

Informe Final

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

Equipo investigador:

José Carlos Díez-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.)*

Presentación de resultados.

Durante el proyecto los resultados obtenidos se resumen en las siguientes líneas principales:

1. Desarrollo de un método de electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser para estudio de perfiles proteicos de *Staphylococcus aureus*.
2. Estudio de los perfiles proteicos de *Staphylococcus aureus* crecidos en diferentes medios de cultivo.
3. Estudio de los perfiles proteicos de *Staphylococcus aureus* crecidos a diferentes temperaturas. Detección de algunas proteínas posiblemente relacionadas con el estrés térmico en el microorganismo.
4. Estudio de los perfiles proteicos de *Staphylococcus aureus* crecidos bajo el efecto del óxido nítrico. Detección de algunas proteínas posiblemente relacionadas con el estrés oxidativo.

Se ha puesto a punto la instrumentación básica necesaria para el estudio, se ha desarrollado la metodología de crecimiento y lisis de los microorganismos para obtener perfiles proteicos reproducibles entre diferentes cultivos, y se han validado los resultados obtenidos comparando la información sacada de los perfiles obtenidos con nuestro método y aquéllos descritos en la bibliografía. A continuación, se resumen los resultados más importantes obtenidos en cada uno de los puntos indicados anteriormente.

Desarrollo de un método de electroforesis capilar (EC) con detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) para estudio de perfiles proteicos de *Staphylococcus aureus*.

El objetivo fijado en este punto del plan de trabajo fue el desarrollo de instrumentación y la metodología que nos permitiese obtener perfiles proteicos reproducibles de *Staphylococcus aureus* y la validación de dichos perfiles.

Se ha completado el montaje de un instrumento de EC que consta de fuente de alimentación de alto voltaje (30 kV), sistema hidrodinámico de inyección de muestra y detección por LIF.

El detector de LIF permite la monitorización en el extremo final del capilar de la separación de proteínas llevada a cabo en el instrumento de EC. Utiliza un láser de Ar⁺ ajustado a 488 nm con una potencia de 20 mW. La luz es enfocada en un punto del capilar próximo a la salida de éste. La fluorescencia emitida por las muestras es colectada en una dirección ortogonal al plano de incidencia del haz del láser, filtrada espectroscópicamente y enfocada sobre un fotomultiplicador (PMT) para su cuantificación. La señal producida por el PMT es digitalizada y tratada por el software de adquisición correspondiente. La Figura 1 muestra una vista de la instrumentación puesta a punto.

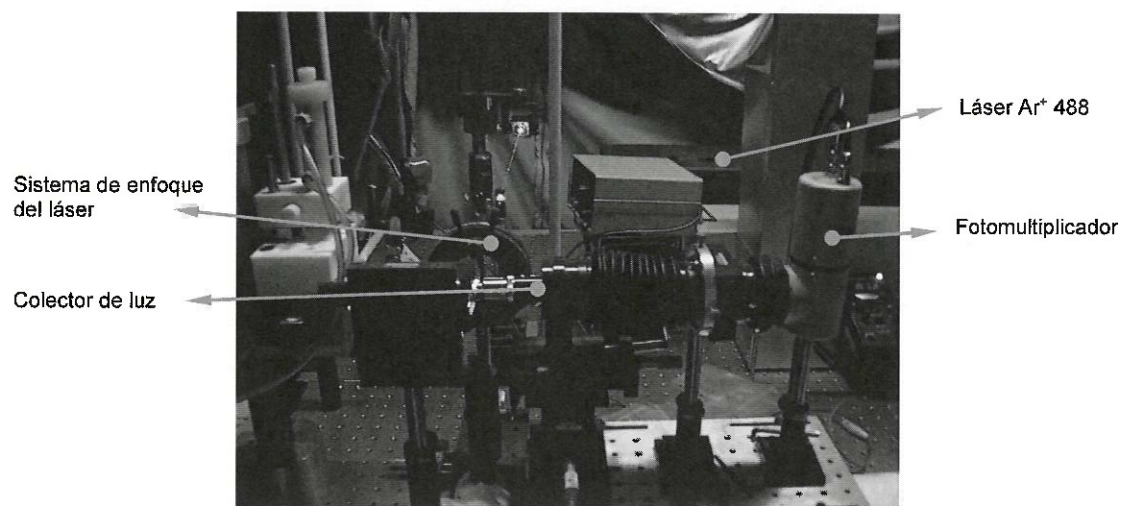


Figura 1. Sistema de CE-LIF desarrollado para el estudio.

