



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2018**

**Efecto de la mutación de *mucA* y *eftM* sobre la  
patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa***

**Sofía Izquierdo Rabassa**





**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2018**

**Programa de Doctorado en Microbiología  
Ambiental y Biomédica**

**Efecto de la mutación de *muca* y *eftM* sobre la  
patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa***

**Sofía Izquierdo Rabassa**

**Director/a: Sebastián Albertí Serrano**  
**Tutor/a: Sebastián Albertí Serrano**

**Doctora por la Universitat de les Illes Balears**



## ABREVIATURAS

*aacC1*: gen de la gentamicina acetil transferasa.

ABTS: ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenotiazolina-6-sulfónico).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ATP: adenosina trifosfato.

*bla*: gen de la beta-lactamasa.

BSA: del inglés *bovine serum albumin*.

CAPE: del inglés *caffeic acid phenethyl ester*.

CFTR: del inglés *cystic fibrosis conductance transmembrane regulator*.

DL<sub>50</sub>: dosis letal 50.

Eftm: del inglés *EF-Tu-modifying enzyme*.

*efm*: gen que codifica Eftm.

Ef-Tu: del inglés *Elongation factor Tu*.

Gm: gentamicina.

GTP: guanosina trifosfato.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

EPS: exopolisacáridos.

FQ: fibrosis quística.

FRT: diana de la recombinasa FIp.

HBS: del inglés *hepes buffered solution*.

Hep: L-glicero-D-mano-heptosa.

Kdo: ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico.

LB: luria bertani.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LPS: lipopolisacárido.

MCS: del inglés *multicloning site*.

MD-2: del inglés *myeloid differentiation factor 2*.

MEM: medio esencial mínimo.

MSD-(n°): del inglés *membrane spanning domain*.

NBD-(n°): del inglés *nucleotide binding domain (n°)*.

NCBI: del inglés *national center for biotechnology information*.

NF-κB: del inglés *nuclear factor kappa B*.

N-C4-HSL: N-butiril-L-homoserina lactona.

PMAP: patrones moleculares asociados a patógeno.

PBS: del inglés *phosphate buffered saline*.

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*.

Pel: del inglés *pellicle formation*.

PLP: piroxidal 5' fosfato.

PQS: del inglés *Pseudomonas quinolone signal* o 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona.

Psi: del inglés *polysaccharide synthesis locus*.

QS: *quorum sensing*.

RBS: del inglés *ribosome binding site*.

RTE: resistencia transepitelial.

RT-PCR: PCR de transcripción reversa a tiempo real.

SP-A: proteína surfactante A.

SST(nº): sistema de secreción tipo (nº).

SCVs: del inglés *small colony variants*.

TLR: del inglés *toll like receptor*.

ori: origen de replicación.

oriT: origen de transferencia conjugativa.

UFC: unidades formadoras de colonias.

ZO: del inglés *zonula occludens*.

3-oxo-C12-HSL: N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona.

A mi familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la concesión de una ayuda por parte del ministerio de economía, industria y competitividad para la contratación de personal investigador en formación 2013, asociado al proyecto SAF 2012-38426.

Le agradezco a mi director de tesis el Dr. Sebastián Albertí y al resto del grupo todo su esfuerzo, trabajo y dedicación. Asimismo, agradezco al grupo de la Dr. Joanna B. Goldberg, al grupo del Dr. Joseph Alexander Christie Oleza y al grupo del Dr. Antonio Oliver su valiosa ayuda.

Además, quiero agradecer la calidez y calidad humana de la mayoría de los que han pasado por el edificio iUNICS.

Por último y más importante, quiero darle las gracias a mi incondicional familia, a mi familia política y a *un parell d'amics* por toda esta riqueza que nos une, que ni se puede valorar con dinero ni se puede definir bien con palabras.

## ÍNDICE

Resúmenes .....	1
Introducción .....	8
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
1.1. Características generales .....	9
1.2. Infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	10
2. Adaptación de <i>P. aeruginosa</i> en infecciones crónicas .....	16
2.1. Formación del Biofilm .....	17
2.2. Fenotipo mucóide .....	20
2.3. Pérdida de movilidad .....	22
2.4. Alteración del lipopolisacárido .....	25
2.5. Aparición de cepas hipermutadoras .....	27
2.6. Alteraciones del <i>Quorum Sensing</i> .....	28
2.7. Alteraciones más significativas de proteínas de membrana externa .....	30
2.8. Aparición de <i>Small Colony Variants</i> .....	32
2.9. Adaptaciones metabólicas .....	33
Hipótesis y Objetivos .....	35
Materiales y métodos .....	37
1. Procedimientos microbiológicos .....	38
1.1. Microorganismos y medios de cultivo .....	38
1.2. Aislamiento y cuantificación de la producción del exopolisacárido de alginato .....	38
1.3. Ensayos de movilidad bacteriana .....	39
2. Ensayos con células humanas .....	39
2.1. Línea celular y medio de cultivo .....	39
2.2. Ensayos de permeabilidad .....	40
2.3. Determinación de la viabilidad celular .....	41
2.4. Ensayos de invasión y trans migración bacteriana .....	41
2.5. Obtención de extractos celulares, fracción citoplasmática y fracción nuclear .....	42
2.6. Microscopía electrónica .....	42
3. Técnicas inmunológicas .....	42
3.1. Análisis de proteínas por <i>Western blot</i> .....	42
3.2. Cuantificación de IL-8 .....	44
3.3. Inmunomicroscopía de fluorescencia .....	44
4. Técnicas de genética molecular .....	44
4.1. Procedimientos generales .....	44
4.2. Cuantificación de ARNm por RT-PCR .....	45
4.3. Transformación .....	46
4.4. Electroporación .....	46
4.5. Conjugación .....	46
4.6. Construcción del mutante deficiente en <i>eftM</i> .....	47
4.7. Complementación de los mutantes deficientes en <i>eftM</i> .....	48
5. Modelo murino de infección respiratoria por <i>P. aeruginosa</i> .....	50
6. Análisis proteómico .....	50
Resultados capítulo I .....	52
Resultados capítulo II .....	64
Discusión .....	76
Conclusiones .....	87
Apéndice .....	89
Bibliografía .....	92

# RESÚMENES

**RESUMEN**

**Introducción:** *Pseudomonas aeruginosa* es el principal responsable de las infecciones crónicas en los pacientes con fibrosis quística, en los que causa una elevada tasa de morbilidad y mortalidad. En estas infecciones, el microorganismo sufre numerosas adaptaciones que le permiten sobrevivir en el ambiente hostil del pulmón y que dificultan la erradicación de la infección. Entre estas adaptaciones se encuentran la mutación de *mucA* y la trimetilación del factor de elongación Tu (EF-Tu). La mutación de *mucA* confiere el fenotipo mucóide por hiperproducción del exopolisacárido de alginato y su aparición se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad. La trimetilación de EF-Tu la realiza la metiltransferasa EftM, generando un epítipo estructuralmente similar a la fosforilcolina, que facilita la interacción con las células del huésped. En esta tesis hemos profundizado en el estudio del impacto que tienen estas dos adaptaciones sobre la patogenicidad de *P. aeruginosa*.

**Contenido de la investigación:** En una primera parte, se ha investigado el efecto de la mutación de *mucA*, sobre la capacidad de invasión y diseminación del microorganismo y los mecanismos moleculares y celulares que subyacen en este efecto. Para ello se ha analizado la capacidad de alterar y atravesar un epitelio respiratorio humano polarizado por parte de una colección de aislados, mucóides y no mucóides, procedentes tanto de infecciones respiratorias agudas como crónicas, una cepa de laboratorio y el mutante isogénico deficiente en *mucA* derivado de ella. Nuestros resultados han demostrado que el fenotipo mucóide se asocia a una menor capacidad para alterar y cruzar la barrera epitelial. *P. aeruginosa* altera la permeabilidad del epitelio gracias a la reducción de los niveles de una proteína esencial en la unión entre células, ZO-1. Esta reducción está mediada por la acción de las exotoxinas bacterianas ExoS y ExoT y por la activación del factor de transcripción celular NF- $\kappa$ B inducida por el patógeno. La mutación de *mucA* reduce la expresión de las exotoxinas y la capacidad del microorganismo para inducir la activación de NF- $\kappa$ B. Estos dos hechos, junto con la menor movilidad que presenta el mutante deficiente en *mucA*, contribuyen a la reducida capacidad invasora que presentan las cepas mucóides.

En una segunda parte, se ha investigado el impacto de la trimetilación de EF-Tu sobre la patogenicidad del microorganismo mediante el análisis del proteoma global de la cepa de laboratorio PAO1 y la cepa HM4, procedente de una infección crónica, los respectivos mutantes isogénicos deficientes en la metiltransferasa responsable de la modificación (EftM) y los correspondientes mutantes complementados. Nuestros resultados han demostrado que la modificación de EF-Tu altera de forma muy discreta un número muy reducido de proteínas que hasta la fecha no han sido implicadas en la patogenicidad del microorganismo. Sin embargo, los resultados obtenidos en un modelo murino de neumonía demuestran que la deficiencia de EftM reduce la virulencia de *P. aeruginosa*.

**Conclusiones:** La mutación de *mucA* reduce la capacidad invasora de *P. aeruginosa* debido a que afecta a los mecanismos que el microorganismo utiliza para alterar la permeabilidad de la barrera epitelial; la reducción de la proteína de unión intercelular ZO-1 mediada por la acción de las exotoxinas y la inducción de la activación de NF-kB. Este hecho podría determinar el confinamiento de las cepas mucoides en el pulmón de los pacientes con fibrosis quística.

El impacto de la trimetilación de EF-Tu sobre la patogenicidad de *P. aeruginosa* parece residir únicamente en la generación de un dominio estructural similar a la fosforilcolina que facilita la interacción del microorganismo con las células humanas

**RESUM**

**Introducció:** *Pseudomonas aeruginosa* es el principal responsable de les infeccions cròniques en pacients amb fibrosis quística, als quals causa una elevada taxa de morbiditat i mortalitat. En aquestes infeccions, el microorganisme sofreix nombroses adaptacions que li permeten sobreviure a l'ambient hostil del pulmó i que dificulten l'erradicació de la infecció. Entre aquestes adaptacions es troba la mutació de *mucA* i la trimetilació del factor d'elongació Tu (EF-Tu). La mutació de *mucA* confereix el fenotip mucoid per hiperproducció de l'exopolisacàrid d'alginat i la seva aparició s'associa a un mal pronòstic de la malaltia. La trimetilació de EF-Tu la realitza la metiltransferasa EftM, generant un epítot estructuralment semblant a la fosforilcolina, que facilita la interacció amb les cèl·lules de l'hoste. En aquesta tesis hem aprofundit en l'estudi de l'impacte que tenen aquestes dues adaptacions sobre la patogenicitat de *P. aeruginosa*.

**Contingut de la recerca:** En una primera part, s'ha investigat l'efecte de la mutació de *mucA*, en la capacitat d'invasió i disseminació del microorganisme i els mecanismes moleculars i cel·lulars subjacents a aquest efecte. Per a això s'ha analitzat la capacitat d'alterar i travessar un epiteli respiratori humà polaritzat per part d'una col·lecció d'aïllats, mucosos i no mucosos, procedents tant d'infeccions respiratòries agudes como cròniques, una soca de laboratori i el mutant isogènic deficient en *mucA* derivat d'ella. Els nostres resultats han demostrat que el fenotip mucoid s'associa a una menor capacitat per alterar i creuar la barrera epitelial. *P. aeruginosa* altera la permeabilitat de l'epiteli gràcies a la reducció dels nivells d'una proteïna essencial en la unió de cèl·lules, ZO-1. Aquesta reducció té lloc mitjançant l'acció de les exotoxines bacterianes ExoS i ExoT i per l'activació del factor de transcripció cel·lular NF-κB induïda pel patogen. La mutació de *mucA* redueix l'expressió de les exotoxines i la capacitat del microorganisme per induir l'activació de NF-κB. Aquests dos fets, juntament amb la menor mobilitat que presenta el mutant deficient en *mucA*, contribueixen a la reduïda capacitat invasora que presenten les soques mucoides.

En una segona part, s'ha investigat l'impacte de la trimetilació d'EF-Tu sobre la patogenicitat del microorganisme mitjançant l'anàlisi del proteoma global de la soca de laboratori PAO1 i la soca HM4, procedent d'una infecció crònica, els respectius mutants isogènics deficients en la metiltransferasa responsable de la modificació (EftM) i els corresponents mutants complementats. Els nostres resultats han demostrat que la modificació d'EF-Tu altera de forma molt discreta un nombre molt reduït de proteïnes que fins a la data no han estat implicades en la patogenicitat del microorganisme. En canvi, els resultats obtinguts en un model murí de pneumònia demostren que la deficiència d'EftM redueix la virulència de *P. aeruginosa*.

**Conclusions:** La mutació de *mucA* redueix la capacitat invasora de *P. aeruginosa*, ja que afecta als mecanismes que el microorganisme utilitza per alterar la permeabilitat de la

barrera epitelial; la reducció de la proteïna d'unió intercel·lular ZO-1 mitjançant l'acció de les exotoxines i la inducció de l'activació de NF-kB. Aquest fet podria determinar el confinament de les soques mucoides en el pulmó dels pacients amb fibrosis quística.

L'impacte de la trimetilació d'EF-Tu sobre la patogenicitat de *P. aeruginosa* sembla residir únicament en la generació d'un domini estructural semblant a la fosforilcolina, que facilita la interacció del microorganisme amb les cèl·lules humanes.

**ABSTRACT**

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is the main responsible for chronic infections in cystic fibrosis patients and currently accounts for the majority of the morbidity and mortality seen in the disease. In order to persist in the lung of these patients, this microorganism undergoes several characteristic adaptations including mutation of *mucA* and trimethylation of the elongation factor Tu (EF-Tu). Mutation of *mucA* confers a mucoid phenotype to *P. aeruginosa*, due to the exopolysaccharide alginate hyperproduction, and is associated with a poor prognosis of the disease. Trimethylation of EF-Tu, mediated by the methyltransferase EftM, results in an epitope that mimics phosphorylcholine which mediates the interaction with the host cells. In this work we have investigated the impact of both adaptations on *P. aeruginosa* pathogenicity.

**Research content:** In the first part, we have investigated the effect of the mutation of *mucA* on the invasive capacity of the microorganism. We have analyzed the ability to alter and cross a polarized human respiratory epithelium using a collection of isolates, mucoid and non-mucoid, from both acute and chronic respiratory infections; a laboratory strain and the derived *mucA* deficient isogenic mutant. Our results have showed that mucoid phenotype is associated with a lower ability to alter and cross the epithelial barrier. We have demonstrated that *P. aeruginosa* alters the permeability of the epithelium due to the reduction of ZO-1 levels, a protein associated with the intercellular tight junctions. ZO-1 reduction is mediated by exotoxins ExoS and ExoT and by *P. aeruginosa* induced activation of NF- $\kappa$ B. *MucA* mutation reduced the expression of both exotoxins and the ability to induce the activation of NF- $\kappa$ B. These two facts, together with the lower mobility of the *mucA* deficient mutant contribute to the reduced invasive capacity exhibit by the mucoid strain.

In the second part, we have investigated the effect of the modification of EF-Tu on the pathogenicity of *P. aeruginosa* through the analysis of the global proteome of the laboratory strain PAO1 and the clinical strain HM4, derived from a chronic infection, the deficient isogenic *eftM* mutants derived from both strains and the corresponding complemented mutants. Our results have showed that the modification of EF-Tu alters slightly the expression of a reduced number of proteins. To our knowledge, none of the altered proteins detected have been implicated in the virulence of this microorganism. However, the results obtained in a murine model of pneumonia show that the deficiency of EftM reduces the virulence of *P. aeruginosa*.

**Conclusions:** Mutation of *mucA* reduces the invasiveness of *P. aeruginosa* because it impairs the strategies that this microorganism exploits to disrupt the permeability of the epithelial barrier; reduction of the intercellular tight junction protein ZO-1 mediated by the exotoxins and induction of NF- $\kappa$ B activation. The impact of the trimethylation of EF-TU on the

pathogenicity of *P. aeruginosa* seems to rely exclusively on the generation of a structural epitope that mimics phosphorylcholine which facilitates the interaction with the host cell.

# **INTRODUCCIÓN**

---

**INTRODUCCIÓN**
**1. *Pseudomonas aeruginosa*.****1.1. Características generales.**

*Pseudomonas aeruginosa* fue por primera vez aislada en cultivo puro y caracterizada por Gessard en 1882 (Gessard 1882). Recibió el nombre de *Bacillus pyocyaneus* debido a su forma y a la presencia de pirocianina, un pigmento característico de este microorganismo. Más adelante en 1899 se describió su capacidad para producir al menos cuatro pigmentos: negro, azul, verde y amarillo (Jordan 1899). La variabilidad tanto en la producción de pigmentos, como en la morfología colonial observada puso de manifiesto el comportamiento cambiante de *P. aeruginosa* y su dificultad en la identificación y clasificación durante los años posteriores (Gabi 1945). Actualmente, el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) clasifica *P. aeruginosa* según se indica en la tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación de *P. aeruginosa*.**

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

*P. aeruginosa* es un bacilo recto o ligeramente curvado cuyas dimensiones oscilan entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de anchura por 1,5 y 4  $\mu\text{m}$  de longitud, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Tiene movilidad gracias a la presencia de un solo flagelo. No forma esporas. Sus requerimientos nutricionales son simples, es quimioorganotrofo y utiliza el oxígeno como último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, aunque tiene capacidad para utilizar el nitrógeno en condiciones anaeróbicas. No es fermentador. Las condiciones de crecimiento óptimas son a pH neutro y 37°C. Sin embargo, puede crecer a temperaturas inferiores, a 22°C, o incluso superiores, a 42°C. Es oxidasa y catalasa positivo (Madigan et al. 2004).

Se encuentra de forma ubicua en el ambiente y tiene un gran genoma compuesto por 6,3 Mpb. Se predice que tiene 5570 marcos abiertos de lectura y que el 8,4% de los genes están implicados en la regulación. Se cree también que hay al menos 150 genes que codifican para proteínas de membrana externa, un número mucho mayor que los que presentan otros genomas bacterianos secuenciados. Además, posee un sistema quimiotáctico muy complejo. Estas características hacen que pueda adaptarse a ambientes poco favorables y que además sea un patógeno oportunista de gran importancia a nivel clínico por su resistencia a múltiples antibióticos y desinfectantes (Stover et al. 2000).

*P. aeruginosa* tiene mecanismos para adaptar su genoma mediante la alteración y movilización del su material genético. Además, puede adquirir nuevos elementos genéticos que le aportan nuevas características sin que, como ocurre en otras adaptaciones patógeno-huésped, se reduzca el genoma del patógeno como consecuencia de la relación establecida. Esta diferencia permite a *P. aeruginosa* vivir en un amplio rango de ambientes incluido el huésped humano de forma crónica (Mathee et al. 2008).

### **1.2. Infecciones causadas por *P. aeruginosa*.**

*P. aeruginosa* se encuentra habitualmente en el ambiente y puede formar parte de la microbiota normal sin causar infecciones en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, en ocasiones, en estos individuos provoca foliculitis, otitis externa e infecciones corneales (Zichichi, Asta, y Noto 2000; Willcox 2007; Weingarten 1977). En este sentido, *P. aeruginosa* causa queratitis ulcerosa a raíz de traumatismos corneales o asociado al uso de lentillas y provoca especial morbilidad por progresar rápidamente y por la pérdida de visión a largo plazo, estando especialmente implicados factores de virulencia como la proteasa alcalina, las elastasas (LasA y LasB) y la exotoxina ExoU (Lomholt, Poulsen, y Kilian 2001; Oka et al. 2015).

Es en los individuos inmunocomprometidos en los que *P. aeruginosa* causa más infecciones. Son vulnerables los individuos portadores del virus de la inmunodeficiencia humana, los trasplantados y los que toman terapia inmunosupresora (Kielhofner et al. 1992; Zeglen et al. 2009; Veroux et al. 2008). En especial los trasplantados de pulmón, quienes en caso de infección son aún más susceptibles de desarrollar rechazo (Botha et al. 2008).

Además, *P. aeruginosa* causa infecciones nosocomiales, que son aquellas que se desarrollan tras las primeras 48h desde la atención hospitalaria y que no se habían manifestado ni estaban en periodo de incubación. Los microorganismos se ven sometidos a la presión selectiva y a la transferencia horizontal de genes de resistencia, que en entorno hospitalario determinan la selección de cepas multirresistentes (Dzidic y Bedeković 2003). En este sentido, *P. aeruginosa* muestra una gran capacidad para adaptarse y ajustar su repertorio genómico en función del ambientes y las dificultades (Mathee et al. 2008). Llama la atención que *P. aeruginosa* pueda crecer en el agua destilada de los hospitales (Favero et al. 1971).

La transmisión de *P. aeruginosa* se da principalmente a través de las manos del personal sanitario (Lowbury et al. 1970; Widmer et al. 1993). Son especialmente vulnerables los individuos en unidad de cuidados intensivos por el elevado contacto con el personal sanitario y los numerosos dispositivos invasivos que suelen portar. En concreto, en relación a la ventilación mecánica invasiva en estas unidades *P. aeruginosa* es el microorganismo más aislado de neumonías nosocomiales (Fernández-Barat et al. 2017). Debe por tanto hacerse especial énfasis en las barreras de protección y la higiene de manos para su prevención

(Lowbury et al. 1970; Prasad et al. 2009), aunque en ocasiones el foco de infección es el propio paciente (Kropec et al. 1993).

Además de las infecciones comentadas, cuyo principal factor determinante es la vulnerabilidad del huésped, *P. aeruginosa* puede provocar infección al producirse una herida, ya sea quirúrgica, por quemadura o por ulceración dado que se rompe la barrera de protección de la piel, incrementando la susceptibilidad a infecciones. Las quemaduras, aunque son estériles en un primer momento, proporcionan un medio rico en proteínas excelente para el crecimiento de microorganismos (Church et al. 2006).

*P. aeruginosa* es el microorganismo más aislado de heridas por quemaduras y el segundo más aislado en heridas quirúrgicas tras *Staphylococcus aureus* (Estahbanati, Kashani, y Ghanaatpisheh 2002; Giacometti et al. 2000; Bowen-Jones 1990). *P. aeruginosa* también ha sido aislado en úlceras por presión (James et al. 2008; Fazli et al. 2009).

Las infecciones en individuos quemados suelen progresar rápidamente y derivar en bacteriemia y sepsis. La causa es el fallo local, donde se ha producido la quemadura, en la respuesta de neutrófilos y linfocitos, así como el consumo de componentes del sistema del complemento como el C3 e inmunoglobulinas (Deitch et al. 1987; Deitch, Dobke, y Baxter 1985). En este sentido, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de causar bacteriemia también a partir de infecciones respiratorias al interrumpir la barrera pulmonar y diseminarse a la sangre (Berube, Rangel, y Hauser 2016).

### 1.2.1. Infecciones respiratorias

El sistema respiratorio puede sufrir infecciones al encontrarse en contacto con el exterior. Una infección respiratoria causada por *P. aeruginosa* pueden diferir de rápida y fatal en un individuo neutropénico a una neumonía de décadas de evolución en un paciente con una patología pulmonar de base (Williams, Dehnbostel, y Blackwell 2010).

#### - Infecciones agudas

En pacientes previamente sanos, las neumonías adquiridas en la comunidad por *P. aeruginosa* son raras. En estos individuos se aísla más frecuentemente *Streptococcus pneumoniae* y *S. aureus* (Restrepo et al. 2006). Las causadas por *P. aeruginosa* adquirida en la comunidad presentan una progresión muy rápida, que en el 33% causa la muerte. En este sentido, es importante considerar que a pesar de estar sanos hasta el momento previo a la neumonía, al realizarse un estudio clínico completo en la mayoría de casos se descubren factores de riesgo asociados como: reciente exposición a corticosteroides, uso de antibióticos previo, ser fumadores o presentar de forma silente alguna patología de base crónica como la diabetes (Hatchette, Gupta, y Marrie 2000).

Como se ha comentado las infecciones agudas por *P. aeruginosa* más frecuentes son las infecciones nosocomiales (Fernández-Barat et al. 2017; Kropec et al. 1993). Para causar infección aguda *P. aeruginosa* presenta ciertos mecanismos que facilitan el inicio de la

infección y que a su vez la autolimitan dado que provocan en el huésped una respuesta inmune que impide la cronificación de la infección. Entre estos mecanismos destacan las fimbrias, el flagelo y el lipopolisacárido como factores de virulencia (Drake y Montie 1988; Knirel 1990; Lau et al. 2004).

Las fimbrias y el flagelo son importantes para el inicio de la infección aguda dado que permiten la movilización de la bacteria, así como el anclaje de la misma a diferentes superficies (Strom y Lory 1993; Semmler, Whitchurch, y Mattick 1999). Sin embargo, son altamente inmunogénicos y el sistema inmune del huésped los detecta (Feldman et al. 1998; Tang et al. 1995). Lo mismo ocurre con el lipopolisacárido, que forma parte de la estructura de la bacteria y le confiere protección. Sin embargo, también es altamente inmunogénico.

Por otra parte *P. aeruginosa* cuenta con otros productos que excreta al exterior y que también contribuyen a la patogénesis como son pigmentos, exoproteasas, exotoxinas y fosfolipasas. Algunos de ellos son exportados a través de los llamados sistemas de secreción (Lau et al. 2004; Filloux 2011).

Entre los pigmentos que produce *P. aeruginosa*, la piocianina (azul) tiene la capacidad de provocar efectos proinflamatorios, citotóxicos, la apoptosis de neutrófilos y la interrupción del movimiento ciliar en el huésped. Estos efectos son importantes en la infección aguda dado que los mutantes para este pigmento son menos perjudiciales para el huésped que los que sí producen piocianina (Liu y Nizet 2009; Lau et al. 2004).

Los sistemas de secreción, además, permiten excretar factores de virulencia nocivos para el huésped. En *P. aeruginosa* se ha estudiado principalmente el sistema de secreción tipo III (SST3) (Hauser 2009). Sin embargo, la heterogeneidad de los sistemas de secreción tipo III entre aislados clínicos de *P. aeruginosa* complican la interpretación de los estudios dada la virulencia relativa asociada a los distintos efectores (Shaver y Hauser 2004). Entre las proteínas efectoras destacan: ExoS, que altera el citoesqueleto de actina pudiendo contribuir a la disminución de la adherencia entre células y facilitando la entrada de la bacteria a través del epitelio en infección aguda (Hauser 2009) y ExoU, poco frecuente en cepas que presentan ExoS (Shaver y Hauser 2004), siendo esta última una potente fosfolipasa capaz de causar una muerte celular de forma rápida (Hauser 2009).

Entre las exoproteasas se ha estudiado principalmente LasA y LasB, también conocidas como elastasas (Toder et al. 1994). Estas son secretadas por el sistema de secreción tipo II (SST2), al igual que la fosfatasa alcalina y lipasas (A y C) (Cianciotto 2005), todas ellas implicadas en el ataque del huésped en infecciones agudas.

### **- Infecciones crónicas**

Las infecciones crónicas de las vías respiratorias son muy frecuentes en gran variedad de grupos de pacientes que tienen en común la acumulación de moco y la inflamación crónica de las mismas. Tal es el caso de pacientes con fibrosis quística (FQ), bronquiectasia o

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) avanzada. Las infecciones en estos pacientes se caracterizan por tener una progresión lenta y por una sintomatología que dificulta su diagnóstico. Las posibilidades de curación son escasas y la dificultad para eliminar *P. aeruginosa* con terapia antibiótica es casi nula dada la capacidad de este microorganismo para adaptarse a las condiciones desfavorables y persistir (Zhou-Suckow et al. 2017; Moradali, Ghods, y Rehm 2017).

### · Bronquiectasia

La bronquiectasia es una inflamación anormal y permanente del árbol bronquial de las vías respiratorias. Esta inflamación del tejido reduce las microvellosidades del epitelio impidiendo la eliminación correcta del moco, que se acumula y obstruye. Se suele clasificar la bronquiectasia en relacionada a fibrosis quística o no relacionada, y puede solaparse a otras enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Su causa suele ser multifactorial. Dos de los síntomas comúnmente asociados a la bronquiectasia son la rinosinusitis y la fatiga. Los principales patógenos aislados en infecciones relacionadas con bronquiectasia son *Haemophilus influenzae* y *P. aeruginosa* (King et al. 2006).

### · Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una limitación persistente y progresiva del flujo aéreo asociado a inflamación crónica de las vías aéreas y parénquima pulmonar. Normalmente se ha iniciado por partículas o gases, o debido a una deficiencia del enzima alfa-1-antitripsina (una proteína que protege de las proteasas al epitelio pulmonar). El epitelio de los alveolos queda dañado y disminuye la capacidad de intercambio gaseoso incrementando el espacio muerto. Para su diagnóstico se tiene en cuenta la presencia de tos crónica productiva y disnea, exposición previa a factores de riesgo (tabaco, exposición ocupacional a partículas o químicos) y una espirometría forzada tras la administración de broncodilatador que resulta en una ratio entre el volumen expiratorio forzado en el primer segundo y la capacidad vital forzada inferior a 0,7.

Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la severidad del proceso y hacen que incremente la inflamación. En nuestro entorno, el tabaco es el principal factor de riesgo, sin embargo, no todos los fumadores desarrollan EPOC.

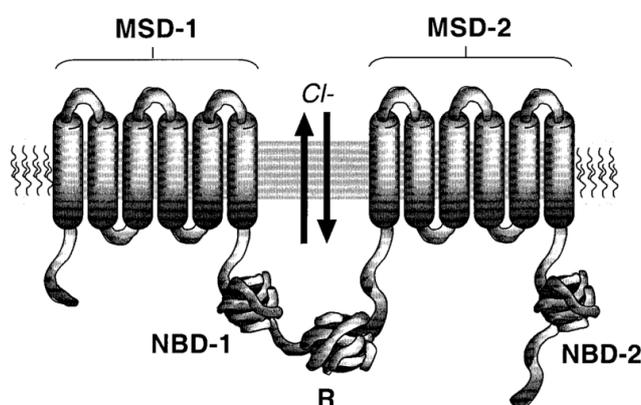
Las neumonías adquiridas en la comunidad en los pacientes con EPOC son frecuentemente signo de mal pronóstico y presentan peor evolución que en otros pacientes, siendo *P. aeruginosa* y *H. influenzae* los microorganismos más frecuentemente aislados (Restrepo et al. 2006).

### · Fibrosis Quística

La fibrosis quística (FQ) es una alteración genética de herencia recesiva en la que los individuos afectados presentan para los dos alelos del gen que codifica la proteína transmembrana reguladora de la conductancia (CFTR del inglés *Cystic Fibrosis Conductance*

*Transmembrana Regulator*) una alteración que impide su correcto funcionamiento. El gen que codifica la proteína CFTR está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en la región q31-q32 y tiene una longitud aproximada de 250kb (Kerem et al. 1989; Zielenski et al. 1991).

La proteína CFTR es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de transportadores ABC de unión a ATP. Los principales motivos que definen esta proteína ABC son dos dominios transmembrana formados por 6 péptidos (MSD-1 y 2) y dos dominios de unión a nucleótido (NBD-1 y 2) (figura 1). La longitud de los bucles hidrofóbicos que forman el canal está muy conservada sugiriendo que la estructura que forman es imprescindible para la función del canal iónico (Lyczak, Cannon, y Pier 2002).



**Figura 1. Diagrama estructural de la proteína CFTR.** MSD-1 y 2 son dominios transmembrana de la proteína, mientras que NBD-1 y 2 son los dominios de unión a nucleótidos. La regulación tiene lugar gracias al dominio R (Lyczak, Cannon, y Pier 2002).

Se estima que la población caucásica tiene una incidencia de FQ de 1 por cada 2000-3000 nacimientos. Siendo la incidencia entre los españoles de 1 por cada 3500 nacimientos. Además, se han identificado más de 1000 mutaciones diferentes posibles para el CFTR (Bobadilla et al. 2002). Estos cambios pueden ser clasificados en 5 clases según el efecto de la mutación, que va desde la síntesis de la proteína CFTR no funcional, hasta la síntesis funcional pero en cantidades insuficientes (tabla 2) (McDaniel, Panmanee, y Hassett 2015).

**Tabla 2. Mutaciones del gen *cftr* y sus efectos.**

Clase	Impacto sobre la proteína CFTR	Ejemplos de mutaciones
Clase I	Síntesis no funcional de CFTR	G542X, W1282X, R553X, 621+1G→A
Clase II	Mal plegamiento de CFTR	F058Δ, N1303K, I507Δ, G85E, R560T.
Clase III	CFTR en la superficie celular, pero funcionamiento incorrecto	G551D, S549N, V520F, L1077P, G1244E
Clase IV	Apertura del canal CFTR defectuosa	R117H, D1152H, R347P, R334W, L206W.
Clase V	CFTR en cantidades insuficientes	3849+10kbC→T, 2789+5G→A, A455E, 3272-26A→G, 3120G→A

La función del CFTR es regular, a través de la membrana celular, el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , importante para el equilibrio osmótico y la hidratación (Sheppard y Welsh 1999), siendo el principal transportador de  $\text{Cl}^-$  de la célula y muy importante también para el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  (McDaniel, Panmanee, y Hassett 2015). Además, el CFTR tiene un papel en la activación del sistema inmune innato (Schroeder et al. 2002). Esta alteración tiene implicaciones a nivel sistémico. Sin embargo, afecta especialmente a la fisiología de los pulmones. El principal problema es la alteración del transporte de fluido en el epitelio pulmonar que genera dificultades para respirar (Jiang et al. 1993).

El líquido en la superficie del epitelio contiene mayor cantidad de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , provocando deshidratación de la superficie epitelial generando un moco más espeso y difícil de eliminar a través de las microvellosidades y de la tos (R. C. Boucher 2004). Además, recientemente se ha determinado que el moco se acumula debido a un defecto en las glándulas submucosas y las microvellosidades (Hoegger et al. 2014), impidiendo aún más su eliminación. Estas diferencias, respecto a los pulmones de un individuo sin FQ, se observan también en los niveles de citoquinas del esputo. En individuos con FQ los niveles de citoquinas proinflamatorias son elevados en comparación con pacientes que también presentan inflamación de las vías respiratorias pero no FQ (Osika et al. 1999). En este sentido, se ha demostrado que incluso antes de infectarse, en fetos no nacidos, las vías respiratorias de FQ se encuentran en un estado proinflamatorio, indicando que la inflamación es previa a la infección (Tirouvanziam et al. 2000; Verhaeghe et al. 2007).

*P. aeruginosa* es uno de los microorganismos más aislados de pacientes con FQ junto con *H. influenzae* y *S. aureus*, siendo los 6 meses de vida la media de edad en la que estos pacientes son colonizados (Saiman 2004). En este sentido, se ha visto que, aunque *P. aeruginosa* puede ser adquirida de forma temprana, su prevalencia es mayor en la edad adulta (figura 2).

