

SHORT COMMUNICATIONS/NOTE

Caratterizzazione di isolati di *Pseudomonas aeruginosa* provenienti da pazienti affetti da fibrosi cistica

Giovanna Pulcrano¹, Antonietta Lambiase¹, Mariassunta Del Pezzo¹, Valeria Raia², Fabio Rossano¹.

¹Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "Luigi Califano", Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II"

²Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica, Dipartimento di Pediatria, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II".

Characterization of different *Pseudomonas aeruginosa* strain in Cystic Fibrosis patients.

Key words: Cystic Fibrosis, *pilA* gene, tRNA-Thr, pilin allele.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is the major pulmonary pathogen that causes morbidity and mortality in burned, immunocompromised and cystic fibrosis patients. Among the various virulence factors, type IV-pili, play a major role in mediating bacteria-host cells interactions, in formation of biofilm and for twitching motility. These pili are composed of pilin, 15000-16000 molecular weight monomeric subunit, synthesized from *pilA* gene. The N-terminal region of pilin protein is strong conserved and is important for the oligomerization. The C-terminal region is less conserved and contains a disulfide-bonded loop (DSL) structure that is thought to interact with the eukaryotic glycolipid receptor "asialo GM1". Analysis of pilin allele distribution among isolates from various sources revealed the presence of six groups of pilin alleles characterized by different DSL sequence and different associated accessory genes in *pilA* chromosomal locus. 81 *P. aeruginosa* isolates were recovered from cystic fibrosis patients during a 3 years period. 30 of these strains were grown and their genomic DNA was prepared using a rapid method for gram-negative bacteria. PCR primers were used for amplification of *pilA* and adjacent sequences revealing the presence of three different amplification products. One of these is highly homologous with *pilA* gene of PA14 strain, the others are identical to PA103 and PAK *pilA* genes. Our study revealed in the prevalence of isolates with group II pilin genes from Cystic Fibrosis compared with other groups that are predominant in previous studies.

INTRODUZIONE

Pseudomonas aeruginosa è un patogeno opportunisto che frequentemente causa infezioni in piante e animali e rappresenta uno dei più importanti patogeni polmonari in pazienti ustionati, immunocompromessi e affetti da Fibrosi Cistica (FC), dal momento che causa più dell'80% delle infezioni croniche alle vie respiratorie (1). Numerosi fattori contribuiscono alla virulenza di *P. aeruginosa* tra cui il lipopolisaccaride (LPS) (2), le esotossine (3), molte proteine di membrana (4), i flagelli e i pili di superficie (5). In particolare i pili sono fondamentali nell'interazione dei batteri con le cellule della mucosa epiteliale (6) e nella formazione del biofilm (7).

I pili sono composti da piline, proteine monomeriche di circa 15 kDa, sintetizzate a partire dal gene *pilA* (8-9). La regione N-terminale delle piline mature è fortemente conservata ed è coinvolta nell'interazione tra le subunità e nell'assemblaggio della struttura ad elica del pilo (10). Al contrario la sequenza C-terminale è molto variabile:

in questa regione si forma la struttura a loop (DSL) che è esposta all'estremità del pilo e interagisce con il recettore eucariotico "asialoGM" (11-12). Al contrario di altri batteri Gram negativi, *P. aeruginosa* possiede un solo gene strutturale per la sintesi del pilo, per cui l'enorme variabilità di piline tra ceppi diversi è dovuta a mutazioni casuali nel gene *pilA* o a trasferimento orizzontale tra ceppi (13).

Dal punto di vista genico, l'operone per la pilina presenta una grossa variabilità tra ceppi diversi: in alcuni ceppi il gene *pilA* si trova strettamente a monte del gene tRNA-Thr, mentre in altri sono frapposte sequenze codificanti per proteine coinvolte nella biosintesi del pilo.

