

PROTEINE CORRELATE ALL'ESPRESSIONE DI LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-SENSIBILE

PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN RELATED PROTEINS IN METHICILLIN-SUSCEPTIBLE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Deriu F¹, Hussein A.H¹, Monaco M², Pantosti A², Tinelli M³, Bonizzi L¹, Roncada P⁴ ¹DIPAV Università di Milano, Milano; ²Istituto Superiore di Sanità, Roma ³U.O Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera della Provincia di Lodi. ⁴Istituto Sperimentale L. Spallanzani, Milano.

Parole chiave: proteomica, *Staphylococcus aureus*, zoonosi, PVL, meticillina.

Key words: proteomics, *Staphylococcus aureus*, zoonosis, PVL, methicillin.

SUMMARY- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major concern for public health; It has been recognised as an occupational hazard for people working in pig herds and it is also responsible for nosocomial infections. Although clinicians are currently concerned primarily with MRSA infections, methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) infections can be present with similar epidemiologic and clinical characteristics. Community-acquired (CA)-MRSA strains contain Panton-Valentine leukocidin (PVL) genes, a toxic bicomponent with the ability to destroy leukocytes, primarily associated with skin infections. According to a large multinational clinical trial, (PVL)⁺ *S. aureus* isolates from community in Europe are more likely to be MSSA than MRSA. Aim of this study was to compare protein profiles of MSSA (PVL)⁺ and (PVL)⁻ in order to detect proteins and modifications potentially related to infections and toxin production.

INTRODUZIONE- *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), a causa della sua importanza zoonosica, rappresenta un grave problema di salute pubblica e un rischio sanitario in medicina umana e veterinaria e può essere trasmesso dall'animale all'uomo. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha recentemente pubblicato la prima indagine a livello comunitario riguardante MRSA nei suini da riproduzione (1). I risultati hanno rivelato che MRSA, può essere comunemente presente negli allevamenti suini da riproduzione di alcuni Stati membri dell'Unione europea (UE). L'indagine, oltre ad aver fornito stime sulla presenza del microrganismo, è servita per promuovere lo studio delle cause e le implicazioni della presenza di MRSA negli allevamenti suini nell'UE.

Nel 2009 è stato riportato un caso d'infezione invasiva da CA-MRSA di origine suina in un allevatore nella provincia di Cremona (2). L'indagine epidemiologica della famiglia del paziente e degli altri allevatori ha evidenziato diversi casi d'infezione da *S.aureus*, sia MRSA, sia MSSA. *S.aureus* rappresenta quindi un rischio sanitario professionale per gli allevatori, i veterinari e le loro famiglie, esposti attraverso il contatto, diretto o indiretto, con i suini. Tali ceppi di stafilococchi di origine animale sono stati recentemente denominati LA (livestock associated)-MRSA. Il genoma di *S. aureus* può esprimere i geni codificanti per la tossina Panton-Valentine Leukocidin (PVL) che svolge un'azione litica sui leucociti provocando lesioni gravi a livello degli epitelii. La tossina PVL rappresenta quindi un importante fattore di virulenza in *S.aureus* e può essere espressa sia in MRSA, sia in MSSA (3).

Nonostante l'attenzione dei clinici sia stata per lungo tempo concentrata primariamente sulle infezioni da MRSA, è riportato che infezioni da MSSA si possono presentare con caratteristiche simili da un punto di vista epidemiologico e clinico. Inoltre, in accordo con recenti segnalazioni, in Europa sono stati segnalati numerosi casi clinici di infezioni prevalentemente cutanee causate da stafilococchi di comunità e caratterizzati come CA-MSSA PVL+ (3,4).

Questo studio ha lo scopo di mappare il proteoma di *S. aureus* MSSA e di identificare proteine correlate all'azione della tossina e coinvolte nella patogenesi e nella resistenza di questi batteri. Le metodiche utilizzate, elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa, hanno permesso di evidenziare importanti differenze a livello dei profili di espressione proteica, arricchendo le conoscenze esistenti con nuove informazioni riguardanti i meccanismi molecolari coinvolti durante l'infezione.