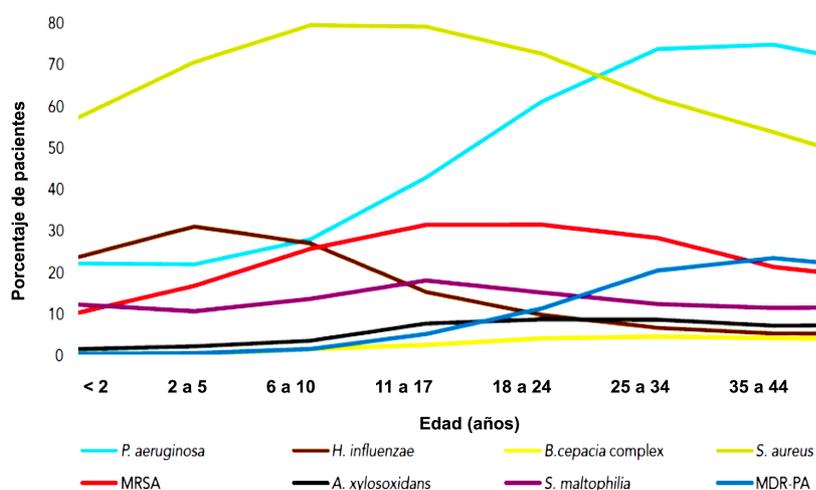


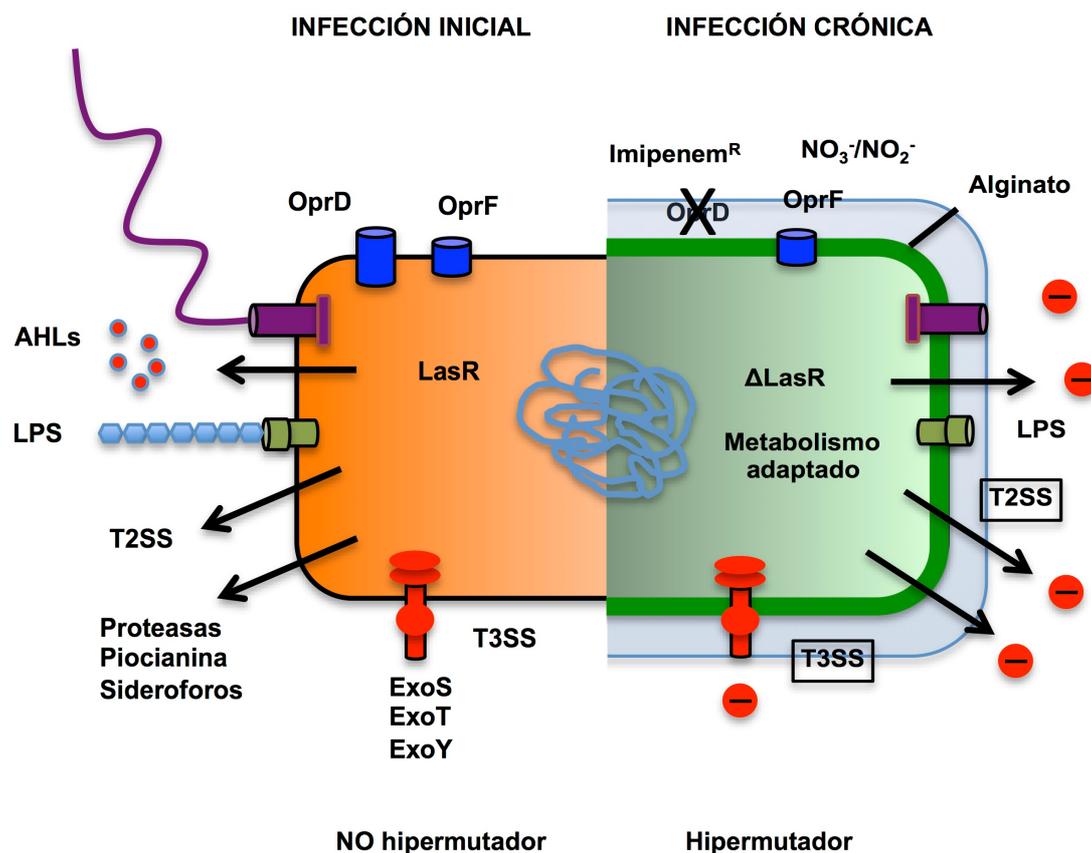
Figura 2. Prevalencia de microorganismos en pacientes con FQ según la edad (McDaniel, Panmanee, y Hassett 2015).

Desde la primera colonización de *P. aeruginosa* hasta la infección crónica tienen lugar en *P. aeruginosa* adaptaciones genómicas (Laurans et al. 2006). En este sentido, la regulación génica se altera dando lugar a mutantes que difieren genotípicamente y fenotípicamente a la cepa que origina la infección. Estos mutantes no se encuentran de forma normal en el ambiente (Bragonzi et al. 2009), siendo, en general, los factores de virulencia que determinan el inicio de la infección reprimidos en estadios crónicos (Smith et al. 2006; Luzar y Montie 1985). La expansión clonal que tiene lugar durante la evolución de la infección crónica por *P. aeruginosa* da lugar a una población con una menor capacidad para iniciar una infección aguda, pero con mayor capacidad para persistir en el huésped causando infección crónica, es decir, con una virulencia alterada, pero no reducida (Bragonzi et al. 2009). Se ha visto que el impacto que tiene *P. aeruginosa* en el deterioro del pulmón es más grave que el que tienen otros patógenos y más rápido. En estos pacientes abundan proteínas asociadas al deterioro de la función pulmonar y especies reactivas de oxígeno (Pattison et al. 2017; Z. Li et al. 2005a).

Dadas las características comentadas y según la bibliografía los pacientes con FQ son el ejemplo más característico de infección respiratoria crónica.

### **2. Adaptación de *P. aeruginosa* en infecciones crónicas.**

*P. aeruginosa* debe superar numerosas condiciones desfavorables tales como el estrés osmótico, la competición con otros posibles colonizadores, la escasez de nutrientes apropiados, el estrés oxidativo y los antibióticos para poder mantenerse y sobrevivir durante años en el pulmón de los pacientes con FQ, EPOC o bronquiectasias. Esto supone una transformación del estilo de vida que este microorganismo afronta mediante alteraciones en la expresión de sus genes que implican variaciones fenotípicas significativas. Está demostrado que en los pacientes con FQ, *P. aeruginosa* experimenta numerosos cambios que le permiten adaptarse a las condiciones específicas del pulmón. Algunos de estos cambios son exclusivos para que el microorganismo persista en el pulmón dado que revierten fácilmente en condiciones de crecimiento en el laboratorio. En este apartado se analizan aquellos cambios más significativos que tienen lugar en el proceso de adaptación hacia la cronificación de una infección por *P. aeruginosa* y que se muestran esquematizados en la figura 3.

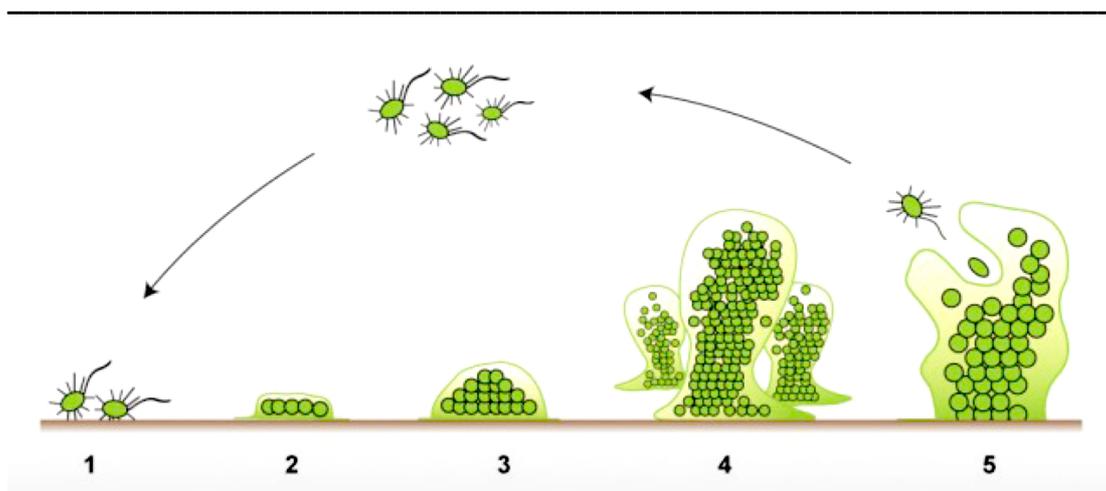


**Figura 3. Adaptaciones de *P. aeruginosa* a la infección crónica.** Algunas de las principales adaptaciones que tienen lugar en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de infección crónica (derecha) respecto a las procedentes de infección respiratoria aguda (izquierda) (Hogardt y Heesemann 2010).

### 2.1. Formación de Biofilm.

El biofilm es una comunidad bacteriana adherida entre sí y a una superficie, biótica o abiótica, que se coordina y fabrica una matriz de sustancias poliméricas en la que se embebe. Se trata de un modo de vida que permite la supervivencia en medio hostil ya que tolera los cambios desfavorables del ambiente. Se ha podido observar la presencia de biofilms tanto en el ambiente como en muchos tipos de infecciones, en especial, en las persistentes (Costerton, Stewart, y Greenberg 1999).

Se ha estudiado el crecimiento y desarrollo del biofilm en un medio mínimo en glucosa, comparable en ciertos aspectos a las condiciones de un proceso infeccioso. En estas condiciones el crecimiento se puede dividir en 5 estadios fenotípicos (Figura 4), estando fuertemente influenciado por la fuente de carbono y las condiciones ambientales (Klausen et al. 2003; Rasamiravaka et al. 2015; De Kievit, Gillis, et al. 2001).



**Figura 4. Etapas en la formación de un biofilm.** En el primer estadio (1) las células individuales de vida planctónica se adhieren a una superficie biótica o abiótica, interaccionan entre sí y sintetizan una matriz que les rodea para acabar formando microcolonias (2) que posteriormente crecen (3) hasta dar lugar a un biofilm maduro (4). Finalmente, algunas bacterias pueden separarse del biofilm, volviendo al crecimiento planctónico y establecer un nuevo biofilm en una localización distinta (5) (Rasamiravaka et al. 2015).

En el estadio I se produce el anclaje irreversible de la bacteria a la superficie, seguido de la formación, en el estadio II, de microcolonias envueltas en matriz. En el estadio III se expanden y estructuran. En el IV el biofilm es maduro y confluye invadiendo toda la superficie. Finalmente, en el estadio V se produce dispersión de bacterias que son capaces de iniciar otra vez el proceso de anclaje y completan el ciclo del biofilm. Este crecimiento tiene lugar en tres dimensiones (Rasamiravaka et al. 2015).

Otros autores proponen un modelo paralelo de formación de biofilm a partir de agregados bacterianos flotantes (*microcolony formation*), en lugar de a partir del anclaje de una sola célula a una superficie. En este modelo, el anclaje para el inicio de la formación del biofilm no sería necesario. En cualquier caso, los agregados bacterianos cooperativos suponen una ventaja competitiva para acceder a los nutrientes además de mayor resistencia antibiótica y al sistema inmune respecto a las formas de vida libre (Rasamiravaka et al. 2015; Cogan et al. 2016; Kragh et al. 2016; Sriramulu et al. 2005).

Las células del biofilm, tanto a nivel macroscópico como a nivel de expresión génica, no presentan homogeneidad ni en el tiempo ni en el espacio. Presenta un patrón de expresión génica y de crecimiento que depende de las señales del ambiente y de la comunicación que se establece entre células (De Kievit, Gillis, et al. 2001). Se sabe que para la formación del biofilm el flagelo es imprescindible (O'Toole y Kolter 1998). Mutantes en el gen *fliC* (deficientes en el flagelo) no son capaces de formar biofilm en una superficie (Yoon et al. 2002). Sin embargo, más adelante, cuando el biofilm está establecido no parece ser necesario ya que se han aislado cepas sin flagelo de infecciones crónicas en enfermos de FQ (Mahenthiralingam, Campbell, y Speert 1994). El biofilm es un nicho ecológico complejo con fuerzas opuestas de selección que determina tasas de crecimiento muy bajas en unos aislados y altas en otros. La coexistencia de estos aislados de *P. aeruginosa* en un contexto

de infección crónica permite la optimización del crecimiento global del biofilm (Yang et al. 2007). En este sentido, se ha observado que aislados del biofilm disminuyen la expresión de bombas de expulsión de antibióticos (De Kievit, Parkins, et al. 2001) e incrementan la producción de alginato (Davies, Chakrabarty, y Geesey 1993) que confiere cierta protección. Una tasa de crecimiento baja junto con la disminución de la permeabilidad de la membrana celular y la presencia de alginato (De Kievit, Gillis, et al. 2001; Yun et al. 2006), explica porque las bombas de expulsión no son tan necesarias para la supervivencia en este contexto. Sin embargo, hay estudios que demuestran que hay una mayor expresión de bombas de expulsión en aislados de pulmón de pacientes con FQ, lo que tendría sentido si tenemos en cuenta la posición de la bacteria en el biofilm (Doumith et al. 2010). Las bacterias del interior del biofilm no tendrían la necesidad de incrementar la expresión de bombas de expulsión para protegerse de los antibióticos mientras que las de la periferia sí.

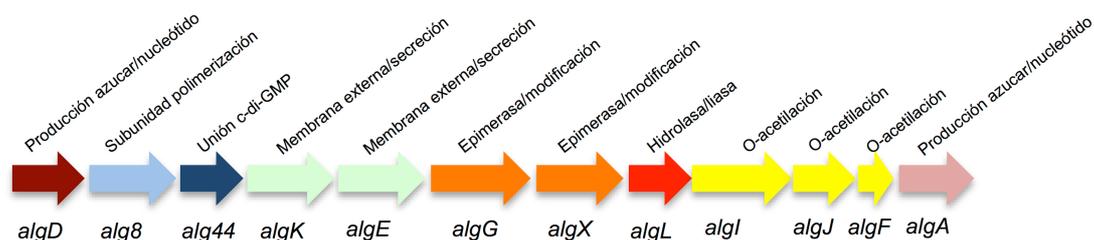
La estructura y fisiología del biofilm confiere resistencia a antibióticos, desinfectantes o germicidas debido a los cambios mencionados anteriormente. Como muchas dianas de antibióticos son los componentes celulares implicados en la replicación, transcripción, traducción o síntesis de la pared celular, las células del biofilm con baja tasa de crecimiento incrementan la tolerancia a dicha clase de antibióticos como por ejemplo: la tetraciclina, la tobramicina y el ciprofloxacino (Ciofu et al. 2015). Se ha observado que los agentes antimicrobianos presentan también patrones diferenciales de difusión al interior del biofilm. Así, por ejemplo, los antibióticos betalactámicos (inhibidores de la síntesis del peptidoglicano) se difunden en la matriz más rápidamente que los aminoglucósidos (inhibidores de la síntesis proteica), lo que está relacionado además de con la matriz, con los diferentes estadios de desarrollo y la diferente velocidad de crecimiento de los grupos de células (Donlan y Costerton 2002; Cogan et al. 2016; Costerton, Stewart, y Greenberg 1999). Por tanto, los antibióticos son menos efectivos contra el biofilm, contribuyendo a la cronicidad de las infecciones (Stewart y Costerton 2001; Costerton, Stewart, y Greenberg 1999).

Las células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, forman parte de la inmunidad innata del huésped y migran al sitio de infección para combatirla. En las infecciones crónicas por *P. aeruginosa* la formación del biofilm altera la migración de las células polimorfonucleares y quedan inmovilizados (Jesaitis et al. 2003). El biofilm responde mediante la liberación de componentes del *quorum sensing* de forma activa que bloquean la activación de las células polimorfonucleares (Bjarnsholt et al. 2005) lo que contribuye a la persistencia de *P. aeruginosa* (Alhede et al. 2009). Por otra parte los radicales libres liberados por las células polimorfonucleares provocan transformación al fenotipo mucóide, que es más difícil de erradicar (Mathee et al. 1999).

## 2.2. Fenotipo mucoide.

Uno de los cambios más aparente que se da en los aislados procedentes de infecciones crónicas es el aspecto mucoide que adquieren las colonias de éstos aislados. El aspecto de las cepas mucoides se debe a la síntesis de exopolisacáridos (EPS). En *P. aeruginosa* se han descrito la síntesis de al menos tres EPS distintos: el alginato, el Pel (del inglés *pellicle formation*) y el Psl (del inglés *polysaccharide synthesis locus*) (Franklin et al. 2011). Sin embargo, el aspecto mucoide está determinado principalmente por la producción del exopolisacárido de alginato.

Las cepas de *P. aeruginosa* procedentes de infecciones respiratorias crónicas son capaces de producir hasta 20-30 veces más alginato que las cepas procedentes de infecciones respiratorias agudas. El alginato es un polímero lineal parcialmente acetilado y formado por la unión de ácido D-manurónico y L-glucurónico mediante enlace beta 1, 4 (Govan y Deretic 1996). La biosíntesis de alginato está codificada por el operón *algD-algA* (loci PA3540-3551) (figura 5). Este operón comprende 12 genes *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF*, y *algA* que codifican para proteínas implicadas en cada uno de los procesos de síntesis, modificación y exportación de este exopolisacárido (figura 6) (Schmid, Sieber, y Rehm 2015) (Okkotsu, Little, y Schurr 2014; Franklin et al. 2011).



**Figura 5. Operón *algD-algA*.** Esquema de la disposición y función del producto de los genes que conforman el operón implicado en la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa* (Franklin et al. 2011).

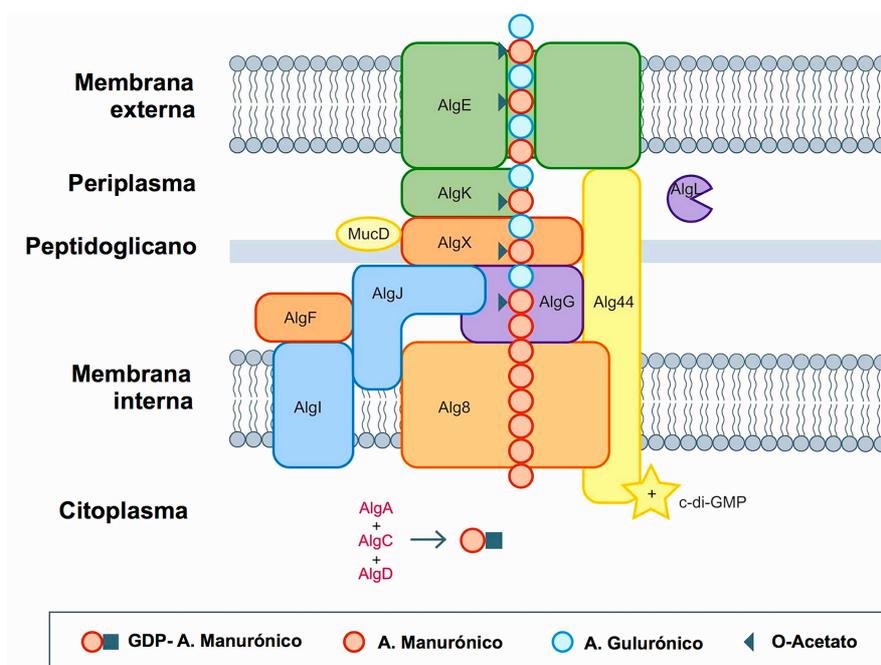


Figura 6. Maquinaria proteica implicada en el proceso de síntesis, exportación y modificación del alginato en *P. aeruginosa* (Schmid, Sieber, y Rehm 2015).

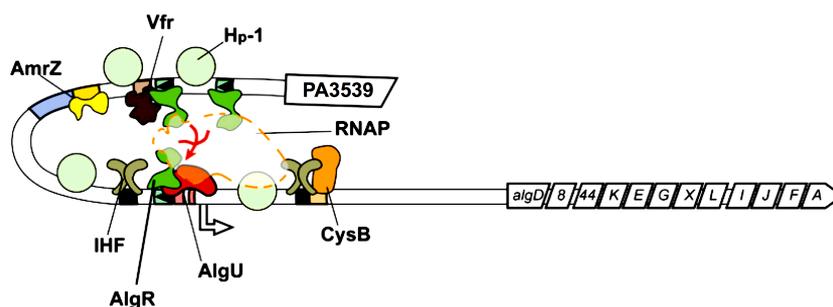


Figura 7. Regulación transcripcional. Representación de la maquinaria implicada en la regulación del operon *algD-algA* (Okkotsu, Little, y Schurr 2014).

La activación del operón *algD-algA* es un proceso controlado por el promotor de *algD* cuya regulación es compleja puesto que intervienen varias proteínas reguladoras que pueden expresarse de forma constitutiva (Konyecsni y Deretic 1990) o inducible (Wozniak y Ohman 1994). Las principales proteínas reguladoras identificadas son: Algu, Algr, KinB/Algb, AmrZ, IHF, Algp, CysB, Vfr y Hp-1 (Figura 7) (Okkotsu, Little, y Schurr 2014; Franklin et al. 2011; Govan y Deretic 1996; Lyczak, Cannon, y Pier 2000).

La adquisición inducible del fenotipo mucoso reside principalmente en el factor sigma ( $\sigma_{22}$ ) (también conocido como Algu o AlgT) codificado por *algU* que forma parte del operón *algU-mucABCD* (DeVries y Ohman 1994). Este factor regula de forma positiva tanto su propia transcripción como la de los factores de transcripción Algb y Algr (Wozniak y Ohman 1994; Mathee et al. 1999). Para la transcripción de *algD* es imprescindible que la proteína Algu se una a la región promotora. La unión de Algu a la región promotora del operón *algD-algA* está

reprimida por los productos de los genes *muc* que están anclados a la membrana interna (Okkotsu, Little, y Schurr 2014; Schmid, Sieber, y Rehm 2015). En concreto, MucA ancla directamente AlgU en condiciones no estresantes y evita la unión de AlgU a la zona promotora del operón *algD-algA* impidiendo la síntesis de alginato. En condiciones estresantes, por ejemplo, en presencia de peróxido de hidrógeno o en presencia de elevadas concentraciones de sal como las que se dan en el moco pulmonar hipersalino de los pacientes con FQ, se escinde la unión entre MucA y AlgU facilitando la actividad de AlgU, dando lugar al fenotipo mucoide (W. Wu et al. 2004; Wood y Ohman 2012; Yu, Schurr, y Deretic 1995). Mutaciones en los genes *muc* impiden el anclaje de AlgU a la membrana interna y el operón *algD-algA* está permanentemente activado induciendo la hiperproducción y exportación de alginato (Lyczak, Cannon, y Pier 2000; Hogardt y Heesemann 2010; Okkotsu, Little, y Schurr 2014; Wood y Ohman 2012). La práctica totalidad de cepas con fenotipo mucoide procedentes de infecciones crónicas en pacientes con FQ lo son por mutaciones en el gen *mucA* (Lam et al. 1980; J. C. Boucher et al. 1997).

El fenotipo mucoide es habitualmente inestable *in vitro* y una gran mayoría de cepas revierten al fenotipo no mucoide tras varios cultivos. Esta inestabilidad sugiere que el fenotipo mucoide confiere ventajas a *P. aeruginosa* para adaptarse a las condiciones del pulmón de los pacientes con FQ o EPOC. En este sentido, se ha demostrado que el alginato participa en la adherencia de la bacteria a las células humanas (Ramphal y Pier 1985) y permite la evasión del sistema inmune del huésped, confiriendo resistencia a la fagocitosis no mediada por anticuerpos (Schwarzmann y Boring 1971; Cabral, Loh, y Speert 1987; Krieg et al. 1988; Leid et al. 2005) y mediada por anticuerpos (Pier et al. 2001). Además, el fenotipo mucoide también confiere una mayor resistencia a los antibióticos, entre ellos la tobramicina (Hentzer et al. 2001). En su conjunto, a pesar de que el fenotipo mucoide no aparece en todos los aislados que causan infecciones crónicas respiratorias, es evidente que confiere ventajas para la colonización del pulmón y de hecho su aparición está asociada a un mal pronóstico en el progreso de la enfermedad (Z. Li et al. 2005b).

### 2.3. Pérdida de movilidad.

*P. aeruginosa* tiene capacidad mótil gracias a un único flagelo polar y un número variable de fimbrias. Las fimbrias son apéndices bacterianos de un diámetro de 6 nm y de extensión variable que permiten, además de la movilidad de la bacteria, interactuar con otros microorganismos o superficies para adherirse o intercambiar material genético (Strom y Lory 1993). Las fimbrias de tipo IV son una de las adhesinas más bien caracterizadas. Está codificado por entre 20 y 40 genes dispersos en el genoma que codifican para proteínas que lo componen (Hobbs et al. 1993). La bacteria no sólo lo utiliza para el desplazamiento y adhesión, sino que además es un sensor de regulación que induce la expresión de genes de patogenicidad cuando se adhiere a las células del huésped (Persat et al. 2015). Se ha visto que las fimbrias se unen a residuos de gangliósidos desprovistos de ácido siálico (AsialoGM1) presentes en la superficie de las células humanas y que estos residuos están

en mayor abundancia en pacientes con FQ (Saiman y Prince 1993). Además, las fimbrias son el mayor ligando para la fagocitosis no mediada por opsoninas (Kelly et al. 1989). Por todo ello, las fimbrias son un factor de virulencia clave en las primeras etapas de la infección, pero su pérdida supone una ventaja para la persistencia de *P. aeruginosa* en infección crónica.

El flagelo es una estructura en forma de filamento helicoidal, más grande que la fimbria, de 20nm de diámetro y una longitud aproximada de 10  $\mu$ m. Este filamento helicoidal de naturaleza proteica tiene en su base un conjunto de proteínas que actúan como los engranajes de un motor y que se parece al sistema de secreción tipo III. La diferencia de potencial iónico a través de la membrana es lo que permite rotar este motor y por ende el filamento helicoidal en dos direcciones. En sentido horario en presencia de un repelente y en sentido antihorario en presencia de un atrayente (Macnab 1999). Para el control de la síntesis del flagelo interviene el factor AlgU, mencionado en el apartado anterior. Además de incrementar la producción de alginato cuando el gen *mucA* está mutado, AlgU inhibe la síntesis del flagelo (Garrett, Perlegas, y Wozniak 1999). En este sentido, su pérdida puede suponer una ventaja, dado que el flagelo es necesario para la internalización en los macrófagos (Mahenthiralingam y Speert 1995) y provoca gran respuesta inflamatoria (Feldman et al. 1998).

Se han descrito tres formas diferentes de movilidad: *swimming*, *twitching* y *swarming*. La movilidad *swimming* es aquella que se da en un medio acuoso (agar inferior al 0,4%) y que permite el desplazamiento de la bacteria a través de éste. Se da gracias a su único flagelo polar que permite a la bacteria moverse en una dirección gracias a la quimiotaxis, tanto hacia un atrayente como en contra de un repelente (Moench y Konetzka 1978). La movilidad *twitching* consiste en el desplazamiento reptante sobre las superficies y se da gracias a la retracción y extensión de las fimbrias tipo IV (Merz, So, y Sheetz 2000). Se trata de un proceso altamente coordinado que permite la rápida colonización de superficies (Semmler, Whitchurch, y Mattick 1999). La movilidad *swarming* consiste en el desplazamiento de la bacteria en respuesta a ciertos aminoácidos sobre superficies semisólidas y depende tanto del flagelo unipolar como de las fimbrias tipo IV. Además, en esta modalidad de movimiento está implicado el sistema *quorum sensing* (Köhler et al. 2000).

Tanto el flagelo como la movilidad *twitching*, y por tanto las fimbrias de tipo IV, son importantes para el inicio de la formación del biofilm (O'Toole y Kolter 1998; Merz, So, y Sheetz 2000). El flagelo, permite incluso el anclaje de la bacteria a superficies hidrofóbicas como el cristal (Bruzaud et al. 2015). Además, se ha descrito como un factor de virulencia en infección aguda (Montie et al. 1982) y facilita la diseminación de la misma desde el lugar en el que se origina hacia la sangre (Drake y Montie 1988). Sin embargo, en aislamientos secuenciales de pacientes con FQ infectados por *P. aeruginosa* se observan tres tipos de patrones en relación a la movilidad: (I) aislados predominantemente móviles, (II) aislados móviles y no móviles sin predominio de unos sobre otros y (III) aislados predominantemente

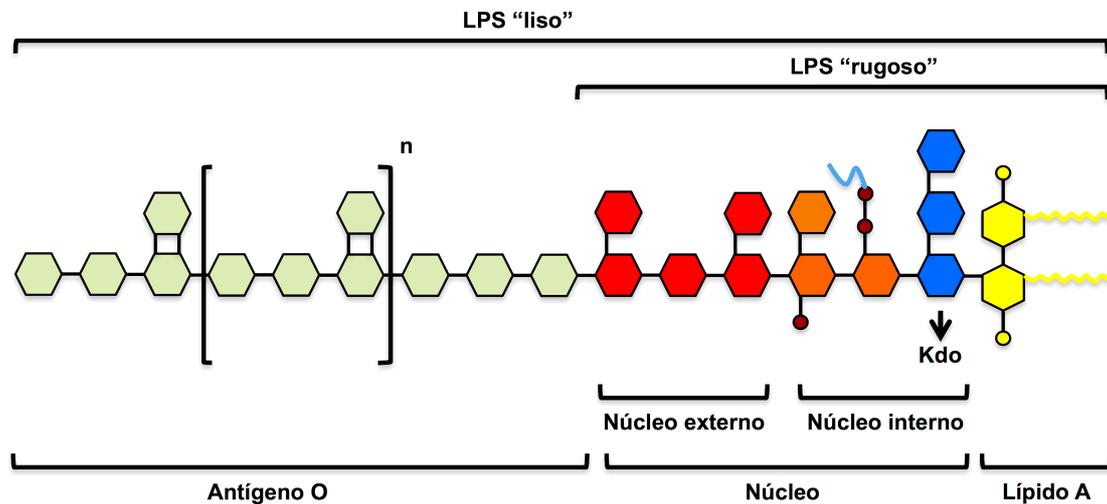
no móviles. Las cepas aisladas de infección temprana suelen ser móviles, flagelados y con fimbrias, parecidos a los que se aíslan del ambiente, y con el transcurso del tiempo se aíslan de infección crónica cepas no móviles y con fenotipo mucoide (Mahenthiralingam, Campbell, y Speert 1994). De esta forma la bacteria en infección crónica quedaría confinada al lugar de la infección y en general evitaría la acción de las defensas del huésped al encontrarse menos accesibles favoreciendo el establecimiento de la infección de forma crónica.

Para evadir las defensas del huésped *P. aeruginosa* utiliza estrategias diferentes mediante la activación sistemática de programas de transcripción génica en respuesta a señales cambiantes del ambiente que incluyen activación del *quorum sensing* y represión de genes que codifican para proteínas inmunogénicas como la flagelina, proteína mayoritaria del flagelo (Wolfgang et al. 2004). Una represión constante de la expresión génica de flagelina puede resultar en una adaptación permanente debido a mutaciones (Wolfgang et al. 2004). Esto supone una ventaja para la bacteria porque el flagelo es reconocido por el receptor de células eucariotas TLR-5 (del inglés *Toll Like Receptor 5*) (Hayashi et al. 2001; Z. Zhang et al. 2005). Además, en la fagocitosis el flagelo se requiere para la internalización (Mahenthiralingam y Speert 1995). En este sentido, la pérdida de la movilidad y de la funcionalidad del flagelo permite resistir la fagocitosis, conservando así energía (Mahenthiralingam, Campbell, y Speert 1994; Amiel et al. 2010). Además, la pérdida de movilidad flagelar permite a la bacteria evitar la inducción de una respuesta inflamatoria adecuada por parte del huésped, impidiendo la quimiotaxis y activación de fagocitos, facilitando la persistencia del microorganismo (Patankar et al. 2013).

La presión selectiva que ejerce la pobre condición clínica de los pacientes con FQ induce la pérdida de factores de virulencia relacionados con la invasión y la motilidad. Estos cambios están relacionados con alteraciones en la envoltura celular (Luzar, Thomassen, y Montie 1985). Experimentos *in vitro* demuestran que los mutantes deficientes en el flagelo contienen cantidades insuficientes de lipopolisacárido que de forma indirecta impiden resistir a la permeabilización por parte de la proteína surfactante A (SP-A) (S. Zhang et al. 2007). Este hecho, podría estar relacionado con otros estudios que indican que las fimbrias tipo IV hace a la bacteria resistente a la permeabilización y fagocitosis mediada por SP-A (Tan et al. 2014). Dichos estudios indicarían que la pérdida de fimbrias o flagelo no supone una ventaja para la persistencia. Sin embargo, en el contexto de infección crónica hay que tener en cuenta que el acceso de la SP-A a las bacterias del interior del biofilm, que además pueden prescindir de la movilidad, probablemente sea más dificultosa y que la SP-A está en menor cantidad en pacientes con FQ (Postle et al. 1999). Así, por tanto, es probable que la pérdida del flagelo no represente un problema para resistir la acción defensiva de la SP-A en el contexto de la infección crónica.

## 2.4. Alteración del lipopolisacárido.

El LPS es el componente en mayor cantidad de la envoltura de las bacterias gram negativas y su estructura ayuda a mantener la integridad celular. Su composición típica está formada por el lípido A que ancla el LPS a la membrana externa, el núcleo o *core* que aporta consistencia y el antígeno O o polisacárido que se encuentra en la parte más externa (figura 8).



**Figura 8. Estructura general del LPS de *P. aeruginosa*.** El LPS está compuesto por tres componentes; lípido A, núcleo y antígeno O. Los LPS "rugosos" solamente presentan lípido A y núcleo, mientras que los LPS "lisos" presentan todos los componentes. Los hexágonos, los círculos y las cadenas representan monosacáridos, grupos fosfatos y cadenas de ácidos grasos, respectivamente. (Maeshima y Fernandez 2013).

El lípido A está embebido en la membrana externa y compuesto por cadenas hidrofóbicas acetiladas que están unidas por enlace éster o amida a cadenas de dímeros de glucosamina (Ernst et al. 1999). En este sentido es el lípido A el que es reconocido por el receptor de células eucariotas TLR4 (del inglés *Toll Like Receptor 4*), siendo el correceptor MD-2 (del inglés *Mieloid Differentiation factor 2*) y el CD14 necesarios para este reconocimiento (Shimazu et al. 1999; Maeshima y Fernandez 2013; Latz et al. 2002).

Los patrones de penta o hexa acetilación del lípido A varían dependiendo de las condiciones ambientales (Ernst et al. 1999). Se ha determinado que el incremento en la acetilación del lípido A proporciona resistencia a péptidos antimicrobianos (Guo et al. 1998). Además, se dan otras modificaciones como la adición en el lípido A de aminoarabinosa y de palmitato, y la deacetilación en posición 3 del ácido graso 3-hydroxidecanoato (Ernst et al. 1999, 2007). En este sentido, se han descrito estas modificaciones en cepas aisladas de FQ (Ernst et al. 1999). Sin embargo, las cepas de aislados de infección aguda pueden realizar estas modificaciones en un medio pobre en magnesio revelando que la síntesis del lípido A característico de cepas de FQ es capaz de ser regulado en función del medio (Ernst et al. 2006). Todas las modificaciones del lípido A alteran la respuesta inmune del huésped (Maeshima y Fernandez 2013; Ernst et al. 1999). En concreto, las cepas aisladas de

pulmones de pacientes con FQ, que presentan un lípido A hexa-acetilado, provocan una mayor respuesta inflamatoria a través de TLR-4 que la respuesta que provocan las penta-acetiladas (Hajjar et al. 2002). Tiene lógica por tanto que las cepas procedentes de infección crónica presenten un patrón de acetilación reducido que limite la capacidad para provocar una respuesta inmune en el huésped y por ende para eliminar la infección por *P. aeruginosa*. Además, junto con modificaciones en los muropéptidos del peptidoglicano resulta en un efecto sinérgico que reduce la actividad inmune del huésped y facilita la persistencia de la infección (Cigana et al. 2009).

El núcleo oligosacárido puede dividirse en núcleo interno y externo. El núcleo interno se ancla al lípido A mediante una glicosilación en la posición 6 a residuos de ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo), el oligosacárido más conservado del núcleo. El Kdo sirve de punto de anclaje con otros oligosacáridos de L-glicero-D-mano-heptosa (Hep), D-glucosa y D-galactosa (Wang y Quinn 2010). El núcleo más externo consiste en grupos de azúcares que difieren entre especies y entre cepas de la misma especie (Wang y Quinn 2010). La síntesis y exportación del LPS es un proceso complejo. En *P. aeruginosa* se ha observado que la fosforilación de azúcares del núcleo interno del LPS es importante para la exportación del LPS y la estabilidad de la membrana (Wang y Quinn 2010; Delucia et al. 2011). Además, el núcleo más externo del LPS tiene capacidad para unirse a la proteína CFTR eucariota y activa la respuesta inmune innata del huésped a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Schroeder et al. 2002).