Uno studio comparativo su piline estratte da ceppi isolati da pazienti affetti da FC o dall'ambiente esterno, ha evidenziato l'esistenza di 6 gruppi di piline distinguibili sia per la struttura del DSL che per quella dell'operone (14). I ceppi isolati dagli espettorati dei pazienti affetti da FC più frequentemente appartengono alle classi I e II. Al gruppo

Il appartengono le piline caratterizzate da un'alta conservatività dei residui amminoacidici e da un DSL terminale di 12 amminoacidi; inoltre il gene *pilA* di questo gruppo si trova strettamente a monte del gene *tRNA-Thr*. Al gruppo I appartiene un numero eterogeneo di piline meno conservate, con un numero variabile di amminoacidi totali e un DSL di 19 amminoacidi e il gene *pilA* di questo gruppo è associato a un'altra sequenza che codifica per una proteina di glicosilazione del pilo (15). Recentemente altri ceppi di *P. aeruginosa* sono stati assegnati a 3 nuove classi sulla base del fatto che le loro piline sono caratterizzate dalla presenza di diverse sequenze codificanti tra i geni *pilA* e *tRNA-Thr*.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di caratterizzare isolati clinici di *P. aeruginosa* provenienti da pazienti affetti da FC dell'azienda ospedaliera universitaria "Policlinico Federico II". A tal fine sono stati raccolti nell'arco di tre anni ceppi isolati dagli espettorati di 81 pazienti colonizzati in modo cronico, subcoltivati e sottoposti ad estrazione del DNA genomico e successiva amplificazione mediante PCR e sequenziamento del gene *pilA*.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e terreni di coltura

Sono stati raccolti presso il Centro di Fibrosi Cistica dell'azienda ospedaliera universitaria "Policlinico Federico II" di Napoli, in un periodo totale di 3 anni, ceppi di *P. aeruginosa* dagli espettorati di 120 pazienti affetti da Fibrosi Cistica, 81 dei quali colonizzati in modo cronico. I ceppi sono stati seminati su Trypticase-Soy-Agar non selettivo supplementato con 5% di sangue di montone (Becton Dickinson) e su agar selettivo McConkey e cresciuti overnight a 37°C. Gli isolati di *P. aeruginosa* sono stati identificati mediante il sistema automatizzato Vitek 2 (bioMérieux).

Estrazione di DNA genomico

Singole colonie di ciascuno dei ceppi isolati, stemperate in 8 ml di brodo Brain-Heart sono state cresciute overnight in agitazione a 37°C. Successivamente 5 ml di coltura batterica sono stati centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti. Il pellet, risospeso in TE (10 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8), è stato incubato in 0.1 mg/ml di Lisozima (Sigma), 0.3 mg/ml Rnasi A (Sigma) e 0.6 mg/ml di proteinasi K (Boehringer Mannheim) per 1 ora a 37°C. Il lisato cellulare è stato poi sottoposto a due estrazioni con fenolo equilibrato (Sigma) e due estrazioni con cloroformio: alcol isoamilico 24:1 (Sigma). Alla fase acquosa è stato aggiunto 0.33 M di Na-Acetano e

3 volumi di Etanolo; il precipitato, raccolto con una bacchetta di vetro, è stato poi lasciato asciugare all'aria e risospeso in 10 mM di TE. Il DNA genomico estratto è quantitativamente valutato in spettrofotometro e controllato poi su gel d'agarosio all'1%.

PCR e sequenziamento

L'amplificazione mediante PCR del gene *pilA* è stata effettuata su 0.5 µg di DNA estratto usando 500 nM degli oligonucleotidi Pilin1-UP (5'-ATGAAAGCTCAAAAAGGCTTTACC-3') e Pilin1-DW (5'-TGAGCTGCTCTACCGACTGAG-3'), in presenza di 200 µM di ciascun dNTP, 2.5 mM di MgCl₂ e 1U di Taq Polimerasi (Sigma). I campioni, sono stati sottoposti ad una denaturazione iniziale a 94°C per 10 minuti, quindi a 35 cicli di amplificazione con denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 55°C per 1 minuto, allungamento a 72°C per 2 minuti a ad un allungamento finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati (Qia-Quick-Spin della Qiagen) e sottoposti a sequenziamento usando gli stessi oligonucleotidi della PCR come innesco.

RISULTATI

Durante 3 anni di studio, sono stati raccolti presso il Centro di Fibrosi Cistica dell'azienda ospedaliera universitaria "Policlinico Federico II" di Napoli, ceppi di *P. aeruginosa* dagli espettorati di 120 pazienti affetti da Fibrosi Cistica, 81 dei quali colonizzati in modo cronico.

