



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
Facultat de Ciències
Departament de Biologia

TESIS DOCTORAL

Dissección molecular de la
interacción entre
Klebsiella pneumoniae
y el sistema inmune
innato del pulmón

Tesis doctoral presentada por
Catalina March Aguiló para optar al título de
Doctora en biología

Palma de Mallorca, 2012

El Dr. José Antonio Bengoechea Alonso, como director de la Tesis “Diseción molecular de la interacción entre *Klebsiella pneumoniae* y el sistema inmune innato del pulmón”, realizada por Catalina March Aguiló, autoriza su presentación puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Palma de Mallorca, 2012

Dr. José Antonio Bengoechea

Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda del Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES; Programa Corporativo de Investigación en Nuevas Dianas Terapéuticas), a dos proyectos del programa ERA-NET PathoGenoMics (Plan Nacional; Ministerio de Economía y Competitividad GEN2006-27776-C2-2-E y SAF2008-04353-E) y a un proyecto financiado por el Programa de Biomedicina (Plan Nacional; Ministerio de Economía y Competitividad SAF2009-07885). CIBERES es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

AGRAÏMENTS

Després de tots aquests anys d'esforç i dedicació, s'ha acabat una etapa de la meva vida que, si més no, ha estat del tot gratificant i positiva. He acabat la tesi i ara crec que és moment d'expressar el meu agraïment a tots els que m'han ajudat i m'han acompanyat en el meu particular viatge. En aquests anys, he après i he viscut què és la ciència de la mà d'en José Antonio i, juntament amb tots els meus companys i amics, he experimentat el significat del treball en equip en un món tan competitiu com és el de la ciència.

En primer lloc, voldria agrair la inversió econòmica de les entitats i institucions que han fet possible la realització d'aquest treball. Durant els dos primers anys vaig gaudir d'una beca de l'Hospital Universitari Son Dureta i els darrers anys, d'un contracte del "Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES)" iniciativa de l'"Instituto Carlos III". També vull agrair als treballadors de la Fundació Caubet-Cimera: a na Maria, na Magdalena o a na Montse, entre d'altres, per a la seva ajuda i facilitats que han posat a la meva disposició en qualsevol moment. I a la gent amb qui vaig coincidir a la unitat d'investigació, a na Meri, na Mamen, na Carmen, n'Amanda, na Mariette, en Pierola, etc. Va ser un plaer haver coincidit amb tots vosaltres.

Vull agrair molt especialment al meu director de tesi, el Dr. José Antonio Bengoechea, el fet d'haver-me donat l'oportunitat de treballar amb ell i amb el seu equip i haver pogut dur a terme aquest treball amb tanta passió i dedicació. Ell m'ha ensenyat què és la perseverança, el no rendir-se i a seguir endavant encara que paresqui que no me n'he de sortir. Si no surt A, sempre hi ha un "plan B, C o D", i al final sempre s'acaba veient "la luz al final del túnel" :-)

També mereixen una menció especial totes les persones amb qui he compartit laboratori. Quan vaig començar erem molt poquets: na Vero, na Camino, en Micky i na Cati (amiga abans i després, dins i fora del laboratori). Gràcies a tots per acollir-me com ho va fer. Vam començar essent companys de feina, vam compartir dinars, cafès i confidències fins que amb alguns ens vam convertir amb amics. A na Cati li vull agrair especialment tot el que ha fet per jo, en reiterades ocasions ha demostrat ser una bona amiga, gràcies per ser com ets. Després el grup va créixer i va arribar en Pau Morey, es va convertir en el meu

aliat i junts vam lluitar en el difícil món d'*Acinetobacter*. No va ser fàcil, però ho vam saber dur (gràcies a jo... o no, Pau???). Els següents en arribar van ser en Quique, una persona que mai no té un no, sempre té un minutet si ho necesites..., sense ell el laboratori no seria com és; en Pau Martí, que ens entretenia els horabaixes amb els seus acudits; en David que és molt graciós (onanismo per organismo, entre d'altres) i un bon company. Na Paloma, n'Antonio, na Silvia o a na Mari Pau, gràcies a tots perquè de cada un d'ells n'he après alguna cosa. De na Mar, per exemple el seu optimisme i les ganas de fer i de'n Cristianito...sobretudo muchos inventos ingeniosos. De verdad te quiero dar las gracias porque siempre me has ayudado, has pensado en mi, me has enseñado un poquito de alemán y por los regalitos que me encantan todos. Espero que tengas mucha suerte y ya sabes que en Mallorca siempre serás bienvenido. De na Junkal he après lo bona professional que és i quan t'havia d'explicar alguna cosa sempre ho feia amb molta claretat. No m'oblido de "la parte alta del labo", la millor sens dubte. Anna, gràcies per ser la meva companya de lloc i amiga, ja saps que "si tu mueres, yo muero"; Núria, encara que haguéssis arribat més tard, ràpidament et vas convertir en una més del barri exclusiu, moltes gràcies per ser així com ets, saps el que vols i lluites per aconseguir-ho, esper que no canviïs i que poguem seguir compartint moments. Whisky, sé que no hem tengut molt temps per conèixer-nos però m'ha bastat per veure que també encaixes en el "barrio", has estat molt afortunada, jeje. I finalment, hem queda agrair a na Vicky tot el que ha fet per jo. A la feina ha estat una peça clau, hem treballat juntes i juntes hem tret endavant la feina. Fora de la feina també li he d'agrair la seva amistat: Vicky eres muy buena amiga y espero que lo sigamos siendo. GRÀCIES A TOTS per a la vostra ajuda i col·laboració. Entre tots hem aconseguit crear un bon ambient per tal de fer més lleugera la feina.

A los de arriba también les quiero agradecer el apoyo prestado, especialmente a Víctor, a Aarne y a Lola, que han puesto su granito de arena en esta tesis (Victor es el que se ha sacado los ojos conmigo en el microscopio, Aarne me ayudó a generar la línea estable de macrófagos y Lola fue mi soporte estadístico); a Patricia le quiero agradecer los buenos momentos y al resto, las risas, cenas y marchitas: María, Carlos, Ana, Ivan, al puto becario, jeje....

Durant la tesi, vaig tenir l'oportunitat de fer una estada de 15 dies a Madrid, al CIB al laboratori de la Dr. Teresa Suárez, per aprendre el maneig de l'ameba *Dictyostelium discoideum*. Me gustaria agrader a Teresa y a sus chicas, Anne y María, la buena acogida, el tiempo dedicado y la ayuda prestada. Realmente, me sentí como en casa. Muchas gracias porqué fue una experiencia muy positiva. También me gustaria agrader al Dr. Juan Tomas por los mutantes de cadena O cedidos, al Dr. Nacho Aguiló del grupo del Profesor Carlos Marín por la realización de los experimentos de apoptosis y al Dr. Sergio Greinstein por los plásmidos enviados y sus sabios consejos.

Per arribar fins aquí, també han estat importants els amics que he tingut al meu costat fora del laboratori. Per això vull agrair als amics d'Inca: tots els moments compartits que han estat importants per desconnectar de la feina, les rialles, els sopars, les sortides. Gràcies per ser-hi. A les amigues de la universitat, amb qui he compartit molts bons moments. I a na Marga, perquè sempre ha estat al meu costat passàs el que passàs. També vull agrair a n'Eugènia, na Martina, na Kika, na Teresa, na Joana els moments compartits durant aquest temps.

No puc oblidar-me de com han estat d'importants els meus pares en tot moment, i especialment en aquesta etapa. En tot moment m'han sabut entendre i sempre m'han sabut aconsellar. Possiblement ells són les persones que més em coneixen i m'entenen i sempre han estat incondicionalment al meu costat. Sense ells, jo no seria el que sóc ni hagués arribat allà on he arribat. Gràcies als dos pel vostre suport i per estimar-me com ho feis. Gràcies a la resta de la meva família que heu estat al meu costat animant-me a seguir, i als que ja no hi són perquè segurament que n'estarien ben orgullosos.

I, finalment, vull agrair a en Pere que hagi estat sempre al meu costat quan el necessitava, que m'hagi cuidat i entès. També vull agrair-li la seva paciència, sobretot en aquests darrers dies, i que m'estimi com ho fa. Moltes gràcies.