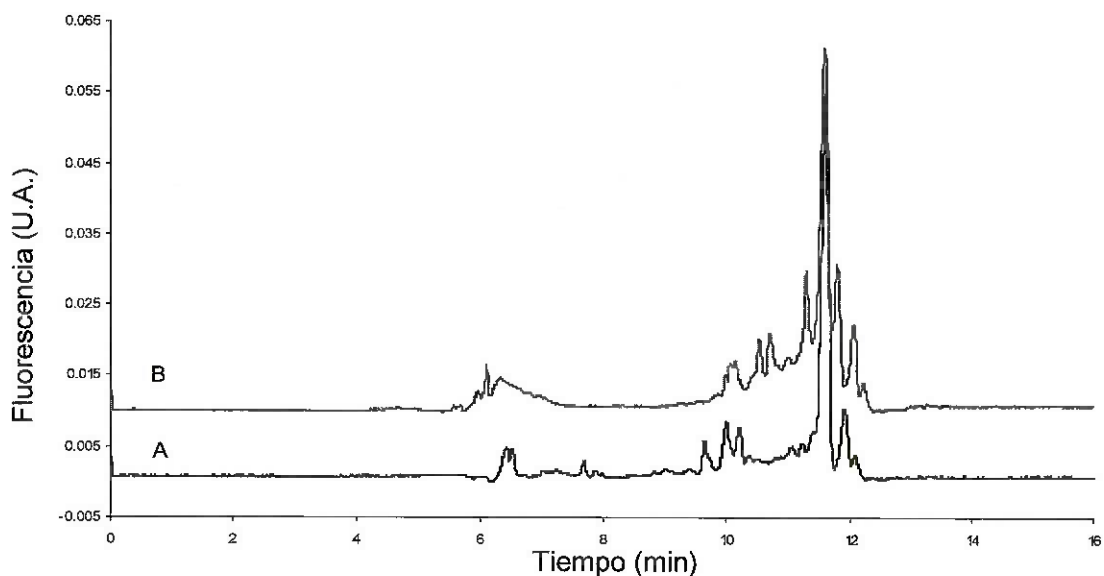


Figura 2 Comparación del perfil proteico obtenido para un cultivo de (A) *S. aureus* y (B) *S. epidermidis*.

En este estudio se emplearon con fines comparativos dos especies del género *Staphylococcus*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Las cepas de los microorganismos fueron obtenidas de la CECT: *S. aureus* CECT4465 y *S. epidermidis* CECT231. Las bacterias fueron crecidas en tubos de 16 mm de diámetro en un agitador orbital a 200 rpm durante 15-60 horas en dos medios de cultivo distintos – nutrient broth (NB) y tryptic soy broth (TBS)-, a tres temperaturas distintas (20, 37 y 42 °C). Los microorganismos fueron lisados empleando ultrasonidos y centrifugados a 6000 x g durante 20 min. El contenido total de proteína de los lisados fue determinado por el método de Bradford. Aquellos lisados que tenían una elevada cantidad de proteína fueron diluidos en tampón PBS con el fin de

normalizar todas las muestras analizadas para que tuviesen el mismo contenido total de proteína.

La solución proteica obtenida en el lisado fue inyectada por gravedad (20 cm) durante un tiempo de 12 s en el capilar del instrumento de EC, derivatizada con el reactivo fluorogénico 3(2-furoil) quinolin-2-carbaldehido (FQ) en el propio capilar de separación durante 0,25 min a 65°C. Transcurrido este tiempo, las proteínas de la muestra fueron separadas en el mismo capilar y detectadas por LIF en el extremo distal de éste.