El antígeno O consiste en unidades repetidas variables de oligosacáridos que pueden ser lineales o ramificados, altamente inmunogénicos, que dan lugar a numerosos serotipos (Knirel 1990). El antígeno O puede bloquear el acceso al lípido A por parte del complemento, por lo que se considera uno de los componentes esenciales para la resistencia a la opsonización y el efecto bactericida del suero en *P. aeruginosa*. Sin embargo, es altamente inmunogénico y puede activar por sí mismo la vía clásica o alternativa (Reeves 1995). Las cepas que sí presentan antígeno O son las llamadas lisas o *smooth* y las que no presentan esta estructura son las llamadas rugosas o *rough*. La inmunogenicidad del antígeno O puede provocar una respuesta inmune muy robusta que sea la causa de la presión selectiva en contra de la síntesis del antígeno O. En este sentido, se ha observado que es muy común que las cepas de aislados crónicos de FQ pierdan el antígeno O, a pesar de que esta deficiencia les suponga ser sensibles a la acción del complemento. La sensibilidad al suero podría explicar que las infecciones crónicas queden en general confinadas al sitio de infección y no se diseminen a la sangre (Hancock et al. 1983). La transición en la pérdida del antígeno O es un proceso que parece ser gradual. Se ha visto que, en infección crónica, el antígeno O, un tanto más corto que el fenotipo típico de *P. aeruginosa*, dejaba de expresarse completamente a 37°C pero no a 25°C, siendo una única mutación la responsable de la pérdida incompleta del antígeno O, es decir, dependiente de la temperatura ambiental (Davis

et al. 2013). La pérdida del antígeno O sería por tanto útil para la protección en el medio ambiente y dispensable en el contexto de infección crónica.

### 2.5. Aparición de cepas hipermutadoras.

Los microorganismos hipermutadores son aquellos que tienen incrementada su tasa de mutación debido a defectos en el ADN o en los sistemas de reparación del ADN. Presentan una ventaja evolutiva en la adaptación a ambientes estresantes, a los tratamientos antibióticos, a la presencia de virus o al ataque del sistema inmune (Oliver y Mena 2010). El pulmón del paciente con FQ es un medio hostil por estar tratado con terapia antibiótica prolongada y presentar limitaciones nutricionales. Probablemente por este motivo las cepas hipermutadoras se aíslan con mayor frecuencia entre los aislados causantes de infección crónica en pacientes con FQ y EPOC que entre los causantes de infecciones respiratorias agudas (Oliver et al. 2000; Maciá et al. 2005). Pese a la enorme variabilidad genética de *P. aeruginosa*, la hipermutabilidad causada por defectos en los sistemas de reparación de ADN *mutS*, *mutL*, *mutH* y *uvrD (mutU)*, en los sistemas de reparación del daño oxidativo y en otros implicados en la replicación, puede permitir esta rápida adaptación necesaria al ambiente de infección crónica: impredecible, estresante y fluctuante (Oliver, Baquero, y Blázquez 2002; Oliver y Mena 2010). La capacidad para hipermutar se produce a costa de los genes implicados en la virulencia necesaria para el inicio de la infección que no se ven seleccionados en el proceso de adaptación. De esta forma, las cepas hipermutantes iniciales de *P. aeruginosa* podrían generar numerosas variantes sin la capacidad destructiva de la cepa inicial que serían seleccionadas por tener una mayor capacidad de adaptación a los pulmones deteriorados, pero menor virulencia (Oliver et al. 2000; Smith et al. 2006; Mena et al. 2007; Hogardt et al. 2007). En este sentido, las cepas hipermutadoras ven reducida la capacidad de colonizar nuevos ambientes y de transmitirse entre individuos (Montanari et al. 2007). Sin embargo, se asocian a un empeoramiento clínico en los pacientes crónicos (Waine et al. 2008).

Las cepas hipermutadoras, a pesar de ser seleccionadas positivamente en el pulmón de pacientes con FQ en un contexto de infección crónica, también se aíslan del ambiente con una prevalencia superior a la esperada, por lo que no es el pulmón de estos pacientes el único factor que determina su existencia (Kenna et al. 2007). Por otra parte, se aíslan cepas con mutaciones en *mucA* y *lasR* en fase temprana de infección, mientras que en fases tardías se aíslan con mayor frecuencia cepas que además tienen alteraciones en genes del sistema de reparación de ADN. Varios estudios concluyen que la hipermutación no es un pre-requisito para la adquisición de fenotipo mucoide y/o pérdida del *quorum sensing* (Ciofu et al. 2010).

La hipermutación tiene dos efectos en relación a la resistencia a los antibióticos, por una parte las cepas hipermutadoras son resistente a un número más amplio de antibióticos que las que no son hipermutadoras y por otra parte el nivel de resistencia de las hipermutadoras

es mucho más elevada (Maciá et al. 2004). En este sentido la inactivación de los sistemas de reparación de ADN incrementan inmediatamente la concentración mínima inhibitoria y bactericida de los agentes antipseudomonadales siendo necesaria la combinación de varios para minimizar la selección de hipermutadores resistentes a antibióticos (Oliver et al. 2004). Es posible suprimir la selección de la resistencia en infecciones causadas por *P. aeruginosa* hipermutadoras utilizando una combinación de antibióticos apropiada en términos de actividad y potencial en el que la detección temprana de infección juega un papel muy importante para evitar la adaptación (Maciá et al. 2006). Además, se ha determinado in vitro que tratamientos secuenciales de antibióticos pueden reducir el biofilm y erradicar cepas hipermutadoras (Rojo-Molinero et al. 2016).

Dada la creciente resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos se han propuesto otras dianas y alternativas terapéuticas. Llama la atención los experimentos realizados con fagos específicos de *P. aeruginosa* para erradicar estas infecciones, siendo eficaces incluso contra el biofilm. Sin embargo, su uso terapéutico es controvertido ya que hay estudios que indican que frente a la presión selectiva que ejercen los fagos, *P. aeruginosa* incrementa la resistencia a ser fagocitada y altera la producción de factores de virulencia (Hosseinioust, van de Ven, y Tufenkji 2013; Waters et al. 2017; McVay, Velásquez, y Fralick 2007).

### **2.6. Alteraciones del Quorum Sensing.**

Tras la observación de patrones de comportamiento bacteriano cooperativo, fue definido el término *Quorum Sensing* (QS) como la unidad mínima de comportamiento de una población para llevar a cabo un acto eficiente. Para ello es necesario que la bacteria produzca un autoinductor, definido como una molécula soluble que se acumula en el medio con el crecimiento. Mediante el autoinductor la población bacteriana monitoriza su propio crecimiento. Cuando se obtiene cierta concentración crítica, señal de densidad de población suficiente, se lleva a cabo un determinado comportamiento para el que se requiere dicha población (Fuqua, Winans, y Greenberg 1994).

En *P. aeruginosa* los sistemas de QS están regulados e interconectados a otros genes reguladores (Venturi 2006) y se estima que controlan un 6% del genoma (Schuster et al. 2003). La integración del QS a otros circuitos de regulación permite incrementar el rango de señales ambientales y metabólicas para los que la bacteria puede dar una respuesta (Venturi 2006). Se ha descrito en la bibliografía que el QS regula genes implicados en la virulencia (exoproteasas, movilidad, producción de pigmentos) y genes implicados en la estructura del biofilm (Whiteley, Lee, y Greenberg 1999; Shrouf et al. 2006; Hogardt et al. 2004; Hassett et al. 1999; Stintzi, Evans, y Poole 1998; Passador et al. 1993), por lo que en ciertas circunstancias, como la infección crónica, sería interesante desactivar los genes del QS implicados en el ataque y potenciar los implicados en guiar la estructura del biofilm en pro de la permanencia. Sin embargo, estas dos direcciones aparentemente opuestas no están

completamente delimitadas y se controlan de forma interconectada como se explica a continuación.

*P. aeruginosa* tiene dos sistemas principales implicados en el QS: LasI/R y RhII/R, cuyos autoinductores son N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) y N-butilil-L-homoserina lactona (N-C4-HSL), respectivamente. Además, existen otros autoinductores como el 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, también conocido como PQS (del inglés *Pseudomonas Quinolone Signal*) del grupo de las quinolonas implicado en ambos sistemas (Pearson et al. 1994, 1995; Pesci et al. 1999; Passador et al. 1993). Se ha visto que el PQS, tiene efectos beneficiosos y deletéreos sobre las diferentes bacterias de una misma población, contribuyendo a seleccionar positivamente aquellas bacterias mejor adaptadas y negativamente a las peor adaptadas de forma simultánea (Häussler y Becker 2008). La síntesis de PQS se quintuplica en el sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa* crecidos en esputo de pacientes con FQ, en comparación con un medio de laboratorio, a causa de la elevada concentración de aminoácidos (Palmer et al. 2005), siendo el PQS una guía para el desarrollo del biofilm al influir en la formación de una población con estructura ordenada (Häussler y Becker 2008).

Por una parte, en el sistema LasI/R, el gen *lasI* es el que controla la síntesis del autoinductor (3-oxo-C12-HSL) (Passador et al. 1993), que se requiere para la actividad de LasR (Pearson et al. 1994). LasR es un pilar central en el QS y su expresión depende de la densidad celular siendo máxima en la fase estacionaria de crecimiento. Además, está regulado positivamente por Vfr (homólogo de la proteína receptora de AMP en *Escherichia coli*) (Albus et al. 1997) y otras proteínas como VqsR (del inglés *virulence QS Regulator*) (Juhás et al. 2004). LasR activa promotores diana como el del gen *lasB* (Gambello y Iglewski 1991b) o *lasA* (Toder, Gambello, y Iglewski 1991) que codifican para elastasas. En infección crónica la mutación en *lasR* puede surgir con anterioridad al fenotipo mucosoide y está asociada a la progresión de enfermedad pulmonar, siendo indicativo de una adaptación temprana al pulmón de FQ (Hoffman et al. 2009). La mutación de este gen disminuye la expresión de ciertos genes de virulencia que favorecen la infección aguda y provoca un incremento en la actividad beta lactamasa confiriendo mayor tolerancia a los beta lactámicos, además de aportar a la bacteria ventajas catabólicas en un medio rico en aminoácidos como es el pulmón de FQ (Argenio et al. 2007).

En el sistema RhII/R, RhII dirige la síntesis del autoinductor (N-C4-HSL) (Pearson et al. 1995) que se requiere para la unión a la proteína reguladora RhIR (Ochsner y Reiser 1995) implicada en la síntesis de ramnolípidos (Ochsner et al. 1994) y de proteasas (Gambello y Iglewski 1991a; Gambello, Kaye, y Iglewski 1993) que son factores de virulencia en infección aguda, por lo que su mutación sería favorable en cuanto a la adaptación en un contexto de infección crónica.

La expresión del gen *rhIR* depende de varios promotores y secuencias reguladoras dependientes a su vez de otras proteínas como LasR, Vfr y de su propio producto de

---

transcripción RhlR, además de estar fuertemente influenciada por nutrientes del medio (Medina et al. 2003).

La relación entre estos dos sistemas es complejo y jerárquico, existiendo además factores de transcripción como el RpoS o VqsR que los comunican (Latifi et al. 1996; Juhas et al. 2004). A su vez existe regulación negativa. En este sentido *lasI* está regulado negativamente por la proteína QscR que evita la activación de genes del QS. Se ha demostrado que la mutación en el gen *qscR* hace a la cepa mutante, que no presenta regulación negativa, más virulenta respecto a la parental en un modelo de infección de *Drosophila melanogaster* (Chugani et al. 2001) lo que en un contexto de infección crónica no sería adaptativo.

El QS juega un papel importante en la severidad de la infección aguda por *P. aeruginosa*, así los mutantes deficientes en *lasI* y *rhlI*, con el QS inactivo, son menos virulentos que la cepa parental en un modelo murino de infección crónica. (H. Wu et al. 2001). Además de ser crítico en la virulencia, el QS también es importante para el desarrollo de biofilm maduro. (Whiteley, Lee, y Greenberg 1999). En este sentido, el biofilm está presente como forma de crecimiento en pacientes con FQ, en los que se han detectado autoinductores implicados en el QS (Singh et al. 2000) por lo que para el desarrollo del biofilm también es necesario el QS.

Como se ha mencionado, en los sistemas QS, además de los autoinductores influyen las condiciones del medio de cultivo (disponibilidad de hierro y fosfato) y los metabolitos secundarios, siendo muy compleja la regulación (Jensen et al. 2006). Esto se puso de manifiesto en tres estudios independientes de transcripción genómica que identificaron solo 97 genes comunes en los 3 estudios, de los 300 genes activados en total por el QS en cada uno de los estudios. Estas diferencias pueden ser debidas a la puesta a punto de los experimentos, la fase de crecimiento y el medio que indican la sensibilidad, el dinamismo y la capacidad de actuar en diferentes direcciones del QS de *P. aeruginosa* en los variados y variables contextos, tanto de infección aguda como crónica (Venturi 2006).

## 2.7. Alteraciones más significativas de proteínas de membrana externa.

*P. aeruginosa* interactúa con el medio externo a través de la membrana externa. En la membrana externa de la bacteria se encuentran proteínas implicadas en la transducción de señales, el transporte de sustancias (porinas), los sistemas de secreción. Algunos de ellos pueden tener un papel estructural. Las proteínas de la membrana externa también se ven alteradas en el proceso de adaptación a la infección crónica por *P. aeruginosa*.

### · Porinas.

Las porinas permiten la entrada y salida de moléculas en la bacteria. OprF es una porina de difusión no específica que permite el paso de ciertos iones como el Na<sup>+</sup> y el Cl<sup>-</sup> y pequeñas moléculas cargadas (Nestorovich et al. 2006). Esta proteína interviene en la respiración anaeróbica y como consecuencia se encuentra 39 veces sobreexpresada en cepas aisladas de condiciones anaeróbicas como los pulmones de pacientes con FQ (Yoon et al. 2002).

Además, la proteína OprF está implicada en la formación del biofilm. Los mutantes en *oprF* forman biofilms menos robustos en condiciones anaeróbicas (Yoon et al. 2002), disminuyen la actividad del sistema de secreción tipo III (SST3) que no puede secretar ExoS ni ExoT y tienen alterada la secreción de pirocianina, exotoxina A, lectina PA-1L y elastasa, en relación al patrón alterado de QS (Fito-Boncompagni et al. 2011). También muestran una adhesión a células eucariotas disminuida (Azghani et al. 2002; Fito-Boncompagni et al. 2011). Además, los pacientes con FQ muestran títulos de anticuerpos anti OprF elevados indicando que la expresión de OprF ha sido elevada en algún momento del proceso infeccioso y que podría asociarse a infección crónica (Yoon et al. 2002).

Otra de las porinas que se ven alteradas en aislados de pacientes con FQ es la proteína OprD, cuya expresión se reduce (Doumith et al. 2010). OprD está especializada en la entrada de aminoácidos y pequeños péptidos (Trias y Nikaido 1990; H. Li et al. 2013). Mutaciones en el gen que codifica esta porina dan lugar a que la proteína no se exprese, lo que confiere resistencia a carbapenemas (Shu et al. 2017). Es más, se determinó que en un aislado panresistente de *P. aeruginosa* la resistencia a carbapenemas estaba causada únicamente por mutaciones en gen *oprD*, sin que ninguna carbapenemasa estuviera implicada en el fenotipo de resistencia a este grupo de antibióticos (Xiong et al. 2017).

Otra porina que disminuye su expresión en aislados crónicos de FQ es OprH. Se ha demostrado que OprH es un ligando para SP-A y para el componente C3 del complemento. En las infecciones crónicas *P. aeruginosa* disminuye la expresión de OprH lo que le permitiría eludir la fagocitosis mediada por estas opsoninas e incrementar su capacidad de persistencia en el pulmón de pacientes con FQ (Qadi et al. 2016, 2017).

La proteína AlgE (Alg 76) es una porina para aniones específicos precursores del alginato (Rehm et al. 1994) que se sobreexpresa en cepas hiperproductoras de alginato, asociada a la conversión al fenotipo mucoso (Lam et al. 1980), que como se ha explicado anteriormente es común en infecciones crónicas. Curiosamente, esta proteína es homóloga a la porina OprD a pesar de que cuando se compara con la familia de proteínas que forman canales específicos para la entrada de nutrientes presenta ausencia de identidad en la secuencia (<10%) (Whitney et al. 2011).

### · Sistemas de secreción.

Como hemos descrito el QS tiene un papel importante en la secreción de exoproteasas y enzimas degradadoras. Muchas exoproteasas se excretan mediante sistemas de secreción, conformados por estructuras proteicas que exponen una parte de la misma en la superficie bacteriana. Existen al menos 6 tipos de sistemas de secreción. El más estudiado es el sistema de secreción tipo III (SST3) por ser el factor que contribuye más a la citotoxicidad, y el sistema de secreción tipo II por su versatilidad en la secreción (SST2) (Filloux 2011).

El sistema de secreción tipo II (SST2) es el responsable de la exportación de elastasa (LasA, LasB), lipasas (LipA, LipC), fosfatasa alcalina (PhoA), Exotoxina A, ADP-ribosiltransferasa

(ToxA) y varias fosfolipasas, entre otros factores implicados en la virulencia en infección aguda (Filloux 2011). Los aislados de infecciones crónicas reducen la expresión de estos factores, atenuándose su virulencia.

La actividad del SST3 depende del contacto con células eucariotas, a las que le inyecta los llamados efectores tóxicos (i.e. ExoU, ExoS, ExoT y/o ExoY) directamente desde el citoplasma bacteriano al citosol eucariota (Filloux 2011; Hauser 2009). Juega un papel muy importante en infección aguda, pero este sistema pierde eficacia en cepas aisladas de las vías respiratorias de pacientes con infección crónica (Hauser 2009). A medida que avanza la infección crónica en el tiempo se seleccionan cepas con una capacidad reducida en la expresión de SST3 (Jain et al. 2004). Es probable que esta reducción esté asociada a la aparición de cepas mucoides por mutación del gen *mucA*, dado que se ha podido demostrar que la mutación de este gen conlleva una disminución en la expresión del SST3 (W. Wu et al. 2004). Sin embargo, se han aislado cepas con el SST3 no funcional en cepas no mucoides y viceversa (Jain et al. 2004), lo que indicaría que no existe una relación causal entre el fenotipo mucoso y el SST3.

### **2.8 Aparición de *Small Colony Variants*.**

Otro de los fenotipos frecuentes entre los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ es la aparición de las llamadas *Small Colony Variants* (SCVs). Estas colonias se caracterizan por presentar una morfología colonial de pequeño tamaño, como su nombre indica. Alcanzan un diámetro de 1 a 3 mm tras 48 h de incubación debido a su crecimiento lento. El aislamiento de SCVs de *P. aeruginosa* está relacionado con el uso de antibióticos, una mayor resistencia a los mismos y una peor prognosis (Häußler et al. 1999).

Tras varios pases en el laboratorio, el fenotipo SCV puede revertir y el crecimiento del aislado se acelera notablemente, mostrando, una vez más, la capacidad de *P. aeruginosa* para adaptarse a las condiciones del medio. Las cepas revertidas presentan una mayor sensibilidad a los antibióticos (Häußler et al. 1999).

Las SCVs presentan subpoblaciones muy heterogéneas que tienen en común el crecimiento lento y la resistencia antibiótica. Se han aislado de infecciones crónicas subpoblaciones de SCVs que crecen de forma agregada, son más hidrofóbicas, se adhieren más, debido a que son hiperpiliadas (hiperexpresión de fimbrias tipo IV), y tienen una capacidad mayor para formar biofilm respecto a las cepas parentales y a las revertidas (Häußler et al. 2003). Además, tanto las SCVs como las revertidas producen mayor cantidad de alginato que la cepa parental original (Häußler et al. 1999), indicando que la reversión no supone una vuelta al fenotipo parental en todas sus características, tal como se ha podido confirmar mediante el análisis de la expresión génica (Gotz et al. 2004).

Además de las características comentadas, las SCVs muestran una expresión mayor de los genes implicados en la síntesis de los exopolisacáridos Pel y Psl y provocan una baja

producción de citoquinas por parte del epitelio polarizado lo que favorece la persistencia en las vías respiratorias de pacientes con FQ (Starkey et al. 2009).

Un hecho que llama la atención es que en las SCVs los genes implicados en el SST3 se encuentran sobreexpresados. De hecho, en un modelo murino de infección respiratoria las SCVs causan mayor citotoxicidad y son más virulentas (Gotz et al. 2004). Esta característica es poco habitual en los aislados de infecciones respiratorias crónicas que tienden a reducir la expresión de estos genes, tal como se ha descrito anteriormente. Esta aparente contradicción puede explicarse debido a la heterogeneidad fenotípica de *P. aeruginosa* entre aislados de la misma muestra (Workentine et al. 2013).

### 2.9. Adaptaciones metabólicas.

Todos los cambios de *P. aeruginosa* tienen lugar para adaptarse a las condiciones del medio. Como hemos comentado, las características del huésped son las que principalmente facilitan la infección crónica y en este contexto la concentración de oxígeno y los nutrientes aportados por el huésped están muy implicados en la selección de determinados cambios.

En relación a la concentración de oxígeno, se comparó el crecimiento en biofilm, propio de infecciones crónicas, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de una cepa parental y mutantes isogénicos en *lasR*, *rhIR*, *lasRrhIR*, *pilA* (mutante deficiente en fimbria) y *flicC* (deficiente en el flagelo). Se observó que, en condiciones aeróbicas, los mutantes, a excepción del mutante en *flicC*, formaban un biofilm más robusto que la cepa parental. En cambio, la cepa parental formaba un biofilm más robusto en condiciones anaeróbicas. Estos resultados sugieren que *P. aeruginosa* prefiere condiciones anaeróbicas para la formación del biofilm (Yoon et al. 2002), siendo una ventaja su capacidad de adaptarse a bajas presiones de oxígeno. Sin embargo, dado que en infección crónica es habitual encontrar mutaciones en los genes *lasR*, *rhIR*, *lasRrhIR*, *pilA* y dado que en el biofilm existen gradientes de concentración de oxígeno (Worlitzsch et al. 2002), en las zonas con más oxígeno sería esperable encontrar un biofilm más robusto formado por estos mutantes.

En relación a los nutrientes, el pulmón de los pacientes con FQ es rico en aminoácidos y supe los requerimientos nutricionales de las cepas auxotróficas, es decir, aquellas que han perdido la capacidad para sintetizar algún aminoácido. Las cepas auxotróficas se ven positivamente seleccionadas en este ambiente, sobre todo si se tiene en cuenta que la síntesis de ciertos aminoácidos es un proceso costoso (Barth y Pitt 1996). Las auxotrofías para arginina, lisina y metionina, alanina y triptófano, isoleucina y valina, y metionina son las más frecuentes (Qin et al. 2012; Taylor, Hodson, y Pitt 1992). Además, se ha visto que el aislamiento de cepas auxotróficas se da principalmente en aquellos pacientes con enfermedad pulmonar severa, aumentando el contenido en aminoácidos en las exacerbaciones así como el de aislados auxotrófos (Taylor, Hodson, y Pitt 1993; Thomas et al. 2000). Este incremento se relaciona con una mayor severidad de la enfermedad pulmonar (Thomas et al. 2000)

además de con un incremento en la producción de PQS relacionado con el QS (Palmer et al. 2005) lo que indicaría cierto grado de organización en *P. aeruginosa*.

Por otra parte, las cepas prototrofas, es decir, aquellas que pueden sintetizar todos los metabolitos que necesitan y crecer en medio mínimo, se han aislado junto con cepas auxótrofas de pacientes con FQ. Se ha propuesto que ambos tipos de cepas interactúan en beneficio mutuo reflejando una primitiva división de tareas propio de un estilo de vida multicelular (Qin et al. 2012) y que las cepas auxótrofas se seleccionan a partir de las prototrofas (Barth y Pitt 1995), siendo la diversidad dentro de la población de *P. aeruginosa* necesaria para entender su evolución en el contexto de FQ (Workentine et al. 2013).

Existen limitaciones para el estudio de las condiciones de crecimiento del pulmón, dado que el pulmón de los pacientes con FQ es muy heterogéneo y se altera de forma constante durante el curso de la infección cambiando el rumbo de las presiones evolutivas (Behrends et al. 2013). A pesar de ello se sabe que en estadios crónicos hay un incremento de la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo energético (Hoboth et al. 2009). El crecimiento de *P. aeruginosa* en esputo de paciente de FQ respecto al crecimiento en glucosa incrementa la transcripción de 113 genes y disminuye la de 34 genes, muchos de estos genes implicados en el metabolismo de aminoácidos (Palmer et al. 2005). En este sentido, los estudios del perfil metabólico (metaboloma) y producción de metabolitos (exometaboloma) son una buena aproximación que muestra la compleja adaptación fenotípica que tiene lugar *in vivo*. Dada la variedad de nichos en función de los pulmones del paciente y del tiempo de evolución de la infección, se dan entre las distintas cepas patrones de uso y producción de metabolitos muy dispares (Behrends et al. 2013). Es por esto por lo que puede que en condiciones de cultivo de laboratorio algunos de los aislados de infección crónica de pacientes con FQ presentan velocidades de crecimiento muy alejados de la media y no relacionadas con su morfología colonial, tamaño o estadio de infección (Behrends et al. 2013).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La aparición de cepas de *P. aeruginosa* mucoides es un fenómeno frecuente y asociado a un mal pronóstico de la infección respiratoria crónica en los pacientes con fibrosis quística. El fenotipo mucoso está causado por una mutación del gen *mucA* que provoca la hiperproducción del polisacárido de alginato, confiriendo a las colonias este aspecto tan característico. El alginato es un factor de virulencia bien caracterizado que dota a la bacteria de resistencia frente a la opsonofagocitosis. A pesar de ello, las evidencias clínicas demuestran que las cepas mucoides son rara vez aisladas fuera del foco primario de la infección y su localización queda limitada al pulmón. Ante tal evidencia, parece razonable plantear la hipótesis de que la mutación de *mucA*, que confiere el fenotipo mucoso a *P. aeruginosa*, altera la capacidad invasora y de translocación del epitelio de este microorganismo, confinando la infección en el pulmón.

En este sentido, nuestro objetivo es investigar si la mutación de *mucA* reduce la capacidad de diseminación de *P. aeruginosa* y averiguar las bases moleculares y celulares que subyacen en este fenómeno.

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que, en determinadas condiciones, *P. aeruginosa* modifica el factor de elongación Tu (EF-Tu) incorporando tres grupos metilo en la lisina 5 del extremo N terminal de esta proteína. Esta modificación, expuesta hacia el exterior sobre la superficie bacteriana, genera un epítipo estructuralmente similar a la fosforilcolina que facilita la interacción del patógeno con las células epiteliales del huésped a través del receptor del factor activador de plaquetas. En consecuencia, esta modificación contribuye a la virulencia del microorganismo, de forma que un mutante incapaz de realizar esta modificación es menos virulento que la cepa parental correspondiente. Sin embargo, la función natural de EF-Tu, una de las proteínas mayoritarias de la bacteria, es incorporar aminoácidos en la síntesis de proteínas, siendo este proceso esencial para la viabilidad celular. En este sentido, parece plausible hipotetizar que quizás la reducción de la virulencia provocada por la incapacidad de trimetilar EF-Tu no reside exclusivamente en la formación de un epítipo que medie la interacción huésped-patógeno, sino que también pueda deberse a la alteración en la síntesis de proteínas que estén implicadas en la virulencia del microorganismo.

Por este motivo, en este trabajo nos hemos planteado como objetivo investigar si la modificación de EF-Tu altera la síntesis de proteínas implicadas en la virulencia de este patógeno mediante un análisis global proteómico de cepas parentales, mutantes isogénicos desprovistos de la capacidad de modificar este factor de elongación y los correspondientes mutantes complementados.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Procedimientos microbiológicos.

#### 1.1 Microorganismos y medios de cultivo.

En la tabla 1 se indican las cepas de *P. aeruginosa* utilizadas en este estudio.

**Tabla 1. Cepas de *P. aeruginosa* usadas en este estudio.**

Cepa	Características	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Aislamiento clínico usado como cepa de referencia.	Colección de laboratorio. (Stover et al. 2000)
<i>P. aeruginosa</i> PAOMA	Mutante isogénico derivado de PAO1 hiperproductor de alginato por deficiencia en <i>mucA</i> .	(Barbier et al. 2012)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ <i>eftM</i>	Mutante isogénico derivado de PAO1 deficiente en el gen <i>eftM</i> .	(Barbier et al. 2013)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ <i>eftM</i> +	Mutante de PAO1 deficiente en <i>eftM</i> complementado con el gen <i>eftM</i> de PAO1.	Este trabajo.
<i>P. aeruginosa</i> HM4	Aislamiento de paciente con infección crónica.	(Varga et al. 2015)
<i>P. aeruginosa</i> HM4 $\Delta$ <i>eftM</i>	Mutante isogénico derivado de HM4 deficiente en el gen <i>eftM</i> .	Este trabajo.
<i>P. aeruginosa</i> HM4 $\Delta$ <i>eftM</i> +	Mutante de HM4 deficiente en <i>eftM</i> complementado con el gen <i>eftM</i> de PAO1.	Este trabajo.

Además de las cepas indicadas en la tabla 1, en el estudio se utilizaron 10 aislados de *P. aeruginosa*, causantes de infecciones respiratorias agudas o infecciones respiratorias crónicas en distintos pacientes (Barbier et al. 2008).

En los experimentos de genética se usaron las cepas de *Escherichia coli* S17.1 ATCC47055 (Simon, Priefer, y Pühler 1983) o DH5 $\alpha$  (Grant et al. 1990).

Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB) (Scharlau), tanto en caldo como solidificado en agar para bacteriología al 1,6% (Sigma-Aldrich). En determinados experimentos el medio fue suplementado con los siguientes antibióticos (Sigma-Aldrich): gentamicina (30/400  $\mu$ g/mL), cefotaxima (1  $\mu$ g/mL) y ampicilina (30  $\mu$ g/mL).

#### 1.2. Aislamiento y cuantificación de la producción del exopolisacárido de alginato.

La determinación de la producción del exopolisacárido de alginato se realizó a partir de 5 mL de tampón fosfato salino (PBS) (ver composición en apéndice) de suspensión bacteriana obtenida a partir de cultivos crecidos durante 48 h a 37°C en placas de LB agar. La

suspensión se ajustó a  $A_{420} \text{ nm} = 1$  y fue agitada vigorosamente durante 15 min con el vórtex para desprender el exopolisacárido. Seguidamente, se centrifugó a 13.000 x g durante 5 min para recoger el sobrenadante, que fue utilizado para cuantificar la cantidad de alginato presente, y liofilizar las células bacterianas para determinar el peso seco de la masa bacteriana utilizada para aislar el alginato. Expresamos la producción en  $\mu\text{g}$  de alginato por mg de peso seco de bacteria.

La cantidad de alginato presente en el sobrenadante se determinó utilizando el ensayo de carbazol-borato (Knutson y Jeanes 1968). Brevemente, se mezcló 1 mL de la muestra o del patrón (rango de 0 a 20  $\mu\text{g/mL}$  de glucuronolactona (Sigma-Aldrich)) con 3 mL de tetraborato de sodio 25 mM (Sigma-Aldrich) en ácido sulfúrico (Biolinea) y se calentó durante 10 min a 95°C. Tras la incubación, la muestra se dejó enfriar durante 2 min y posteriormente se añadieron por muestra 100  $\mu\text{L}$  de carbazol (Sigma-Aldrich) al 0,125% en etanol absoluto. Después de 15 min a 95°C se midió la densidad óptica de la solución a 530 nm. La concentración de alginato se calculó a partir de la recta realizada con el estándar de glucuronolactona y se normalizó por el peso seco de las bacterias a partir de las que se había obtenido el alginato.

### 1.3. Ensayos de movilidad bacteriana.

Para determinar la movilidad de los distintos microorganismos se utilizaron distintos medios de cultivo (Pérez-Gallego et al. 2016). La movilidad *swimming* se determinó en medio de cultivo compuesto por triptona al 1% (Cultimed), NaCl al 0,5% (Sigma-Aldrich) y solidificado con agarosa al 0,3% (Sigma-Aldrich). El inóculo se llevó a cabo mediante deposición de una colonia procedente de un cultivo fresco en placa de LB agar. Para determinar la movilidad *swarming*, se depositaron 2,5  $\mu\text{L}$  de una suspensión bacteriana ( $10^8$  UFC/mL) en placas de medio mínimo M9 suplementado con  $\text{MgSO}_4$  1mM, glucosa al 0,2%, Bacto Casaminoácidos al 0,5% y agar al 0,5% (productos de Sigma-Aldrich). Todas las placas se sellaron con *parafilm* para mantener la humedad. Tras la incubación durante 16 h a 37°C se midió el diámetro del halo formado y se fotografiaron las placas.

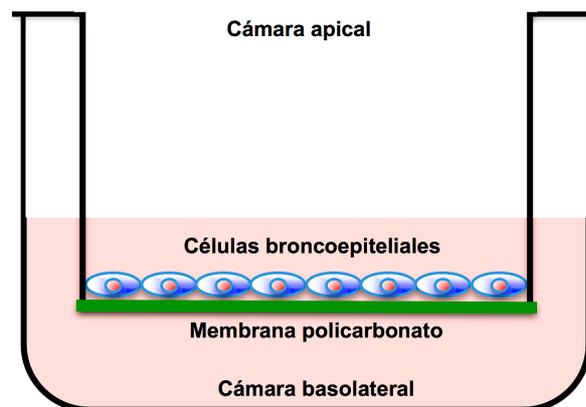
## 2. Ensayos con células humanas.

### 2.1. Línea celular y medio de cultivo.

Todos los ensayos se realizaron con la línea celular 16HBE14o<sup>-</sup> amablemente cedida por el Dr. Gruenert (Universidad de Vermont, EEUU). Las células 16HBE14o<sup>-</sup>, son células broncoepiteliales humanas, inmortalizadas con el virus de simio (SV40) defectivo en su origen, que conservan todas las características esenciales del epitelio bronquial humano, incluyendo la capacidad de formar monocapas, las uniones entre células adyacentes y el transporte direccional de iones (Gruenert et al. 1988). Para el mantenimiento y crecimiento de la línea celular se utilizó el medio esencial mínimo de Earl (MEM) suplementado con 1% de L-glutamina, 10% de suero de ternera fetal, previamente inactivado por calor a 56°C

durante 30 min, y 1 % de penicilina y estreptomycin (productos de Labclinics). Las células se crecieron a 37°C y al 5 % de CO<sub>2</sub>, sobre plástico o membranas de policarbonato, ambos previamente recubiertos durante 18 h a 37°C con una solución de fibronectina (20 µg/mL, Corning Costar Corp.) y colágeno (24 µg/mL, laboratorios PAA) disuelta en tampón HBE (ver composición en apéndice).

En los ensayos de permeabilidad y trans migración bacteriana se usaron cultivos de células 16HBE14o<sup>-</sup> polarizadas. Para obtener estos cultivos se utilizó un sistema de cultivo celular de doble cámara (cámara apical y cámara basolateral), separadas por una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 3 µm (Corning Costar) dispuestos en placas de cultivo de 12 pocillos (figura 9). Sobre estas membranas se depositaron 50.000 células y se dejaron crecer durante 10 días a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub> reemplazando el medio de cultivo cada 48 h. Para confirmar que el cultivo había alcanzado la confluencia y se había formado la barrera epitelial correctamente se midió la resistencia transepitelial (RTE) mediante el uso de un Ohmímetro (EVOMX, *World Precision Instruments*) y con un electrodo STX100. La medición de la RTE permitió verificar que no había continuidad entre los fluidos de la cámara apical y basal.