**Als meus pares, Paco i Aina
A en Pere**

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	23
ÍNDICE DE TABLAS	27
ABREVIATURAS	29
INTRODUCCIÓN	31
1. El sistema inmune innato del pulmón	33
1.1 Inmunidad innata humoral pulmonar	33
1.1.1 El sistema del complemento.....	33
1.1.2 Proteínas y péptidos antimicrobianos	35
1.2 Inmunidad innata celular	36
1.2.1 El epitelio respiratorio	37
1.2.2 Los macrófagos alveolares	37
1.2.2.1 La maduración fagolisosomal	39
1.2.2.2 Estrategias de vida intracelular	41
1.3 Inflamación	42
1.3.1 Los receptores TLR.....	44
1.3.2 Los receptores NLR	47
1.3.3 Vías de señalización mediadas por TLRs y NLRs	48
1.3.3.1 Vía de señalización del NF- κ B	50
1.3.3.2 Vía de señalización de las MAP quinasas	51
2. El género <i>Klebsiella</i>	54
2.1 Características generales	54
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> como agente causante de infecciones nosocomiales	54
2.3 Factores de virulencia	56
2.3.1 Lipopolisacárido (LPS)	58
2.3.2 Polisacárido capsular (CPS)	64
3. El sistema inmune innato del pulmón y <i>K. pneumoniae</i>	66

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	77
2. Construcción de mutantes	77
2.1 Construcción de los mutantes 52OmpA2 y 52145- Δwca_{k2} OmpA	77
2.2 Construcción de los mutantes 52OmpK36 y 52145- Δwca_{k2} OmpK36	78
2.3 Complementación de las mutaciones en los genes <i>ompA</i> y <i>ompK36</i>	79
2.4 Construcción de un mutante descapsulado en la cepa Kp43816	80
3. Construcción de la fusión transcripcional <i>Procps::gfp</i> en la cepa Kp43816	82
4. Extracción de proteínas de membrana externa	83
4.1 SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie	83
5. Extracción, purificación y cuantificación de CPS	85
6. Líneas celulares y mantenimiento de las líneas celulares	85
7. Infección de células en cultivo	87
8. Ensayos de adhesión e internalización bacteriana	88
8.1 Adhesión e internalización en células epiteliales	88
8.2 Adhesión, fagocitosis y vida intracelular en macrófagos alveolares	89
9. Secreción de IL-8	91
10. Oponización de <i>Klebsiella</i> y fagocitosis por macrófagos	91
11. <i>Western blot</i>	92
12. Transfecciones células epiteliales	93
12.1 Pequeños ARN de interferencia (siRNA)	93
13. Transfecciones de plásmidos en macrófagos alveolares	93
14. Activación de NF- κ B	94
15. Activación de NF- κ B vía NOD1	94
16. Estudio de la expresión intracelular de cápsula	95
17. Medida de fluorescencia	96

18. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	96
19. Generación de la línea celular estable MH-S/pLC3B	98
19.1 Producción de retrovirus	98
19.2 Infección a macrófagos alveolares MH-S	98
19.3 Selección de clones	99
20. Tinciones y microscopía de fluorescencia en macrófagos	99
21. Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	102
22. Citotoxicidad y medición de apoptosis en macrófagos	103
23. Manejo de la ameba <i>Dictyostelium discoideum</i>	104
24. Crecimiento de <i>D. discoideum</i> sobre bacterias	105
25. Supervivencia de bacterias en contacto con <i>D. discoideum</i>	105
26. Supervivencia de <i>D. discoideum</i> en contacto con <i>Klebsiella</i>	106
27. Visualización de bacterias intracelulares en la ameba <i>D. discoideum</i>	106
28. Modelo intranasal de infección	107
29. Análisis estadístico	108
RESULTADOS	111
1. IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA OmpA EN LA PREVENCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL PULMÓN	113
1.1 La infección con un mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i> induce la secreción de IL-8 por células del epitelio respiratorio	113
1.2 El mutante <i>ompA</i> atenúa la secreción de IL-8 inducida por IL-1 β	116
1.3 El mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i> induce <i>in vivo</i> mayores niveles de citoquinas que los inducidos por la cepa silvestre	117
1.4 La expresión de IL-8 inducida por un mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i> es dependiente de la activación de NF- κ B.....	118
1.5 La expresión de IL-8 inducida por un mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i> es dependiente de la activación de las MAPKs.....	121
1.6 Disección de los receptores celulares necesarios para la activación de las respuestas inflamatorias inducidas por los mutantes <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i>	123
1.7 Virulencia del mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i>	126

2. INTERACCIÓN DE <i>K. pneumoniae</i> CON FAGOCITOS PROFESIONALES: LA AMEBA SOCIAL <i>D. discoideum</i> Y MACRÓFAGOS ALVEOLARES	128
2.1 PAPEL DE LAS ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE DE <i>K. pneumoniae</i> EN LA INTERACCIÓN CON FAGOCITOS PROFESIONALES	129
2.1.1 Estudio de la interacción entre <i>K.</i> y la ameba <i>D. discoideum</i>	129
2.1.2 Papel del CPS en la interacción con fagocitos profesionales	131
2.1.3 Papel de la sección polisacáridica del LPS en la interacción con fagocitos profesionales	133
2.1.4 Papel del lípido A del LPS en la interacción con fagocitos profesionales	137
2.1.5 Papel de las OMPs en la interacción con fagocitos profesionales	139
2.2 ESTUDIO DE LA VIDA INTRACELULAR DE <i>K. pneumoniae</i> EN MACRÓFAGOS	142
2.2.1 Caracterización de la fagocitosis de <i>Klebsiella</i> en macrófagos	143
2.2.2 Análisis de la vida intracelular de <i>K. pneumoniae</i> en macrófagos	145
2.2.3 Citotoxicidad e inducción de apoptosis en macrófagos por <i>K. pneumoniae</i>	148
2.2.4 Descripción de la <i>Klebsiella containing vacuole</i> (KCV) en macrófagos MH-S	150
2.2.5 Descripción de la <i>Klebsiella containing vacuole</i> (KCV) en macrófagos THP-1	160
2.2.6 Papel del CPS en la supervivencia intracelular	162
DISCUSIÓN	169
1. La proteína OmpA de <i>K. pneumoniae</i> es necesaria para prevenir la activación de las células epiteliales	171
2. Interacción del patógeno <i>K. pneumoniae</i> con fagocitos profesionales ..	174
3. Consideraciones finales y direcciones futuras	182

CONCLUSIONES	185
REFERENCIAS	189
ANEXOS	223
Anexo I: Cepas utilizadas en este trabajo	225
Anexo II: Plásmidos utilizados en este trabajo	228
Anexo III: Cebadores utilizados en este trabajo.....	230
Anexo IV: Métodos de fijación probados para diferentes anticuerpos en macrófagos MH-S y THP-1.....	232
Anexo V: Anticuerpos primarios probados en macrófagos	235
Anexo VI: Artículos publicados relacionados con este trabajo	236
Anexo VII: Otros artículos publicados	254

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de activación del sistema del complemento.....	34
Figura 2. Representación esquemática del tracto respiratorio inferior.....	36
Figura 3. Representación esquemática de la ruta endocítica.....	39
Figura 4. Receptores del sistema inmune innato.....	43
Figura 5. Vías de señalización de los receptores TLR y NLR.....	49
Figura 6. Diagrama de activación del NF- κ B.....	51
Figura 7. Diagrama de activación de las MAP quinasas (MAPK).....	52
Figura 8. Representación esquemática de los principales factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	58
Figura 9. Representación esquemática del LPS de una bacteria Gram negativa.....	59
Figura 10. Estructura del núcleo tipo 2 del LPS de <i>K. pneumoniae</i>	61
Figura 11. Lípido A de <i>K. pneumoniae</i>	62
Figura 12. Lípido A de los mutantes 52- Δ pagP y 52- Δ pmrF de <i>K. pneumoniae</i>	63
Figura 13. Construcción de los mutantes <i>ompA</i> y <i>ompK36</i> mediante recombinación homóloga.....	78
Figura 14. Complementación de los mutantes <i>OmpA</i> y <i>OmpK36</i> usando el vector de transposición mini-Tn7TKm.....	80
Figura 15: Esquema de la construcción de un mutante descapsulado en <i>Klebsiella</i>	81
Figura 16: Fusión transcripcional entre la región promotora del operón <i>wca</i> y la <i>gfp</i>	82
Figura 17. Visualización de las OMPs de <i>K. pneumoniae</i>	84
Figura 18. Un mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i> induce una mayor secreción de IL-8 que la cepa silvestre en las células epiteliales de pulmón A549.....	114
Figura 19. <i>K. pneumoniae</i> atenúa la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β	116
Figura 20. Expresión de citoquinas proinflamatorias en los pulmones de ratones infectados con <i>K. pneumoniae</i>	118