La Figura 2 muestra sendos electroforegramas correspondientes a los perfiles proteicos de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Puede apreciarse que ambos difieren tanto en la presencia de algunas proteínas como en la cantidad (altura del pico) con que aparecen otras. Los resultados coinciden aceptablemente con los publicados en la bibliografía [Zang, Z., Carpenter, E., Puyan, X., Dovichi, N.J., Electrophoresis 22 (2001) 1127-1132]

Estudio de los perfiles proteicos de *S. aureus* crecidos en diferentes medios de cultivo.

Con el fin de comprobar la capacidad de la técnica para distinguir perfiles proteicos de microorganismos crecidos en diferentes medios, se prepararon cultivos de *S. aureus* en dos medios de cultivo distintos, uno fue NB y otro fue TBS (en ambos casos el cultivo se realizó a 20°C y durante 24 h -fase estacionaria del cultivo).

En la Figura 3 se puede apreciar que los perfiles proteicos correspondientes a los microorganismos cultivados en las dos condiciones son diferentes. El cultivo crecido en medio NB presenta tres picos (presumiblemente tres proteínas) en la región correspondiente a 10,5-12 min que no aparecen en los cultivos crecidos en TBS. El microorganismo cultivado en TBS presenta otros tres picos distintos de los anteriores, que no aparecen en el cultivo en medio NB.

Estudio de los perfiles proteicos de *S. aureus* crecidos a diferentes temperaturas. Detección de proteínas posiblemente relacionadas con el estrés térmico en el microorganismo.

Para comprobar las posibilidades de la técnica en el estudio el estrés de los microorganismos, se procedió a investigar el efecto de la temperatura de crecimiento en los perfiles proteicos obtenidos para los microorganismos correspondientes. Para ello se cultivó *S. aureus* a temperaturas de 20 °C y 45 °C (en medio TBS durante 60 y 15 horas, respectivamente).

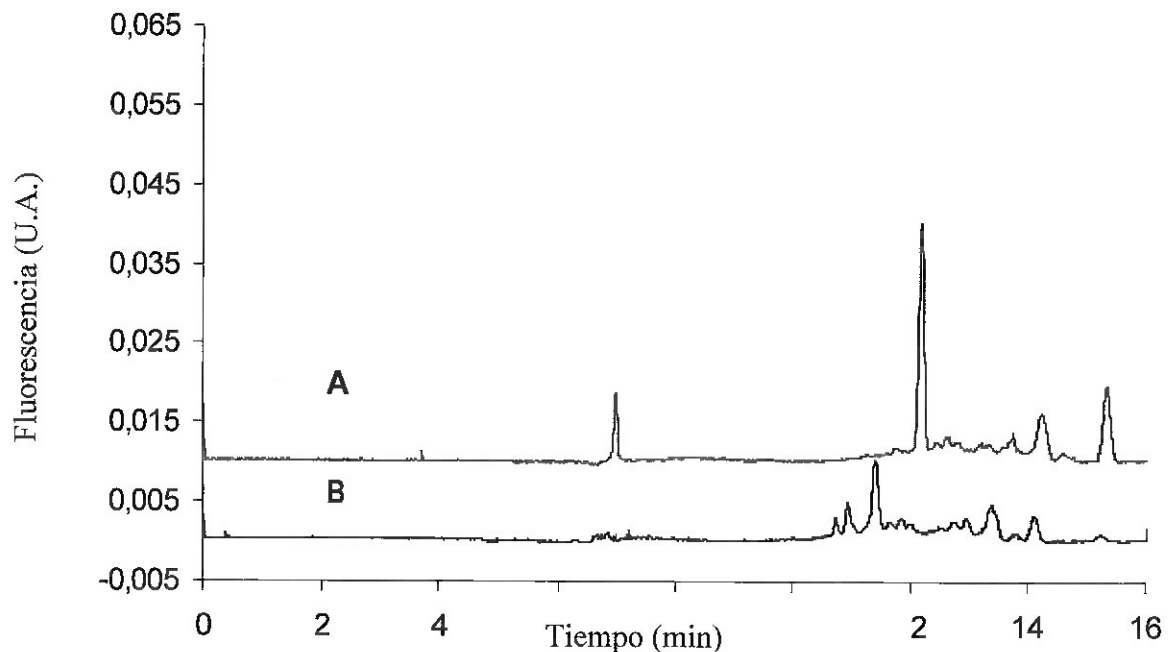


Figura 3. Comparación de los perfiles proteicos obtenidos para dos cultivos de *S.aureus* crecidos en medio (A) NB y (B) TBS. Condiciones de crecimiento: temperatura 20°C; tiempo de crecimiento, 24h.