**Figura 9. Esquema representativo del sistema de cultivo.** En la cámara superior se sembraron las células en un volumen de 0,5 mL y en la cámara inferior se rellenó con un volumen de 1,5 mL. Ambas, separadas por una membrana de policarbonato de 3 µm que impide el paso de las células, pero permite el paso de las bacterias.

## 2.2. Ensayos de permeabilidad.

La permeabilidad de los cultivos polarizados se midió con el uso del marcador macromolecular no-iónico dextrano-3000 marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich). Para ello los cultivos polarizados, obtenidos como se ha descrito en el apartado 2.1, fueron estimulados apicalmente durante 6 h con una suspensión bacteriana preparada en PBS a una densidad óptica de 0,2 unidades a 420 nm a partir de placas de cultivo crecidas durante 18 h y diluidas 1/10 en medio de cultivo MEM estéril sin antibióticos, siendo la concentración  $2 \cdot 10^7$  UFC/mL. Seguidamente el medio de la cámara basolateral fue

reemplazado por medio fresco mientras que el de la cámara apical fue reemplazado por medio fresco conteniendo dextrano-3000 (Sigma-Aldrich) marcado (100 µg/mL). Tras 1 h de incubación, se tomaron muestras del medio basolateral y se midió la fluorescencia del medio mediante el uso del espectrofotómetro de fluorescencia *Cary Eclipse*, utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

### 2.3. Determinación de la viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad celular se usó el *kit* de detección de citotoxicidad de Roche (*Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*) basado en la cuantificación de la actividad enzimática del lactato deshidrogenasa (LDH), un enzima presente en el citoplasma celular, liberado por las células como consecuencia de la lisis celular. Para ello se recogió el sobrenadante de los cultivos y se centrifugó a 13.000 x *g* durante 5 min para eliminar restos celulares. Seguidamente, se mezclaron 50 µL del sobrenadante con 50 µL de la solución LDH, preparada según las instrucciones del fabricante, y se leyó la absorbancia a 490 nm. El sobrenadante de células lisadas con agua destilada y el de células sin tratar fueron utilizados como control positivo y negativo, respectivamente. El porcentaje de citotoxicidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{Valor muestra} - \text{Control negativo}}{\text{Control positivo} - \text{Control negativo}} \times 100$$

### 2.4. Ensayos de invasión y trans migración bacteriana.

En los ensayos de invasión y trans migración bacteriana las células 16HBE14o<sup>-</sup> polarizadas fueron infectadas con *P. aeruginosa* por inoculación de 2·10<sup>7</sup> UFC/mL (ratio bacteria/célula broncoepitelial 50:1) en el medio de cultivo de la cámara apical. Al cabo de distintos tiempos de incubación se tomó una muestra del medio de la cámara basolateral y se determinó el número de bacterias que habían cruzado la barrera de células epiteliales por cultivo de distintas diluciones sobre placas de LB agar. Para determinar las bacterias que habían entrado en las células, se retiró el medio de cultivo celular y se repuso con medio fresco que contenía gentamicina (100 µg/mL) para eliminar las bacterias extracelulares. Trascorrida 1 h de incubación con el antibiótico, se realizaron tres lavados con PBS y las células fueron lisadas con el detergente Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,5% en PBS durante 10 min. Finalmente, se cuantificó el número de bacterias intracelulares plaqueando distintas diluciones del lisado celular en placas de LB agar.

Con el fin de determinar el papel del factor de transcripción NF-κB en la trans migración bacteriana, las células fueron pretratadas durante 30 min con un inhibidor específico de dicho factor, el pen-etil ester del ácido caféico (*caffeic acid penethyl ester* (CAPE), Sigma-Aldrich) (Natarajan et al. 1996). Para ello, en la cámara apical se usó medio de cultivo conteniendo

CAPE (10 µg/mL). Tras el pretratamiento, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo conteniendo la suspensión bacteriana como se ha indicado previamente.

### **2.5. Obtención de extractos celulares, fracción citoplasmática y fracción nuclear.**

Para la obtención de extractos celulares totales las células fueron resuspendidas en el tampón de lisis RIPA (Santa Cruz). Para la obtención de la fracción citoplasmática y nuclear se utilizó el *kit NE-PER<sup>®</sup> Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las monocapas de células broncoepiteliales fueron despegadas, concentradas por centrifugación, lavadas con PBS, y tratadas con las soluciones CER I y CER II suministradas en el *kit*. Tras una breve centrifugación, se recogió el sobrenadante, en el que se encontraba el contenido citoplasmático, y se trató el precipitado con la solución de extracción nuclear (NER). Después de un paso de centrifugación se recogió el sobrenadante que contenía el contenido nuclear. Los extractos y fracciones fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis. La concentración de proteínas de cada muestra se cuantificó con la técnica de Bradford usando el *Quick Start<sup>™</sup> Bradford Protein Assay* siguiendo las instrucciones del fabricante (BioRad).

### **2.6. Microscopía electrónica.**

Las membranas de policarbonato sobre las que se habían crecido las células broncoepiteliales 16HBE14o<sup>-</sup> polarizadas y se habían infectado, tal como se indica en el apartado 2.4, se prepararon para ser observadas al microscopio electrónico de barrido de la siguiente manera. Primero se fijaron, sumergiéndolas en glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 3% en PBS durante 18 h a 4°C. Tras la fijación, las muestras se lavaron y deshidrataron por incubaciones consecutivas de 10 min a temperatura ambiente en concentraciones crecientes de etanol (25%, 50%, 75% y 100%). Por último, las muestras se recubrieron con una película de oro y se observaron con el microscopio electrónico de barrido S-3400N Hitachi.

## **3. Técnicas inmunológicas.**

### **3.1 Análisis de proteínas por Western blot.**

Las proteínas específicas se detectaron y cuantificaron mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia a membranas e identificación con anticuerpos específicos.

Para la separación de proteínas se prepararon geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico utilizando el sistema de electroforesis *Miniprotean* (BioRad). Los geles de un grosor de 0,75 mm estaban formados por una fase de apilamiento o *stacking* de las muestras y una fase de resolución o *resolving* (ver composición apéndice). En la fase de resolución las concentraciones de acrilamida variaron entre el 6 y el 15% en función del peso molecular de la proteína de interés. Las muestras fueron diluidas 1:1 en tampón de carga (ver composición apéndice), hervidas durante 5 min y separadas mediante electroforesis a un amperaje

constante de 20 mA en tampón de electroforesis (ver composición en apéndice) utilizando como referencia de pesos molecular el *Precision Plus Protein All Blue Standards* (BioRad).

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas durante 20-60 min a 15 V a membranas de Immobilon-P (Millipore), previamente tratadas con metanol. La transferencia se realizó en tampón *Towbin* (ver composición en apéndice) y usando el sistema *Transfer Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad). Una vez terminada la transferencia, las membranas se bloquearon en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (PBS-BSA 1%) durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron durante 18 h a 4°C con los anticuerpos primarios específicos indicados en la tabla 2, disueltos en la solución de bloqueo.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en este estudio.**

Antígeno detectado	Dilución	Isotipo /origen	Proporcionado por
ZO-1	1:200	IgG /policlonal conejo	Santa Cruz
Claudina-7	1:100	IgG /policlonal conejo	Abcam
Ocludina	1:1000	IgG /policlonal conejo	Millipore
$\beta$ -Actina	1:10000	IgG/monoclonal ratón	Sigma-Aldrich
NF- $\kappa$ B p65	1:200	IgG/policlonal conejo	Santa Cruz
IK $\beta$	1:5000	IgG/policlonal conejo	Abcam
Ef-Tu	1:1000	IgG/policlonal conejo	(Barbier et al. 2013)
Trimetil-lisina	1:1000	IgG/policlonal conejo	Cell Signaling
AlgE	1:2000	IgG/policlonal conejo	(Rehm et al. 1994)

Tras la incubación con los anticuerpos primarios se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina acorde al origen del primario (tabla 3) durante 1h a temperatura ambiente.

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizado en este estudio.**

Antígeno detectado	Dilución	Isotipo/origen	Proporcionado por
IgG conejo	1:2000	IgG/Cabra	Sigma-Aldrich
IgG ratón	1:5000	IgG/Cabra	Sigma-Aldrich

A continuación, se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se reveló la membrana con el tampón de revelado constituido por una pastilla de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolio (Sigma-Aldrich) diluidas en 10 mL de agua. Tras el secado de las membranas se escanearon mediante el escáner *GS-800 Calibrated Densitometer* (Bio Rad) y se cuantificó la intensidad de las bandas.

### 3.2. Cuantificación de IL-8.

La cantidad de IL-8 producida por las células broncoepiteliales tras la infección por *P. aeruginosa* se cuantificó por ELISA formato sándwich (Peprotech). Para ello se usaron 100 µL/pocillo de los sobrenadantes de los cultivos infectados, previamente centrifugados para retirar restos celulares. Los sobrenadantes se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en pocillos que habían sido previamente activados durante 18 h a temperatura ambiente con el anticuerpo de captura específico anti-IL-8 humana y bloqueados durante 1 h a temperatura ambiente con PBS-BSA 1%. Tras tres lavados con PBS, los pocillos fueron incubados 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo de detección anti-IL-8 humana conjugado con biotina, lavados de nuevo y finalmente incubados con avidina conjugada a peroxidasa. La presencia de peroxidasa fue detectada con el uso de su sustrato, el ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) o ATBS. Las lecturas de las absorbancias a 415 nm del producto resultante se midieron en un lector de ELISA (BioRad Modelo 680). La concentración de IL-8 se determinó a partir de una recta estándar realizada en paralelo con cantidades conocidas de IL-8.

### 3.3. Inmunomicroscopía de fluorescencia.

En los experimentos de microscopía de fluorescencia, las células epiteliales 16HBE14o<sup>-</sup> se infectaron tal como se ha descrito en el apartado 2.4. Tras la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a 4°C, se permeabilizaron con Tritón al 0,1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se bloquearon con PBS-BSA 1%. A continuación, se incubaron secuencialmente con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ZO-1 y el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina, ambos (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:50 en PBS-BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Antes y después de cada incubación se realizaron lavados de 5 min con PBS. Además, se llevaron a cabo paralelamente diferentes controles con el fin de asegurar la especificidad. Finalmente se utilizó el medio de montaje DAKO® y las muestras se observaron con microscopio confocal laser Leika LS230.

## 4. Técnicas de genética molecular.

### 4.1. Procedimientos generales.

El aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos (ADN genómico, ADN plasmídico, ARN o productos de PCR) se llevó a cabo mediante el uso de los *kits* comerciales específicos. En concreto, para el aislamiento de ADN genómico se usó el *Ultraclean Microbial DNA isolation kit* (MOBIO), para el ADN plasmídico el *Qiaprep Spin Miniprep kit* (Qiagen), para el ARN, el *RNasy mini kit* (Qiagen) y para los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el *Qiaquick PCR purification kit* (Qiagen). En todos los casos se utilizaron los protocolos suministrados por el fabricante.

Las reacciones enzimáticas (digestión de ADN con enzimas de restricción, desfosforilación de fragmentos de ADN o plásmidos, ligación entre moléculas de ADN, PCR) se llevaron a cabo utilizando enzimas de Takara siguiendo las directrices del fabricante o protocolos descritos previamente (Green, Sambrook, y Sambrook 2012).

Para la separación y visualización de las moléculas de ADN se utilizó la electroforesis en geles de agarosa. La agarosa (Sigma-Aldrich) se diluyó en tampón TAE (ver composición en apéndice) a una concentración variable del 0,7-2% en función del peso molecular de los fragmentos de ADN a separar. Las muestras se diluyeron en tampón de carga (Promega) y se aplicaron voltajes de 30 a 100 V. Para visualizar las muestras, se tiñeron los geles en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en agua durante 15 min y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad).

#### 4.2. Cuantificación de RNAm por RT-PCR.

En este estudio la técnica de PCR de transcripción reversa (RT-PCR) a tiempo real se utilizó para cuantificar los niveles de expresión de los genes *exoS* y *exoS*T en *P. aeruginosa*. Para ello se aisló el ARN, tal como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.1, a partir de cultivos en fase exponencial crecidos en agitación a 37°C en medio LB. Para eliminar posibles contaminaciones por ADN, el ARN aislado fue tratado con DNasa (*Turbo DNA free*<sup>™</sup> (Ambion)) durante 30 min a 37°C y posteriormente cuantificado en el espectrofotómetro Nanodrop (ThermoScientific). La RT-PCR se llevó a cabo con el kit *Quantitec*<sup>®</sup> *SYBR Green RT-PCR* (Qiagen) en el equipo *Eco Real Time PCR System* (Illumina) utilizando los siguientes componentes y cantidades indicadas en la tabla 4.

**Tabla 4. Componentes y cantidades en la reacción de RT-PCR.**

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
2x RT-PCR máster mix	5
Quantitec RT mix	0,1
Cebador F (10 µM)	0,4
Cebador R (10 µM)	0,4
H <sub>2</sub> Od (sin RNasas)	3,1
ARN (50 ng/mL)	1
Volumen total	10

El cálculo de la expresión relativa se realizó atendiendo a la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{ expresión} = 2^{-a-b}$$

$$a = N_x \text{ cepa 1} - N_y \text{ cepa 1}$$

$$b = N_x \text{ cepa 2} - N_y \text{ cepa 2}$$

N es el ciclo umbral en el que se detecta el gen estudiado (x) o el gen de expresión constitutiva (y) (*housekeeping gene*).

En todos los casos se consideró el valor medio de ARNm obtenido en tres experimentos independientes en los que se realizaron las PCR por duplicado.

### 4.3. Transformación.

Para la transformación de *E. coli* se prepararon células competentes a partir de 100 mL de un cultivo exponencial ( $A_{600\text{ nm}} = 0,3$  unidades) crecido en agitación a 37°C en LB. Tras enfriar el cultivo 15 min en hielo, se recogieron las bacterias por centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 16 mL del tampón TB1 frío (ver composición en apéndice). Tras una incubación de 15 min en hielo, la suspensión bacteriana se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 4 mL del tampón TB2 (ver composición en apéndice). Seguidamente, la suspensión bacteriana fue alicuotada en fracciones de 300  $\mu\text{L}$  que fueron usadas directamente o congeladas a -80°C.

Para la transformación se mezclaron el ADN con una alícuota de células competentes y se incubaron secuencialmente 10 min en hielo, 90 s a 42°C, 2 min en hielo y 1 h a 37°C en agitación previa adición de 1 mL de LB. Finalmente, la suspensión se plaqueó sobre LB agar con el antibiótico apropiado.

### 4.4. Electroporación.

Las células competentes de *P. aeruginosa* se prepararon a partir de un cultivo de 50 mL crecido en LB a 37°C que había alcanzado la fase exponencial y cuya absorbancia a 600 nm era 0,5 unidades. El cultivo se incubó durante 15 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 5,000 x *g* durante 15 min para recoger las bacterias. Una vez descartado el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 25 mL del tampón SMEB frío (ver composición en apéndice). Seguidamente se realizaron dos lavados más en las mismas condiciones, pero reduciendo el volumen de resuspensión en 5 mL y 500  $\mu\text{L}$ . A continuación, se alicuotó la suspensión bacteriana en fracciones de 100  $\mu\text{L}$  que fueron usadas directamente o congeladas a -80°C.

Para la electroporación se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de ADN (aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ ) con una alícuota de las células competentes y se incubaron durante 5 min en hielo. Seguidamente, la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación de 0,2 cm de ancho a la que se le aplicaron 2,5 KV en un pulso de 5 ms usando el electroporador Gen Pulser Xcell (BioRad). Tras el pulso eléctrico, se añadió 1 mL de LB y la suspensión bacteriana se incubó 1 h a 37°C con agitación. Finalmente, se plaquearon las bacterias sobre placas de LB agar con el antibiótico adecuado.

### 4.5. Conjugación.

Para los experimentos de conjugación se obtuvieron cultivos en fase exponencial de la cepa donadora *E. coli* S17.1, portadora del plásmido a transferir, y de la cepa receptora de *P. aeruginosa* correspondiente. Seguidamente se mezclaron 5 mL del cultivo de la cepa

donadora con 500  $\mu$ L de la cepa receptora y se centrifugaron durante 10 min a 5.000 x g. Una vez descartado el sobrenadante por decantación, las bacterias fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L del medio residual y se depositaron sobre una placa de LB agar que fue incubada durante 18 h a 37°C. Al día siguiente, la masa de conjugación fue resuspendida en 1 mL de LB y se plaqueó en el medio selectivo correspondiente.

### 4.6. Construcción del mutante deficiente en *eftM*.

En este estudio se construyó un mutante deficiente en la enzima EftM a partir de la cepa HM4 aislada en un paciente con infección respiratoria crónica. Para ello se usó la misma estrategia que se utilizó para construir el mutante PAO1 $\Delta$ *eftM* derivado de PAO1 (Barbier et al. 2013) basada en el protocolo descrito por Quénée y colaboradores (Quénée, Lamotte, y Polack 2005). En primer lugar se transfirió por conjugación el plásmido pEXT*eftM*::Gm desde *E. coli* S17.1 a *P. aeruginosa* HM4. El plasmido pEXT*eftM*::Gm es un vector suicida que contiene una copia del gen *eftM* de la cepa PAO1 con una delección de 100 pb y el gen que confiere resistencia a gentamicina (*aacC1*) procedente del plásmido pUCGmlox (Quénée, Lamotte, y Polack 2005). Este vector no puede replicar en *P. aeruginosa* y es letal en presencia de sacarosa (*sacB*). Por este motivo, los transconjugantes se crecieron en placas de LB agar que contenían sacarosa al 5%, gentamicina 400  $\mu$ g/mL y cefotaxima 1  $\mu$ g/mL. La incapacidad de replicación del plásmido pEXT*eftM*::Gm en *P. aeruginosa*, la necesidad de integrar el gen de resistencia a gentamicina y la letalidad que provoca el gen *sacB* determinó la doble recombinación como única opción para la viabilidad celular. De esta manera, los aislados de *P. aeruginosa* resistentes a gentamicina tenían el gen *eftM* mutado incorporado en su cromosoma. Se utilizó una concentración alta de gentamicina dado que la cepa HM4 es en sí misma resistente a altas concentraciones de este antibiótico (> 200  $\mu$ g/mL).

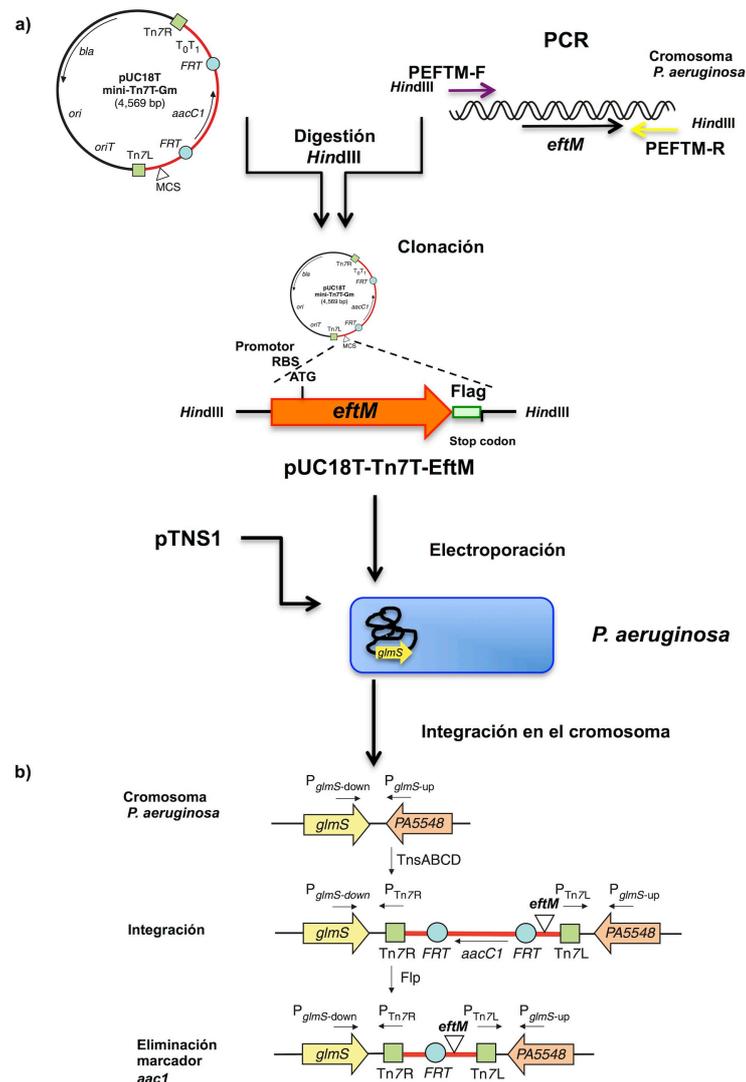
Tabla 5. Cebadores utilizados en este estudio.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Gen diana
P <sub>ExoSF</sub>	CGTTTGGGACAGATTGAGGC	<i>exoS</i>
P <sub>ExoSR</sub>	GCACCATCTGCTTGAACACG	<i>exoS</i>
P <sub>ExoTF</sub>	CAGCATGTACTIONCAGCGCAAG	<i>exoT</i>
P <sub>ExoTR</sub>	CGCCGTTGGTATAGAGACCG	<i>exoT</i>
P <sub>rpsLF</sub>	GCTGCAAAACTGCCCGCAACG	<i>rpsL</i>
P <sub>rpsLR</sub>	ACCCGAGGTGTCCAGCGAACC	<i>rpsL</i>
P <sub>EftMF1</sub>	CGCCTTTGCGAAGCTTGGAACGC	<i>eftM</i>
P <sub>EftMR1</sub>	CCCAAGCTTCTACGTCATCCTTGTAGTCCATGCGCTTCACG	<i>eftM</i>
P <sub>Tn7R</sub>	CACAGCATAACTGGACTGATTTTC	Tn7
P <sub>glmS-down</sub>	GCACATCGGCGACGTGCTCTC	<i>glmS</i>
P <sub>3'eftmF</sub>	ATGCCCTGTTCGTCTGCGTGA	<i>eftM</i>
P <sub>glmS-up</sub>	CTGTGCGACTGCTGGAGCTGA	<i>glmS</i>

#### 4.7. Complementación de los mutantes deficientes en *eftM*.

Con el fin de revertir el fenotipo de los mutantes deficientes en *EftM* optamos por complementar cada mutante con el gen nativo original procedente de la cepa parental correspondiente. La complementación se llevó a cabo introduciendo una sola copia del gen *eftM* en el cromosoma de *P. aeruginosa* mediante el uso de vector pUC18T-miniTn7T (Choi y Schweizer 2006) tal como se indica en la figura 10. Para ello, en primer lugar, se amplificó por PCR, usando como molde el ADN genómico de la cepa parental correspondiente y los cebadores P<sub>EftMF1</sub> y P<sub>EftMR1</sub> (tabla 5), un fragmento que contenía 500 pb de la región *upstream* del codón de iniciación de *eftM*, incluyendo la región promotora del gen y el sitio de unión al ribosoma (RBS), el gen completo *eftM*, la secuencia que codifica el péptido FLAG y el codón de terminación. El producto de PCR resultante se clonó en el vector pUC18T-miniTn7T linearizado con *HindIII* para dar lugar al plásmido pUC18T-miniTn7T-*eftM* que fue introducido en *E. coli* DH5 $\alpha$  por transformación (apartado 4.3) para su posterior aislamiento y purificación. El plásmido pUC18T-miniTn7T-*eftM* fue transferido a *P. aeruginosa* por electroporación siguiendo el protocolo (apartado 4.4). Para ello se mezcló una alícuota de células competentes, 50 ng del plásmido pUC18T-miniTn7T-*eftM* y 50 ng del plásmido pTNS1 (Choi y Schweizer 2006). El plásmido pTNS1 codifica las subunidades TnsABCD de la transposasa imprescindibles para que tenga lugar la transposición. Tras la electroporación se plaqueó la suspensión bacteriana sobre placas de LB agar con gentamicina (30  $\mu$ g/mL).

Finalmente, el marcador de selección (*aacC1*) fue eliminado por escisión gracias a la recombinasa FIp.



**Figura 10. Esquema de la estrategia seguida en la complementación de los mutantes deficientes en EftM.**

a) La extensión del ADN del vector suicida y del mini-Tn7 están indicados en línea negra y roja, respectivamente. Abreviaturas: *aacC1*, gen de la gentamicina acetil transferasa; *bla*, gen de la beta-lactamasa; FRT diana de la recombinasa FIp; MCS, sitio de clonaje múltiple; *ori*, origen de replicación del plásmido derivado de ColE-1; *oriT*, origen de transferencia conjugativa; T0T1, terminadores transcripcionales T0 y T1 del bacteriófago I y del operón *rrnB* de *E. coli*, respectivamente; Tn7L y Tn7R, respectivos extremos terminales izquierdo y derecho del Tn7. Las flechas indican la extensión y la dirección de transcripción de los genes *aacC1* y *bla*.

b) Integración del mini-Tn7 en el cromosoma. El mini-Tn7-T-Gm se transpone en el cromosoma bacteriano (línea negra) tras la co-electroporación del pUC18T-miniTn7T-*eftM* y el plásmido pTNS1 que codifica TnsABCD. Los transformantes resistentes a gentamicina (Gm) resultantes de la transposición (línea roja y delimitada por cuadrados verdes) en el cromosoma son seleccionados para su posterior análisis. El marcador de resistencia a gentamicina puede ser eliminado gracias a la escisión mediada por la recombinasa FIp, dando lugar a una cepa sin rastro de la inserción del mini-Tn7. La transposición puede ser verificada por PCR usando los distintos cebadores indicados con flechas convergentes ( $P_{glmS-down}$ ,  $P_{glmS-up}$ ,  $P_{Tn7R}$  y  $P_{Tn7L}$ ). Las flechas más gruesas indican los genes y su orientación transcripcional.

### 5. Modelo murino de infección respiratoria por *P. aeruginosa*.

Para el modelo animal utilizamos ratones BALB/c hembra de 20-25 g, agrupados en grupos de 4 por jaula, con acceso ilimitado a comida y agua. Se instauró un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, una temperatura ambiental de 20-22°C y una humedad al 45-65%.

Para realizar la infección respiratoria seguimos el protocolo previamente descrito por Barbier y colaboradores (Barbier et al. 2013). Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de anestésico y relajante muscular (10 µL de ketamina (Imalgene 1.000) + 5 µL de xilacina (Xilagesic 2%) por cada 10 g de peso corporal). Una vez anestesiados se infectaron por vía intranasal depositando un volumen de 20 µL de una suspensión bacteriana en PBS (dosis inoculada:  $3\text{-}4\cdot 10^7$  UFC/ratón) en el interior de los orificios nasales. La suspensión bacteriana se obtuvo a partir de cultivos en fase exponencial crecidos a 25°C en caldo LB. Los animales fueron monitorizados a lo largo de 96 h.

Los experimentos con animales se aprobaron por el comité ético de la institución siguiendo las directrices institucionales y nacionales.

### 6. Análisis proteómico.

El análisis proteómico de las células de *P. aeruginosa* PAO1 y HM4 se realizó a partir de cultivos crecidos en medio LB con agitación a 25°C y 37°C, respectivamente. Hay que recordar que en la cepa PAO1 la trimetilación de EF-Tu por EftM sólo es funcional a temperaturas inferiores a 30°C (Barbier et al. 2013), por este motivo esta cepa se creció a 25°C. Por otro lado, en la cepa HM4, EftM modifica EF-Tu tanto a 25°C como a 37°C. Sin embargo, al ser 37°C una temperatura más relevante desde el punto de vista de la infección humana, se decidió realizar el análisis proteómico a partir de células crecidas a 37°C. En ambos casos, las bacterias se crecieron hasta la fase exponencial ( $A_{600\text{ nm}} = 0,5$  unidades) en un volumen suficiente para obtener entre 20-30 mg de biomasa. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 5,000 x g durante 20 min, se lavaron y se resuspendieron en tampón NuPAGE® LDS (Invitrogen) a razón de 2 µL/mg de biomasa. Para lisar las bacterias, la suspensión fue incubada 5 min a 95°C, agitada vigorosamente 1 min con la ayuda del vórtex y sometida a ultrasonidos en un baño durante 5 min. Estos tratamientos se repitieron hasta 4 veces para asegurar una lisis eficiente. A continuación, las proteínas presentes en la muestra se separaron por electroforesis en un gel de Bis-tris poliacrilamida NuPAGE® (Invitrogen) en las condiciones descritas anteriormente (apartado 3.1). El gel fue teñido con *Coomassie SimplyBlue™ Safestain* (Invitrogen) y posteriormente fragmentado en pequeñas porciones para su posterior proteólisis con tripsina.

Para la digestión con tripsina, las porciones de gel de poliacrilamida se lavaron dos veces con bicarbonato amónico 50 mM en etanol al 50% (v/v) durante 20 min a 55°C. Seguidamente fueron deshidratadas durante 5 min a 55°C con etanol absoluto, rehidratadas durante 45 min a 56°C con bicarbonato amónico 50 mM suplementado con ditiotreitól 10 mM

(Sigma-Aldrich) para reducir los puentes disulfuro y tratadas con yodoacetamida 55 mM (Sigma-Aldrich) disuelta en bicarbonato amónico 50 mM durante 30 min a oscuras. Finalmente, las porciones de gel fueron lavadas, rehidratadas como se ha descrito antes y digeridas a 37° durante 18 h con tripsina (Promega) (2,5 ng/ $\mu$ L) disuelta en bicarbonato amónico 50 mM. Para extraer los péptidos resultantes de la digestión de las porciones de gel, éstas fueron incubadas en una solución de ácido fórmico al 5% (v/v) en acetonitrilo 50% (v/v) durante 30 min en un baño de ultrasonidos. Los péptidos liberados fueron secados por completo a 40°C al vacío hasta que todo el solvente fue eliminado y conservados a -20°C hasta que fueron analizados.

La mezcla de péptidos fue analizada en el espectrómetro de masas en tándem con un equipo de cromatografía líquida *Nano-scale Ultimate 3000/Orbitrap Fusion Instrument* (Thermo Scientific) usando las condiciones descritas previamente (Groot et al. 2009). La identificación y cuantificación relativa de las proteínas de cada muestra se llevó a cabo con el programa Progenesis Q1 para proteómica (Nonlinear Dynamics). Todos los análisis se normalizaron respecto a una referencia seleccionada por el *software* y la intensidad de los picos fue normalizada respecto a la intensidad total. Los espectros de MS/MS fueron exportados desde el *software* de Progenesis al sistema de MASCOT v.2.5.0 (Matrix Science) para la identificación de los péptidos a partir de la base de datos de secuencias polipeptídicas según la información provista por la secuencia y anotación del genoma de cada cepa usada en el estudio. De esta forma se asignó a que péptido correspondía cada espectro de MS/MS. Se consideró que una proteína estaba presente en la muestra si al menos se podían detectar dos péptidos no redundantes de la misma proteína. Tras tres experimentos independientes, se seleccionaron las proteínas que se detectaron en distintas cantidades entre las cepas en base a que al menos hubiera un cambio igual o superior a dos veces y que el cambio fuese estadísticamente significativo (valor de  $p < 0,05$  en *Test T-Student*).

# **RESULTADOS: CAPÍTULO I**

---

**RESULTADOS: CAPÍTULO I**
**Translocación de aislados clínicos de *P. aeruginosa* a través de un epitelio respiratorio polarizado.**

Las cepas de *P. aeruginosa* con fenotipo mucoide, es decir, hiperproductoras del exopolisacárido alginato, se aíslan frecuentemente en infección crónica (Lam et al. 1980) y además, se asocian a un mal pronóstico en la evolución de la enfermedad. En este estudio se determinó la capacidad para alterar y atravesar una barrera broncoepitelial polarizada de una colección de aislados clínicos procedentes de infecciones respiratorias agudas o crónicas con diferente grado de producción del exopolisacárido de alginato (tabla 6).

**Tabla 6.** Translocación a través de células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> polarizadas de distintos aislados clínicos de *P. aeruginosa*.

Cepa	Infección	Producción alginato <sup>a</sup>	Bacterias traslocadas (media x 10 <sup>3</sup> UFC) <sup>b</sup>	Resistencia eléctrica transepitelial <sup>c</sup>
A2	Aguda	0,23 ± 0,01	2050	26 ± 2,0
A3	Aguda	0,33 ± 0,01	50	28 ± 4,1
A5	Aguda	0,31 ± 0,02	440	15 ± 2,2
C5	Crónica	0,24 ± 0,02	240	17 ± 1,1
C7	Crónica	0,27 ± 0,01	10	22 ± 4,1
C9	Crónica	2,73 ± 1,02	50	3 ± 0,5
C13	Crónica	2,22 ± 0,59	10	4 ± 0,4
HM4	Crónica	3,78 ± 0,40	20	3 ± 0,5
FQSE21-1003	Crónica	2,74 ± 0,42	1	11 ± 1,0
FQSE28-1110	Crónica	2,55 ± 0,54	102	12 ± 0,9

<sup>a</sup> La producción de alginato se cuantificó mediante el ensayo con carbazol y se expresa como la cantidad de alginato en microgramos por miligramo de peso seco de bacterias.

<sup>b</sup> Media de tres determinaciones independientes.

<sup>c</sup> Porcentaje de reducción de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) relativa a la RET antes de la infección.

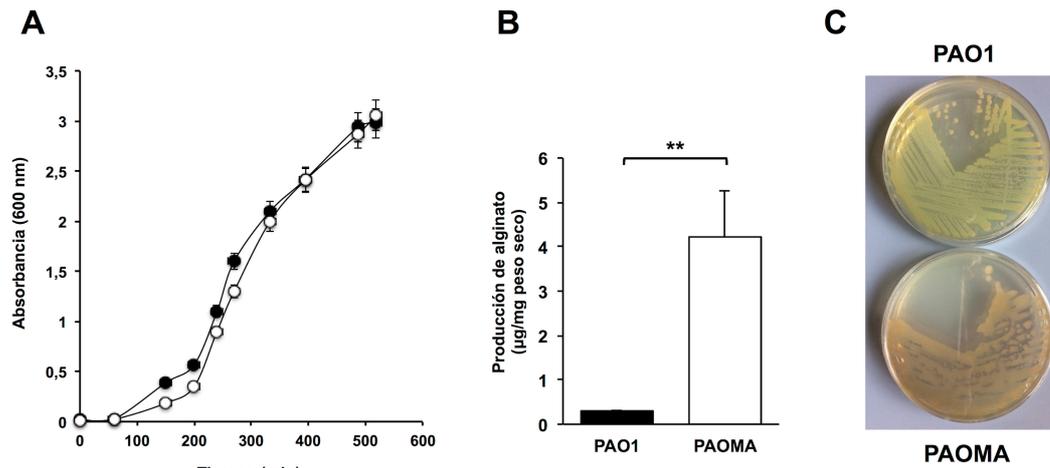
Para ello se crecieron las células broncoepiteliales 16HBE14o<sup>-</sup> hasta la confluencia sobre membranas porosas en las condiciones que indujeron tanto la polarización fisiológica de las células, diferenciándose una región apical y una región basal, como la formación de las uniones entre células adyacentes. Las células polarizadas fueron infectadas depositando una suspensión de cada cepa clínica sobre la superficie apical de las células. En cada ensayo se usó un número similar de microorganismos, por lo tanto, el número de microorganismos recuperados del compartimento basal representa una medida directa de la eficiencia de translocación de la cepa.

Se observó un amplio rango de eficiencias de translocación entre las cepas estudiadas, aunque los resultados obtenidos en los diferentes experimentos fueron reproducibles. Se detectó una asociación inversamente proporcional entre la cantidad de alginato producido por la cepa y su capacidad para cruzar la barrera epitelial. En este sentido, se recuperaron de 10 a 2050 microorganismos translocados al compartimento basal en los ensayos con las cepas que producían niveles bajos de alginato, es decir, no mucoides (tabla 6, filas en gris). Por el contrario, sólo se recuperaron de 1 a 102 microorganismos en los ensayos con las cepas mucoides (tabla 6, filas en blanco). También se determinó el efecto de cada una de las cepas sobre la función epitelial midiendo la RET. En coherencia con los ensayos de translocación, las cepas que producían poco alginato redujeron significativamente más la RET que las cepas mucoides.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el exopolisacárido de alginato reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para alterar y atravesar un modelo de epitelio respiratorio humano de células polarizadas.