Figura 21. La activación del NF- κ B es necesaria para la expresión de IL-8 inducida por un mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i>	120
Figura 22. La activación de las MAPKs es necesaria para la expresión de IL-8 inducida por un mutante <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i>	122
Figura 23. Papel del MyD88, TLR2, TLR4 y NOD1 en la activación celular inducida por los mutantes <i>ompA</i> de <i>K. pneumoniae</i>	125
Figura 24. Recuento de las bacterias en dos órganos de ratón	127
Figura 25. Estudio de la virulencia de <i>K. pneumoniae</i> en la ameba <i>D. discoideum</i>	130
Figura 26. Citotoxicidad de Kp52145 hacia <i>D. discoideum</i>	130
Figura 27. Efecto del CPS en la interacción con macrófagos.....	131
Figura 28. Efecto del CPS en la interacción con la ameba <i>D. discoideum</i>	133
Figura 29. Representación esquemática de los mutantes de <i>K. pneumoniae</i> en la sección polisacáridica del LPS	134
Figura 30. Papel de la sección polisacáridica del LPS en la interacción con fagocitos profesionales	135
Figura 31. Fagocitosis de mutantes en la sección polisacáridica del LPS de <i>Klebsiella</i> por la ameba <i>D. discoideum</i>	136
Figura 32. Papel del lípido A en la interacción con fagocitos profesionales.....	138
Figura 33. Papel de las OMPs (OmpA y OmpK36) de <i>K. pneumoniae</i> en la interacción con fagocitos profesionales.....	140
Figura 34. Mecanismo molecular de la fagocitosis de Kp43816 por macrófagos.....	144
Figura 35. Supervivencia de <i>Klebsiella</i> en Macrófagos.....	146
Figura 36. Observación de bacterias activas mediante FISH.....	147
Figura 37. Efecto citotóxico de macrófagos infectados y no infectados por <i>Klebsiella</i>	148
Figura 38. Apoptosis de macrófagos infectados con <i>Klebsiella</i>	149
Figura 39. Localización subcelular de <i>Klebsiella</i> en compartimentos de la ruta endocítica.....	151
Figura 40. Marcaje con LysoTracker y tratamiento con bafilomicina A1 en macrófagos alveolares MH-S	152

Figura 41. Colocalización de Kp43816 con la GTPasa Rab7.....	153
Figura 42: <i>Klebsiella</i> se localiza en un compartimento subcelular que presenta un nivel reducido de fusión con lisosomas.....	155
Figura 43: KCV no se fusionan con lisosomas.....	155
Figura 44: Funcionalidad de la maquinaria lisosomal y colocalización con LysoTracker en macrófagos infectados con <i>Klebsiella</i> muerta con luz UV.....	156
Figura 45: Colocalización entre KCV y el aparato de Golgi.....	157
Figura 46: Las KCS no adquieren marcadores de RE.....	158
Figura 47: <i>Klebsiella</i> no colocaliza con LC3B.....	159
Figura 48: Maduración de KCV en macrófagos THP-1.....	161
Figura 49: <i>Klebsiella</i> no colocaliza con el aparato de Golgi en los macrófagos THP-1.....	162
Figura 50: Efecto del CPS en la supervivencia intracelular de <i>Klebsiella</i> ..	163
Figura 51: Papel del CPS de <i>K. pneumoniae</i> en la opsonización.....	165
Figura 52: Expresión de CPS dentro del macrófago.....	166
Figura 53: La acidez y el bajo magnesio disminuyen la expresión de cápsula en la cepa Kp43816.....	167
Figura 54: Modelo propuesto para explicar las infecciones de <i>Klebsiella</i> en macrófagos alveolares.....	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas y péptidos antimicrobianos de las vías respiratorias.....	35
Tabla 2. TLRs y sus ligandos	44
Tabla 3. Líneas celulares usadas en este trabajo	86
Tabla 4. Descripción de los inhibidores químicos y compuestos antiinflamatorios usados en este trabajo	90
Tabla 5. Métodos de fijación en MH-S y THP-1.....	100
Tabla 6. Anticuerpos primarios usados en este trabajo.....	100
Tabla 7. Porcentaje de amebas infectadas con los mutantes de .la sección polisacáridica del LPS	137

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
ATCC	del inglés <i>American type cultured collection</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CAPE	del inglés <i>caffeic acid phenethyl ester</i>
°C	Grado celsius
Cm	Cloranfenicol
CPS	Polisacárido capsular
DMSO	Dimetil sulfóxido
d.o.i.	Desionizada y purificada por ósmosis inversa
EEA1	del inglés <i>early endosome antigen 1</i>
ELISA	del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GFP	del inglés, <i>green fluorescent protein</i>
Gm	Gentamicina
h	Horas
IL-(n)	Interleuquina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IFN	Interferón
kb	Kilobase
KCV	vacuola que contiene <i>Klebsiella</i> (del inglés <i>Klebsiella containing vacuole</i>)
Km	Kanamicina
L	Litro
Lamp-1	del inglés <i>lysosome-associated membrana protein 1</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1^a/1B light Caín 3</i>
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MAPK	del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minutos
mm	Milímetros
MBP	del inglés <i>mannose binding protein</i>
MOI	Multiplicidad de infección

NHBE	Células primarias de epitelio bronquial humano
NLR	del inglés, <i>nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor</i>
DO	Densidad óptica
OMP	Proteína de membrana externa
PA	Péptido antimicrobiano
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno (del inglés, <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
pb	Par de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PI3K	del inglés, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMA	del inglés, <i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PRR	del inglés, <i>pattern recognition receptor</i>
PxB	Polimixina B
RE	Retículo endoplasmático
RFP	del inglés <i>red fluorescent protein</i>
Rif	Rifampicina
RILP	del inglés <i>Rab7-interacting lysosomal protein</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RRX	Rodamin-RedX
RT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
s	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
TA	Temperatura ambiente
TACO	del inglés, <i>tryptophane aspartate-containing coat protein</i>
TLR	del inglés, <i>Toll-like receptor</i>
TNFα	del inglés <i>tumor necrosis factor α</i>
ST6S	Sistema tipo VI de secreción
ufc	Unidades formadoras de colonia
UV	Radiación ultravioleta
URF.....	Unidades relativas de fluorescencia
vATPasa	ATPasa vacuolar

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNE INNATO DEL PULMÓN

El sistema respiratorio humano está formado por los pulmones y por una secuencia de conductos aéreos que los comunica con el medio externo. Por tanto, el pulmón está expuesto continuamente a agentes externos como humo de tabaco, contaminantes y también microorganismos, pero aún así, se mantienen estériles debido a la acción inmediata y efectiva de diversos elementos del sistema inmune innato.

El sistema inmune innato de las vías respiratorias consta de diversos mecanismos defensivos para combatir las infecciones. El primer nivel de defensa está constituido por **barreras físicas, anatómicas y mecánicas** como son la piel y sus secreciones, la tos, y el movimiento mucociliar del tracto respiratorio. De hecho, la integridad de la barrera epitelial es crítica para la protección contra infecciones bacterianas. Si los microorganismos superan estas barreras físicas, se enfrentan a la acción conjunta de la **inmunidad innata celular**, mediada por el epitelio respiratorio y las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), y la **inmunidad innata humoral**, presente en los fluidos corporales que recubren el tracto respiratorio, y que incluye, principalmente, al sistema del complemento, los péptidos y proteínas antimicrobianas así como las proteínas del surfactante pulmonar.

1.1 Inmunidad innata humoral pulmonar

1.1.1 El sistema del complemento

El sistema del complemento está compuesto por proteínas y glicoproteínas organizadas en cascadas que se encuentran en su mayor parte circulando por el torrente sanguíneo en conformación inactiva y que por escisión proteolítica se van activando (Alper *et al.*, 1980; Carroll, 2004). Estas proteínas son sintetizadas tanto por los hepatocitos como por los monocitos, los macrófagos tisulares o las células del epitelio respiratorio. Existen tres vías enzimáticas implicadas en la activación del sistema del complemento: la vía clásica, la vía alternativa y la vía dependiente de la proteína MBP (del inglés *mannose binding protein*) (**Fig.1**). La **vía clásica** se activa tras la interacción de la proteína C1q₂S₂ con un complejo antígeno–anticuerpo o directamente con la bacteria. La **vía alternativa** se inicia con la deposición de la proteína C3 sobre la

superficie bacteriana mientras que la **vía dependiente de MBP** se activa tras la unión de la MBP a carbohidratos bacterianos que contienen manosa. El resultado final de la activación de las tres vías es el mismo: la formación del denominado complejo de ataque a la membrana (MAC) que causa la destrucción de la bacteria.