La Figura 4A y 4B muestra los perfiles proteicos obtenidos para los microorganismos crecidos a estas temperaturas. Puede observarse como los picos numerados como 2, 5, 6 y 10 aparecen sólo en el perfil de los cultivos llevados a cabo a 20°C mientras los picos 1, 3, 4 y 7 aparecen sólo en el perfil crecido a 42°C.

Con el fin de tener una idea sobre la posible naturaleza de estas proteínas se consultaron las bases de datos sobre proteínas relacionadas al estrés térmico en *S. aureus*. Estos picos podrían estar relacionados con las proteínas DnaK y GroEl que se relacionan con el estrés térmico o con la proteína cspA relacionado con el choque frío de *S. aureus*.

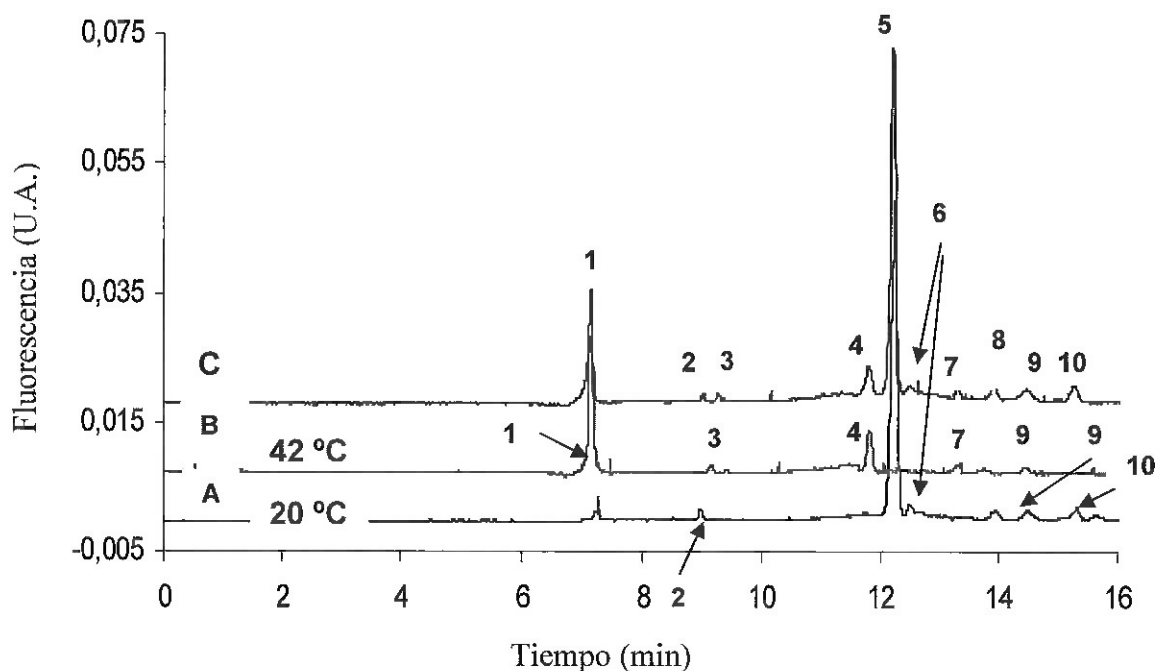


Figura 4. Comparación de los perfiles proteicos obtenidos para (A) un cultivo de *S. aureus* crecido a 20°C durante 60h, (B) un cultivo de *S. aureus* crecido a 42 °C durante 15 h y (C) una mezcla 1:1 (V/V) de los cultivos de (A) y de (B). Medio de crecimiento TBS.

Estudio de los perfiles proteicos de *S. aureus* crecidos bajo el efecto del óxido nítrico. Detección de algunas proteínas posiblemente relacionadas con el estrés oxidativo.