MATERIALI E METODI- L'analisi proteomica è stata effettuata su ceppi di *Staphylococcus aureus* MSSA (PVL)⁺ e MSSA (PVL)⁻. Il *pellet* cellulare ottenuto da 100 ml di coltura è stato risospeso in 1 ml di tampone di estrazione (9M Urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 15mM Tris) e sonicato (5 cicli massima potenza, in ghiaccio). Dopo aver centrifugato per eliminare i residui cellulari (14000 RPM, 20°C, 60 minuti), le proteine sono state precipitate con tributilfosfato: acetone: metanolo (5) e il *pellet* proteico è stato risospeso in 400µl dello stesso tampone di estrazione precedentemente utilizzato. Dopo la quantificazione delle proteine (2D quant kit GE Healthcare), è stata eseguita l'isoelettrofocalizzazione su gradienti di pH immobilizzati utilizzando *strip* con *range* di pH 4-8 e pH 4-5.5 18 cm (6). L'IEF è stata effettuata su IPGphor II (GE Healthcare) fino al raggiungimento di 100KV/h totali. Dopo l'equilibratura, le *strip* sono state trasferite su gel (SDS-PAGE 12% acrilammide) per la separazione in seconda dimensione effettuata su Protean II xi 2D Cell (Biorad). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per ottenere dati statisticamente significativi. I gel colorati con Argento Nitrato (7) e Coomassie colloidale (8), sono stati digitalizzati per l'analisi qualitativa e quantitativa degli *spot* proteici tramite *software* dedicati.

RISULTATI- L'analisi d'immagine ha evidenziato diversi spot proteici sia sovra espressi, sia sotto espressi in MSSA (PVL)⁺ (Fig.1, Fig.2). Dall'analisi con spettrometria di massa MALDI sono state identificate sette proteine. Tra queste, cinque proteine sono sovra espresse in MSSA (PVL)⁺, mentre le restanti due sono sottoespresse in MSSA (PVL)⁺. Le proteine identificate sono riportate in tabella 1.

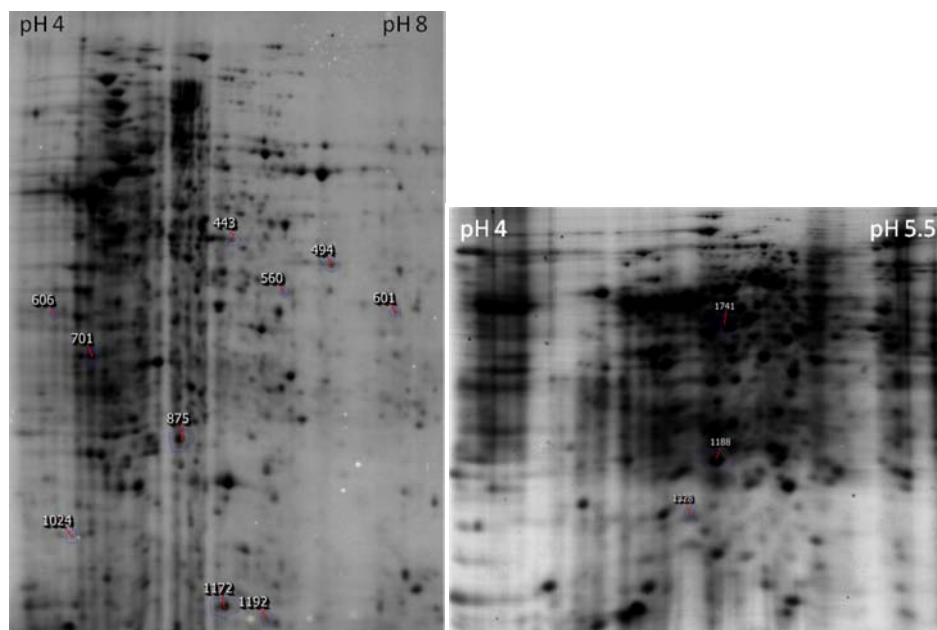


Fig1: Mappe bidimensionali su pH 4-8 e 4-5,5. I numeri indicano gli spot risultati statisticamente significativi dall'analisi d'immagine.