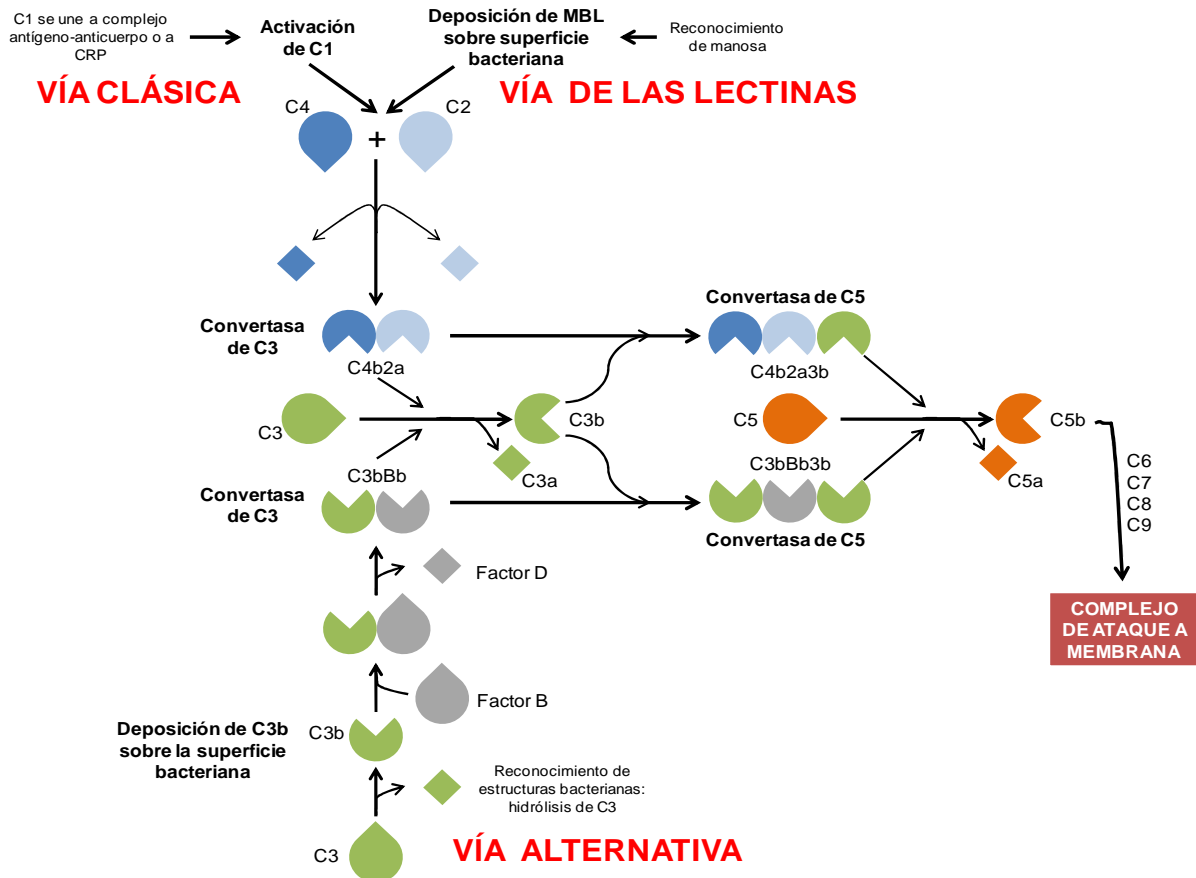


Figura 1. Vías de activación del sistema del complemento. La vía clásica se inicia cuando C1 se une a los complejos antígeno-anticuerpo. La vía alternativa se inicia con la unión de C3 a la superficie bacteriana. La vía de las lectinas se inicia con la unión de la proteína sérica MBP (*Mannose Binding Protein*) a la superficie bacteriana. Las tres vías generan el complejo de ataque a membrana (MAC).

Los neumocitos tipo II, los macrófagos alveolares, los neutrófilos y los fibroblastos sintetizan y secretan proteínas integrantes de la vía clásica (C2, C3, C4 y C5) y alternativa (factor B). Pero, además, los niveles de estas proteínas aumentan cuando las células productoras reciben estímulos

inflamatorios (Bolger *et al.*, 2007; de Astorza *et al.*, 2004; Hogasen *et al.*, 1995; Rothman *et al.*, 1990; Strunk *et al.*, 1988; Watford *et al.*, 2000). La importancia del sistema del complemento en la defensa del pulmón frente a las infecciones se demostró por el hecho de que algunos pacientes con deficiencias en proteínas del complemento, o en receptores del complemento, adquirirían infecciones respiratorias recurrentes (Figuroa and Densen, 1991).

1.1.2 Proteínas y péptidos antimicrobianos

Las proteínas y péptidos antimicrobianos (PAs) constituyen otro importante mecanismo defensivo frente a las infecciones. Aunque existe una gran variabilidad en cuanto a composición aminoacídica y estructura, todos los PAs comparten dos características: son catiónicos y anfipáticos. Estas dos características son centrales para su actividad bactericida (Brodgen, 2005; Hancock, 1997; Hancock and Scott, 2000; Jenssen *et al.*, 2006; Nicolas and Mor, 1995).

A diferencia de otros órganos vitales, el pulmón es quizás el órgano donde se han aislado mayor número de PAs (Rogan *et al.*, 2006). Algunos de estos péptidos pueden ser de síntesis constitutiva (lisozima o β -defensina1) o inducida por estímulos inflamatorios o por la presencia de patógenos (β -defensina2) (Bals 2000; Ganz, 2002; Ganz, 2003; Hancock and Chapple, 1999; Moranta *et al.*, 2010; Rogan *et al.*, 2006; Selsted and Ouellette, 2005).

A continuación, se describe en la **Tabla 1** la estructura, distribución y actividad de las principales proteínas y péptidos antimicrobianos.

Tabla 1. Proteínas y péptidos antimicrobianos de las vías respiratorias

Proteínas y péptidos	Células productoras	Actividades
Lisozima	MAs, PMNs, células epiteliales	-Bactericida frente a bacterias Gram positivas y negativas
Lactoferrina	PMNs	-Limita la cantidad de hierro disponible. -Desestabiliza la membrana externa. -Altera la permeabilidad de la membrana externa en Gram negativas
SLPI	MAs, PMNs, Células epiteliales	Bactericida frente a Gram positivas y negativas

Defensinas α	HNP-1 a -4	PMNs Células epiteliales	-Permeabilizan las membranas microbianas -Activan el complemento -Aumentan la adhesión de los PMNs -Estimulan la producción de citoquinas
	HD-5 y -6		- Participan en la regeneración tisular -Bactericida frente a Gram positivas y negativas
β	hBD-1		
	hBD-2 y -3		
	hBD-4		
	hBD-5		
θ			
Catelicidina LL-37		Células epiteliales	-Bactericida -Modula la repuesta inmune
BPI		PMNs	Bactericida frente bacterias Gram negativas
Colectinas SP-A SP-D		Neumocitos tipo II Células clara	-Inhiben la adhesión microbiana -Estimulan la fagocitosis -Modulan la producción de citoquinas -Actividad quimiotáctica y bactericida

MAs: macrófagos alveolares; **PMNs:** células polimorfonucleares; **SLPI:** del inglés *secretory leucoprotease inhibitor*; **HNP:** del inglés *human neutrophil protein*; **HD:** del inglés *human defensin*; **hBD:** del inglés *human beta-defensin*; **BPI:** del inglés *bacteria permeability increasing protein*; **SP:** del inglés *surfactant protein*

1.2 Inmunidad innata celular

Como se ha indicado anteriormente, la inmunidad innata celular es dependiente del **epitelio respiratorio** y las **células fagocíticas** (Fig. 2).

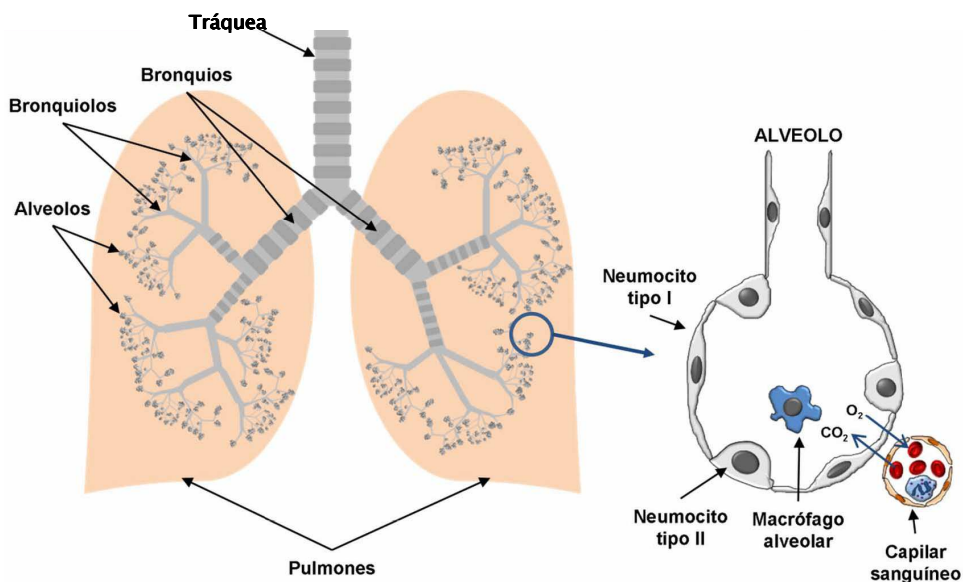


Figura 2. Representación esquemática del tracto respiratorio inferior. Detalle de un alveolo pulmonar (derecha).