Con el objetivo de comprobar la acción del óxido nítrico (NO) sobre *S. aureus* utilizando la técnica desarrollada se prepararon cultivos del microorganismo crecidos en presencia de donadores sintéticos de óxido nítrico (NONOatos) que liberan NO a tiempos predefinidos. En este sentido, se controlaron en paralelo las curvas de crecimiento de cultivos de *S. aureus* crecidas en NB con curvas del mismo microorganismo y en idénticas condiciones a las que en un determinado momento se las añade un agente donador de NO al medio de cultivo.

En la Figura 5 se observan las curvas de crecimiento de *S. aureus* crecidas en NB dopadas y sin dopar con agentes donadores de NO. Se puede apreciar que en el momento en el que se añade la combinación de donadores de NO a una de las curvas de crecimiento ésta se despegue de la anterior y crece más lentamente, indicando una posible inhibición de la respiración celular.

En la Figura 6 se muestran placas de medio de cultivo fresco sembradas a partir de alícuotas de *S. aureus* tomadas de ambas curvas de crecimiento, en ausencia (imágenes 1 y 2) y en presencia de donadores de NO (imágenes 3 y 4). Mientras que en las imágenes 1 y 2 el crecimiento bacteriano se extiende por toda la superficie de la placa, en la 3 el crecimiento es menor, existiendo

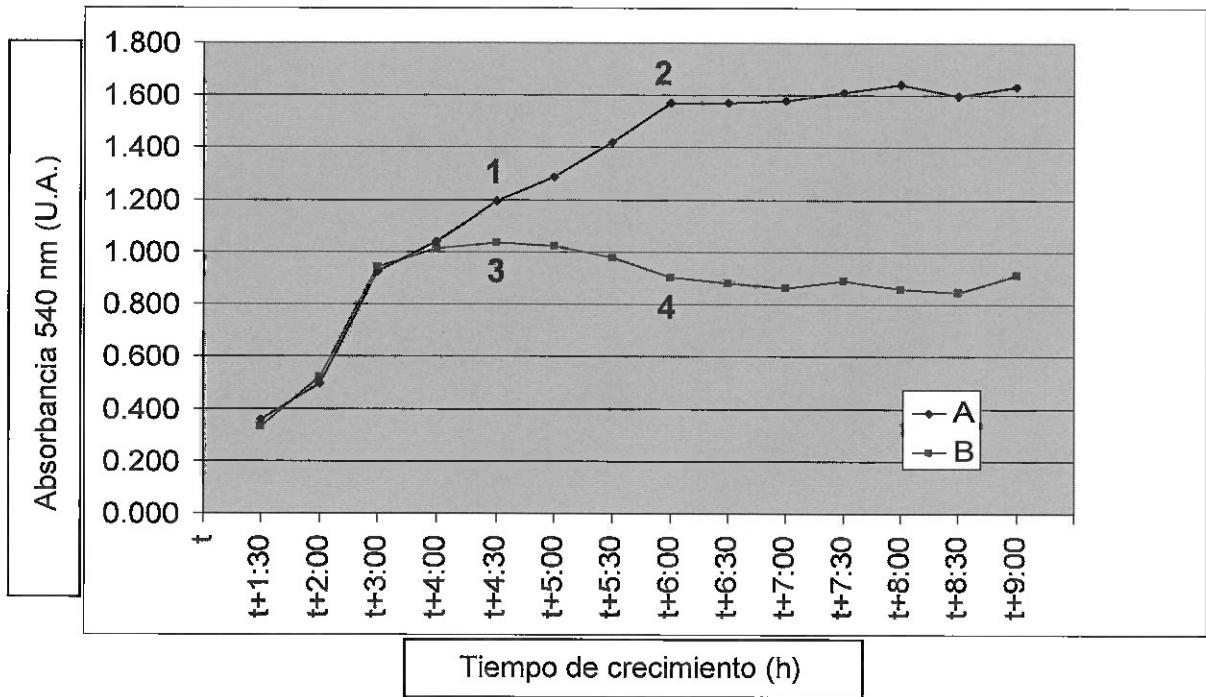


Figura 5. Comparación de las curvas de crecimiento obtenidas para (A) un cultivo de *S. aureus* crecido en NB y (B) un cultivo de *S. aureus* crecido en NB al que a las 4 h (D.O. ~ 1) se le añade una combinación de 1,1 mM de DEA NONOato y 10 mM de NOC-12. Las letras A-D en rojo indica los puntos de la curva de crecimiento en los que se han tomado alícuotas para hacer el plaqueo (ver fig. 6)