**Efecto de la mutación de *mucA* sobre la capacidad de translocación de *P. aeruginosa* a través de células broncoepiteliales humanas polarizadas.**

Está perfectamente establecido que en la mayoría de los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infecciones crónicas el fenotipo mucoide está causado por la mutación de *mucA* (ver apartado 2.2 de la introducción). Por este motivo, para investigar de forma directa el efecto del alginato sobre la translocación de *P. aeruginosa* a través del epitelio respiratorio utilizamos la cepa parental PAO1 y el mutante isogénico deficiente en *mucA* PAOMA. La mutación de *mucA* no afectó a la capacidad de crecimiento de la cepa, tal como se puede observar en la figura 11.A En este sentido, PAO1 y PAOMA presentaron tasas de crecimiento similares *in vitro*; el tiempo de duplicación en la fase exponencial en LB fue de 33 a 36 min a 37°C. La mutación incrementó la producción de alginato de PAO1 de forma muy marcada (figuras 11.B y C).



**Figura 11. Características fenotípicas de *P. aeruginosa* PAO1 y el mutante isogénico deficiente en *mucA* PAOMA.**

A) Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 (círculos negros) y el mutante PAOMA (círculos blancos) en medio LB a 37°C con agitación.

B) Producción de exopolisacárido de alginato por *P. aeruginosa* PAO1 (columna negra) y el mutante PAOMA (columna blanca). La cantidad de exopolisacárido de alginato se determinó mediante el ensayo del carbazol y se expresa en microgramos por miligramo de peso seco de las bacterias de las que se realizó el aislamiento de alginato.

Los resultados proceden de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error representan los errores estandar de las medias. Los análisis estadísticos se realizaron con un test T-Student de dos colas no pareadas en el que \*\* representa un valor  $P < 0,01$ .

C) Fotografía del aspecto de las colonias de *P. aeruginosa* PAO1 y el mutante PAOMA crecidos en LB a 37°C durante 24 horas.

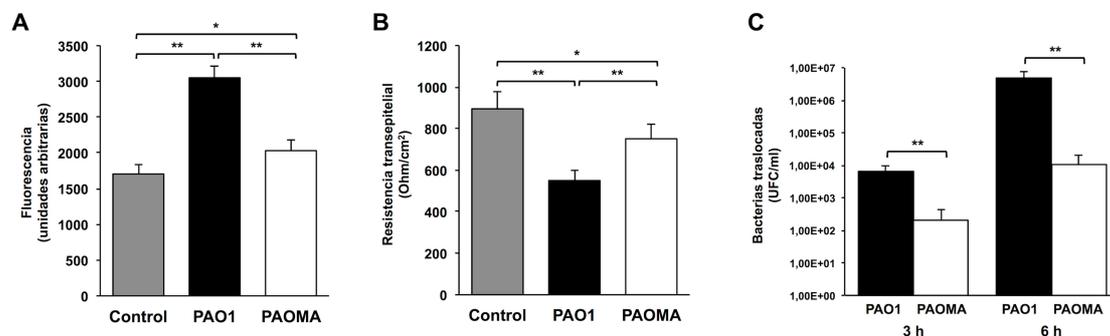
En los ensayos de translocación se depositó una suspensión bacteriana de cada cepa sobre la superficie apical de las células polarizadas crecidas como se ha descrito anteriormente. El efecto de cada cepa sobre la función epitelial se determinó midiendo la permeabilidad paracelular y la RET. Tras 6 h de estimulación, la permeabilidad celular de las células broncoepiteliales tratadas con la cepa parental PAO1 se había incrementado un  $179 \pm 8\%$  respecto al control sin infectar (figura 12.A). En coherencia con este resultado, la RET había disminuido un  $47 \pm 4\%$ , respecto al control (figura 12.B). En contraposición con estos resultados, la permeabilidad paracelular de las células tratadas con el mutante deficiente en *mucA* PAOMA sólo se incrementó ligeramente ( $120 \pm 6\%$ ), respecto al control, mientras que la RET disminuyó solamente un  $27 \pm 5\%$ .

A continuación, comparamos la capacidad de ambas cepas para cruzar a través de las células 16HBE14o<sup>-</sup> crecidas sobre las membranas porosas. En cada uno de los tiempos estudiados, la cepa parental PAO1 cruzó la barrera epitelial de forma más eficiente que el mutante PAOMA (figura 12.C). En este sentido, después de 3 h de infección sólo unas pocas bacterias ( $206 \pm 34$  UFC/ml) del mutante PAOMA habían sido capaces de cruzar la barrera epitelial, mientras que al menos  $6.468 \pm 549$  células de la cepa PAO1 translocaron del compartimento apical al basal.

De forma similar, al cabo de 6 h de infección la capacidad para pasar a través de las células broncoepiteliales del mutante PAOMA era hasta 100 veces inferior a la de la cepa parental PAO1.

Se determinó la citotoxicidad de PAO1 y PAOMA sobre las células broncoepiteliales mediante la cuantificación de la actividad del lactato deshidrogenasa liberada al sobrenadante (datos no mostrados). No se observaron diferencias entre los sobrenadantes de las células tratadas con tampón PBS, como control sin infectar, y los sobrenadantes de las células infectadas con PAO1 o PAOMA, confirmando que la alteración de la barrera epitelial no estaba causada por la citotoxicidad bacteriana.

Estos resultados sugieren que la mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para cruzar a través de un modelo *in vitro* de epitelio respiratorio polarizado.



**Figura 12. Efecto de la mutación de *mucA* sobre la capacidad de *P. aeruginosa* para alterar la permeabilidad de las células broncoepiteliales humanas polarizadas.**

A) Permeabilidad paracelular de células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> infectadas durante 6 h con PAO1 (columnas negras), con el mutante PAOMA (columnas blancas) o sin infectar (control, columnas grises). La permeabilidad paracelular se midió utilizando el marcador macromolecular no iónico fluorescente FITC-*dextran* 3000.

B) Resistencia eléctrica transepitelial (RET) de células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> infectadas durante 6 h con PAO1 (columnas negras), con el mutante PAOMA (columnas blancas) o sin infectar (control, columnas grises). La RET se midió mediante un ohmímetro.

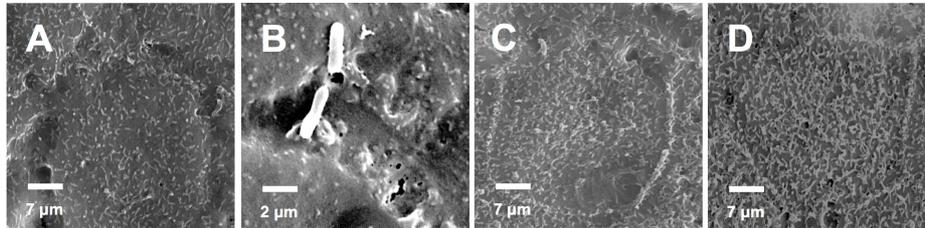
C) Número de bacterias recuperadas del compartimento basolateral después de 3 y 6 h de infección de las células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> con PAO1 (columnas negras) o con el mutante PAOMA (columnas blancas).

Los resultados proceden de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error representan los errores estándar de las medias. Los análisis estadísticos se realizaron con un test T-Student de dos colas no pareadas en el que \* representa un valor  $P < 0,05$  y \*\*  $P < 0,01$ .

### La mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para alterar las uniones intercelulares.

Con el fin de investigar el efecto de *P. aeruginosa* sobre la unión entre células, observamos las células broncoepiteliales 16HBE14o<sup>-</sup> infectadas al microscopio electrónico de barrido. Las imágenes de las células polarizadas que estuvieron expuestas a PAO1 durante 6 h demostraron que tenían las uniones entre las células alteradas y las células estaban retraídas

(figura 13.A). En algunas muestras, se pudieron observar bacterias en las brechas intercelulares (figura 13.B). Estas alteraciones no eran tan aparentes en las células expuestas al mutante deficiente en *mucA* y no se observaron en las células sin infectar (figuras 13.C y D, respectivamente).

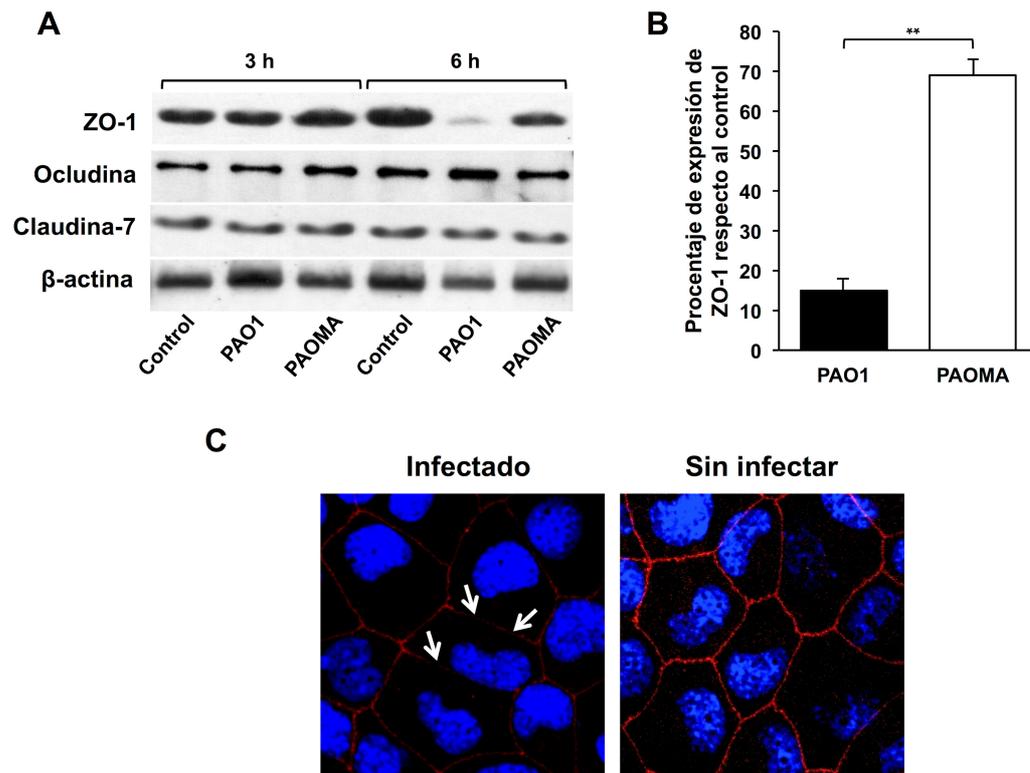


**Figura 13. Efecto de la mutación de *mucA* sobre la capacidad de *P. aeruginosa* para alterar las uniones intercelulares.**

Fotos obtenidas por microscopía electrónica de barrido representativas del efecto de *P. aeruginosa* sobre las células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> polarizadas. Las células infectadas durante 6 horas con *P. aeruginosa* PAO1 (paneles A y B) mostraron alteraciones de las uniones entre células, retracción celular y la presencia de bacterias en las brechas intercelulares. Las células infectadas durante el mismo tiempo con el mutante de *mucA* PAOMA (panel C) mostraron una menor alteración que la observada con PAO1. Las células control sin infectar (panel D) no mostraron ningún tipo de alteración.

Para investigar si la mutación de *mucA* reducía la capacidad de *P. aeruginosa* de inducir la alteración de las uniones intercelulares, evaluamos los niveles de expresión de los componentes del epitelio implicados en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial tales como la proteína *zonula occludens-1* (ZO-1), la ocludina y la claudina-7 de las células expuestas a PAO1 o PAOMA. Para ello se obtuvieron extractos celulares de células broncoepiteliales expuestas a *P. aeruginosa* y se analizó la expresión de las proteínas indicadas por *Western blot* con anticuerpos específicos. El análisis de los extractos de las células tratadas con PAO1 durante 6 h mostró una marcada reducción de ZO-1, pero no de la claudina-7 ni de la ocludina (figura 14.A). Esta reducción fue casi cinco veces más pronunciada que en las células expuestas al mutante PAOMA (figura 14.B).

El análisis por inmunomicroscopía de fluorescencia reveló que el patrón continuo en forma de cinturón resultante de la tinción con anticuerpos específicos contra ZO-1 observado en las células sin infectar (figura 14.C) estaba alterado y se visualizaba con una señal menos intensa y más difusa en las uniones intercelulares de las células infectadas durante 6 h con PAO1 (figura 14.C, flechas blancas). Estos cambios no se observaron en las células infectadas con PAOMA, cuyo aspecto era más semblante al de las células sin infectar (datos no mostrados). Estos resultados indican que la mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* de inducir la reducción de los niveles de ZO-1 y consecuentemente alterar las uniones entre células.



**Figura 14. Efecto de la mutación de *mucA* sobre el impacto de *P. aeruginosa* en la reducción de la expresión de las proteínas de unión intercelular de las células broncoepiteliales.**

A) Análisis por *Western blot* de la presencia de ZO-1, ocludina, claudina-7 y β-actina (como control de carga) en extractos totales de monocapas de células 16HBE14o<sup>-</sup> sin infectar (control) o infectadas con PAO1 o el mutante deficiente en *mucA* PAOMA durante 3 o 6 horas.

B) Análisis densitométrico de la expresión de ZO-1 en células 16HBE14o<sup>-</sup> infectadas con PAO1 o el mutante deficiente en *mucA* PAOMA durante 6 horas. La expresión de ZO-1 se muestra relativa a la expresión de ZO-1 en los controles no infectados.

Los resultados proceden de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error representan los errores estándar de las medias. Los análisis estadísticos se realizaron con un test T-Student de dos colas no pareadas en el que \*\* representa un valor  $P < 0,01$ .

C) Foto de microscopía de fluorescencia con anticuerpos específicos representativa del análisis de la expresión de ZO-1 (rojo) en monocapas de células broncoepiteliales 16HBE14o<sup>-</sup> sin infectar o infectadas con PAO1 durante 6 h. Las flechas blancas indican las regiones de unión intercelular con una menor expresión de ZO-1.

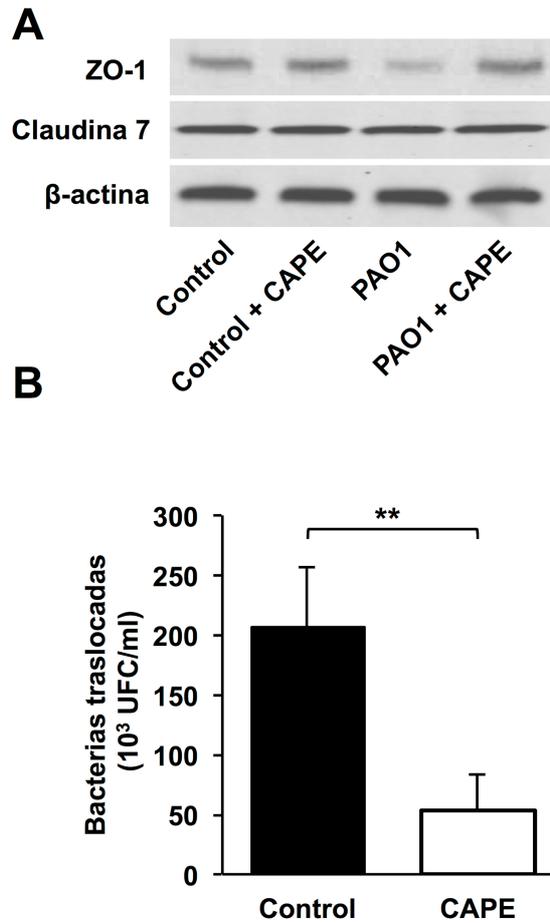
### **Análisis molecular de los factores que contribuyen a la alteración de la barrera epitelial por *P. aeruginosa*.**

A continuación, nos propusimos investigar las bases moleculares y celulares que subyacían en la reducción de la capacidad para alterar la barrera epitelial que suponía la mutación de *mucA* en *P. aeruginosa*. Está demostrado que la mutación de *mucA* no tan solo induce la sobreexpresión del alginato confiriendo un aspecto mucoide a las colonias, sino que también afecta a la expresión de varios genes incluidos los de las exotoxinas del SST3, ExoS y ExoT (Wu et al. 2004). En efecto, en condiciones de crecimiento que inducen la síntesis de estas

exotoxinas, un mutante deficiente en *mucA* produce menos cantidad de ExoS y ExoT que la cepa parental isogénica. Dado que estas toxinas contribuyen a la alteración de la función de la barrera epitelial afectando a la distribución y niveles de expresión de proteínas de unión intracelular como ZO-1 y ocludina (Soong et al. 2008), decidimos investigar si en las condiciones de medio cultivo en las que habíamos realizado los experimentos de translocación bacteriana descritos en la figura anterior existían diferencias en producción de las exotoxinas del SST3 entre la cepa parental PAO1 y el mutante PAOMA. Para ellos se aisló el RNA mensajero de ambas cepas crecidas durante 6 h en el medio de cultivo y en las condiciones del experimento utilizados en los ensayos de translocación bacteriana y se analizó el nivel de expresión relativo de *exoS* y *exoT* por RT-PCR. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión de *exoS* y *exoT* fue, respectivamente, 16,3 y 10 veces inferior en el mutante deficiente en *mucA* que en la cepa parental. Así, por tanto, la diferencia en la capacidad para alterar la barrera epitelial y atravesarla observada entre la cepa PAO1 y el mutante PAOMA podría ser debida a la diferencia en la expresión de las exotoxinas ExoS y ExoT.

Por otro lado, está bien establecido que el TNF- $\alpha$  y la IL-1- $\beta$  tiene un efecto notable sobre la función del epitelio de la córnea, afectando a la localización de ZO-1 en un mecanismo mediado por NF- $\kappa$ B (Kimura, Teranishi, y Nishida 2009; Kimura et al. 2008). Dado que la entrada de *P. aeruginosa* en las células epiteliales del tracto respiratorio induce la activación de NF- $\kappa$ B (Schroeder et al. 2002) planteamos la hipótesis de que la reducción de ZO-1 en las células broncoepiteliales podría estar mediada por la activación de NF- $\kappa$ B inducida por *P. aeruginosa* y que la diferencia en la activación de este factor de transcripción celular inducida por distintas cepas podría ser la responsable de las diferencias observadas entre PAO1 y PAOMA en su capacidad para alterar la barrera epitelial.

Para comprobar esta hipótesis estudiamos las consecuencias de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B sobre la reducción de la expresión de ZO-1 inducida por *P. aeruginosa* y sobre la translocación del microorganismo. Tal como se muestra en la figura 15.A, el tratamiento de las monocapas de células broncoepiteliales con un inhibidor específico de NF- $\kappa$ B (CAPE) (Natarajan et al. 1996), bloqueó la reducción de ZO-1 inducida tras la infección con PAO1, pero no tuvo ningún efecto sobre las células no infectadas (control). Además, tanto en las células infectadas como en las células no infectadas, los niveles de claudina-7 no se vieron afectados por el tratamiento con el inhibidor CAPE. Por último, el tratamiento con el inhibidor CAPE inhibió significativamente en prácticamente 4 órdenes de magnitud la translocación de *P. aeruginosa* a través de las células broncoepiteliales (figura 15.B). No detectamos diferencias entre la cantidad de lactato deshidrogenasa liberada por las células tratadas con el tampón PBS o CAPE, indicando que el inhibidor de NF- $\kappa$ B no tuvo efectos citotóxicos sobre las células 16HBE14o<sup>-</sup> (datos no mostrados).



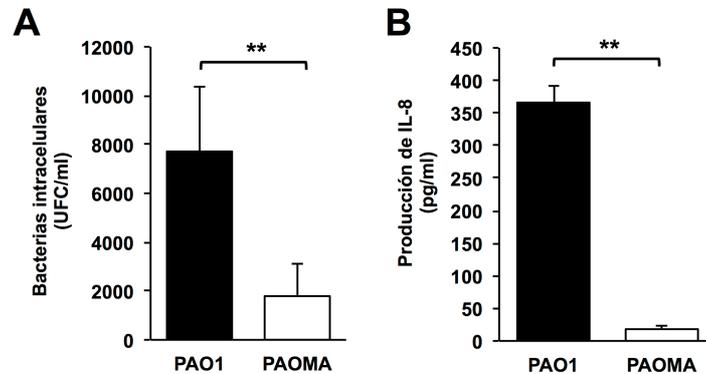
**Figura 15. Efecto de la inhibición de la activación de NFκB sobre la alteración de la barrera epitelial inducida por *P. aeruginosa*.**

A) Análisis por *Western blot* de la presencia de ZO-1, claudina-7 y β-actina (como control de carga) en extractos totales de monocapas de células 16HBE14o<sup>-</sup> sin infectar (control) incubadas con un inhibidor específico de NFκB (CAPE, 10 μg/mL) o PBS y posteriormente infectadas con PAO1 o sin infectar. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

B) Bacterias recuperadas del compartimento basal (translocadas) tras 6 h del inicio de la infección apical de células 16HBE14o<sup>-</sup> polarizadas con *P. aeruginosa* PAO1 previamente tratadas con CAPE (10 μg/mL) o PBS (control) durante 30 minutos. Los resultados proceden de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de las medias. Los análisis estadísticos se realizaron con un test T-Student de dos colas no pareadas en el que \*\* representa un valor  $P < 0,01$ .

Seguidamente nos preguntamos si había diferencias entre PAO1 y PAOMA en su capacidad para activar NF-κB. En primer lugar, se determinó la capacidad para interaccionar con las células broncoepiteliales de ambas cepas mediante ensayos de invasión. El recuento de bacterias intracelulares demostró que la mutación en *mucA* disminuye la capacidad invasiva en al menos 4 veces respecto a la cepa parental (figura 16.A). Así mismo, para determinar la capacidad de provocar una respuesta inflamatoria en las células broncoepiteliales, se cuantificó la cantidad de IL-8 liberada al medio tras la estimulación de las células con cada una de las cepas. Las células estimuladas con la cepa hipermucoide PAOMA produjeron hasta prácticamente 14 veces menos IL-8 que las células estimuladas con la cepa parental PAO1

(figura 16.B). Ambos resultados sugieren que la mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para interactuar con las células humanas, probablemente debido a la hiperproducción de cápsula.



**Figura 16. Efecto de la mutación de *mucA* sobre la interacción de *P. aeruginosa* con las células broncoepiteliales.**

A) Cuantificación del número de bacterias intracelulares tras infectar células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> con *P. aeruginosa* PAO1 (columnas negras), o el mutante isogénico deficiente en *mucA*, PAOMA (columnas blancas) durante 1 hora.

B) Liberación de IL-8 por parte de células broncoepiteliales humanas 16HBE14o<sup>-</sup> infectadas durante 6 h con PAO1 (columnas negras), con el mutante PAOMA (columnas blancas). La cuantificación de la IL-8 liberada al sobrenadante del cultivo por parte de las células se realizó mediante un ELISA específico.

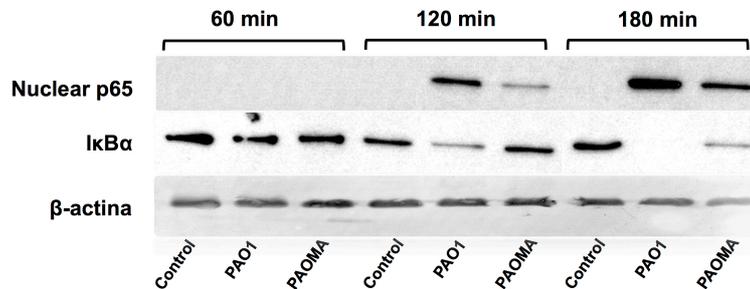
Los resultados proceden de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error representan los errores estándar de las medias. Los análisis estadísticos se realizaron con un test T-Student de dos colas no pareadas en el que \*\* representa un valor  $P < 0,01$ .

Para confirmar si la reducción en la interacción *P. aeruginosa*-célula broncoepitelial inflúa sobre la activación de NF- $\kappa$ B, analizamos la activación de este factor de transcripción en las células broncoepiteliales infectadas con PAO1 o PAOMA.

NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma de la célula en su estado inactivo gracias a la acción de I $\kappa$ B $\alpha$  que bloquea los sitios de unión al ADN de este factor de transcripción. Al activarse NF- $\kappa$ B, los niveles celulares de I $\kappa$ B $\alpha$  disminuyen y la subunidad p65 del propio factor de transcripción, ausente en el núcleo en el estado inactivo, se traslada al núcleo celular para activar los genes diana.

Para investigar la activación de NF- $\kappa$ B se analizó la presencia de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en los extractos nucleares de las células 16HBE14o<sup>-</sup> estimuladas con *P. aeruginosa* como indicador de la activación. Al cabo de 120 y 180 min de estimulación con PAO1 la presencia de p65 en el núcleo era mucho más aparente que en las células estimuladas con PAOMA, mientras que en las células sin estimular no se detectaba dicha unidad (figura 17). Para confirmar estos resultados se analizó la disminución de I $\kappa$ B $\alpha$  en los extractos celulares totales. Tal como se muestra en la figura 17, al cabo de 120 min de estimulación con la cepa POA1 los

niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  habían disminuido mientras que en las células estimuladas con PAOMA se mantenían igual que en el control. Tras 180 min de incubación, los efectos de PAOMA sobre la reducción de I $\kappa$ B $\alpha$  eran ya aparentes, pero no tan evidentes como en las células infectadas con PAO1.



**Figura 17. Efecto de la mutación de *mucA* sobre la activación de NF- $\kappa$ B por *P. aeruginosa*.**

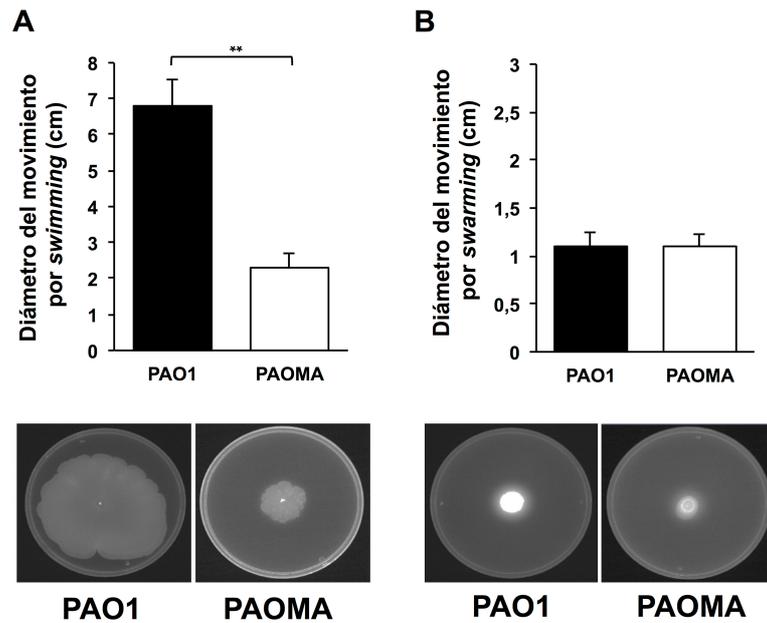
Análisis por *Western blot* de la presencia de p65 en extractos nucleares o I $\kappa$ B $\alpha$  extractos totales de células 16HBE14o $\bar{c}$  sin infectar (control) o infectadas con PAO1 o el mutante deficiente en *mucA* PAOMA durante 60, 120 o 180 minutos. La presencia de  $\beta$ -actina se usó como control de carga. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Estos datos indican que PAO1 induce la activación de NF- $\kappa$ B de forma más eficiente que la cepa mucoide PAOMA, y en su conjunto sugieren que las diferencias en la alteración de la barrera epitelial observadas entre ambas cepas pueden también ser debidas a sus distintas capacidades para activar NF- $\kappa$ B.

#### **La mutación de *mucA* disminuye la movilidad de *P. aeruginosa*.**

Se ha demostrado que el flagelo de *P. aeruginosa* es necesario para la translocación de la bacteria a través de un epitelio respiratorio polarizado (Parker y Prince 2013). Sin embargo, el flagelo no tiene ningún efecto sobre la barrera epitelial, por lo que su implicación en la translocación reside exclusivamente en el efecto directo que ejerce sobre la movilidad del microorganismo.

Para determinar los efectos de la mutación del gen *mucA* sobre la movilidad de *P. aeruginosa* mediada por el flagelo (*swimming* y *swarming*) (ver apartado 2.3 de la introducción), realizamos estudios de movilidad con las cepas PAO1 y PAOMA. En los ensayos de *swimming*, que analizan la movilidad unicelular mediada por el flagelo en un medio acuoso, se pudo apreciar que la mutación de *mucA* redujo hasta 3 veces la movilidad de la cepa parental (figura 18.A). Sin embargo, la mutación no tuvo ningún efecto sobre la movilidad *swarming*, mediada tanto por el flagelo como por las fimbrias de tipo IV (figura 18.B).



**Figura 18.** Efecto de la mutación de *mucA* sobre la movilidad de *P. aeruginosa*.

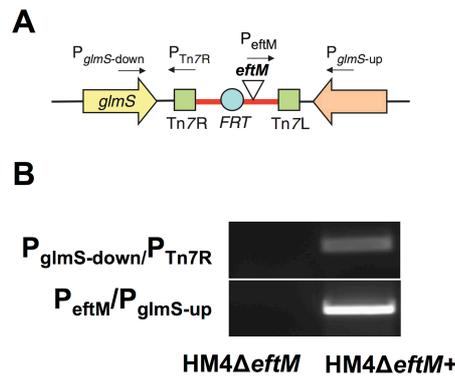
La movilidad por *swimming* (panel A) o por *swarming* (panel B) de *P. aeruginosa* PAO1 y el mutante isogénico deficiente en *mucA*, PAOMA se determinó inoculando las placas tal como se indica en el apartado 1.3 de materiales y métodos. Los datos representan la media y los errores estándar de las del diámetro del área de movilidad de 10 colonias por cepa. Los análisis estadísticos se realizaron con un test T-Student de dos colas no pareadas en el que \*\* representa un valor  $P < 0,01$ . Las fotografías son imágenes representativas de la movilidad de cada cepa.

## **RESULTADOS: CAPÍTULO II**

---

**RESULTADOS: CAPÍTULO II****Construcción de un mutante deficiente en *eftM* a partir de la cepa *P. aeruginosa* HM4 y su complementación.**

La modificación de EF-Tu que lleva a cabo EftM es importante en las primeras etapas de la infección del tracto respiratorio facilitando la interacción de *P. aeruginosa* con las células epiteliales del huésped (Barbier et al. 2013). Sin embargo, en la mayoría de aislados clínicos procedentes de infecciones respiratorias agudas, la actividad de EftM es prácticamente nula a la temperatura fisiológica de 37°C, realizando su actividad a temperatura ambiente (22-27°C) (Barbier et al. 2008). Se ha descrito que esta característica funcional de EftM es distinta en algunos aislados procedentes de infecciones respiratorias crónicas en los que la actividad de EftM a 37°C permite la trimetilación de EF-Tu a la temperatura en la que se da el proceso infeccioso en el huésped (Barbier et al. 2008). Sin embargo, se desconocen los efectos que tiene esta modificación sobre la fisiología y la patogenicidad de estos aislados. Con el fin de estudiar estos efectos, construimos un mutante deficiente en *eftM* a partir de la cepa HM4, procedente de una infección crónica en un paciente con bronquiectasias y con capacidad para trimetilar EF-Tu a 37°C (Varga et al. 2015). Para ello se usó la misma estrategia que se utilizó para construir el mutante PAO1 $\Delta$ *eftM* derivado de PAO1 (Barbier et al. 2013) basada en el protocolo descrito por Quénéé y colaboradores (Quénéé, Lamotte, y Polack 2005), en la que, por doble recombinación, se fuerza la integración de una copia con una delección interna del gen *eftM* en el cromosoma de HM4. El mutante así construido fue denominado HM4 $\Delta$ *eftM*. Con el fin de revertir el fenotipo, el mutante fue complementado con el gen nativo original procedente de la cepa HM4 introduciendo una sola copia del gen *eftM* en el cromosoma del mutante HM4 $\Delta$ *eftM* mediante el uso del vector pUC18T-miniTn7T (Choi y Schweizer 2006). El mutante complementado fue denominado HM4 $\Delta$ *eftM*+. La introducción de la copia del gen nativo en el cromosoma fue verificada por PCR usando los cebadores indicados con flechas convergentes en la figura 19.A. Como se observa en la figura 19.B, la amplificación del ADN genómico del mutante complementado con los cebadores P<sub>gImS-down</sub>/P<sub>Tn7R</sub> y P<sub>eftM</sub>/P<sub>gImS-up</sub> generó productos de PCR del tamaño esperado, mientras que la amplificación del ADN genómico del mutante sin complementar fue negativa para cada juego de cebadores.



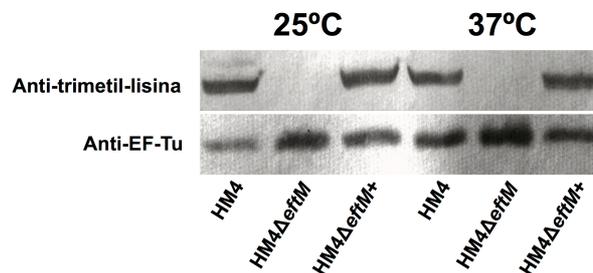
**Figura 19. Comprobación de la complementación del mutante HM4Δ*eflM*.**

A) Esquema de la disposición de los cebadores utilizados para efectuar la comprobación de la complementación por PCR.

La línea negra representa el cromosoma bacteriano y la línea roja delimitada por cuadros verdes representa el vector pUC18T-miniTn7T-*eflM* integrado en el cromosoma como resultado de la transposición. Tn7L y Tn7R, son los respectivos extremos terminales izquierdo y derecho del Tn7. FRT es la diana de la recombinasa. Las flechas negras indican la localización y la dirección de síntesis de los cebadores.

B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de los productos resultantes de la amplificación del ADN genómico del mutante HM4Δ*eflM* y el mutante complementado HM4Δ*eflM*+ con los juegos de cebadores indicados a la izquierda.

El análisis por *Western blot*, con el anticuerpo anti-trimetil lisina, de los extractos celulares del mutante deficiente en *eflM* derivado de HM4, denominado HM4Δ*eflM*, demostró que el mutante era incapaz de trimetil EF-Tu, tanto a 25°C como a 37°C, en contraste con la cepa parental o el mutante complementado que sí lo hacía a ambas temperaturas (figura 20).



**Figura 20. Análisis por *Western blot* de la modificación de EF-Tu.**

Las proteínas de los extractos celulares totales de las cepas indicadas crecidas a 37°C o a 25°C fueron separadas por electroforesis en gels de poliacrilamida y analizadas utilizando anticuerpos específicos para lisina trimetiladas (panel superior) o específicos para EF-Tu, como control de carga, (panel inferior).

La cepa parental HM4, el mutante isogénico HM4 $\Delta$ effM y el mutante complementado tuvieron tasas de crecimiento similares sin diferencias significativas tanto a 37°C como a 25°C; en medio LB, el tiempo de duplicación en la fase exponencial varió entre 100-110 min a 37°C y entre 130-140 min a 25°C.

#### **Análisis proteómico del efecto de la trimetilación de EF-Tu en HM4.**

Para conocer el efecto global de la trimetilación de EF-Tu sobre el proteoma de *P. aeruginosa* HM4 llevamos a cabo un análisis proteómico comparativo con la cepa HM4, el mutante isogénico HM4 $\Delta$ effM y el mutante complementado. Para estos experimentos las cepas fueron crecidas a 37°C en medio LB. El análisis proteómico logró identificar al menos 1920 proteínas de cada cepa y en cada réplica de las tres independientes que se realizaron.