1.2.1 El epitelio respiratorio

El epitelio respiratorio es una barrera física que separa la superficie luminal del medio interno, formado por células epiteliales alveolares o también llamados neumocitos tipo I y II (**Fig. 2**). Los **neumocitos tipo I** representan aproximadamente un 95% de la superficie alveolar, son células alargadas y aplanadas para facilitar el intercambio de gases y no tienen capacidad de división. Los **neumocitos tipo II** ocupan aproximadamente un 5% de la superficie alveolar, se disponen entremezclados con los neumocitos tipo I y tienen capacidad de división y de reparación del epitelio alveolar ya que son capaces de diferenciarse a neumocito tipo I (Castranova *et al.*, 1988; Féréol *et al.*, 2008; Mason, 2006;).

Entre otras funciones, los neumocitos tipo II son los encargados de la síntesis, secreción y reabsorción del surfactante pulmonar (SP). Éste está formado por diversas proteínas y lípidos e impide el colapso de los alvéolos además de poseer actividad antimicrobiana y antiinflamatoria debida, en parte, a las colectinas SP-A y SP-D. Así, Wu y colaboradores (Wu *et al.*, 2003) demostraron que tanto SP-A como SP-D tienen actividad bactericida frente a bacterias Gram negativas. Además, varios trabajos indican que, tanto SP-A como SP-D, pueden actuar como opsoninas y, por tanto, facilitar la fagocitosis de los microorganismos (Sahly *et al.*, 2008). Finalmente, la evidencia disponible sugiere que estas proteínas también modulan la respuesta de macrófagos frente a patógenos y, por tanto, participan en el control de la inflamación (Kuroki *et al.*, 2007; Rubovitch *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Los neumocitos tipo II también son capaces de producir componentes del sistema del complemento (Mason, 2006). Asimismo, los neumocitos tipo II intervienen en el transporte de agua y sodio, y en el metabolismo de compuestos xenobióticos (Mason, 2006).

1.2.2 Los macrófagos alveolares

Los fagocitos profesionales presentes en el tracto respiratorio son responsables de la eliminación de los microorganismos mediante la fagocitosis y procesamiento fagolisosomal del material fagocitado. Las principales células fagocíticas residentes en el tracto respiratorio son los macrófagos alveolares. Son células móviles que provienen de monocitos sanguíneos generados por

hematopoyesis en la médula ósea (Gordon and Read, 2002). Los macrófagos alveolares ingieren material exógeno de 0,4 a 25 μm de diámetro previamente reconocido a través de un amplio espectro de receptores celulares presentes en la membrana plasmática. Estos receptores reconocen y se unen a ligandos presentes en la superficie bacteriana o a las opsoninas que la recubren. La unión ligando-receptor determina el inicio del proceso de **fagocitosis** (Underhill and Ozinsky, 2002). Una vez la partícula se ha unido al receptor correspondiente, ésta es rodeada por pseudópodos, protusiones de la membrana del fagocito producida mediante la reorganización coordinada del citoesqueleto, e internalizada en una vesícula llamada **fagosoma**. El fagosoma formado no es bactericida (la membrana que la envuelve es membrana plasmática y el fluido contenido en el interior es una muestra de medio extracelular), por tanto deberá sufrir una drástica conversión para adquirir características microbicidas y degradativas. Esta conversión es conocida como **maduración fagosomal** y supone una secuencia de eventos de fusión y fisión y adquisición/pérdida de proteínas que dan como resultado la transición por una serie de compartimentos (fagosomas tempranos, fagosomas tardíos y fagolisosomas) (Flannagan *et al.*, 2009; Hass, 2007; Vieira *et al.*, 2002).

Además, los macrófagos alveolares generan mediadores inflamatorios que facilitan el reclutamiento de otros macrófagos y neutrófilos circulantes en el torrente sanguíneo así como la activación celular.

Los macrófagos se pueden encontrar en diversos estadios funcionales definidos por marcadores específicos. Desde el punto de vista académico, los extremos de todo el posible abanico de estadios de activación del macrófago se han denominado M1 y M2. Cuando el macrófago está expuesto a IFN o a componentes bacterianos, como por ejemplo el LPS, el macrófago deriva hacia la forma M1 con gran capacidad microbicida (Benoit *et al.*, 2008; Gordon 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Mosser and Edwards, 2008). Los macrófagos M1 expresan niveles elevados de receptores opsónicos (CD16), moléculas coestimuladoras (CD80, MHC II), TLR2 y TLR4. También producen elevados niveles de citoquinas y quimioquinas y liberan intermediarios reactivos del nitrógeno y oxígeno. Los macrófagos M2 se caracterizan por elevados niveles de receptores no opsónicos (scavenger receptors, receptor de manosa), CD14 y CD23 y producen elevados niveles de IL-10 y TGF, y bajos niveles de

citoquinas proinflamatorias (Benoit *et al.*, 2008; Gordon 2003; Mantovani *et al.*, 2004).

1.2.2.1 La maduración fagolisosomal

Inmediatamente después de la formación del fagosoma, éste debe ir remodelando su membrana y cambiando la composición del lumen integrándose en la ruta endocítica mediante eventos de fusión que comunican de forma unidireccional fagosomas tempranos, fagosomas tardíos y fagolisosomas. El fagolisosoma es el compartimento final de la maduración caracterizado por poseer un pH muy bajo, enzimas hidrolíticas para la digestión de partículas, defensinas y otros péptidos bactericidas y la habilidad de generar compuestos oxidativos tóxicos (Flannagan *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2002).

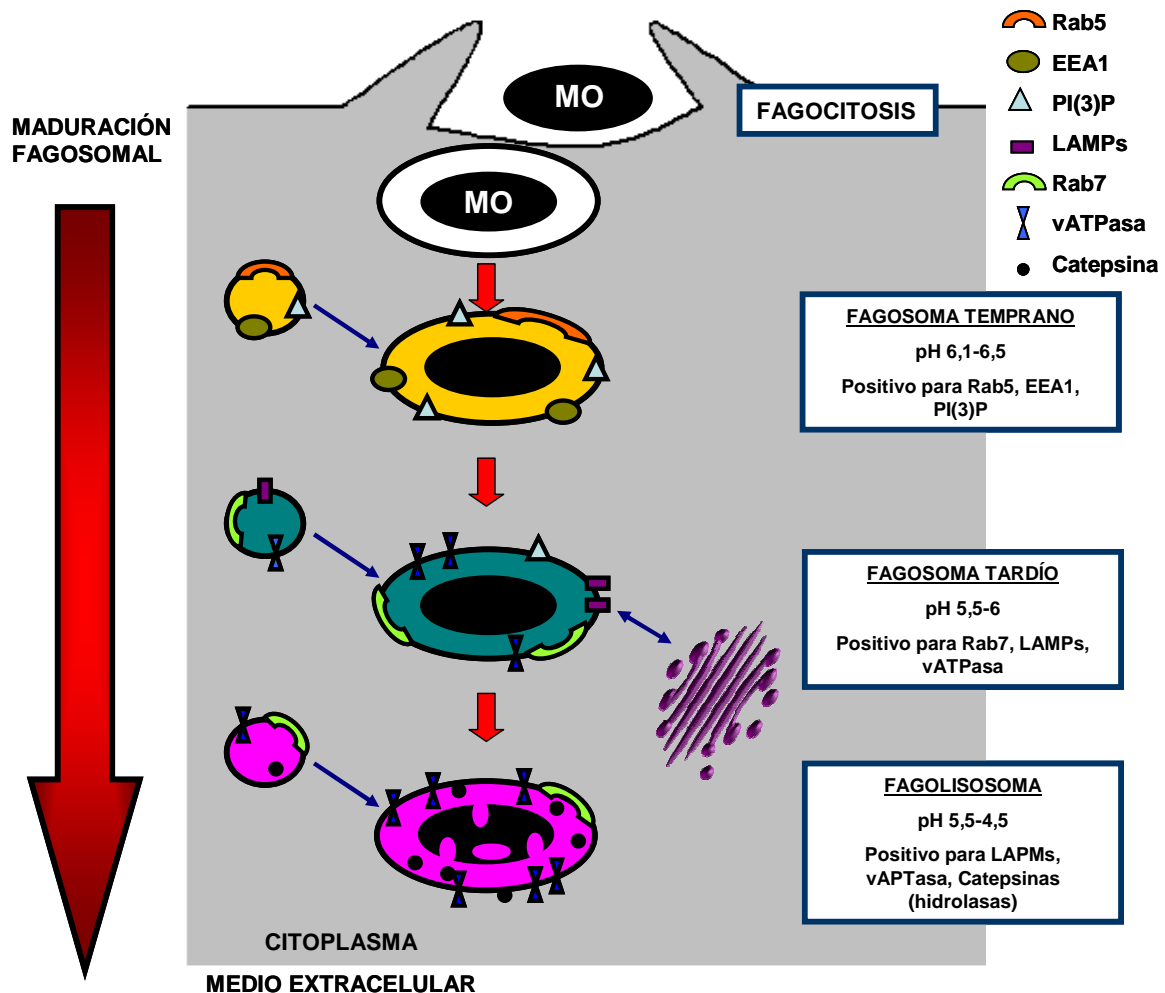


Figura 3. Representación esquemática de la ruta endocítica. Los fagosomas se fusionan con vesículas de la ruta endocítica en sucesivos estadios de maduración, hasta fusionarse con los lisosomas. Los principales marcadores de la vacuola, así como el pH, están indicados para los distintos estadios de maduración.

