadas como respuesta al estrés oxidativo del microorganismo.

METODOLOGÍA:

Desarrollo de microorganismos y comprobación del efecto de agentes oxidantes sobre el metabolismo celular.

El efecto de los gases oxidantes sobre *S. aureus* se estudiará sobre cultivos de microorganismos en fase exponencial o en fase estacionaria en medios ricos de cultivo. Para ello, los cultivos crecidos en condiciones aeróbicas en atmósfera no modificada se dividirán en dos porciones, una de las cuales se mantendrá en las mismas condiciones, mientras que la otra se transferirá a un recinto de atmósfera controlada enriquecida en ozono o en óxido nítrico a concentraciones subletales (determinadas previamente para la cepa objeto de estudio). Se tomarán muestras al cabo de 1, 2, 6 y 24 horas, y se medirá la actividad de la superóxido dismutasa, como una prueba de la respuesta del microorganismo a la formación de especies tóxicas.

Las muestras obtenidas se utilizarán para determinar los perfiles proteicos (tal como se describe más abajo) para comparar las muestras tratadas y no tratadas, con el fin de detectar algunas de las proteínas expresadas diferencialmente. La variación de los perfiles proteicos de *S. aureus* sometidos y no sometidos a oxidación se correlacionarán con la actividad superóxido dismutasa extracelular.

Obtención de perfiles proteicos de microorganismos.

En el presente estudio la obtención de los perfiles proteicos de *S. aureus* de manera rápida y sensible va a ser una pieza clave para poner de manifiesto las alteraciones metabólicas del microorganismo que originan una modificación en su producción de proteínas. Tradicionalmente estos perfiles se han obtenido por técnicas de electroforesis en geles (SDS-PAGE, 2D-PAGE). Estas técnicas tienen el inconveniente de que son lentas y poco sensibles. En el presente trabajo se va a utilizar la electroforesis capilar con detección por CE-LIF con detección post-columna mediante cubeta de vena líquida (sheat-flow, su término en inglés). Esta técnica permite obtener perfiles proteicos de microorganismos en pocos minutos (Zang Z, Carpenter E, Puyan X, Dovichi NJ. Manipulation of protein fingerprints during on-column fluorescent labeling: Protein fingerprint of six *Staphylococcus* species by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001;22:1127-1132). El empleo de LIF como técnica de

monitorización permitirá la detección de mínimas cantidades de proteína en el extracto proteico a analizar: del orden de 10^{-9} M, si se emplea detección en el propio capilar de separación, y del orden de 10^{-12} M, si se emplea detección post-columna en cubeta de "sheath-flow".

La casi totalidad de las proteínas que sintetiza *S. aureus* no son capaces de producir fluorescencia cuando son excitadas con la luz emitida por el láser que vamos a utilizar en estos experimentos (Ar-ionizado λ_{exc} 488). Para hacer que las proteínas produzcan fluorescencia utilizaremos la técnica de derivatización en el capilar de proteínas con 3-(2-furoil)quinolin-2-carboxaldehído (FQ) que ya hemos puesto a punto en nuestro grupo (Veledo MT, de Frutos M, Díez-Masa JC. Development of a method for quantitative análisis of the major whey proteins by capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescent detection. *Journal of Separation Sciences* 2005;28:935-940).

PLAN DE TRABAJO:

Obtención de perfiles proteicos mediante CE-LIF:

1. Obtención del perfil proteico de *S. aureus* crecidos en condiciones de referencia (medio rico en nutrientes, fase exponencial)
2. Optimización de la composición del tampón de separación en CE para obtener la máxima separación de las proteínas.
3. Optimización de las condiciones de derivatización de las proteínas con FQ para obtener la máxima señal luminosa por LIF con cubeta de sheath-flow.
4. Optimización de las variables físicas de la detección (potencia de emisión del láser y potencial de polarización del fotomultiplicador) para obtener la máxima señal para las proteínas derivatizadas con FQ.
5. Estudio de los perfiles proteicos de microorganismos tratados en diferentes condiciones de oxidación (según indicado en los apartados siguientes).

Tratamiento de *S. aureus* con ozono:

1. Determinación de la sensibilidad de *S. aureus* CECT4465 a ozono.
2. Estudio del efecto del ozono a concentraciones subletales sobre los perfiles proteicos de células en fase exponencial.
3. Estudio del efecto del ozono sobre células en fase estacionaria en las que algunos de los mecanismos de respuesta a estrés pueden estar previamente inducidos.

Tratamiento de *S. aureus* con óxido nítrico:

1. Determinación de la sensibilidad de *S. aureus* CECT4465 a óxido nítrico.
2. Estudio del efecto del óxido nítrico a concentraciones subletales sobre los perfiles proteicos de células en fase exponencial.

3. Estudio del efecto del óxido nítrico sobre células en fase estacionaria en las que algunos de los mecanismos de respuesta a estrés pueden estar previamente inducidos.

Estudio de datos:

Se correlacionarán los perfiles proteicos obtenidos en función de la fase de crecimiento de *S. aureus* en busca de expresión diferencial de proteínas. De la misma manera, se compararán los perfiles proteicos de microorganismos sometidos a la acción de ozono y óxido nítrico, respectivamente.

TIEMPO DE REALIZACIÓN:

El tiempo de realización del proyecto será de 12 meses.