La comparación del nivel de expresión de cada una de las proteínas identificadas en el mutante respecto al de la cepa parental reveló diferencias significativas en 47 proteínas. Sin embargo, a pesar de que las diferencias eran estadísticamente significativas, el cambio en el nivel de expresión no era muy marcado. En la tabla 7 se muestra la lista de las proteínas con un mayor cambio en la expresión (variación  $\geq 1$ ). Como se puede observar, solamente 5 proteínas se expresan en mayor cantidad en el mutante respecto a la cepa parental. Por el contrario, 22 proteínas se expresan en menor cantidad en el mutante en comparación con la cepa parental, aunque sólo dos de ellas se expresaron aproximadamente 2 veces menos.

Tabla 7. Lista de proteínas expresadas de forma diferencial en el mutante HM4 $\Delta$ *eftM* en comparación con la cepa parental HM4.

PA HM4 ID	Nombre o descripción	Incremento
PAHM4_RS03365	7-ciano-7-deazaguanina sintetasa	1,7
PAHM4_RS02180	Transportador	1,6
PAHM4_RS02170	Biotina sintetasa	1,2
PAHM4_RS05150	Proteína integral de membrana	1,1
PAHM4_RS12230	Glicerofosforil diester fosfodiesterasa	1,1
PAHM4_RS07405	N-formilglutamato deformilasa	-1,1
<b>PAHM4_RS10275</b>	<b>Proteína AlgA / Biosíntesis de alginato</b>	<b>-1,1</b>
PAHM4_RS10325	Glicosil transferasa	-1,1
<b>PAHM4_RS26810</b>	<b>Permeasa transportador ABC</b>	<b>-1,1</b>
PAHM4_RS02030	Proteína hipotética	-1,2
<b>PAHM4_RS21995</b>	<b>Transportador</b>	<b>-1,2</b>
PAHM4_RS20150	Proteína quimiotáctica	-1,2
PAHM4_RS11245	LrgB / Hidrolasa de mureina	-1,2
PAHM4_RS24320	Hidrolasa	-1,3
PAHM4_RS08035	Proteína hipotética	-1,3
<b>PAHM4_RS07930</b>	<b>PilP/ Proteína biogénesis fimbria tipo 4</b>	<b>-1,3</b>
PAHM4_RS03370	Proteína hipotética	-1,4
<b>PAHM4_RS08085</b>	<b>Proteína quimiotáctica</b>	<b>-1,4</b>
<b>PAHM4_RS18640</b>	<b>Flagelina</b>	<b>-1,6</b>
PAHM4_RS10290	Poli(beta-D-mannuronato) O-acetilasa	-1,6
PAHM4_RS17925	Subunidad GlcD de glicolato oxidasa	-1,7
PAHM4_RS27215	Metilmalonato-semialdehido dehidrogenasa	-1,7
<b>PAHM4_RS10285</b>	<b>AlgE/ Proteína de transporte de alginato</b>	<b>-1,7</b>
<b>PAHM4_RS00745</b>	<b>Proteína hipotética</b>	<b>-1,8</b>
PAHM4_RS18770	Sulfatasa	-1,9
<b>PAHM4_RS18570</b>	<b>Proteína L del flagelo</b>	<b>-2,1</b>
<b>PAHM4_RS24100</b>	<b>Proteína hipotética</b>	<b>-2,2</b>

Un valor positivo en la columna de incremento indica una mayor expresión en el mutante respecto a la cepa parental, es decir, una mayor expresión en ausencia de EftM (filas sombreadas). Por el contrario, un valor negativo indica una menor expresión en el mutante. En negrita se indican aquellas proteínas que también se expresaron de forma diferencial en el mutante complementado respecto a la cepa parental.

Para confirmar que los cambios en la expresión de las proteínas identificadas en el análisis proteómico comparativo entre la cepa parental y el mutante eran debidos única y exclusivamente a la ausencia de EftM en el mutante, llevamos a cabo la comparación del proteoma del mutante y el mutante complementado.

La comparación del nivel de expresión de cada una de las proteínas identificadas en el mutante

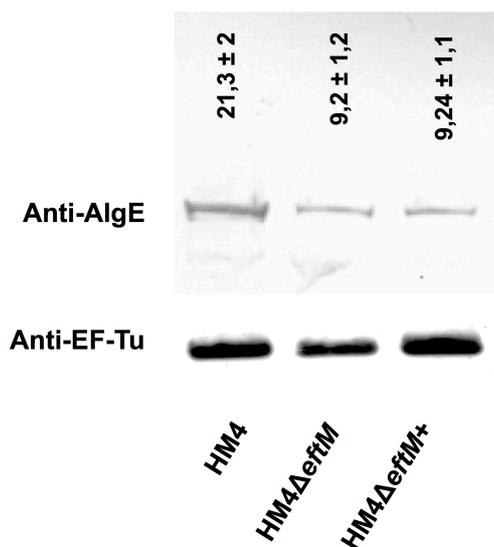
respecto al del mutante complementado con *eftM* detectó solamente diferencias significativas en 14 proteínas (tabla 8), aunque el cambio en la expresión de estas proteínas fue muy reducido, inferior a un orden de magnitud en todos los casos, y en ningún caso coincidió con alguna de las proteínas indicadas en la tabla 7. Es más, el mutante complementado presentó un perfil de expresión de proteínas más similar al del mutante que a la de la cepa parental. Un número importante de proteínas que presentaban una expresión alterada en el mutante respecto a la cepa parental, seguían manteniendo la misma alteración en el mutante complementado (tabla 7, proteínas en negrita).

**Tabla 8. Lista de proteínas expresadas de forma diferencial en el mutante HM4 $\Delta$ *eftM* en comparación con el mutante complementado con *eftM*, HM4 $\Delta$ *eftM*<sup>+</sup>.**

PA HM4 ID	Nombre o descripción	Incremento
PAHM4_RS03530	Fosforibosilglicinamida formiltransferasa	0,9
PAHM4_RS15825	Regulador transcripcional de la familia GntR	0,7
PAHM4_RS21610	Hipotético regulador	0,7
PAHM4_RS06445	Proteína de unión de ATP transportador ABC	0,5
PAHM4_RS25435	Oxidoreductasa	0,4
PAHM4_RS13150	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	0,4
PAHM4_RS18780	Proteína hipotética	0,4
PAHM4_RS08425	Acil-CoA dehidrogenasa	0,4
PAHM4_RS10405	Aldehído oxidasa	0,4
PAHM4_RS27530	Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa	0,4
PAHM4_RS14990	Permeasa de transportador ABC	-0,4
PAHM4_RS12930	Proteína hipotética	-0,6
PAHM4_RS26910	Piranopterina cíclica monofosfato sintetasa	-0,6
PAHM4_RS01270	Subunidad R de endonucleasa de restricción	-0,8

Un valor positivo en la columna de incremento indica una mayor expresión en el mutante respecto al mutante complementado, es decir, una mayor expresión en ausencia de *EftM* (filas sombreadas). Por el contrario, un valor negativo indica una menor expresión en el mutante complementado.

Para validar los resultados obtenidos con los estudios de proteómica llevamos a cabo un análisis por *Western blot* de la expresión de AlgE en extractos celulares totales de HM4, el mutante y el mutante complementado. Esta proteína fue seleccionada por ser la única de la cual disponíamos anticuerpos específicos y se había expresado en menor cantidad en el mutante y el mutante complementado respecto a la cepa parental. Como se observa en la figura 21, la cantidad de AlgE presente en el extracto de la cepa parental fue significativamente superior a la que se detectó en los extractos del mutante HM4 $\Delta$ *eftM* o el mutante complementado HM4 $\Delta$ *eftM*<sup>+</sup>.



**Figura 21. Análisis por Western blot de la expresión de AlgE en distintas cepas.**

Las proteínas de los extractos celulares totales de las cepas indicadas en la parte inferior del panel, crecidas a 37°C, fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y analizadas por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos contra AlgE (panel superior) o específicos para EF-Tu, como control de carga (panel inferior). Los números en el panel superior son la media y la desviación estándar de los valores de la intensidad densitométrica de la banda correspondiente a AlgE, de tres experimentos independientes.

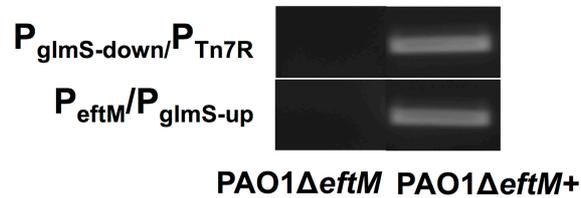
En su conjunto, los resultados del análisis proteómico comparativo de las cepas HM4, el mutante HM4ΔeftM y el mutante complementado HM4ΔeftM+ indican que, en las condiciones de crecimiento ensayadas, la ausencia de *eftM* y por tanto, la incapacidad de trimetilizar EF-Tu, no causa cambios relevantes en el nivel de ninguna de las proteínas identificadas. Además, los resultados sugieren que en el proceso de generación del mutante se han producido cambios que alteran la expresión de determinadas proteínas, como por ejemplo AlgE, pero que dichos cambios no son revertibles con la complementación con EftM.

#### **Análisis proteómico del efecto de la trimetilación de EF-Tu en PAO1.**

El análisis proteómico con el juego de cepas HM4/ HM4ΔeftM/ HM4ΔeftM+ no detectó que la trimetilación de EF-Tu tuviera efectos globales sobre el proteoma de *P. aeruginosa*. Por este motivo decidimos repetir el análisis con otro juego de cepas, PAO1/ PAO1ΔeftM/ PAO1ΔeftM+.

En estudios anteriores nuestro grupo había construido el mutante PAO1ΔeftM derivado de la cepa parental PAO1 y deficiente en *eftM* (Barbier et al. 2013). Para la realización del análisis proteómico complementamos el mutante PAO1ΔeftM con el gen nativo *eftM* procedente de PAO1 utilizando la misma estrategia que se utilizó para complementar el mutante de HM4. El mutante complementado fue denominado PAO1ΔeftM+. La introducción de la copia del gen nativo en el cromosoma fue verificada por PCR usando los cebadores indicados con flechas convergentes en la figura 19A. Al igual que sucedió en la complementación del mutante de HM4, la amplificación del ADN genómico del mutante complementado PAO1ΔeftM+ con los

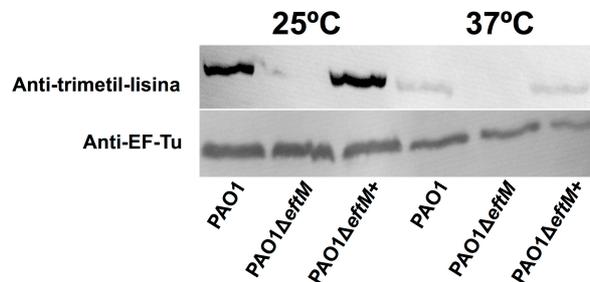
cebadores  $P_{\text{glmS-down}}/P_{\text{Tn7R}}$  y  $P_{\text{eftM}}/P_{\text{glmS-up}}$  generó productos de PCR del tamaño esperado, mientras que la amplificación del ADN genómico del mutante sin complementar fue negativa para cada juego de cebadores (figura 22).



**Figura 22. Comprobación de la complementación del mutante PAO1 $\Delta$ *eftM*.**

Análisis por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de los productos resultantes de la amplificación del ADN genómico del mutante PAO1 $\Delta$ *eftM* y el mutante complementado PAO1 $\Delta$ *eftM*+ con los juegos de cebadores indicados a la izquierda.

El análisis por *Western blot*, con el anticuerpo anti-trimetil-lisina, de los extractos celulares del mutante PAO1 $\Delta$ *eftM*, demostró que el mutante era incapaz de trimetilar EF-Tu, tanto a 25°C como a 37°C, en contraste con la cepa parental o el mutante complementado, que si lo hacían de forma intensa a 25°C, pero de forma muy reducida a 37°C (figura 23).



**Figura 23. Análisis por *Western blot* de la modificación de EF-Tu.**

Las proteínas de los extractos celulares totales de las cepas indicadas crecidas a 37°C o a 25°C fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y analizadas utilizando anticuerpos específicos para lisina trimetiladas (panel superior) o específicos para EF-Tu, como control de carga, (panel inferior).

La cepa parental PAO1, el mutante isogénico PAO1 $\Delta$ *eftM* y el mutante complementado tuvieron tasas de crecimiento similares sin diferencias significativas tanto a 37°C como a 25°C; en medio LB, el tiempo de duplicación en la fase exponencial varió entre 33 y 36 min a 37°C y entre 92 y 96 min a 25°C.

El análisis proteómico se realizó a partir de los extractos celulares totales obtenidos de cultivos en fase exponencial realizados a 25°C en medio LB. El análisis proteómico logró identificar al

menos 2159 proteínas de cada cepa y en cada réplica de las tres independientes que se realizaron.

La comparación del nivel de expresión de cada una de las proteínas identificadas en el mutante respecto al de la cepa parental tan sólo detectó diferencias significativas en los niveles de 33 proteínas (tabla 9), de las cuales 26 estaban más expresadas en el mutante y 7 menos expresadas. Sin embargo, a pesar de que las diferencias eran estadísticamente significativas, el cambio en el nivel de expresión no era muy marcado, destacando únicamente la expresión 4 veces incrementada de la proteína RidA en el mutante.

Tabla 9. Lista de proteínas expresadas de forma diferencial en el mutante PAO1 $\Delta$ *eftM* en comparación con la cepa parental PAO1.

PAO1 ID	Nombre	Descripción	Incremento
PA0814	RidA	Enamina deaminasa	4,5
PA2559	–	Proteína hipotética	2,0
<b>PA2292</b>	<b>OprB</b>	<b>Proteína de membrana externa</b>	<b>1,4</b>
<b>PA4525</b>	<b>PilA</b>	<b>Proteína precursora de fimbria tipo IV</b>	<b>1,1</b>
PA2263	–	2 hidroxácido deshidrogenasa	1,0
<b>PA0263</b>	<b>HcpA</b>	<b>Proteína extracelular</b>	<b>0,9</b>
PA5363	–	Proteína hipotética	0,9
<b>PA4527</b>	<b>PilC</b>	<b>Proteína de ensamblaje de fimbria tipo IV</b>	<b>0,9</b>
<b>PA5041</b>	<b>PilP</b>	<b>Biogénesis fimbria tipo IV</b>	<b>0,8</b>
<b>PA4552</b>	<b>PilW</b>	<b>Biogénesis fimbria tipo IV</b>	<b>0,7</b>
PA2875	–	Acil CoA hidrolasa	0,7
<b>PA4704</b>	<b>CbpA</b>	<b>Proteína quinasa dependiente de AMPc</b>	<b>0,7</b>
<b>PA4556</b>	<b>PilE</b>	<b>Biogénesis fimbria tipo IV</b>	<b>0,7</b>
PA1714	ExsD	Exotoxina	0,6
<b>PA4616</b>	–	<b>Proteína hipotética</b>	<b>0,6</b>
PA0328	AaaA	Autotransportador	0,6
<b>PA4554</b>	<b>PilY1</b>	<b>Factor biogénesis fimbria tipo IV</b>	<b>0,6</b>
PA4523	–	Proteína hipotética	0,5
<b>PA5044</b>	<b>PilM</b>	<b>Biogénesis fimbria tipo IV</b>	<b>0,5</b>
<b>PA0396</b>	<b>PilU</b>	<b>Biogénesis fimbria tipo IV</b>	<b>0,5</b>
<b>PA3487</b>	<b>PldA</b>	–	<b>0,5</b>
<b>PA0020</b>	<b>TsaP</b>	<b>Proteína asociada a la secretina TsaP</b>	<b>0,5</b>
PA3268	TonB	Proteína de membrana externa	0,4
<b>PA0085</b>	<b>Hcp1</b>	–	<b>0,3</b>
<b>PA0622</b>	–	<b>Probable proteína de fago</b>	<b>0,3</b>
PA0277	–	Peptidasa	0,3
PA2001	AtoB	Acetil CoA acetiltransferasa	-0,3
<b>PA1324</b>	–	<b>Probable transportador de azúcares</b>	<b>-0,3</b>
PA3459	AsnB	Probable glutamina amidotransferasa	-0,5
PA3366	AmiE	Amilasa alifática	-0,6
PA0038	–	Proteína hipotética	-0,6
<b>PA1999</b>	<b>DhcA</b>	<b>Deshidrocarnitina CoA transferasa</b>	<b>-0,7</b>
<b>PA0395</b>	<b>PilT</b>	<b>Proteína para movilidad <i>twitching</i></b>	<b>-0,8</b>

Un valor positivo en la columna de incremento indica una mayor expresión en el mutante respecto a la cepa parental, es decir, una mayor expresión en ausencia de EftM (filas sombreadas). Por el contrario, un valor negativo indica una menor expresión en el mutante. En negrita se indican aquellas proteínas que también se expresaron de forma diferencial en el mutante complementado respecto a la cepa parental.

La comparación del proteoma del mutante deficiente en EftM con el proteoma del mutante complementado tampoco detectó cambios muy marcados en la expresión de las proteínas identificadas (tabla 10). Solamente 7 proteínas presentaban niveles significativamente más altos en el mutante que en el mutante complementado, aunque el incremento era mínimo, excepto en el caso de la proteína RidA que fue de 3,4 veces. Por el contrario, el mutante complementado expresó dos proteínas en mayor cantidad que el mutante (AsnB y AmiE). Curiosamente, un número importante de proteínas que presentaban niveles alterados en el mutante respecto a la parental, también estaban alterados en el mutante complementado respecto a la parental (proteínas indicadas en negrita en tabla 9).

**Tabla 10. Lista de proteínas expresadas de forma diferencial en el mutante PAO1 $\Delta$ eftM en comparación con el mutante complementado PAO1 $\Delta$ eftM+.**

PAO1 ID	Nombre	Descripción	Incremento
PA0814	RidA	Enamina deaminasa	3,4
PA2559	–	Proteína hipotética	1,8
PA2875	–	Acil CoA hidrolasa	0,3
PA1714	ExsD	Exotoxina	0,3
PA0328	AaaA	Autotransportador	0,3
PA4523	–	Proteína hipotética	0,3
PA0277	–	Peptidasa	0,3
PA3459	AsnB	Probable glutamine amidotransferasa	-0,3
PA3366	AmiE	Amilasa alifática	-0,5

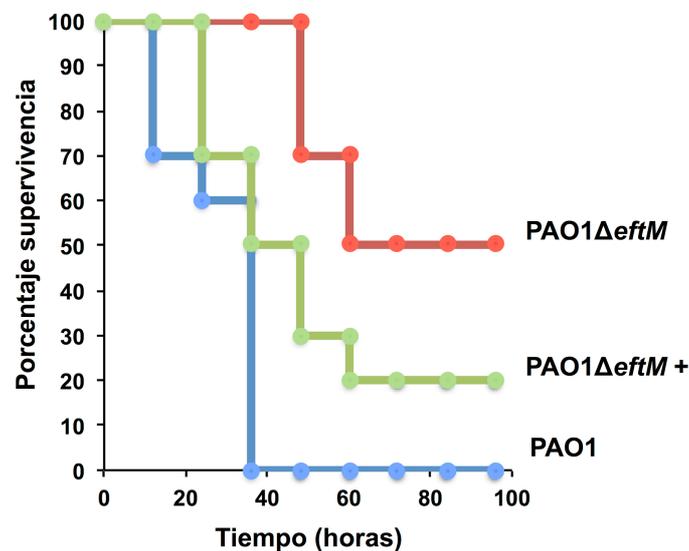
Un valor positivo en la columna de incremento indica una mayor expresión en el mutante respecto al mutante complementado, es decir, una mayor expresión en ausencia de EftM (filas sombreadas). Por el contrario, un valor negativo indica una menor expresión en el mutante.

En su conjunto, el análisis comparativo del proteoma de las cepas PAO1, PAO1 $\Delta$ eftM y PAO1 $\Delta$ eftM+ indicó que la ausencia de EftM provoca escasos cambios cualitativos (número de proteínas alteradas) y cuantitativos (cambios en el nivel de expresión de estas proteínas). Al igual que sucedió con el análisis del proteoma de las cepas derivadas de HM4, el proteoma global del mutante complementado se asemeja más al del mutante que al de la cepa parental, lo cual sugiere que en el proceso de construcción del mutante se generarán cambios que no están directamente relacionados con la presencia o ausencia de EftM, puesto que la complementación no ha revertido dichos cambios. Por otra parte, sólo los niveles de la proteína RidA, que está en niveles más elevados en el mutante que en la cepa parental y el mutante complementado, parece verse afectada por la ausencia de EftM.

### Impacto de EftM en la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo murino de infección respiratoria.

En un estudio previo nuestro grupo había demostrado que la deficiencia de EftM reducía la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo murino de infección respiratoria (Barbier et al. 2013). En el estudio publicado en 2013, se utilizó la cepa parental PAO1 y el mutante deficiente en EftM PAO1 $\Delta$ *eftM* que se ha utilizado para llevar a cabo los análisis proteómicos descritos en esta tesis. Dado que los resultados del estudio de proteómica solamente han detectado cambios mínimos entre la cepa parental y el mutante, y dado que la mayor parte de estos cambios no han revertido al complementar el mutante con el gen *eftM* original, decidimos evaluar la virulencia del mutante complementado en el mismo modelo utilizado por Barbier y colaboradores.

Grupos de 10 ratones fueron infectados con aproximadamente  $2 \cdot 10^7$  UFC de cada cepa mediante la administración de 20 microlitros de suspensión bacteriana por vía intranasal. Para intentar simular las condiciones de una infección por *P. aeruginosa* desde una fuente exógena y dado que la actividad de EftM es máxima a 25°C, las cepas fueron crecidas hasta la fase exponencial en medio LB a 25°C, al igual que en el estudio de Barbier y colaboradores. El análisis de la supervivencia a lo largo del tiempo confirmó los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, la DL<sub>50</sub> de la cepa mutante fue más alta ( $2 \cdot 10^7$  UFC) que la de la cepa parental ( $2,2 \cdot 10^6$  UFC). El mutante complementado mostró un fenotipo intermedio respecto a su virulencia (DL<sub>50</sub>:  $5,4 \cdot 10^6$  UFC).



**Figura 24. Impacto de la trimetilación de EF-Tu en la infección respiratoria por *P. aeruginosa*.**

Curva de supervivencia a lo largo de 96 h de ratones infectados intranasalmente con  $2 \cdot 10^7$  UFC de la cepa parental PAO1 (azul, n=10), el mutante isogénico PAO1 $\Delta$ *eftM* (rojo, n=10) o el mutante complementado PAO1 $\Delta$ *eftM*+ (verde, n=10). La diferencia entre PAO1 vs PAO1 $\Delta$ *eftM* y PAO1 $\Delta$ *eftM* vs PAO1 $\Delta$ *eftM*+ fue estadísticamente significativa (log rank test  $P < 0,005$ ).

## **DISCUSIÓN**

En este estudio se ha utilizado un modelo de células epiteliales polarizadas para investigar los mecanismos que *P. aeruginosa* utiliza para cruzar el epitelio respiratorio. En este tipo de estudios, las células polarizadas representan un modelo más adecuado que el uso de cultivos de células en monocapas, puesto que se forma un epitelio claramente diferenciado en tres zonas (apical, lateral y basal), cuya composición es diferente. Esta característica es esencial en los estudios de la interacción de *P. aeruginosa* con el epitelio, dado que la capacidad de adhesión de este microorganismo es variable y dependiente de la zona con la que interactúa (Lee et al. 1999). En este sentido, la membrana apical confiere resistencia a la infección, siendo muy poco frecuente encontrar bacterias unidas a ella. Por el contrario, es muy habitual encontrarlas en los huecos entre células y en zonas con lesiones. Golovkine y colaboradores demostraron que para la translocación *P. aeruginosa* utiliza las brechas que existen entre las células en sitios muy concretos y específicos, donde las uniones intercelulares están temporalmente interrumpidas (Golovkine et al. 2014). Estos sitios determinados coinciden con las zonas de división o senescencia celular. Estas observaciones son consistentes con los resultados previamente obtenidos por Lee y colaboradores que sugerían que la citotoxicidad bacteriana requiere de una interacción directa con la membrana basolateral (Lee et al. 1999). En este sentido, la información que se puede obtener del estudio de la interacción patógeno huésped utilizando cultivos polarizados es más fidedigna a lo que ocurre *in vivo* que la que se puede obtener con cultivos en monocapas, que además no permiten los estudios de translocación bacteriana.

Nuestros resultados han demostrado que *P. aeruginosa* altera la permeabilidad del epitelio respiratorio reduciendo los niveles de una proteína implicada en las uniones entre células como es ZO-1, facilitando la translocación paracelular del patógeno. Este resultado es consistente con estudios previos realizados *in vivo* que demostraron que *P. aeruginosa* disminuía la cantidad de ZO-1 en un modelo porcino de infección de herida por quemadura, así como en un modelo murino de neumonía (Lyczak, Cannon, y Pier 2000; George et al. 1998) y en un modelo murino de quemadura (Martínez-Ramos 2014). Además, nuestros resultados apoyan la reciente observación publicada por Higgins y colaboradores, quienes han demostrado que la lipoxina A4, que incrementa la expresión de la proteína ZO-1 en las uniones intercelulares, retrasa la translocación de *P. aeruginosa* a través de las células broncoepiteliales (Higgins et al. 2016)

En este estudio hemos investigado el efecto de la mutación de *mucA* sobre la capacidad de translocación de *P. aeruginosa* utilizando un modelo de epitelio respiratorio polarizado. Como se ha comentado en el apartado 2.2 de la introducción, la mutación de *mucA* es frecuente entre los aislados procedentes de infecciones crónicas en pacientes con FQ. Su aparición se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad y provoca una sobreproducción del exopolisacárido de alginato, un reconocido factor de virulencia de este microorganismo. Los resultados de nuestra investigación demuestran que la mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para alterar la permeabilidad del epitelio y, en consecuencia,

---

para atravesar la barrera epitelial *in vitro*. Esta observación experimental es consistente con la evidencia clínica sobre la baja frecuencia en la que se aíslan cepas mucoides causantes de bacteriemia, a pesar del carácter protector que confiere la cápsula de alginato frente a la opsonofagocitosis (Pier et al. 2001).

Esta mutación afecta a dos de las estrategias que *P. aeruginosa* utiliza para alterar la barrera epitelial: la liberación de exotoxinas secretadas por el sistema de secreción tipo III (SST3) y la activación de NF-κB. Nuestros experimentos no permiten descartar si existen otras estrategias, no descritas hasta la fecha, que se puedan ver afectadas por la deficiencia en *mucA*. En 2008, Soong y colaboradores demostraron que las exotoxinas liberadas por el SST3 alteraban la integridad del citoesqueleto celular y favorecían la capacidad invasora de *P. aeruginosa* interaccionando con componentes del citoesqueleto de la célula eucariota (Soong et al. 2008). En efecto, un mutante deficiente en el SST3 exhibía una menor capacidad para alterar la distribución y organización de las proteínas de unión intercelular ZO-1 y ocludina respecto a la cepa parental. Esto conllevaba una menor capacidad para atravesar un epitelio humano polarizado. En este sentido, se sabe que ExoS y ExoT tienen la capacidad para inactivar GTPasas como Rho, Rac y CDC42 implicadas en la movilidad del citoesqueleto y por tanto en la retracción celular (Huber et al. 2014). Previamente, Wu y colaboradores (Wu et al. 2004) habían demostrado que, en determinadas condiciones de crecimiento, la mutación de *mucA* provocaba una represión de los genes del SST3. Nuestros datos han confirmado que en las condiciones experimentales que hemos utilizado, el mutante deficiente en *mucA* expresa menor cantidad de *exoS* y *exoT* que la cepa parental. De esta manera, es razonable concluir que la menor capacidad para alterar la barrera epitelial y cruzar el epitelio que ha presentado el mutante PAOMA respecto a la cepa parental en nuestros ensayos es, al menos en parte, debido a la menor síntesis de exotoxinas del SST3 por parte del mutante. Sin embargo, Soong y colaboradores observaron que *P. aeruginosa* también era capaz de inducir el incremento de la permeabilidad epitelial utilizando otra estrategia, independiente de la acción de las exotoxinas, que hasta la fecha permanece sin determinar (Soong et al. 2008).

Los experimentos con el inhibidor de NF-κB revelan que otra diana alternativa podría ser este factor de transcripción celular. En efecto, la reducción de ZO-1 inducida por *P. aeruginosa* pudo ser inhibida mediante el pre-tratamiento de las células epiteliales con CAPE, sugiriendo la implicación de NF-κB en el proceso. *P. aeruginosa* expresa varios Patrones Moleculares Asociados a Patógeno (PMAP) capaces de activar los *Toll-like receptors* (TLRs) presentes en la superficie de las células epiteliales (Hayashi et al. 2001; Zhang et al. 2005; Maeshima y Fernandez 2013; Schwandner et al. 1999). Atendiendo a nuestros hallazgos, y tal como previamente sugirieron Clarke y colaboradores (Clarke et al. 2011), la barrera epitelial se altera en respuesta al reconocimiento de los distintos PMAP presentes en la superficie de los distintos patógenos y la comprometen. Este mecanismo representaría una estrategia general

que los microorganismos podrían utilizar para atravesar la barrera epitelial en distintos órganos y facilitar la diseminación sistémica de la bacteria.

Hasta la fecha se han descrito componentes aislados de las bacterias que están implicados en la reducción de la RET, de la expresión y de la distribución de proteínas de las uniones intercelulares. En algunos de estos estudios también se ha utilizado un sistema de doble cámara. Entre los componentes aislados destacan el LPS que en contacto con una línea celular corneal aumenta la permeabilidad del sistema, reduciendo la RET y disminuyendo los niveles de las proteínas ZO-1, ZO-2 y ocludina. Esta disminución es tiempo dependiente, siendo a mayor tiempo de exposición del LPS mayor la deslocalización de dichas proteínas (Yi, Wang, y Yu 2000). Lo mismo ocurre en una línea celular de epitelio intestinal, en el que la proteína ZO-1 aparece deslocalizada (Bein et al. 2017) al igual que en epitelio respiratorio utilizando LPS de *P. aeruginosa* y de *E. coli* (Zhou et al. 2017; Eutamene et al. 2005). Además, tanto en epitelio intestinal como en epitelio respiratorio hay estudios que demuestran que los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* provocan un incremento de la permeabilidad paracelular disminuyendo la RET y alterando la estructura del epitelio (Zulianello et al. 2006; Wallace, Medina, y ElSayed 2014).

Por otra parte, las proteínas secretadas por el SSTII, en concreto la elastasa, juega además un papel importante en la permeabilidad paracelular en epitelio de riñón (Azghani 1996), nasal (Nomura et al. 2014), bronquial (Clark et al. 2011) y cutáneo (Azghani, Miller, y Peterson 2000).

Por último y como no podía ser de otra forma dado su papel en el *quorum sensing*, se han estudiado los autoinductores. Estos modifican las proteínas ZO-1 y E-caderina-beta-catenina entre otras en la línea celular de epitelio intestinal, incrementando la permeabilidad (Eum et al. 2014; Vikström et al. 2010).

A diferencia de estos estudios, en nuestro estudio, los mecanismos que afectan la barrera epitelial no se han estudiado utilizando un componente concreto purificado de *P. aeruginosa*, sino el conjunto de la bacteria. En este sentido la bacteria entera viva representa una aproximación más fidedigna de la situación biológica real. *P. aeruginosa*, en el caso de presentar la mutación en *mucA*, evita la activación de una vía de señalización del sistema inmune innato como lo es la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Se sabe que este factor de transcripción se activa en respuesta a *P. aeruginosa* (Sadikot et al. 2006) y tiene un papel importante en la respuesta inmune (Sehnert et al. 2013)

Los resultados obtenidos plantean una paradoja: la activación de NF- $\kappa$ B reduce la expresión de ZO-1, que facilita la translocación de *P. aeruginosa* a través de la barrera epitelial, y que podría representar un mecanismo de virulencia para la diseminación de las infecciones del tracto respiratorio. Sin embargo, por otro lado, está bien establecido que la activación de NF- $\kappa$ B por la vía de transducción de señales mediada por los TLRs es un mecanismo esencial del sistema inmune innato frente a las infecciones por *P. aeruginosa* dado que induce la

liberación de citoquinas implicadas en el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de la infección (Chen et al. 2008). Si la activación de NF- $\kappa$ B fuera un mecanismo de virulencia, se podría esperar que las cepas altamente invasoras indujeran una intensa activación de este factor de transcripción. Por contra, las cepas con escasa capacidad invasora presentarían una reducida capacidad para activar NF- $\kappa$ B.

Por otro lado, no hay que olvidar que el incremento de la permeabilidad epitelial inducida por la activación de NF- $\kappa$ B también facilitará el acceso de los fagocitos periféricos al lugar de la infección, permitiendo la eliminación del microorganismo. En cualquier caso, las cepas que eluden la activación de este factor de transcripción presentarán una menor capacidad de diseminación, pero al mismo tiempo pasarán inadvertidas, lo que facilitará la persistencia de la infección. En este sentido, la mutación de *mucA*, que entre otros efectos conlleva la hiperproducción de alginato, es una clara adaptación que permite a *P. aeruginosa* colonizar de forma crónica el pulmón de los pacientes con FQ.

Se ha descrito la capacidad de reducir la expresión de ZO-1 por parte de otros patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus* (Ohnemus et al. 2008) o *Streptococcus agalactiae* (Kim et al. 2017). En este sentido, parece probable que la reducción de ZO-1 sea una estrategia general utilizada por distintos patógenos para alterar la barrera epitelial y facilitar la diseminación del microorganismo.

A diferencia de lo que ocurre con otros patógenos, en nuestro estudio la infección de las células epiteliales con *P. aeruginosa* no afectó a la expresión de otras proteínas implicadas en las uniones intercelulares como la claudina-7 o la ocludina (Clarke et al. 2011; Kim et al. 2017). Sin embargo, tal como se ha mencionado anteriormente, en otros estudios se ha descrito que *P. aeruginosa* es capaz de reducir otras proteínas implicadas en las uniones intercelulares como la ocludina, la claudina 1 y 4 o la tricelulina (Nomura et al. 2014; Eum et al. 2014). Estas discrepancias entre estudios puedan ser atribuidas a diferencias en las aproximaciones metodológicas utilizadas. Así el tiempo de infección, la concentración y cantidad de los componentes utilizados, e incluso la línea celular o cultivo puesto a punto, pueden provocar variaciones en los resultados. De cualquier forma, sería interesante conocer si estas diferencias también pudieran estar causadas por la inducción de señales celulares específicas para cada microorganismo. Ahora bien, el elemento que parece ser común en todos los estudios es que la proteína más susceptible a sufrir cambios en su cantidad o en su distribución es la proteína ZO-1. Este efecto podría ser debido al hecho de que ZO-1 es una proteína que está asociada al citoesqueleto y además situada en la parte apical, constituyendo la primera diana para alterar la permeabilidad. De esta manera, tiene sentido que la movilización de ZO-1 se de en primer lugar. Por el contrario, la claudina y la ocludina son proteínas ancladas a la membrana celular y no conectadas directamente al citoesqueleto por lo que su movilización es lógico que sea más lenta. En nuestro estudio solo observamos alteraciones en la proteína ZO-1. Sin embargo, es posible que con un

incremento en el tiempo de exposición a las bacterias, hubiéramos detectado también diferencias observables además en la claudina y la ocludina.