Garin y colaboradores (Garin *et al.*, 2001) caracterizaron más de 250 proteínas presentes en los fagosomas, entre ellas calnexina y calreticulina, proteínas presentes en el retículo endoplasmático (RE). Además, en el 2002, el grupo de Michel Desjardins propone un modelo en el que los fagosomas se forman por una asociación y fusión directa de distintas regiones del RE a la membrana plasmática durante el proceso de fagocitosis y durante los diferentes pasos de la maduración del fagosoma (Gagnon *et al.*, 2002) (**Fig. 3**).

Fagosomas tempranos. Los fagosomas formados tienen un lumen relativamente ácido (pH 6,1 - 6,5), una actividad hidrolítica pobre y rápidamente adquieren marcadores de endosoma temprano como Rab 5 y EEA1 (del inglés *early endosome antigen 1*). Las fosfatidilinositol 3 quinazas (PI3Ks) son reguladores clave en la formación y maduración del fagosoma (Gillooy *et al.*, 2001). Una de las principales funciones es la activación de GTPasas, las cuales controlan algunos aspectos del tráfico celular como la formación y movilidad de vesículas, transporte y las fusiones entre vesículas (Brumell and Scidmore, 2007; Somel and Wandinger-Ness, 2000; Zerial and McBride, 2001). El fosfatidilinositol 3 fosfato (PI(3)P), una PI3K de clase III, es esencial para la maduración del fagosoma. Así activa la GTPasa Rab 5 necesaria para reclutar EEA-1, la cual promueve la unión y fusión de otros orgánulos endocíticos tempranos. PI3P estabiliza la unión entre EEA1 y Rab 5 (Cameron *et al.*, 2002; Flannagan *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2002).

Fagosomas tardíos. Estos fagosomas están caracterizados por una mayor acidificación del lumen (pH 5,5 - 6). La acidificación es dependiente de la adquisición adicional de bombas de protones vATPasas (Lukacs *et al.*, 1990). El fagosoma tardío está enriquecido con proteasas y proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMPs) importadas del Golgi o adquiridas por fusiones con endosomas tardíos. La GTPasa Rab 7 es un marcador característico de este estadio y la evidencia disponible indica que media el tráfico entre fagosomas tardíos a lisosomas. Rab7 recluta algunos efectores a la membrana vacuolar como RILP (del inglés *Rab-interacting lysosomal protein*), el cual, a su vez, promueve la fusión entre los fagosomas tardíos y los lisosomas. En los fagosomas tardíos, también se puede detectar la presencia de Rab 9, receptor

manosa-6-fosfato y ácido lisobifosfatídico (LBPA) (Bucci *et al.*, 2000; Flannagan *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2003; Jordens *et al.*, 2001).

Fagolisosomas. Es el último proceso de la maduración de la ruta endocítica. El fagolisosoma está dotado de un completo y sofisticado armamento para la eliminación y degradación del microorganismo. Se origina por la fusión con lisosomas en un proceso Rab7 dependiente. El pH del lumen es muy ácido, pH 4,5 o inferior, debido a la adquisición de vATPasas adicionales. Los fagolisosomas se pueden diferenciar de los fagosomas tardíos por la escasez de LBPA o PI(3)P (Gillooly *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1998) en la membrana interna, por la ausencia de receptores manosa-6-fosfato (Griffiths *et al.*, 1988) y por el alto contenido en endo y exopeptidasas e hidrolasas, como, por ejemplo, las catepsinas (Flannagan *et al.*, 2009; Gruenberg and Van der Goot, 2006).

1.2.2.2 Estrategias de vida intracelular

A pesar del complejo mecanismo que la célula tiene para defenderse de los microorganismos, éstos han desarrollado diversas estrategias para poder sobrevivir intracelularmente (Alonso and García del Portillo, 2004; Flannagan *et al.*, 2009; Gruenberg and Van der Goot, 2006; Hass, 2007; Hybiske and Stephens, 2008).

Algunos patógenos **inhiben la fagocitosis**. Por ejemplo, *Escherichia coli* enteropatógena bloquea la señalización de PI3K, imprescindible para la fagocitosis (Celly *et al.*, 2001). *Yersinia enterocolitica* inhibe la polimerización de actina gracias a unas proteínas (Yops) secretadas por el sistema tipo III de secreción (Rosqvist *et al.*, 1990). Por su parte, otros patógenos **escapan de la ruta endocítica** evitando la fusión con lisosomas para, posteriormente, romper la vacuola y escapar al citoplasma como es el caso de *Listeria monocytogenes* (Shaughnessy *et al.*, 2006). Otra estrategia es **arrestar la maduración fagosomal** en un estado de prefagolisosoma con el fin de crear un nicho óptimo para replicarse. Un típico ejemplo es *Mycobacterium tuberculosis* que reduce los niveles de PI(3)P de los fagosomas tempranos parando la ruta en este estadio (Russell, 2001; Vergne *et al.*, 2005), *Rhodococcus equi* también arresta la maduración del fagosoma durante la transición endosoma temprano a tardío (Fernández-Mora *et al.*, 2005). Otros patógenos, en cambio, **modifican**

o desvían la maduración del fagosoma y las respuestas inflamatorias para evitar su muerte. Así, por ejemplo, algunos patógenos residen en vacuolas que no tienen carácter endocítico, como *Legionella pneumophila* que replica en el interior de una gran vacuola ácida que comparte características con el RE (Kagan and Roy, 2002; Sturgill-Koszycki and Swanson, 2000). Otro ejemplo es *Chlamydia spp.* que reside en una vacuola con esfingolípidos o colesterol que capta del Golgi (Carabeo *et al.*, 2003; Wolf and Hackstadt, 2001). Por su parte, *Brucella abortus* transita temporalmente por la ruta endocítica pero, al final, crea un nicho intracelular favorable para replicarse en el RE (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998). *Salmonella* arresta la maduración en un compartimento ácido y positivo para Rab5 mediante el control de la actividad de Rab7 (Holden, 2002; Méresse *et al.*, 1999). Finalmente, hay patógenos que **retrasan la formación del fagolisosoma**, pero no permanentemente, como el caso de *Coxiella burnetii*, que reside en un compartimento tipo lisosoma ácido, con algunas proteínas lisosomales y con la vATPasa, donde llega a replicarse incluso, en presencia de algunos factores antimicrobianos (Heinzen *et al.*, 1996).

1.3 Inflamación

La inflamación es una de las primeras respuestas del sistema inmune innato ante una infección o un daño (Barton, 2008; Mizgerd, 2008). Numerosas células y moléculas están implicadas en esta respuesta del organismo, pero los aspectos críticos son el control de la migración de las poblaciones leucocitarias y la presencia, en concentraciones elevadas, de diversas citoquinas (TNF- α o IL-1), secretadas tanto por neutrófilos, como macrófagos y células epiteliales (Luster *et al.*, 2005).

La duración e intensidad de una respuesta inflamatoria aguda local deben ser cuidadosamente reguladas con el fin de facilitar la eliminación del patógeno y la reparación del daño tisular pero sin llegar a comprometer la funcionalidad del tejido. Así, los mecanismos implicados en la resolución de la inflamación ya se activan transcurridas pocas horas tras el inicio del proceso inflamatorio. Las principales moléculas implicadas en el proceso de resolución son la citoquina anti-inflamatoria IL-10, el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) y diversos mediadores lipídicos como las lipoxinas (Moore *et al.*, 2001; Nathan, 2002; Takabayshi *et al.*, 2006; Serhan and Savill, 2005).

Los principales tipos celulares del tracto respiratorio implicados en la respuesta inflamatoria son el **epitelio** y los **fagocitos profesionales**. Estas células expresan unos receptores denominados PRRs (del inglés *pattern recognition receptors*), claves en el reconocimiento de una serie de estructuras conservadas expresadas por los microorganismos, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) (Mogensen, 2009).