SPOT	PROTEINA IDENTIFICATA	ID SWISS PROT
1188	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	P0A0B5
1741	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	P0A036
1328	50S ribosomal protein L10	Q2FJA1
1172	ATP synthase epsilon chain	Q2FF25
875	Elongation factor Tu	Q2FJ92
701	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	P0A0A1
494	Threonine dehydratase catabolic	Q2FH01

Tab.1: Proteine identificate con spettrometria di massa (MALDI).

DISCUSSIONE- Lo spot 1188 (ahpC) è una proteina ampiamente nota e studiata soprattutto in relazione al suo ruolo nella protezione contro i ROS (specie reattive dell'ossigeno) (9). Durante l'infezione batterica l'ospite produce H₂O₂ e altre specie reattive dell'ossigeno, che fanno parte dei meccanismi di difesa nei confronti del microrganismo infettante. Le conseguenze di queste ossidazioni sono diverse (per esempio, se a carico di cisteina e metionina possono portare all'inattivazione di proteine ed enzimi) e saranno soprattutto a scapito della funzionalità proteica e del DNA. La proteina ahpC è sovra espressa in (PVL) +. Insieme con questa, lo spot 1741, gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi, lo spot 701 piruvato deidrogenasi (entrambe coinvolte nel metabolismo degli zuccheri), lo spot 1328, una proteina ribosomiale e lo spot 494, la treonina deidratasi (coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi), sono anch'esse sovra espresse.

Uno studio di proteomica comparativa sulle modificazioni a carico del proteoma di *S.aureus* sottoposto a stress ossidativi (10) ha evidenziato come le specie reattive dell'ossigeno possano causare l'inattivazione di alcuni enzimi metabolici chiave (come la gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi) e di conseguenza la diminuzione della produzione di ATP.

Questi dati mostrano che nei (PVL) + oltre che una sovra espressione di enzimi antiossidanti vi è buona attività metabolica e produzione di energia a livello di cicli metabolici come la glicolisi. Di contro, nei (PVL) - questi enzimi antiossidanti sono sotto espressi e vi è anche una minore attività metabolica. In alternativa vi è produzione di ATP a livello di membrana, mediante il meccanismo che sfrutta le pompe protoniche (ATP sintetase).

Questi risultati, oltre che rafforzare le conoscenze esistenti riguardo al ruolo degli enzimi antiossidanti nella patogenesi e nella resistenza batterica, suggeriscono studi più approfonditi sui meccanismi di difesa batterici nei confronti dei ROS in corso d'infezione e, in particolare, sulle modifiche a carico delle proteine in (PVL) + e (PVL) - in seguito a stress ossidativo.

BIBLIOGRAFIA –1) European Food Safety Authority (2009) EFSA Journal, 7(11):1376; 2) Pan A. et al. (2009) **Emerg Infect Dis**, 15 (5), 845-7; 3) Tinelli M. et al. (2009) *Emerg Infect Dis*, 15 (2), 250-7; 4) Kearns A.M. et al., (2010) *ECCMID*; 5) Mastro R et al. (1999) *Anal Biochem.* 2, 313-5; 6) Westermeier, R. (2001) *Electrophoresis in Practice* WILEY-VCH, Weinheim.; 7) Heukeshoven J, Dernick R.. (1988) *Electrophoresis.* 9, 28-32; 8) Rabilloud, T. (1996) *Electrophoresis* 17, 813-829.; 9) Cosgrove K. et al. (2007) *J Bacteriology*, 189 (3), 1025-35 10) Weber H. et al. (2004) *Molecular Microbiology*, 52 (1), 133–140.

Ricerca eseguita con un contributo del Ministero della salute, Ricerca Finalizzata: 'Genomica e Proteomica dei microrganismi di interesse zoonosico' UO Prof.Luigi Bonizzi