Los estudios realizados por Parker y colaboradores demostraron que el flagelo de *P. aeruginosa* está implicado en la translocación del microorganismo a través del epitelio (Parker y Prince 2013). Nuestros resultados han demostrado que la mutación de *mucA* altera la movilidad de *P. aeruginosa*. El mutante PAOMA exhibió un menor desplazamiento que la cepa parental en el movimiento de *swimming* en el que el flagelo es el principal responsable. En consecuencia, es probable que esta alteración también influya en la capacidad de *P. aeruginosa* para atravesar la barrera epitelial. Tal como indicaron Parker y colaboradores, el flagelo es necesario para la translocación, pero no tiene ningún efecto sobre la barrera epitelial, por lo que su implicación en la translocación reside exclusivamente en el efecto directo que ejerce sobre la movilidad del microorganismo. Esta observación es consistente con los resultados de nuestros ensayos de translocación bacteriana. En efecto, después de 3 horas de infección de las células epiteliales polarizadas apenas se detectaron diferencias entre la cepa parental y el mutante deficiente en *mucA* en su capacidad para alterar la permeabilidad del epitelio. Sin embargo, el número de bacterias de la cepa parental que habían cruzado la barrera era de casi dos órdenes de magnitud superior a la del mutante. Esta diferencia en la translocación se observó también tras 6 horas de infección. La translocación de la cepa parental superó en casi tres órdenes de magnitud a la de la cepa mutante, un hecho difícilmente explicable tan solo por el mayor incremento que la cepa parental indujo sobre la permeabilidad del epitelio. Dado que no existen diferencias en la tasa de crecimiento entre ambas cepas, es razonable pensar que la marcada diferencia detectada en la translocación de las cepas sea debido a la disminución de la movilidad que causa la mutación de *mucA*.

En resumen, la mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para cruzar la barrera epitelial debido a que reprime la expresión de las exotoxinas del SST3, capaces de alterar las proteínas de unión intercelular, disminuye la movilidad *swimming* mediada por el flagelo, e impide la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que cuando se activa incrementa la permeabilidad paracelular; una nueva estrategia que facilita la translocación previamente desconocida en *P. aeruginosa*. La combinación de estos efectos junto con la pérdida del antígeno O del LPS, que confiere resistencia a la acción bactericida del complemento, podrían explicar la escasa capacidad invasora que exhiben las cepas de *P. aeruginosa* procedentes de infecciones respiratorias crónicas.

La modificación del factor de elongación Tu por adición de tres grupos metilo en la lisina número 5 contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa*. Esta modificación da lugar a un dominio cuya similitud estructural con la fosforilcolina facilita la interacción del microorganismo con el receptor del factor activador de plaquetas, permitiendo el inicio de la infección del tracto respiratorio (Mariette Barbier et al. 2013). *P. aeruginosa* lleva a cabo la trimetilación de EF-Tu gracias a la acción de una metiltransferasa denominada EftM (Owings et al. 2016). Esta modificación se da en todas las cepas de *P. aeruginosa* a temperaturas inferiores a 28°C, pero la eficiencia se reduce drásticamente a la temperatura fisiológica de 37°C, excepto en el caso de los aislados procedentes de infecciones respiratorias crónicas, en los que su capacidad para trimetilizar EF-Tu a 37°C es superior a la que muestran los aislados procedentes de infecciones respiratoria agudas (M Barbier et al. 2008).

EF-Tu es la proteína bacteriana más abundante en el citoplasma siendo un componente esencial para la síntesis de proteínas. Su función consiste en asistir al aminocil ARNt facilitando la unión al sitio adecuado del ribosoma en el proceso de la síntesis proteica. Dada su función, era razonable plantear que la modificación del extremo N-terminal de la proteína por parte de la metiltransferasa EftM pudiera afectar a la síntesis de proteínas que contribuyeran a la virulencia del microorganismo. Esta hipótesis se veía reforzada por un hallazgo muy reciente realizado por el grupo de la Dra. Häussler (Pustelny et al. 2013; Krueger et al. 2016). En efecto, los investigadores de este grupo demostraron que la metilación post-traduccional de los residuos de glutamina del motivo conservado GGQ en los factores de liberadores de la cadena peptídica en la síntesis proteica alteraban la virulencia de *P. aeruginosa*. El análisis proteómico de un mutante deficiente en PrmC, la metiltransferasa responsable de la modificación, demostró que la metilación tenía efectos globales sobre procesos celulares asociados con la virulencia del patógeno, incluyendo la producción de pirocianina y de la exotoxina T del SST3 cuya expresión era menor en el mutante desprovisto de la metiltransferasa. Este estudio nos animó a investigar si la modificación de EF-Tu tenía algún impacto sobre la síntesis de determinadas proteínas que pudieran estar implicadas en la virulencia de *P. aeruginosa*.

El análisis proteómico llevado a cabo con los extractos totales de la cepa HM4 procedente de una infección respiratoria crónica y las cepas derivadas de ella identificó hasta 1920 proteínas de las 5906 posibles según el análisis de su genoma (Varga et al. 2015). Del conjunto de proteínas detectadas, solamente 27 presentaron una expresión diferencial  $\geq 1$  al comparar la cepa parental con la cepa deficiente en *eftM*. Sin embargo, el aspecto más remarcable fue el reducido efecto que tuvo la mutación sobre el nivel de expresión de estas proteínas. En tan solo dos proteínas, la mutación redujo su expresión en escasamente dos veces (PAHM4\_RS18570, PAHM4\_RS24100), mientras que en las restantes el cambio prácticamente fue insignificante ( $<2$ ). Habitualmente, en la mayoría de análisis proteómicos comparativos estas pequeñas diferencias no suelen ser consideradas como cambios que merezcan un estudio más detallado o exhaustivo (Bantscheff et al. 2007). Sin embargo, dada

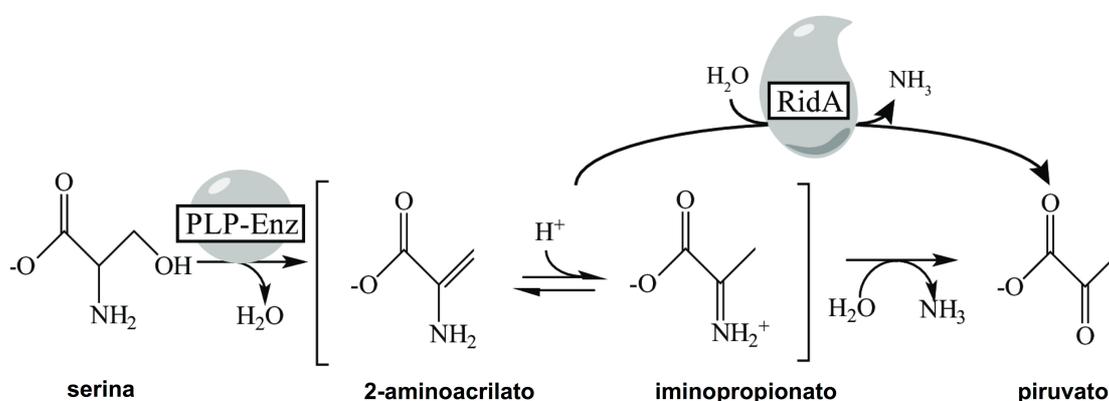
la disponibilidad de anticuerpos contra AlgE, una de las proteínas que se expresaba en menor cantidad en el mutante que en la cepa parental, decidimos investigar si esta pequeña diferencia podría suponer un cambio fenotípico importante para la patogenicidad de HM4. Nuestros ensayos confirmaron los datos obtenidos en el análisis proteómico, el mutante producía una menor cantidad de AlgE que la cepa parental. Esta menor expresión de AlgE era la responsable de una reducción significativa en la cantidad de exopolisacárido de alginato exportado hacia el exterior por la cepa mutante, siendo la cepa parental más mucoide que la cepa mutante. Por último, esta diferencia tuvo un impacto significativo en la capacidad de cada cepa para interactuar con células broncoepiteliales e inducir la respuesta pro-inflamatoria (datos no mostrados). En este sentido, el mutante deficiente en *eftM* de HM4, al exportar menos alginato y ser menos capsulada, invadió las células epiteliales e indujo en ellas la liberación de IL-8 de forma más eficiente que la cepa parental, contrariamente a lo que cabría esperar en relación a la deficiencia de *eftM*. Estos resultados sugieren que pequeñas diferencias, inferiores a dos veces en la expresión, despreciadas en algunos estudios proteómicos, pueden representar cambios fenotípicos muy relevantes desde el punto de vista biológico.

Desafortunadamente, ninguno de los cambios en la expresión de las proteínas identificadas al comparar la cepa parental con la cepa mutante revirtió al complementar la cepa mutante con el gen nativo *eftM*. Este resultado sugiere que, en el proceso de construcción del mutante, se seleccionó una cepa con mutaciones inespecíficas que alteran la expresión de determinadas proteínas que no guardan ninguna relación con la mutación del gen *eftM*. No encontramos en la literatura científica ningún artículo que hiciera referencia a que el sistema utilizado para construir el mutante, el sistema *cre-lox* descrito por Quénee y colaboradores (Quénee, Lamotte, y Polack 2005), pudiera ser el responsable de la aparición de estas mutaciones. Por otra parte, tampoco comprobamos, mediante secuenciación del genoma del mutante, si realmente se habían producido cambios en las secuencias de los genes codificantes de las proteínas con la expresión alterada según el análisis proteómico. En su lugar, decidimos repetir el análisis proteómico con la cepa de referencia PAO1, genéticamente más estable que HM4 que presenta un fenotipo hipermutador (Varga et al. 2015).

El análisis comparativo del proteoma de PAO1, el mutante deficiente en *eftM* y el mutante complementado volvió a demostrar que en el proceso de construcción del mutante se seleccionaba una cepa que presentaba alteraciones en la expresión de proteínas que no estaban directamente relacionadas con el efecto de la metilación de EF-Tu, puesto que el mutante complementado seguía manteniendo las mismas alteraciones en la expresión de determinadas proteínas, cuya expresión no revertía al estado natural al complementar el mutante con el gen *eftM*. De cualquier manera, la mutación afectó a la expresión de un número muy reducido de proteínas, cuyo cambio en la expresión fue muy discreto. Solamente dos proteínas presentaron una mayor expresión en el mutante en comparación

con la cepa parental y el mutante complementado, RidA y una hipotética proteína PA2559, de la que, actualmente, no se dispone de ningún tipo de información.

RidA es una proteína que forma parte de la familia de proteínas Rid (RidA/YjgF/YER057c/UK114) muy conservadas y bien distribuidas entre los seres vivos (Yang et al. 2015; X. Liu et al. 2016). Se encuentra también en *P. aeruginosa* (Hodge-Hanson y Downs 2017) aunque se ha estudiado principalmente en *Salmonella enterica* (Yang et al. 2015). Su nombre refleja la actividad que lleva a cabo, del inglés *reactive intermediate/imine deaminase A*, muy conservada. RidA acelera la liberación de amonio a partir de los metabolitos intermediarios (enaminas e iminas) procedentes del piroxidal 5'-fosfato (PLP) - dependiente de serina/treonina deshidratatas dando lugar a los productos cetoácidos de interés (figura 25) (Lambrecht, Flynn, y Downs 2012).



**Figura 25. Actividad de RidA.** *In vivo*, los metabolitos intermediarios 2-aminoacrilato e iminopropionato se encuentran en equilibrio. Este último puede ser hidrolizado gracias a la acción de RidA produciendo piruvato. La acumulación de 2-aminoacrilato en un mutante de *S. enterica* deficiente en *ridA* causa defectos en el crecimiento (Hodge-Hanson y Downs 2017).

La importancia del papel de RidA radica en que todos los organismos presentan para su actividad metabólica enzimas PLP. Estas son imprescindibles para el metabolismo y generan los metabolitos intermedios mencionados. En un principio se especulaba que eran eliminados por hidrólisis no enzimática, pero actualmente se sabe que tiene lugar gracias a RidA. En ausencia de RidA, se ha visto que se acumulan dichos metabolitos intermediarios (2-aminoacrilato/iminopropionato) altamente dañinos para la célula (Lambrecht, Schmitz, y Downs 2013). De esta manera, la principal función de la proteína RidA es prevenir el efecto tóxico que ejercen estos metabolitos intermediarios cuando no se metabolizan rápidamente y se acumulan en el interior celular. En *S. enterica*, la acumulación de 2-aminoacrilato tiene efectos nocivos sobre múltiples enzimas *in vitro*, causa defectos en el crecimiento de la bacteria en determinados medios de cultivo e inhibe su movilidad. Desconocemos el impacto que puede tener la sobreexpresión de RidA en el mutante deficiente en *eftM* de *P. aeruginosa*, pero dado el estrés que supone el proceso de generación de mutantes no puede descartarse que la bacteria persiga contrarrestar la acumulación de los metabolitos intermediarios mencionados. Por otra parte, en las condiciones y medios de cultivo utilizados en nuestros

experimentos, no hemos podido asociar esta sobreexpresión con ninguna alteración o defecto en el crecimiento. Será necesario realizar ensayos en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de carbono y/o aminoácidos para averiguar si la diferencia de producción de RidA observada entre la cepa parental y el mutante tiene un impacto similar al observado en *S. enterica* y si este efecto se puede asociar a una reducción en la virulencia.

El análisis comparativo del proteoma global de la cepa PAO1, el mutante isogénico deficiente en *eftM* y el mutante complementado no ha permitido identificar de forma concluyente ninguna diferencia que permita explicar la evidencia experimental obtenida en el modelo murino de neumonía en el que el mutante deficiente en la capacidad de modificar EF-Tu es menos virulento que la cepa parental o el mutante complementado (figura 24). Llegado este punto, se podrían proponer tres posibles explicaciones a nuestros resultados.

En primer lugar, es razonable pensar que el análisis proteómico no es capaz de detectar todas las proteínas que la bacteria está expresando, de forma que, quizás entre el mutante y la cepa parental existan diferencias en la expresión de proteínas que nuestros análisis no han detectado y que pueden contribuir a la diferencia observada en la virulencia de las cepas. En este sentido, es interesante destacar que el análisis del proteoma global de las cepas del estudio no detectó la presencia de EftM ni en la cepa parental PAO1 ni en el mutante isogénico complementado. Sin embargo, si pudimos detectar sus efectos tanto en el análisis por *Western blot* de los extractos celulares con anticuerpos específicos contra trimetil-lisina (figura 20 y 23), como en el análisis por espectrometría de masas del péptido N terminal de la proteína EF-Tu que confirmó la trimetilación de la lisina 5 en la cepa parental y en el mutante complementado, pero no en el mutante deficiente en *eftM*. Estos resultados ponen de manifiesto una de las limitaciones de los análisis proteómicos, la incapacidad para detectar proteínas cuyo nivel de expresión es muy reducido, pero cuyos efectos puede tener un impacto sobre la fisiología bacteriana. De esta forma, la modificación de EF-Tu podría haber alterado la expresión de enzimas, indetectables por espectrometría de masas, pero claves en la biosíntesis de factores de virulencia de naturaleza no proteica.

Otra posible explicación a nuestros resultados vendría dada por las condiciones en que las cepas fueron crecidas para realizar los ensayos proteómicos. En efecto, las condiciones que se dan *in vivo* en el modelo murino, en donde la modificación de EF-Tu por parte de EftM podría generar diferencias en la expresión de proteínas, quizás no se dan al crecer las cepas en LB.

Finalmente, es probable que la diferencia en la virulencia observada en el modelo murino sea debido solamente a que la trimetilación de EF-Tu genera un epítipo, estructuralmente similar a la fosforilcolina, que facilita la interacción del microorganismo con las células del huésped.

La modificación de EF-Tu está implicada en la expresión diferencial de varias proteínas o asociada a determinados procesos fisiológicos en las bacterias. Así, por ejemplo, *E. coli* monometila la lisina en posición 56 y fosforila la treonina en posición 382 de EF-Tu en

respuesta a la falta de nutrientes (Young y Bernlohr 1991; Kraal, Lippmann, y Kleanthous 1999). *P. aeruginosa* hidroxila la prolina 54 en respuesta a la falta de oxígeno gracias a la acción de una prolil-hidroxilasa, modulando la expresión de pirocianina (Dickinson et al. 2017; Scotti et al. 2014). En nuestro caso, la trimetilación de la lisina 5 no parece alterar, de forma significativa, la expresión de ninguna proteína en concreto. Ahora bien, las modificaciones de EF-Tu con algún efecto sobre la síntesis de proteínas se dan en residuos situados en dominios claves para la actividad de este factor de elongación. En efecto, la prolina 54, que se hidroxila tanto en procariontas como en eucariotas (Scotti et al. 2014), como la lisina 56, están ubicadas en una región altamente conservada implicada en la interacción de los nucleótidos con el extremo 5' del ARNt. Estas modificaciones ralentizan la hidrólisis de GTP, incrementando la precisión de la traducción. Por otra parte, la fosforilación de la treonina 382 es llevada a cabo por una quinasa asociada al ribosoma. Este residuo está ubicado en el dominio 3 de EF-Tu cerca del sitio de unión del ARNt (Kraal, Lippmann, y Kleanthous 1999). La trimetilación descrita por nuestro grupo se localiza en la lisina 5 situada en el extremo N terminal (Mariette Barbier et al. 2013), una región de EF-Tu que, hasta la fecha, no ha sido implicada en ninguna de las actividades descritas para este factor de elongación. Sin embargo, está situada en una región de la proteína que atendiendo a los resultados de Kunze y colaboradores (Kunze et al. 2004), estaría expuesta hacia el exterior pudiendo interactuar con las células del hospedador. En su conjunto, todos estos resultados refuerzan la noción de que el impacto de la trimetilación de EF-Tu sobre la patogenicidad de *P. aeruginosa* reside única y exclusivamente en la generación de un dominio estructural que facilitaría la interacción con las células humanas.

## **CONCLUSIONES**

---

## CONCLUSIONES

1. Existe una relación inversamente proporcional entre la producción del exopolisacárido de alginato en *P. aeruginosa* y su capacidad para alterar y atravesar un modelo *in vitro* de epitelio respiratorio humano polarizado.
2. La mutación de *mucA* reduce la capacidad de *P. aeruginosa* para alterar y atravesar el epitelio respiratorio en un modelo *in vitro*.
3. La menor capacidad para alterar la barrera epitelial y cruzar el epitelio del mutante en *mucA* se debe a una menor expresión de las exotoxinas *exoS* y *exoT* capaces de alterar los niveles de ZO-1, y a la reducción de la capacidad para activar NF- $\kappa$ B.
4. La mutación de *mucA* disminuye la movilidad de *P. aeruginosa* retrasando la capacidad para atravesar el epitelio.
5. En el proceso de construcción de mutantes deficientes en EftM, la metiltransferasa que modifica el factor de elongación EF-Tu, se producen cambios que podrían ser causados por el propio proceso, dado que no revierten en el mutante complementado.
6. La deficiencia en la metiltransferasa EftM causa cambios muy discretos en los niveles de un número reducido de proteínas, cuyo efecto sobre la virulencia de *P. aeruginosa* es, hasta la fecha, desconocido.
7. El impacto de la trimetilación de EF-Tu sobre la patogenicidad de *P. aeruginosa* parece residir única y exclusivamente en la generación de un dominio estructural similar a la fosforilcolina que facilita la interacción del microorganismo con las células humanas.

# APÉNDICE

---

## APÉNDICE

Los reactivos utilizados provienen de la casa comercial Sigma-Aldrich a excepción de aquellos que entre paréntesis indican otra casa comercial.

### Líneas celulares

·Solución de recubrimiento para cultivo celular: Tampón HBS suplementado con 20 µg/mL de BSA, 20 µg/mL de fibronectina y 24 µg/mL de colágeno bovino tipo I.

·Tampón de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology). Constituido por:

- 1 mL de tampón de lisis 1X.
- 10 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo disuelto en DMSO.
- 10 µL de cóctel inhibidor de proteasas disuelto en DMSO.
- 10 µL de ortovanadato sódico disuelto en H<sub>2</sub>O destilada.

·Tampón PBS (pH 7,2): 130 mM NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

·Tampón HBS (pH 7,4–7,6): 6,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 18 mM HEPES, 122 mM NaCl, 1,1 mM D-(+)- Glucosa y 0,125% solución rojo fenol en PBS.

### Electroforesis

·Solución de zona de apilamiento (gel): poliacrilamida al 5%. Constituido por:

- 0,68 mL de H<sub>2</sub>O destilada:
- 10 µL de dodecil sulfato sódico al 10%.
- 0,13 mL de Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8.
- 0,17 mL de 30% Acrilamida-0,8% Bisacrilamida.
- 1 µL de N, N,N',N'-Tetrametiletilenediamina.
- 10 µL de persulfato amónico al 10%.

·Solución de zona de resolución (gel): geles de poliacrilamida del 6 al 15%. Constituido por:

- 1,1-2,6 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
- 50 µL de dodecil sulfato sódico al 10%.
- 1,3 mL de Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8.
- 1-2,5 mL de 30% Acrilamida - 0,8% Bisacrilamida.
- 2-4 µL de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina.

-50 µL de persulfato amónico al 10%.

·Tampón de electroforesis (pH 8,3): 1,9 M glicina, 0,25 M Tris base y 35 mM de dodecil sulfato sódico.

·Tampón de transferencia Towbin (pH 8,3): 25 mM Tris base, 190 mM glicina y 20% metanol.

#### Genética molecular

·Tampón SMEB: 1 mM HEPES (pH 7,0), 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> y 300 mM sacarosa.

·Tampón TAE 10X: 40 M Tris, 20 M ácido acético glacial y 1 M EDTA. Tras diluir 1X para su uso la concentración resultante es: 40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial y 1 mM EDTA.

·Tampón TB1 (pH 5,8): 1,2% RbCl, 1% MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 3% (v/v) AcOK 1M (pH 7,5), 0,12% CaCl<sub>2</sub> y 15% glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar.

·Tampón TB2: 2% (v/v) 0,5 M MOPS (pH 6,8), 0,12% RbCl, 0,83% CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

**BIBLIOGRAFÍA**

Albus, A M.; Pesci, E C.; Runyen-janecky, L J.; West, S E H.; e Iglewski, B H. **1997**. Vfr controls *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179 (12): 3928–35.

Alhede, M; Bjarnsholt, T; Jensen, P.; Phipps, R K.; Moser, C.; Christophersen, L.; Christensen Louise, D.; et al. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology* 155 (11): 3500–3508.

Allen, H L. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell* 3 (4): 593–603.

Amiel, E; Lovewell, R R. ; O'Toole, G A.; Hogan, D A.; y Berwin, B. **2010**. *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infection and Immunity* 78 (7): 2937–45.

Argenio, D A D.; Wu, M.; Hoffman, L R.; Kulasekara, H D.; Smith, E E.; Nguyen, H.; Ernst, R K.; et al. **2007**. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Molecular Microbiology* 64 (2): 512–33.

Azghani, A O.; Idell, S.; Bains, M.; y Hancock, R E W. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microbial Pathogenesis* 33 (3): 109–14.

Azghani, A O.; Miller, E J.; y Peterson, B T. **2000**. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* 178 (5): 261–69.

Azghani, A O. **1996**. *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 15 (1): 132–40.

Bantscheff, M.; Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J.; y Kuster, B. **2007**. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (4): 1017–31.

Barbier, M.; Martínez-Ramos, I.; Townsend, P.; y Albertí, S. **2012**. Surfactant protein A blocks recognition of *Pseudomonas aeruginosa* by CKAP4/P63 on airway epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases* 206 (11): 1753–62.

Barbier, M; Oliver, A; Rao, J; Hanna, S L.; Goldberg, J B.; y Albertí, S. **2008**. Novel phosphorylcholine containing protein of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection isolates interacts with airway epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases* 197 (3): 465–73.

Barbier, M; Owings, J P.; Martínez-Ramos, I; Damron, F H.; Gomila, R.; Blázquez, J.; Goldberg, J B; y Albertí, S. **2013**. Lysine trimethylation of EF-Tu mimics platelet-activating factor to initiate *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *mBio* 4 (3): e00207–13.

Barth, A L.; y Pitt, T L. **1995**. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1): 37–40.

Barth, A L; y Pitt, T L. **1996**. The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology* 45 (2): 110–19.

Behrends, V.; Ryall, B.; Zlosnik, J E A.; Speert, D P.; Bundy, J G.; y Williams, H D. **2013**. Metabolic

---

adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environmental Microbiology* 15 (2): 398–408.

Bein, A.; Zilbershtein, A; Golosovsky, M.; Davidov, D.; y Schwartz, B. **2017**. LPS induces hyper-permeability of intestinal epithelial cell. *Journal of Cellular Physiology* 232 (2): 381–90.

Berube, B J.; Rangel, S M.; y Hauser, A R. **2016**. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Current Genetics* 62 (1): 109–13.

Bjarnsholt, T.; Jensen, P Ø.; Burmølle, M.; Hentzer, M.; Haagensen, J A J.; Hougen, H P.; Calum, H.; et al. **2005**. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is *quorum sensing* dependent. *Microbiology* 151 (2): 373–83.

Bobadilla, J L.; Macek, M; Fine, J P.; y Farrell, P M. **2002**. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation* 19 (6): 575–606.

Botha, P.; Archer, L.; Anderson, R L.; Lordan, J.; Dark, J H.; Corris, P A.; Gould, K.; y Fisher, A J. **2008**. *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 85 (5): 771–74.

Boucher, J C.; Yu, H.; Mudd, M H.; y Deretic, V. **1997**. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infection and Immunity* 65 (9): 3838–46.

Boucher, R C. **2004**. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal* 23 (1): 146–58.

Bowen-Jones, J R.; Coovadia, E Y.; y Bowen-Jones, E J. **1990**. Infection control in a third world burn facility. *Burns* 16 (6): 445-448.

Bragonzi, A.; Paroni, M.; Nonis, A.; Cramer, N.; Montanari, S.; Rejman, J.; Di Serio, C.; Döring, G.; y Tümmler, B. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (2): 138–45.

Bruzaud, J.; Tarrade, J.; Coudreuse, A.; Canette, A.; Herry, J M.; Taffin de Givenchy, E.; Darmanin, T.; Guittard, F.; Guilbaud, M.; y Bellon-Fontaine, M N. **2015**. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1 (131): 59–66.

Cabral, D A.; Loh, B A.; y Speert, D P. **1987**. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatric Research* 22 (4): 429–31.

Chen, S M.; Cheng, D S.; Williams, B J.; Sherrill, T P.; Han, W.; Chont, M.; Saint-Jean, L.; et al. **2008**. The nuclear factor kappa-B pathway in airway epithelium regulates neutrophil recruitment and host defence following *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Clinical & Experimental Immunology* 153 (3): 420–28.

Choi, K-H.; y Schweizer, H P. **2006**. Mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols* 1 (1): 153–61.

Chugani, S A.; Whiteley, M.; Lee, K M.; D'Argenio, D.; Manoil, C.; y Greenberg, E P. **2001**. QscR, a modulator of *quorum-sensing* signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (5): 2752–57.

---

Church, D.; Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B.; y Lindsay, R. **2006**. Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2): 403–34.

Cianciotto, N P. **2005**. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology* 13 (12): 581–88.

Cigana, C.; Curcuru, L.; Leone, M R.; Ierano, T.; Lore, N I.; Bianconi, I.; Silipo, A.; et al. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS ONE* 4 (12): e8439.

Ciofu, O.; Mandsberg, L F.; Bjarnsholt, T.; Wassermann, T.; y Høiby, N. **2010**. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology* 156 (Pt4): 1108–19.

Ciofu, O.; Tolker-Nielsen, T.; Jensen, P O.; Wang, H.; y Hoiby, N. **2015**. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews* 85 (5): 7–23.

Clark, C A.; Thomas, L K.; y Azghani, A O. **2011**. Inhibition of protein kinase C attenuates *Pseudomonas aeruginosa* elastase-induced epithelial barrier disruption. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45 (6): 1263–71.

Clarke, T B.; Francella, N.; Huegel, A.; y Weiser, J N. **2011**. Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host and Microbe* 9 (5): 404–14.

Cogan, N G.; Harro, J M.; Stoodley, P.; y Shirtliff, M E. **2016**. Predictive computer models for biofilm detachment properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 7 (3): 10–12.

Costerton, J W.; Stewart, P S.; y Greenberg, E P. **1999**. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418): 1318–22.

Davies, D G.; Chakrabarty, A M.; y Geesey, G G. **1993**. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 59 (4): 1181–86.

Davis, M R.; Muszynski, A.; Lollett, I V.; Pritchett, C L.; Carlson, R W.; y Goldberg, J B. **2013**. Identification of the mutation responsible for the temperature-sensitive lipopolysaccharide O-Antigen defect in the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate 2192. *Journal of Bacteriology* 195 (7): 1504–14.

Deitch, E A.; Bridges, R M.; Dobke, M.; y McDonald, J C. **1987**. Burn wound sepsis may be promoted by a failure of local antibacterial host defenses. *Annals of Surgery* 206 (3): 340–48.

Deitch, E A.; Dobke, M.; y Baxter, C R. **1985**. Failure of local immunity. A potential cause of burn wound sepsis. *Archives of Surgery* 120 (1): 78–84.

Delucia, A M.; Six, D A.; Caughlan, R E.; Gee, P.; Hunt, I.; Lam, J S.; y Dean, C R. **2011**. Lipopolysaccharide (LPS) inner-core phosphates are required for complete LPS synthesis and transport to the outer membrane in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *mBio* 2 (4): 1–9.

Devries, C A.; y Ohman, D E. **1994**. Mucoïd-to-nonmucoïd conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *Journal of Bacteriology* 176 (21): 6677–

87.

Dickinson, R S.; Murphy, F.; Doherty, C.; Williams, S.; Mirchandani, A.; Willson, J.; Scotti, J S.; et al. **2017**. *Pseudomonas* expression of an oxygen sensing prolyl hydroxylase homologue regulates neutrophil host responses in vitro and in vivo. *Open Research* 2 (104): 1–14.

Donlan, R M.; y Costerton, J W. **2002**. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (2): 167–19.

Doumith, M.; Warner, M.; Turton, J F.; Beceiro, A.; Bou, G.; Livermore, D M.; y Woodford, N. **2010**. Efflux pumps, OprD porin, AmpC B-Lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (5): 2219–24.

Drake, D.; y Montie, T C. **1988**. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* 134 (1): 43–52.

Dzidic, S.; y Bedeković, V. **2003**. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacologica Sinica* 24 (6): 519–26.

Ernst, R K.; Moskowitz, S M.; Emerson, J C.; Kraig, G M.; Adams, K N.; Harvey, M D.; Ramsey, B.; Speert, D P.; Burns, J L. y Miller, S I. **2007**. Unique lipid A modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* 196 (7): 1088–92.

Ernst, R K.; Yi, E C.; Guo, L.; Lim, K B.; Burns, J L.; Hackett, M.; y Miller, S I. **1999**. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286 (5444): 1561–65.

Ernst, R K.; Adams, K N.; Moskowitz, S M.; Kraig, G M.; Kawasaki, K.; Stead, C M.; Trent, M S.; y Miller, S I. **2006**. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *Journal of Bacteriology* 188 (1): 191–201.

Estahbanati, H K.; Kashani, P P.; y Ghanaatpisheh, F. **2002**. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 28 (4): 340–48.

Eum, S Y.; Jaraki, D.; Bertrand, L.; Andrés, I E.; y Toborek, M. **2014**. Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(Oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 306 (11): G992–1001.

Eutamene, H.; Theodorou, V.; Schmidlin, F.; Tondereau, V.; Garcia-Villar, R.; Salvador-Cartier, C.; Chovet, M.; Bertrand, C.; y Bueno, L. **2005**. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *European Respiratory Journal* 25 (5): 789–96.

Favero, M. S.; Carson, L. A.; Bond, W. W.; y Petersen, N. J. **1971**. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 173 (3999): 836–38.

Fazli, M.; Bjarnsholt, T.; Kirketerp-Møller, K.; Jørgensen, B.; Andersen, A S.; Kroghfelt, K A.; Givskov, M.; y Tolker-Nielsen, T. **2009**. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology* 47 (12): 4084–89.

Feldman, M.; Bryan, R.; Rajan, S.; Scheffler, L.; Brunnert, S.; Tang, H.; y Prince, A. **1998**. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and Immunity* 66 (1): 43–51.

Fernández-Barat, L.; Ferrer, M.; De Rosa, F.; Gabarrús, A.; Esperatti, M.; Terraneo, S.; Rinaudo, M.;

Bassi, G Li; y Torres, A. **2017**. Intensive care unit-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance. *Journal of Infection* 74 (2): 142–52.

Filloux, A. **2011**. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function. *Frontiers in microbiology* 2 (155) : 1–21.

Fito-Boncompte, L.; Chapalain, A.; Bouffartigues, E.; Chaker, H.; Lesouhaitier, O.; Gicquel, G.; Bazire, A.; et al. **2011**. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infection and Immunity* 79 (3): 1176–86.

Franklin, M J.; Nivens, D E.; Weadge, J T.; y Howell, P. L. **2011**. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology* 2 (167): 1–16.

Fuqua, W C; Winans, S C; y Greenberg, E P. **1994**. *Quorum sensing* in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176 (2): 269-275

Gaby, W L. **1945**. Study of dissociative behavior of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 51 (2): 217–34.

Gambello, M J.; e Iglewski, B H. **1991**. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* Gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology* 173 (9): 3000–3009.

Gambello, M J.; Kaye, S.; e Iglewski, B H. **1993**. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and Immunity* 61 (4): 1180–84.

Garrett, E S; Perlegas, D.; y Wozniak, D J. **1999**. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is Modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *Journal of Bacteriology* 181 (23): 7401–4.

Gessard, C. **1882**. Sur les colorations bleue et verte des linges a pansements. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 94: 536–38.

George, D L.; Falk, P S.; Wunderink, R G.; Leeper, K V.; Meduri, G U.; Steere, E S.; Corbett, C E.; y Mayhall, C G. **1998**. Epidemiology of ventilator-acquired pneumonia based on protected bronchoscopic sampling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158 (6): 1839–47.

Giacometti, A.; Cirioni, O.; Schimizzi, A. M.; Del Prete, M S.; Barchiesi, F.; D'Errico, M M.; Petrelli, E.; y Scalise, G. **2000**. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2): 918–22.

Golovkine, G.; Faudry, E.; Bouillot, S.; Voulhoux, R.; Attrée, I.; y Huber, P. **2014**. VE-Cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. *PLoS Pathogens* 10 (3): e1003939.

Gotz, F V.; Haussler, S.; Jordan, D.; Saravanamuthu, S S.; Wehmhoner, D.; Strubman, A.; Lauber, J.; et al. **2004**. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology* 186 (12): 3837–47.

Govan, J R W.; y Deretic, V. **1996**. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60 (3): 539–74.

---

Grant, S G.; Jessee, J.; Bloom, F R.; y Hanahan, D. **1990**. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (12): 4645–49.

Green, M R.; y Sambrook, J. **2012**. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2026p

Groot, A.; Dulermo, R.; Ortet, P.; Blanchard, L.; Guérin, P.; Fernandez, B.; Vacherie, B.; et al. **2009**. Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genetics* 5 (3): e1000434.

Gruenert, D C.; Basbaum, C B.; Welsh, M J.; Li, M.; Finkbeiner, W E.; y Nadel, J A. **1988**. Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (16): 5951–55.

Guo, L.; Lim, K B.; Poduje, C M.; Daniel, M.; Gunn, J S.; Hackett, M.; y Miller, S I. **1998**. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95 (2): 189–98.

Hajjar, A M.; Ernst, R K.; Tsai, J H.; Wilson, C B.; y Miller, S I. **2002**. Human toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature Immunology* 3 (4): 354-359

Hancock, R E W.; Mutharia, L M.; Chan, L.; Darveau, R P.; Speert, D P.; y Pier, G B. **1983**. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infection and Immunity* 42 (1): 170–77.

Hassett, D J.; Ma, J F.; Elkins, J G.; McDermott, T R.; Ochsner, U A.; West, S E.; Huang, C T.; et al. **1999**. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology* 34 (5): 1082–93.

Hatchette, T F.; Gupta, R.; y Marrie, T J. **2000**. *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 2000 (31): 1349–56.

Hauser, A R. **2009**. The Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* : infection by injection. *Nature Reviews Microbiology* 7 (9): 654–65.

Häussler, S.; y Becker, T. **2008**. The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *PLoS Pathogens* 4 (9): e1000166.