Il lavoro di ricerca è stato iniziato su 30 di questi 81 ceppi, scelti tra quelli isolati da pazienti di età diverse e soprattutto provenienti da famiglie diverse, per diminuire la probabilità di isolare ceppi identici. Allo scopo di caratterizzare i ceppi isolati è stata scelta una coppia di oligonucleotidi disegnata in modo da amplificare la regione codificante del gene *pilA* ed eventuali geni accessori. L'oligonucleotide *forward*, Pilin1-UP, riconosce la regione 5' del gene *pilA* con l'ATG di inizio della traduzione, che tra i diversi ceppi rappresenta la regione più conservata. L'oligonucleotide *reverse*, Pilin1-DW, riconosce una regione interna al gene per il *tRNA-Thr* che è identico nei diversi ceppi.

La scelta di questi oligonucleotidi permette sia di amplificare la regione di interesse senza conoscere la sequenza 3' del gene *pilA* che è estremamente variabile tra i diversi ceppi, sia di amplificare eventuali geni accessori interposti tra i geni *pilA* e *tRNA-Thr*. Anche il programma di amplificazione scelto permette l'amplificazione di prodotti più lunghi nel caso siano presenti geni accessori. I 30 ceppi in esame sono stati sottoposti ad amplifica-

zione e nella maggior parte dei casi è stato evidenziato un singolo prodotto di PCR della lunghezza di 500 bp. In altri casi è stato ottenuto un prodotto di amplificazione di circa 2000 bp, probabilmente risultato dell'amplificazione del gene *pilA* e di un gene accessorio. Com'è evidente in figura I, nelle corsie 3 e 5 è presente un amplificato di 2000 bp e uno di peso molecolare ancora superiore, al contrario delle corsie 2, 4, 6, 7 dove si osserva una banda unica di 500 bp. E' evidente anche la differenza di quantità tra gli amplificati di 500 e 2000 bp. Tutti gli amplificati sono stati purificati e sequenziati in doppio filamento con gli stessi oligonucleotidi della PCR. Parte degli amplificati di 500 bp sequenziati, sono risultati identici al gene *pilA* del ceppo PAK, mostrando una sola sostituzione nucleotidica in terza base su un amminoacido della regione codificante, che quindi non produce variazioni nella sequenza proteica.

Altri amplificati di 500 bp sono simili al 98% al gene del ceppo PA103; anche in questo caso si evidenziano delle sostituzioni nucleotidiche che però non cadono sempre in terza base e quindi producono anche cambiamenti nella sequenza proteica, pur essendo la sostituzione amminoacidica sempre presente con un altro amminoacido di uguale carica o polarità. Per quanto riguarda gli amplificati di peso molecolare superiore, si sono rivelate contaminazioni dovute probabilmente alle condizioni sperimentali. Al contrario l'amplificato di circa 2000 bp è stato sequenziato solo in parte, ma risulta molto simile (94% di identità) al ceppo noto UCBPP-Pa14. Inoltre a valle del gene *pilA* è stato identificato un gene molto simile al già descritto *tfpY*.

DISCUSSIONE

P. aeruginosa è un patogeno opportunistico che ha la capacità di adattarsi a numerose nicchie ambientali e di infettare diversi ospiti. Molti fattori di virulenza sono richiesti per la patogenesi e non sono state evidenziate differenze in questi fattori tra specie cliniche e ambientali (16), suggerendo così che ogni ceppo è capace di infettare un ospite o colonizzare un ambiente a seconda delle circostanze. In questo studio sono stati analizzati 30 ceppi di *P. aeruginosa* responsabili di infezioni ricorrenti in pazienti affetti da fibrosi cistica. I ceppi analizzati colonizzano in modo cronico l'epitelio delle vie respiratorie e sono responsabili della formazione di biofilm. In particolare è stato caratterizzato per ogni ceppo il gene per la proteina *pilA* coinvolta nella biosintesi del pila, uno dei fattori di virulenza coinvolti anche nella formazione di biofilm. Tale gene è molto conservato nella regione 5' corrispondente ai primi 20-30

amminoacidi della catena proteica e altamente variabile nella regione 3', nella quale sono state evidenziate sia differenze a livello della sequenza primaria nella proteina che differenze nella lunghezza della stessa proteina.

A differenza di altri batteri Gram negativi, la cui diversità nelle piline dei vari ceppi è determinata da eventi di ricombinazione genica tra il gene che codifica per la pilina e altri geni silenti della stessa cassetta, *P. aeruginosa* possiede un solo gene strutturale per la pilina, per cui la variabilità tra ceppi è da ricondurre a mutazioni puntiformi casuali oppure a trasferimenti orizzontali da altri ceppi o specie diverse.