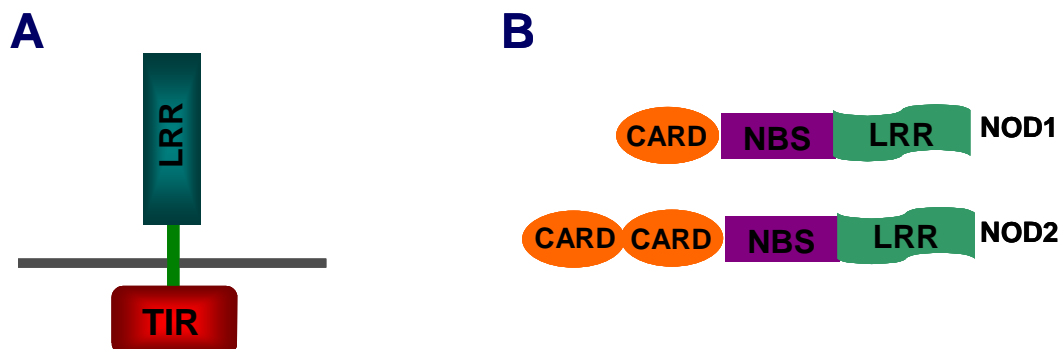


Figura 4. Receptores del sistema inmune innato. (A) TLR con un dominio transmembrana LRR y un dominio citoplasmático TIR. (B) NLR con un dominio C-terminal (LRR), un dominio intermedio (NBS) y el dominio N-terminal (CARD).

Los PRRs mejor caracterizados son los receptores TLR (del inglés *Toll like receptors*) y los receptores NLR (del inglés *nucleotide binding and oligomerization domain-like receptors*) (Janeway and Medzhitov, 2002; Kumar *et al.*, 2009) (**Fig. 4**). La interacción PAMP-PRR activa un número reducido de factores de transcripción: el factor NF- κ B, las MAP quinasas (del inglés, *mitogen-associated protein*) y los IRFs (del inglés *interferon regulatory factor*) (Barnes *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2002; Hayden and Ghosh, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2007). Entre los genes controlados por estos factores se incluyen los que codifican para diversas citoquinas inflamatorias, los IFNs y los péptidos antimicrobianos (Bals and Hiemstra, 2004; Kumar and Valdivia, 2009; Trinchieri and Sher, 2007). Entre las citoquinas hay que destacar la IL-8, principal citoquina expresada por células epiteliales infectadas y que actúa de señal para atraer a las células polimorfonucleares a los lugares de infección (Craig *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2002).

Existen otros receptores, como por ejemplo la familia de los denominados *scavenger receptors* (SRs) que no activan vías de señalización intracelulares pero participan en la fagocitosis o actúan de forma subsidiaria con otros PRRs. Estos receptores reconocen moléculas expresadas en macrófagos y determinadas células endoteliales con una especificidad por ligandos polianiónicos (Aderem and Underhill, 1999; Gordon and Read, 2002).

La subversión de las respuestas inflamatorias son importantes para la supervivencia intracelular, al menos, en los primeros estadios de la infección, aunque no se sabe mucho acerca de los mecanismos utilizados por la mayoría de los patógenos (Finlay and McFadden, 2006; Roy and Mocarski, 2007). Las estrategias mejor caracterizadas son la modificación de los PAMPs para evitar ser reconocidos por los PRRs y la alteración de las vías de señalización intracelulares implicadas en la defensa (Hajishengallis and Lambris, 2011; Bhavsar *et al.*, 2007; Portnoy, 2005)

1.3.1 Los receptores TLR

Los estudios sobre estos receptores se iniciaron después del descubrimiento de la proteína Toll, proteína que juega un papel importante en la defensa contra las infecciones fúngicas en *Drosophila* (Lemaitre, *et al.*, 1996). Estudios posteriores permitieron el descubrimiento de los TLRs en el hombre (Medzhitov *et al.*, 1997).

Tabla 2. TLRs y sus ligandos.

TLR	Localización	Ligando
TLR1	Membrana plasmática	Triacil lipoproteínas
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteínas
TLR3	Endolisosoma	RNA doble cadena
TLR4	Membrana plasmática	LPS
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina
TLR6	Membrana plasmática	Diacil lipoproteínas
TLR7 (TLR8 humano)	Endolisosoma	RNA cadena simple

TLR9	Endolisosoma	Motivos CpG del ADN
TLR10	Endolisosoma	Desconocido
TLR11	Membrana plasmática	<i>Profilin-like molecules</i>

Los TLRs son un conjunto de proteínas de membrana que reconocen lípidos, carbohidratos, péptidos y ácidos nucleicos presentes en los microorganismos (Trinchieri and Sher, 2007). Hasta el momento, se han identificado 11 TLR en mamíferos y 12 en ratones. Estructuralmente, se componen de un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR) responsable del reconocimiento de los PAMPs y un dominio citoplasmático (TIR) necesario para iniciar la cascada de señales intracelulares (Kawai and Akira, 2007; Takeuchi and Akira, 2010). En la **Tabla 2** se resumen la localización y algunos de los ligandos reconocidos por los diferentes TLRs. De entre todos ellos, los receptores TLR2 y TLR4 han sido los más estudiados en el contexto de las neumonías bacterianas. A continuación, se resumen brevemente sus principales características:

TLR2 reconoce un rango estructuralmente diverso de PAMPs bacterianos, de virus, de micobacterias y de hongos. Entre estos componentes se incluyen, por ejemplo las lipoproteínas o lipopéptidos de las especies de *Mycoplasma* o *E. coli*, o el peptidoglicano de *S. aureus* o *S. pneumoniae*. TLR2 reconoce sus ligandos formando heterodímeros con TLR1 o TLR6. Más aún, la posibilidad de TLR2 de formar heterodímeros con TLR1 o TLR6 le permite discriminar entre diferentes PAMPs, como, por ejemplo, distinguir entre triacil y diacil lipopéptidos. Dependiendo del tipo celular, las respuestas de TLR2 serán diferentes. Así, después de la interacción de TLR2 con su ligando se induce la producción de varias citoquinas proinflamatorias, pero no de IFNs en macrófagos y células dendríticas. En cambio TLR2 en monocitos inflamatorios inducen IFNs tipo I en respuesta a una infección viral (Barbalat *et al.*, 2009).

TLR4 reconoce las moléculas de lipopolisacárido (LPS) presentes bien en la membrana externa de las bacterias Gram negativas o solubles (Takeda and Akira, 2003). Además de TLR4, CD14 y LBP también participan en el

reconocimiento del LPS. Así, LBP, proteína de unión al lipopolisacárido, presente en el suero y en diversas mucosas, une el LPS y este complejo LPS-LBP es reconocido por CD14. Ésta es una proteína glicosil-fosfatidil-inositol anclada en la membrana, aunque también existe de forma soluble. La estimulación con el LPS induce un incremento en la proximidad física entre CD14 y TLR4 indicando que CD14 y TLR4 pueden interaccionar en la señalización del LPS. MD-2 se identificó como una molécula que se asocia con el dominio extracelular de TLR4 y aumenta la respuesta al LPS (Akashi *et al.*, 2000; da silva *et al.*, 2001; Shimazu *et al.*, 1999). MD-2 se asocia con TLR4 en el retículo endoplasmático/cis Golgi y luego el complejo TLR4/MD-2 se transloca a la superficie celular, mientras que el exceso de MD-2 es secretado. Normalmente, TLR4 se encuentra en la superficie celular pero aparece en el aparato de Golgi en aquellas células deficientes en MD-2 lo que indica que MD-2 es esencial para el tráfico de TLR4 a la superficie. TLR4 también reconoce moléculas endógenas como fibronectina o ácido hialurónico (Takeda and Akira, 2005). TLR4 también está implicado en el reconocimiento de virus uniéndose a proteínas de la envoltura viral como la de MMTV (virus del tumor mamario de ratón) o la proteína de fusión de VRS (virus respiratorio sincitial) (Burzyn *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2008; Kurt-Jones *et al.*, 2000). La importancia de las respuestas dependientes de la activación de TLR4 en las neumonías causadas por patógenos Gram-negativos fue puesta de manifiesto por Schurr y colaboradores (Schurr *et al.*, 2005). Así, estos autores demostraron elegantemente que en ratones infectados intranasalmente la señalización vía TLR4 controla la expresión de la mayoría de los genes que determinan la supervivencia del huésped tras una infección causada por bacterias Gram negativas (Schurr *et al.*, 2005). En otro trabajo, se demostró que tanto CD14 como TLR4 son indispensables para activar *in vivo* respuestas defensivas frente *Acinetobacter baumannii* y su LPS (Erridge *et al.*, 2007; Knapp *et al.*, 2006;). Las respuestas inmunes innatas del pulmón dependientes de la activación de TLR4 también son esenciales para eliminar *Pseudomonas aeruginosa* y prevenir el daño letal en el pulmón así como la bacteremia (Faure *et al.*, 2004).