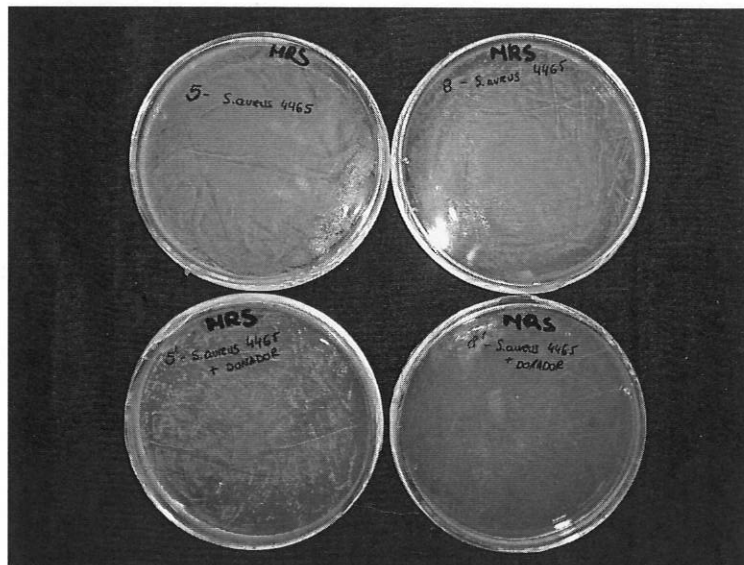


Figura 6. Plaqueo de alícuotas de las curvas de crecimiento. (1) y (2) Alícuotas tomadas en los puntos 1 y 2 de la curva crecida en ausencia de donador de NO, (3) y (4) Alícuotas tomadas en los puntos 3 y 4 de las curvas crecidas en presencia de la combinación de los donadores de NO.

colonias aisladas, y en la 4 no existe apenas crecimiento, viéndose prácticamente sólo el medio de cultivo, lo que puede atribuirse a un efecto antimicrobiano de los donadores de NO.

Para comprobar que el uso de este tipo de donadores sintéticos de NO era adecuado para nuestro estudio y en nuestras condiciones de cultivo, se midió la acumulación de nitritos en el medio de cultivo mediante la reacción de Griess. Este ensayo –uno de los métodos normalmente utilizados para determinar de manera indirecta la presencia de NO en el medio- se trata de una reacción colorimétrica producida por la adición del reactivo que lleva su nombre a un medio en el que se hayan producido nitritos, incubada a temperatura ambiente y medida a 540 nm. Los resultados de los ensayos mostraron que el uso de estos donadores producía en el medio una cantidad de NO adecuada (0,2 mM de nitritos a los 30 min de la adición de los donadores) para el desarrollo del estudio.

En la Figura 7 se observan los perfiles proteicos correspondientes a dos alícuotas de lisados de *S. aureus* tomadas de las curvas crecidas en presencia y en ausencia de NO. El cultivo crecido en ausencia de NO presenta tres regiones de picos claramente diferenciadas (una primera región entre los minutos 5 y 6; una segunda entre los minutos 7,2 y 8,5; y una tercera a partir del minuto 10), mientras que en el cultivo crecido en medio adicionado con el agente de NO se puede apreciar que el perfil de proteínas de la región central (minutos 7,2 a 8,5) desaparece o disminuye considerablemente.