Castric e Deal avevano classificato le sequenze delle piline in due gruppi filogenetici basati sulle sequenze di ceppi noti; al gruppo I appartenevano geni più lunghi e associati al gene *pilO*, responsabile della glicosilazione delle piline mature, mentre al gruppo II appartenevano geni più corti tra cui quelli dei ceppi noti PAK, PAO1 e PA103. In seguito sono stati isolati geni per piline non classificabili nei gruppi suddetti, caratterizzati dalla presenza di geni aggiuntivi diversi da *pilO*; in particolare al gruppo III appartengono i ceppi noti G7 e PA14, associati al gene *tfpY*; al gruppo IV e al gruppo V appartengono una serie di isolati clinici caratterizzati dalla presenza di geni aggiuntivi per proteine transmembrana.

Precedenti dati di letteratura hanno descritto, per quanto riguarda gli isolati clinici di pazienti affetti da fibrosi cistica, un'appartenenza soprattutto al gruppo I, laddove la presenza del gene *pilO* per la proteina di glicosilazione favoriva anche la colonizzazione dell'epitelio e la formazione del biofilm.

In disaccordo con i dati riportati in letteratura, i ceppi da noi isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica nel "Policlinico Federico II" appartengono per la maggior parte ai gruppi II e III. Tale risultato potrebbe essere ricondotto a una diversa distribuzione ambientale di *P. aeruginosa* in Campania o anche a fenomeni di cross-infezione tra pazienti ricoverati durante lo stesso periodo.

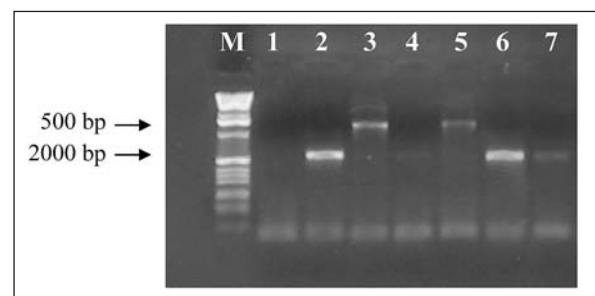


Figura I. Elettroforesi dei prodotti di amplificazione su gel d'agarosio all'1%. M: marcatore di peso molecolare 1 kb (Invitrogen); corsia 1: controllo negativo; corsie 2-7: ceppi di *P. aeruginosa*

BIBLIOGRAFIA

1. Hutchison ML, Govan JR. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 1999; 1: 1005-14.
2. Pollack M, Young LS. Protective activity of antibodies to exotoxin A and lipopolysaccharide at the onset of *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in man. *J Clin Invest* 1979; 63: 276-86.
3. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* 1977; 15: 138-144.
4. Mutharia LM, Hancock REW. Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983; 42: 1027-33.
5. Paranchych W, Frost LS. The physiology and biochemistry of pili. *Adv Microb Physiol* 1988; 29: 53-114.
6. Hahn HP. The tupe-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*- a review. *Gene* 1997; 192: 99-108.
7. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1988; 30: 295-304.
8. Keizer DW, Slupsky CM, Kalisiak M, et al. Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implication for the assembly of pili. *J Biol Chem* 2001; 276: 24186-93.
9. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959-64.
10. Lee KK, Sastry PA, Paranchych W, Hodges RS. Immunological studies of the disulfide bridge region of *Pseudomonas aeruginosa* PAK and PAO pilins, using anti-PAK pilus and antipeptide antibodies. *Infect Immun* 1989; 57: 520-6.
11. Lee KK, Sheth HB, Wong WY, et al. The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol*. 1994 Feb; 11(4): 705-13.
12. Saiman L, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1875-80.
13. Pasloske BL, Joffe AM, Sun Q, et al. Serial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient have identical pilin sequences. *Infect Immun* 1988; 56: 665-672.
14. Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 2004; 150: 1315-26.
15. Castric P. PilO, a gene required for glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin. *Microbiology* 1995; 141: 1247-54.
16. Alonso A, Rojo F, Martinez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* (1999); 1: 421-30.

Giovanna Pulcrano

Dipartimento di Biologia e Patologia
Cellulare e Molecolare "L. Califano"
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università di Napoli "Federico II"
Via Pansini n°5 -80131-Napoli
Tel.: 081 7462530 - Fax: 081 7462530
E-mail: giovannapulcrano@libero.it