Häußler, S.; Tummler, B.; Weibbrodt, H.; Rohde, M.; y Steinmetz, I. **1999**. Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clinical Infectious Diseases* 29 (3): 621–25.

Häußler, S.; Ziegler, I.; Löttel, A.; Götz, F V.; Rohde, M.; Wehmhohner, D.; Saravanamuthu, S.; Tummler, B.; y Steinmetz, I. **2003**. Highly adherent small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology* 52 (4): 295–301.

Hayashi, F.; Smith, K D.; Ozinsky, A.; Hawn, T R.; Yi, E C.; Goodlett, D R.; Eng, J K.; Akira, S.; Underhill, D M.; y Aderem, A. **2001**. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature* 410 (6832): 1099–1103.

Hentzer, M.; Teitzel, G M.; Balzer, G J.; Heydorn, A.; Molin, S.; Givskov, M.; y Parsek, M R. **2001**. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *Journal of Bacteriology* 183 (18). 5395–5401.

---

Higgins, G.; Fustero Torre, C.; Tyrrell, J.; McNally, P.; Harvey, B J.; y Urbach, V. **2016**. Lipoxin A4 prevents tight junction disruption and delays the colonization of cystic fibrosis bronchial epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 (11): L1053–61.

Hobbs, M.; Collie, E S R.; Free, P D.; Livingston, S P; y Mattick, J S. **1993**. Pils and Pilr, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 7 (5): 669–82.

Hoboth, C.; Hoffmann, R.; Eichner, A.; Henke, C.; Schmoltdt, S.; Imhof, A.; Heesemann, J.; y Hogardt, M. **2009**. Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* 200 (1): 118–30.

Hodge-Hanson, K M.; y Downs, D M. **2017**. Members of the Rid protein family have broad imine deaminase activity and can accelerate the *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase (DauA) reaction *in vitro*. *PLoS One* 12 (9): e0185544.

Hoegger, M J.; Fischer, A. J.; McMenimen, J D.; Ostedgaard, L S.; Tucker, A J.; Awadalla, M A.; Moninger, T O.; et al. **2014**. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science* 345 (6198): 818–22.

Hoffman, L R.; Kulasekara, H D.; Emerson, J.; Houston, L S.; Burns, J L.; Ramsey, B W.; y Miller, S I. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *Journal of Cystic Fibrosis* 8 (1): 66–70.

Hogardt, M.; Hoboth, C.; Schmoltdt, S.; Henke, C.; Bader, L.; y Heesemann, J. **2007**. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* 195 (1): 70–80.

Hogardt, M.; y Heesemann, J. **2010**. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*. 300 (8): 557-562

Hogardt, M.; Roeder, M.; Schreff, A M.; Eberl, L.; y Heesemann, J. **2004**. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by *quorum sensing* and RpoS. *Microbiology* 150 (4): 843–51.

Hosseinidoust, Z.; van de Ven, T G M.; y Tufenkji, N. **2013**. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence as a result of phage predation. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (19): 6110–16.

Huber, P.; Bouillot, S.; Elsen, S.; y Attrée, I. **2014**. Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (10): 1927–41.

Jain, M.; Ramirez, D.; Seshadri, R.; Cullina, J F.; Powers, C A.; Schulert, G S.; Bar-meir, M.; Sullivan, C L.; Mccolley, S A.; y Hauser, A R. **2004**. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during Infection of individuals with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (11): 5229–37.

James, G A.; Swogger, E.; Wolcott, R.; Pulcini, E D.; Secor, P.; Sestrich, J.; Costerton, J W.; y Stewart, P S. **2008**. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 16 (1): 37–44.

Jensen, V.; Löns, D.; Zaoui, C.; Bredenbruch, F.; Meissner, A.; Dieterich, G.; Münch, R.; y Häussler, S. **2006**. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the pseudomonas quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways. *Journal of Bacteriology* 188 (24): 8601–6.

- 
- Jesaitis, A J.; Franklin, M J.; Berglund, D.; Sasaki, M.; Lord, C I.; Bleazard, J B.; Duffy, J E.; Beyenal, H.; y Lewandowski, Z. **2003**. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *Journal of Immunology* 171 (8): 4329–39.
- Jiang C.; Finkbeiner, W E.; Widdicombe J H.; McCray, P J.; y Miller S S. **1993**. Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262 (5132): 424–27.
- Jordan, E O. **1899**. *Bacillus pycocyaneus* and its Pigments. *Journal of Experimental Medicine* 4 (5–6): 627–47.
- Juhas, M.; Wiehlmann, L.; Huber, B.; Jordan, D.; Lauber, J.; Salunkhe, P.; Limpert, A S.; et al. **2004**. Global regulation of *quorum sensing* and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150 (4): 831–41.
- Kelly, N M.; Kluftinger, J L.; Pasloske, B L.; Paranchych, W.; y Hancock, R E W. **1989**. *Pseudomonas aeruginosa* pili as ligands for nonopsonic phagocytosis by fibronectin-stimulated macrophages. *Infection and Immunity* 57 (12): 3841–45.
- Kenna, D T.; Doherty, C J.; Foweraker, J.; Macaskill, L.; Barcus, V A.; y Govan, J R W. **2007**. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology* 153 (6): 1852–59.
- Kerem, B.; Rommens, J M.; Buchanan, J A.; Markiewicz, D.; Cox, T K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; y Tsui, L C. **1989**. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245 (4922): 1073–80.
- Kielhofner, M.; Atmar, R L.; Hamill, R J.; y Musher, D M. **1992**. Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus Infection. *Clinical Infectious Diseases* 14 (2): 403–11.
- Kievit, T R D.; Parkins, M D.; Gillis, R J.; Srikumar, R.; Ceri, H.; Poole, K.; Iglewski, B H.; y Storey, D G. **2001**. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (6): 1761–70.
- Kievit, T R D.; Gillis, R.; Marx, S.; Brown, C.; e Iglewski, B H. **2001**. *Quorum-sensing* genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4): 1865–73.
- Kim, B J.; Bee, O B.; McDonagh, M A.; Stebbins, M J.; Palecek, S P.; Doran, K S.; y Shusta, E V. **2017**. Modeling group B *Streptococcus* and blood-brain barrier interaction by using induced pluripotent stem cell-derived brain endothelial cells. *mSphere* 2 (6): e00398-17.
- Kimura, K.; Teranishi, S.; Fukuda, K.; Kawamoto, K.; y Nishida, T. **2008**. Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in a manner dependent on NF- $\kappa$ B. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (2): 565.
- Kimura, K.; Teranishi, S.; y Nishida, T. **2009**. Interleukin-1 $\beta$ -induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (2): 597-603.
- King, P.; Holdsworth, S.; Freezer, N.; y Holmes, P. **2006**. Bronchiectasis. *Internal Medicine Journal* 36 (11): 729–37.
- Klausen, M.; Heydorn, A.; Ragas, P.; Lambertsen, L.; Aaes-Jørgensen, A.; Molin, S.; y Tolker-Nielsen, T. **2003**. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 48 (6): 1511–24.
-

---

Knirel, Y A. **1990**. Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology* 17 (4): 273–304.

Knutson, C A.; y Jeanes, A. **1968**. A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Analytical Biochemistry* 24 (3): 470–81.

Köhler, T.; Curty, L K.; Barja, F.; Delden, C V.; y Pechère, J C. **2000**. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology* 182 (21): 5990–96.

Konyecsni, W M.; y Deretic, V. **1990**. DNA sequence and expression analysis of *algP* and *algQ*, components of the multigene system transcriptionally regulating mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: *algP* contains multiple direct repeats. *Journal of Bacteriology* 172 (5): 2511–20.

Kraal, B.; Lippmann, C.; y Kleanthous, C. **1999**. Translational regulation by modifications of the elongation factor Tu. *Folia Microbiologica* 44 (2): 131–41.

Kragh, K N.; Hutchison, J B.; Melaugh, G.; Rodesney, C.; Roberts, A E L.; Irie, Y.; Jensen, P.; et al. **2016**. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio* 7 (2): e00237.

Krieg, D P.; Helmke, R J.; German, V F.; y Mangos, J A. **1988**. Resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to nonopsonic phagocytosis by alveolar macrophage in vitro. *Infection and Immunity* 56 (12): 3173–79.

Kropec, A.; Huebner, J.; Riffel, M.; Bayer, U.; Benzing, A.; Geiger, K.; y Daschner, F. D. **1993**. Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infections in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Medicine* 19 (3): 161–65.

Krueger, J.; Pohl, S.; Preusse, M.; Kordes, A.; Rugen, N.; Schniederjans, M.; Pich, A.; y Häussler, S. **2016**. Unravelling post-transcriptional PrmC-dependent regulatory mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 18 (10): 3583–92.

Kunze, G.; Zipfel, C.; Robatzek, S.; Niehaus, K.; Boller, T.; y Felix, G. **2004**. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16 (12): 3496–3507.

Lam, J.; Chan, R.; Lam, K.; y Costerton, J. W. **1980**. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infection and Immunity* 28 (2): 546–56.

Lambrecht, J A.; Schmitz, J E.; y Downs, D M. **2013**. RidA proteins prevent metabolic damage inflicted by PLP-dependent dehydratases in all domains of life. *mBio* 4 (1): 1–8.

Lambrecht, J A.; Flynn, J M.; y Downs, D M. **2012**. Conserved YjgF protein family deaminates reactive enamine/imine intermediates of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme reactions. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (5): 3454–61.

Latifi, A.; Foglino, M.; TanaKa, K.; Williams, P.; y Lazdunski, A. **1996**. A hierarchical *quorum sensing* cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Molecular microbiology* 21 (6): 1137–46.

Latz, E.; Visintin, A.; Lien, E.; Fitzgerald, K A.; Monks, B G.; Kurt-Jones, E A.; Golenbock, D T.; y Espevik, T. **2002**. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47834–43.

---

Lau, G.; Ran, H.; Kong, F.; Hassett, D.; y Mavrodi, D. **2004**. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and immunity* 72 (7): 4275–78.

Laurans, M.; Arion, A.; Fines-Guyon, M.; Regeasse, A.; Brouard, J.; Leclercq, R.; y Duhamel, J F. **2006**. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: first colonization to chronic infection. *Archives de Pediatrie* 13 (1): 22–29.

Lee, A.; Chow, D.; Haus, B.; Tseng, W.; Evans, D.; Fleiszig, S.; Chandy, G.; y Machen, T. **1999**. Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *The American Journal of Physiology* 277 (1 Pt 1): L204-17.

Leid, J G.; Willson, C J.; Shirliff, M E.; Daniel, J.; Parsek, M R.; Jeffers, A K.; y Jeffers, A K. **2005**. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from INF-mediated macrophage killing. *The Journal of Immunology* 175 (11): 7512–18.

Li, H.; Luo, Y.; Williams, B J.; Blackwell, T S.; y Xie, C M. **2013**. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology* 302 (2): 1–13.

Li, Z.; Kosorok, M R.; Farrell, P M.; Laxova, A.; West, S E H.; Green, C G.; Rock, M J.; y Splaingard, M L. **2005**. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *Journal of American Medical Association* 293 (5): 581–88.

Liu, G Y.; y Nizet, V. **2009**. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology* 17 (9): 406–13.

Liu, X.; Zeng, J.; Chen, X.; y Xie, W. **2016**. Crystal structures of RidA, an important enzyme for the prevention of toxic side products. *Scientific Reports* 6 (5): 30494.

Lomholt, J A.; Poulsen, K.; y Kilian, M. **2001**. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infection and Immunity* 69 (10): 6284–95.

Lowbury, E J L.; Thom, B T.; Lilly, H A.; Babb, J R.; y Whittall, K. 1970. Sources of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with tracheostomy. *Journal of Medical Microbiology* 3 (1): 39–56.

Luzar, M A.; Thomassen, M J.; y Montie, T C. **1985**. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infection and Immunity* 50 (2): 577–82.

Luzar, M A.; y Montie, T C. **1985**. Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 50 (2): 572–76.

Lyczak, J B.; Cannon, C L.; y Pier, G B. **2000**. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* 2 (9): 1051-1060.

Lyczak, J B.; Cannon, C L.; y Pier, G B. **2002**. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 194–222.

Maciá, M D.; Borrell, N.; Segura, M.; Gómez, C.; Pérez, J L.; y Oliver, A. **2006**. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (3): 975–83.

Maciá, M D.; Blanquer, D.; Togores, B.; Sauleda, J.; Pérez, J L. y Oliver, A. **2005**. Hypermutation is a

key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (8): 3382–86.

Maciá, M D.; Borrell, N.; Pérez, J L.; y Oliver, A.. **2004**. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the etest and disk diffusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (7): 2665–72.

Macnab, R M. **1999**. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *Journal of Bacteriology* 181 (23): 7149–53.

Madigan, M T.; Martinko, J M.; Parker, J.; y Gacto Fernández, M. **2004**. *Brock Biología de Los Microorganismos*. Prentice Hall Hispanoamericana.

Maeshima, N.; y Fernandez, R C. **2013**. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (3): 1–13.

Mahenthiralingam, E.; y Speert, D P. **1995**. Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum. *Infection and Immunity* 63 (11): 4519–23.

Mahenthiralingam, E.; Campbell, M E.; y Speert, D P. **1994**. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity* 62 (2): 596–605.

Martínez-Ramos, I. **2014**. Papel del factor de elongación Tu en la interacción con los keratinocitos humanos. *UIB* (Tesis doctoral).

Mathee, K.; Ciofu, O.; Sternberg, C.; Lindum, P W; Campbell, J I A.; Jensen, P.; Givskov, M.; et al. **1999**. Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145 (Pt 6): 1349–57.

Mathee, K.; Narasimhan, G.; Valdes, C.; Qiu, X.; Matewish, J M.; Koehrsen, M.; Rokas, A.; et al. **2008**. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (8): 3100–3105.

McDaniel, C T.; Panmanee, W.; y Hassett, D J. **2015**. An overview of infections in cystic fibrosis airways and the role of environmental conditions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and viability. *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*, chapter 8: 171–98.

McVay, C S.; Velásquez, M.; y Fralick, J A. **2007**. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (6): 1934–38.

Medina, G.; Juarez, K.; Diaz, R.; y Soberon-chavez, G. **2003**. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR*, encoding a quorum sensing regulatory protein. *Microbiology* 149 (Pt 11): 3073–81.

Mena, A.; Maciá, M D.; Borrell, N.; Moya, B.; De Francisco, T.; Pérez, J L.; y Oliver, A. **2007**. Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice. *Journal of bacteriology* 189 (9): 3665–68.

Merz, J.; So, M.; y Sheetz, M P. **2000**. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407 (6800): 98–102.

- 
- Moench, T T.; y Konetzka, W A. **1978**. Chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 133 (1): 427–29.
- Montanari, S.; Oliver, A.; Salerno, P.; Mena, A.; Bertoni, G.; Tümmler, B.; Cariani, L.; Conese, M.; Döring, G.; y Bragonzi, A. **2007**. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 153 (5): 1445–54.
- Montie, T C.; Huntzinger, D D.; Craven, R C.; y Holder, I A. **1982**. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned mouse model. *Infection and Immunity* 38 (3): 1296–98.
- Moradali, M F.; Ghods, S.; y Rehm, B H A. **2017**. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7 (39): 1113.
- Natarajan, K.; Singh, S.; Burke, T. R.; Grunberger, D. y Aggarwal, B B. **1996**. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-Kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (17): 9090–95.
- Nestorovich, E.; Sugawara, E.; Nikaido, H.; y Bezrukow, S. **2006**. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (24): 16230–37.
- Nomura, K.; Obata, K.; Keira, T.; Miyata, R.; Hirakawa, S.; Takano, K.; Kohno, T.; Sawada, N.; Himi, T.; y Kojima, T. **2014**. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respiratory Research* 15 (1): 21.
- Parker, D.; y Prince, A. **2013**. Epithelial uptake of flagella initiates proinflammatory signaling. *PLoS ONE* 8 (3): 1–8.
- Pier, G. B.; Coleman, F.; Grout, M.; Franklin, M.; y Ohman, D. E. **2001**. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infection and Immunity* 69 (3): 1895–1901.
- Pustelny, C.; Brouwer, S.; Müsken, M.; Bielecka, A.; Dötsch, A.; Nimtz, M.; y Häussler, S. **2013**. The peptide chain release factor methyltransferase PrmC is essential for pathogenicity and environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Environmental Microbiology* 15 (2): 597–609.
- O'Toole, G A.; y Kolter, R. **1998**. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30 (2): 295–304.
- Ochsner, U A.; Koch, A K.; Fiechter, A.; y Reiser, J. **1994**. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 176 (7): 2044–54.
- Ochsner, U A.; y Reiser, J. **1995**. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (14): 6424–28.
- Ohnemus, U.; Kohrmeyer, K.; Houdek, P.; Rohde, K.; Wladykowski, E.; Vidal, S.; Horstkotte, M A.; et al. **2008**. Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *Journal of Investigative Dermatology* 128 (4): 906–16.
- Oka, N.; Suzuki, T.; Ishikawa, E.; Yamaguchi, S.; Hayashi, N.; Gotoh, N.; y Ohashi, Y. **2015**. Relationship of virulence factors and clinical features in keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (11): 6892–98.

- 
- Okkotsu, Y.; Little, A S.; y Schurr, M J. **2014**. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (82): 1–21.
- Oliver, A.; y Mena, A. **2010**. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 16 (7): 798–808.
- Oliver, A.; Baquero, F.; y Blázquez, J. **2002**. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molecular Microbiology* 43 (6): 1641–50.
- Oliver, A.; Cantón, R.; Campo, P.; Baquero, F.; y Blázquez, J. **2000**. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288 (5469): 1251–53.
- Oliver, A.; Levin, B R.; Bruce R.; Juan, C.; Baquero, F.; y Blázquez, J. **2004**. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (11): e4226.
- Osika, E.; Cavallion, J. M.; Chadelat, K.; Boule, M.; Fitting, C.; Tournier, G.; y Clement, A. **1999**. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *European Respiratory Journal* 14 (2): 339–46.
- Owings, J P.; Kuiper, E G.; Prezioso, S M.; Meisner, J.; Varga, J J.; Zelinskaya, N.; Dammer, E B.; et al. **2016**. *Pseudomonas aeruginosa* EftM is a thermoregulated methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (7): 3280–90.
- Palmer, K L.; Mashburn, L M.; Singh, P K.; y Whiteley, M. **2005**. Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *Journal of bacteriology* 187 (15): 5267–77.
- Parker, D.; y Prince, A. **2013**. Epithelial uptake of flagella initiates proinflammatory signaling. *PLoS ONE* 8 (3): 1–8.
- Passador, L.; Cook, J M.; Gambello, M J.; Rust, L.; e Iglewski, B H. **1993**. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260 (5111): 1127–30.
- Patankar, Y R.; Lovewell, R R.; Poynter, M E.; Jyot, J.; Kazmierczak, B I.; y Berwin, B. **2013**. Flagellar motility is a key determinant of the magnitude of the inflammasome response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 81 (6): 2043–52.
- Pattison, S H.; Gibson, D S.; Johnston, E.; Peacock, S.; Rivera, K.; Tunney, M M.; Pappin, D J.; y Elborn, J S.; **2017**. Proteomic profile of cystic fibrosis sputum cells in adults chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *European Respiratory Journal* 50 (1): e1601569.
- Pearson, J P.; Gray, K M.; Passador, L.; Tucker, K D.; Eberhard, A.; Iglewski, B H.; y Greenberg, E P. **1994**. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1): 197–201.
- Pearson, J P.; Passador, L.; Iglewski, B H.; y Greenberg, E P. **1995**. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (5): 1490–94.
- Pérez-Gallego, M.; Torrens, G.; Castillo-Vera, J.; Moya, B.; Zamorano, L.; Cabot, G.; Hultenby, K.; et al. **2016**. Impact of ampC derepression on fitness and virulence: the mechanism or the pathway?. *mBio* 7 (5): e01783-16.

- 
- Persat, A.; Inclan, Y F.; Engel, J N.; Stone, H A.; y Gitai, Z. **2015**. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (24): 7563–68.
- Pesci, E C.; Milbank, J B J.; Pearson, J P.; McKnight, S.; Kende, A S.; Greenberg, E P.; e Iglewski, B H. **1999**. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (20): 11229–34.
- Pier, G B.; Coleman, F.; Grout, M.; Franklin, M.; y Ohman, D E. **2001**. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infection and Immunity* 69 (3): 1895–1901.
- Postle, A D.; Mander, A.; Reid, K B M.; Wang, J.; Wright, S M.; Moustaki, M.; y Warner, J O. **1999**. Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20 (1): 90–98.
- Kashin, P.; Mayank, D.; Anshuman, M.; Singh, R.; Afzal, A.; y Baronia, A.. **2009**. Nosocomial cross-transmission of *Pseudomonas aeruginosa* between patients in a tertiary intensive care unit. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 52 (4): 509–13.
- Qadi, M.; Izquierdo-Rabassa, S.; Mateu Borrás, M.; Doménech-Sánchez, A.; Juan, C.; Goldberg, J B.; Hancock, R E W.; y Albertí, S. **2017**. Sensing Mg<sup>2+</sup> contributes to the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to complement-mediated opsonophagocytosis. *Environmental Microbiology* 19 (10): 4278–86.
- Qadi, M.; Lopez-causapé, C.; Izquierdo-Rabassa, S.; Mateu Borrás, M.; Goldberg, J B.; Oliver, A; y Albertí, S. **2016**. Surfactant protein A recognizes outer membrane protein OprH on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from individuals with chronic infection. *Journal of Infectious Diseases* 214 (9): 1449–55.
- Qin, X.; Zerr, D M.; Mcnutt, M A.; Berry, J E.; Burns, J L.; y Kapur, R P. **2012**. *Pseudomonas aeruginosa* syntrophy in chronically colonized airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (11): 5971–81.
- Quénée, L.; Lamotte, D.; y Polack, B. **2005**. Combined sacB-based negative selection and Cre-Lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* 38 (1): 63–67.
- Ramphal, R.; y Pier, G B. **1985**. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infection and Immunity* 47 (1): 1–4.
- Rasamiravaka, T; Labtani, Q; Duez, P; y El Jaziri, M. **2015**. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International* (759348): 1–17.
- Reeves, P. **1995**. Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends in Microbiology* 3 (10): 381–86.
- Rehm, B H A.; Boheim, G.; Tommassen, J.; y Winkler, U K. **1994**. Overexpression of AlgE in *Escherichia coli*: subcellular localization, purification, and ion channel properties. *Journal of Bacteriology* 176 (18): 5639–47.
- Restrepo, M I.; Mortensen, E M.; Pugh, J A.; y Anzueto, A. **2006**. COPD is associated with increased mortality in patients with community-acquired pneumonia. *The European Respiratory Journal* 28 (2): 346–51.

Rojo-Molinero, E; Macià, M D.; Rubio, R; Moyà, B; Cabot, G; López-Causapé, C; Pérez, J L.; Cantón, R; y Oliver, A. **2016**. Sequential treatment of biofilms with aztreonam and tobramycin: a novel strategy for combating *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (5): 2912–22.

Sadikot, R T.; Zeng, H.; Joo, M.; Everhart, M B.; Sherrill, T P.; Li, B.; Cheng, D.; Yull, F E.; Christman, J W.; y Blackwell, T S.; **2006**. Targeted immunomodulation of the NF-kappaB pathway in airway epithelium impacts host defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Immunology* 176 (8): 4923–30.

Saiman, L.; y Prince, A. **1993**. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 92 (4): 1875–80.

Saiman, L. **2004**. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatric Respiratory Reviews* 5 (Supl A): S367–69.

Schmid, J; Sieber, V; y Rehm, B. **2015**. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology* 6 (496): 1–24.

Schroeder, T H.; Lee, M M.; Yacono, P W.; Cannon, C L.; Gerçeker, A A.; Golan, D E.; y Pier, G B. **2002**. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-Kappa B translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (10): 6907–12.

Schuster, M.; Lostroh, C P.; Ogi, T.; y Greenberg, E P. **2003**. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology* 185 (7): 2066–79.

Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M.; y Kirschning, C. **1999**. Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (25): 17406–9.

Schwarzmann, S.; y Boring, J R. **1971**. Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 3 (6): 762–67.

Scotti, J S.; Leung, I K H.; Ge, W.; Bentley, M A.; Paps, J.; Kramer, H B.; Lee, J.; et al. **2014**. Human oxygen sensing may have origins in prokaryotic elongation factor Tu prolyl-hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (37): 13331–36.

Simon, R.; Priefer, U.; y Pühler, A. **1983**. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1 (9): 784–91.

Sehnert, B.; Burkhardt, H.; Wessels, J T.; Schroder, A.; May, M J.; Vestweber, D.; Zwerina, J.; et al. **2013**. NF-kB inhibitor targeted to activated endothelium demonstrates a critical role of endothelial NF-kB in immune-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (41): 16556–61.

Semmler, A B T.; Whitchurch, C B.; y Mattick, J S. **1999**. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 (10): 2863–73.

Shaver, C M.; y Hauser, A R. **2004**. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity* 72 (12): 6969–77.

Sheppard, D N.; y Welsh, M J. **1999**. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological Reviews* 79 (1 Suppl): S23–45.

- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K.; y Kimoto, M. **1999**. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 189 (11): 1777–82.
- Shrout, J D.; Chopp, D L.; Just, C L.; Hentzer, M.; Givskov, M.; y Parsek, M R. **2006**. The impact of *quorum sensing* and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* 62 (5): 1264–77.
- Shu, J.; Kuo, A.; Su, L.; Liu, T.; Lee, M.; Su, I.; y Wu, T. **2017**. Development of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with OprD polymorphisms, particularly the amino acid substitution at codon 170. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (9): 2489–95.
- Singh, P.; Schaefer, A.; Parsek, M.; Moninger, T.; Welsh, M.; y Greenberg, E. P. **2000**. *Quorum-sensing* signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407 (12): 762–64.
- Smith, E E.; Buckley, D G.; Wu, Z.; Saenphimmachak, C.; Hoffman, L R.; D'Argenio, D A.; Miller, S I.; et al. **2006**. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis Patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (22): 8487–92.
- Soong, G.; Parker, D.; Magargee, M.; y Prince, A S. **2008**. The Type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *Journal of Bacteriology* 190 (8): 2814–21.
- Sriramulu, D D.; Lunsdorf, H.; Lam, J S.; y Romling, U. **2005**. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *Journal of Medical Microbiology* 54 (Pt 7): 667–76.
- Starkey, M.; Hickman, J H.; Ma, L.; Zhang, N.; De Long, S.; Hinz, A.; Palacios, S.; et al. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic lung. *Journal of Bacteriology* 191 (11): 3492–3503.
- Stewart, P S.; y Costerton, W J. **2001**. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358 (9276): 135–38.
- Stintzi, A.; Evans, K.; y Poole, K. **1998**. *Quorum-sensing* and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 166 (2): 341–45.
- Stover, C K.; Pham, X Q.; Erwin, A L.; Mizoguchi, S D.; Warrenner, P.; Hickey, M J.; Brinkman, F S.; et al. **2000**. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 (6799): 959–64.
- Strom, M S.; y Lory, S. **1993**. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annual Review of Microbiology* 47 (10): 565–96.
- Soong, G.; Parker, D.; Magargee, M.; y Prince, A S. **2008**. The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *Journal of Bacteriology* 190 (8): 2814–21.
- Tan, R M.; Kuang, Z.; Hao, Y.; y Lau, G W. **2014**. Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. *Journal of Innate Immunity* 6 (2): 227–39.
- Tang, H.; Kays, M.; y Prince, A. **1995**. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infection and Immunity* 63 (4): 1278–85.

---

Taylor, R F H.; Hodson, M E.; y Pitt, T L. **1992**. Auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 71 (3): 243-6.

Taylor, R F H.; Hodson, M E.; y Pitt, T L. **1993**. Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbations and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax* 48 (10): 1002-5.

Thomas, S R.; Ray, A.; Hodson, M E.; y Pitt, T L. **2000**. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 55 (9): 795-97.

Tirouvanziam, R.; de Bentzmann, S.; Hubeau, C.; Hinnrasky, J.; Jacquot, J.; Péault, B.; Puchelle, E. et al **2000**. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23 (2): 121-27.

Toder, D S.; Ferrell, S J.; Nezezon, J L.; Rust, L.; e Iglewski, B H. **1994**. *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infection and Immunity* 62 (4): 1320-27.

Toder, D S.; Gambello, M J.; e Iglewski, B H. **1991**. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Molecular Microbiology* 5 (8): 2003-10.

Trias, J.; y Nikaido, H. **1990**. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (26): 15680-84.

Varga, J J.; Barbier, M.; Mulet, X.; Bielecki, P.; Bartell, J A.; Owings, J P.; Martinez-Ramos, I.; et al. **2015**. Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. *BMC Genomics* 16 (1): 883.

Venturi, V. **2006**. Regulation of *quorum sensing* in *Pseudomonas*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 30 (2): 274-91.

Verhaeghe, C.; Delbecq, K.; de Leval, L.; Oury, C.; y Bours, V. **2007**. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *Journal of Cystic Fibrosis* 6 (4): 304-8.

Veroux, M.; Giuffrida, G.; Corona, D.; Gagliano, M.; Scriffignano, V.; Vizcarra, D.; Tallarita, T.; et al. **2008**. Infective complications in renal allograft recipients: epidemiology and outcome. *Transplantation Proceedings* 40 (6): 1873-76.

Vikström, E.; Bui, L.; Konradsson, P.; y Magnusson, K E. **2010**. Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing* molecule. *European Journal of Cell Biology* 89 (8): 584-97.

Waine, D J.; Honeybourne, D.; Smith, E G.; Whitehouse, J L.; y Dowson, C G. **2008**. Association between hypermutator phenotype, clinical variables, mucoid phenotype, and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (10): 3491-93.

Wallace, C J.; Medina, S H.; y ElSayed, M E H. **2014**. Effect of rhamnolipids on permeability across Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research* 31 (4): 887-94.

Wang, X.; y Quinn, P J. **2010**. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research* 49 (2): 97-107.

- 
- Waters, E M.; Neill, D R.; Kaman, B.; Sahota, J S.; Clokie, M R J.; Winstanley, C.; y Kadioglu, A. **2017**. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax* 72 (7): 666-667.
- Weingarten, M A. **1977**. Otitis externa due to *Pseudomonas* in swimming pool bathers. *The Journal of the Royal College of General Practitioners* 178 (27): 359-60.
- Whiteley, M.; Lee, K M.; y Greenberg, E P. **1999**. Identification of genes controlled by *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24): 13904-9.
- Whitney, J C.; Hay, I D.; Li, C.; Eckford, P D W.; Robinson, H.; Amaya, M F.; Wood, L F.; et al. **2011**. Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (32): 13083-88.
- Widmer, A F.; Wenzel, R P.; Trilla, A.; Bale, M J.; Jones, R N.; y Doebbeling, B N. **1993**. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker. *Clinical Infectious Diseases* 16 (3): 372-76.
- Willcox, M D P. **2007**. *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear: a review. *Optometry and Vision Science* 84 (4): 273-78.
- Williams, B J.; Dehnbostel, J.; y Blackwell, T S. **2010**. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* 15 (7): 1037-56.
- Wolfgang, M C.; Jyot, J.; Goodman, A L.; Ramphal, R.; y Lory, S. **2004**. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (17): 6664-68.
- Wood, L F.; y Ohman, D E. Identification of genes in the sigma 22 regulon of *Pseudomonas aeruginosa* required for cell envelope homeostasis in either the planktonic or the sessile mode of growth. *mBio* 3 (3): e00094-12.
- Workentine, M L.; Sibley, C D.; Glezerson, B.; Purighalla, S.; Norgaard-Gron, J C.; Parkins, M D.; Rabin, H R.; y Surette, M G. **2013**. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE* 8 (4): e 60225.
- Worlitzsch, D.; Tarran, R.; Ulrich, M.; Schwab, U.; Cekici, A.; Meyer, K C.; Birrer, P.; et al. **2002**. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of Clinical Investigation* 109 (3): 317-25.
- Wozniak, D J.; y Ohman, D E. **1994**. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *Journal of Bacteriology* 176 (19): 6007-14.
- Wu, H.; Song, Z.; Givskov, M.; Doring, G.; Worlitzsch, D.; Mathee, K.; Rygaard, J.; y Høiby, N. **2001**. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in *lasI* and *rhlI* *quorum sensing* systems result in milder chronic lung infection. *Microbiology* 147 (Pt 5): 1105-13.
- Wu, W.; Badrane, H.; Arora, S.; Baker, H V.; y Jin, S. **2004**. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 186 (22): 7575-85.
- Xiong, J.; Déraspe, M.; Iqbal, N.; y Krajden, S. **2017**. Complete genome of a panresistant from a patient with respiratory failure in a canadian community hospital. *Genome Announcements* 5 (22): e00458-17.
-

---

Yang, L.; Haagensen, J A J.; Jelsbak, L.; Johansen, H K.; Sternberg, C.; Hoiby, N.; y Molin, S. **2007**. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *Journal of Bacteriology* 190 (8): 2767–76.

Yang, G.; Sau, C.; Lai, W.; Cichon, J.; y Li, W. **2015**. From microbiology to cancer biology: the Rid protein family prevents cellular damage caused by endogenously generated reactive nitrogen species. *Molecular Microbiology* 96 (2): 211–19.

Yi, X.; Wang, Y.; y Yu, F S. **2000**. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (13): 4093–4100.

Yoon, S S.; Hennigan, R F.; Hilliard, G M.; Ochsner, U A.; Parvatiyar, K.; Kamani, M C.; Allen, H L.; et al. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell* 3 (4): 593–603.

Young, C C.; y Bernlohr, R W. **1991**. Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 173 (10): 3096–3100.

Yu, H.; Schurr, M J.; y Deretic, V. **1995**. Functional equivalence of *Escherichia coli*  $\sigma$ (E) and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. Coli* rpoE restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 177 (11): 3259–68.

Yun, M A.; Yeon, K M.; Park, J S.; Lee, C H.; Chun, J.; y Lim, D J. **2006**. Characterization of biofilm structure and its effect on membrane permeability in MBR for dye wastewater treatment. *Water Research* 40 (1): 45–52.

Zeglen, S.; Wojarski, J.; Wozniak-Grygiel, E.; Siola, M.; Jastrzebski, D.; Kuciewicz-Czech, E.; y Zembala, M. **2009**. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in lung transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 41 (8): 3222–24.

Zhang, S.; McCormack, F. X.; Levesque, R. C.; O'Toole, G. A.; y Lau, G. W. **2007**. The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS ONE* 2 (6): e564.

Zhang, Z.; Louboutin, J.; Weiner, D J.; Goldberg, J B.; y Wilson, J M. **2005**. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-Like receptor 5. *Infection and Immunity* 73 (1): 7151–60.

Zhou, H S.; Li, M.; Sui, B D.; Wei, L.; Hou, R.; Chen, W S.; Li, Q.; Bi, S H.; Zhang, J.; y Yi, D. **2017**. Lipopolysaccharide impairs permeability of pulmonary microvascular endothelial cells via connexin40. *Microvascular Research* 115 (1): 58–67.

Zhou-Suckow, Z.; Duerr, J.; Hagner, M.; y Mall, M A. **2017**. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell and Tissue Research* 367 (3): 537–50.

Zichichi, L.; Asta, G.; y Noto, G. **2000**. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis after shower/bath exposure. *International Journal of Dermatology* 39 (4): 270–73.

Zielenski, J.; Rozmahel, R.; Bozon, D.; Kerem, B.; Grzelczak, Z.; Riordan, J R.; Rommens, J.; y Tsui, L C. **1991**. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10 (1): 214–28.

Zulianello, L.; Canard, C.; Köhler, T.; Caille, D.; Lacroix, J S.; y Meda, P. **2006**. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas*

*aeruginosa*. *Infection and Immunity* 74 (6): 3134–47.