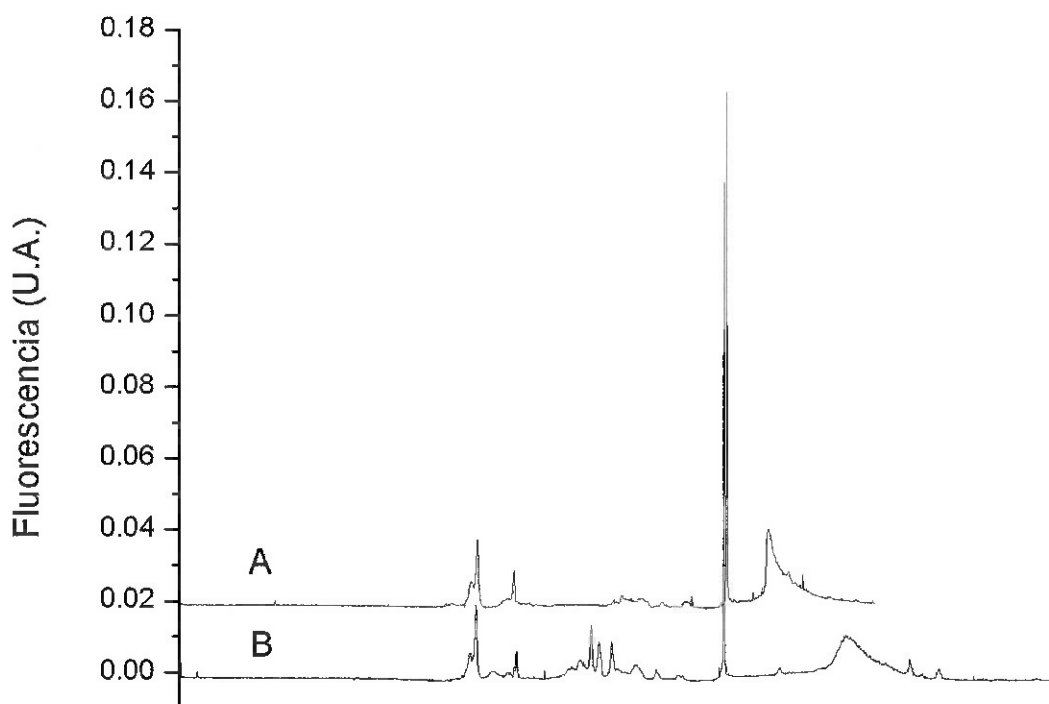


Figura 7. Comparación de los perfiles proteicos resultantes de (A) un lisado de un cultivo de *S. aureus* crecido en NB y (B) un lisado de un cultivo de *S. aureus* crecido en NB al que se le añade una combinación de 1,1 mM de DEA NONOato y 10 mM de NOC-12.

Es evidente que son necesarios estudios empleando técnicas como la espectrometría de masas acopladas con electroforesis capilar para identificar las proteínas sobreexpresadas e infraexpresadas por *S. aureus* en presencia de NO. Sin embargo, se puede especular, se acuerdo con los estudios realizados por otros autores, empleando otra metodología diferente distints de la aquí empleada, [A.R. Richarson, P.M. Dunman, F.C. Fang, *Mol. Microbiol.* 61 (2006) 927-939], que proteínas tales como el sistema regulador SrrAB y la proteína Hmp, entre otras, están implicadas en esta respuesta de adaptación del microorganismo a medios conteniendo NO.

Conclusiones

1. La técnica de EC con detección LIF empleada en este proyecto conduce a perfiles proteicos concordantes con los descritos en la literatura.
2. Se ha demostrado que el perfil proteico del *S. aureus* obtenido por EC-LIF permite apreciar diferencias entre las condiciones de crecimiento del microorganismo, en particular al estrés térmico y oxidativo por NO.
3. Se ha comprobado que en las curvas de crecimiento de *S. aureus* en las que está presente el NO se observa una ralentización de crecimiento.

Perspectivas futuras

- La técnica desarrollada, debido a que puede analizar el perfil proteico de una sola célula (resultados no mostrados es este proyecto) puede ser de utilidad para el estudio del mecanismo de ataque de las células del sistema inmune innato (p.e., macrófagos) a microorganismos.
- Está prevista, tras pedir a esa Fundación las oportunas autorizaciones, la publicación de los trabajos referentes al estudio de los perfiles proteicos de *S. aureus* sometidos a la acción del estrés térmico y oxidativo por NO a los que se hace referencia en el presente informe.