La distribución de los TLR ha sido ampliamente estudiada. Los monocitos/macrófagos expresan el ARNm así como la proteína de la mayoría de los TLR, excepto el TLR3 (Muzio *et al.*, 2000). Las células epiteliales que bordean el tracto respiratorio también expresan TLRs, aunque existe cierta controversia sobre la localización de los TLR4. Algunos trabajos indican que se expresa en compartimentos intracelulares (Guillot *et al.*, 2004; Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2003) mientras que otros, muestran que TLR4 se expresa en la superficie celular (Armstrong *et al.*, 2004b; Birchler *et al.*, 2001; Monick *et al.*, 2003; Regueiro *et al.*, 2006). En cualquier caso, en condiciones inflamatorias TLR4 se expresa predominantemente en la superficie de la célula y esto se correlaciona con un incremento en la respuesta frente al LPS (Fan *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2003; Monick *et al.*, 2003). La regulación de la expresión de los TLRs está modulada fundamentalmente por PAMPs y citoquinas. Por ejemplo, el IFN γ y el TNF α incrementan la expresión de TLR2 y TLR4 en monocitos, macrófagos y células epiteliales pulmonares (Abreu *et al.*, 2002; Armstrong *et al.*, 2004a; Armstrong *et al.*, 2004 b).

1.3.2 Los receptores NLR

Son receptores citosólicos que pueden servir como segundo sistema centinela para detectar patógenos invasivos o algún otro daño. La familia NLR está formada por 23 proteínas en humanos y 34 en ratones (Kanneganti *et al.*, 2007). Los miembros mejor caracterizados dentro de la familia de los NLRs son NOD1 (también conocido como CARD4) y NOD2 (CARD15). Se pueden distinguir tres dominios estructurales (**Fig. 4**): (i) un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR) responsable del reconocimiento del ligando, (ii) un dominio NBS central (del inglés *nucleotid binding site*) con actividad ATPasa y (iii) un dominio aminoterminal o CARD (del inglés *caspase activating and recruitment domain*) que media la interacción proteína-proteína (Martinón *et al.*, 2005). Hay evidencias que indican que estos receptores reconocen péptidos derivados del peptidoglicano. Mientras que NOD1 reconoce el dipéptido iE-DAP (ácido γ -D-glutamyl-m-diaminopimélico), NOD2 reconoce el motivo muramil dipéptido (MDP) (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003b; Inohara *et al.*, 2005). Después de la interacción de estos ligandos con los receptores NOD1 y NOD2 se activan los mismos factores de señalización indicados anteriormente

con el fin de activar la secreción de péptidos antimicrobianos y citoquinas inflamatorias (Kumar *et al.*, 2009).

Aunque los mecanismos moleculares que activan los receptores NLRs son todavía poco conocidos, sí existen ejemplos de bacterias reconocidas por los receptores NOD1 y/o NOD2. Experimentos *in vitro* muestran que *E. coli* (Kim *et al.*, 2004), *Shigella flexneri* (Girardin *et al.*, 2003a), *Chlamydia species* (Buchholz and Stephens, 2008), *Campylobacter jejuni* (Zilbauer *et al.*, 2007), *Haemophilus influenza* (Ratner *et al.*, 2007) y *P. aeruginosa* (Travassos *et al.*, 2005) son detectados por NOD1, mientras que *Streptococcus pneumoniae* (Opitz *et al.*, 2004) o *M. tuberculosis* (Ferwerda *et al.*, 2005) son detectadas por NOD2. Se ha descrito que *L. monocytogenes* es detectada tanto por NOD1 como por NOD2 (Hasegawa *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2005). Pero la relevancia *in vivo* de NOD1 y NOD2 se demuestra claramente en infecciones bacterianas con *Helicobacter pylori* y *L. monocytogenes*. Ratones con una delección en el gen *nod1* mostraron un incremento en la susceptibilidad a *H. pylori* (Viala *et al.*, 2004). En este trabajo se muestra como este patógeno gástrico considerado como un patógeno extracelular inyecta los derivados del peptidoglicano al citosol a través de un sistema tipo IV de secreción, lo que conlleva la activación de NOD1 y la subsecuente secreción de citoquinas y el reclutamiento de neutrófilos (Masumoto *et al.*, 2006; Fructuoso *et al.*, 2010; William *et al.*, 2010). También se observó un incremento en la carga bacteriana en ratones con el gen *nod2* mutado infectados con *L. monocytogenes* (Kobayashi *et al.*, 2005). Recientemente, se ha demostrado que NOD2 también está implicado en la activación de respuestas inmunitarias contra infecciones respiratorias por el virus sincitial (Sabbah *et al.*, 2009)

Como ya se ha comentado anteriormente para los TLR, la expresión de los NLRs también está modulada por la propia infección y citoquinas. Así, se ha demostrado que el IFN γ incrementa la expresión de NOD1 en células epiteliales (Hisamatsu *et al.*, 2003) y que el TNF α junto con el IFN γ regulan la expresión de NOD2 (Rosentiel *et al.*, 2003).

1.3.3 Vías de señalización mediadas por TLRs y NLRs

Los TLRs, exceptuando el TLR3, interaccionan con una proteína adaptadora denominada **MyD88**, adaptador universal que recluta algún miembro de la

familia **IRAK** (familia compuesta por cuatro miembros, IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M e IRAK-4) que, a su vez, se fosforila y se asocia con **TRAF6** (un miembro de la familia TRAF) lo que procede a la activación de las vías de señalización de las MAPKs y del NF- κ B (Kawai and Akira, 2007).

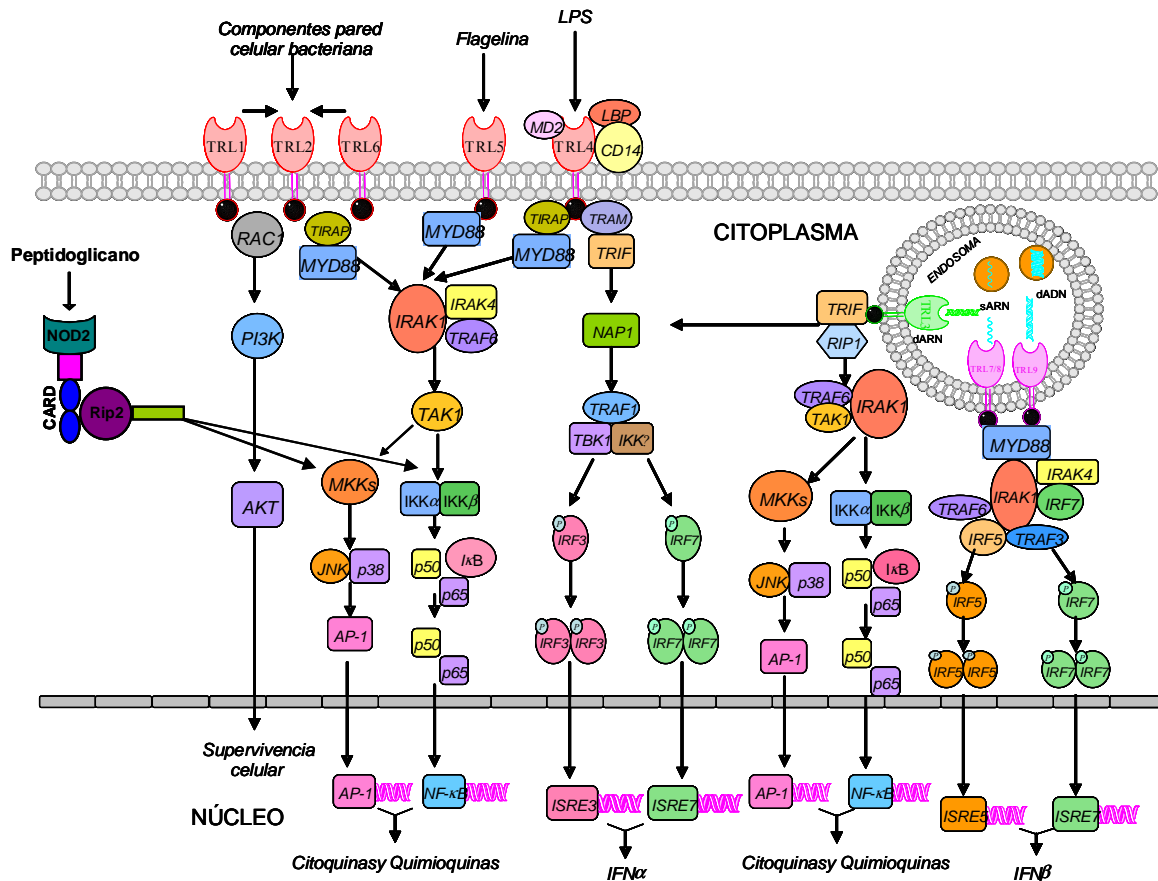


Figura 5. Vías de señalización de los receptores TLR y NLR. Se indican los PAMPs bacterianos reconocidos por los TLRs y los NLRs y la activación de las vías de señalización intracelulares del NF- κ B y de las MAPKs que tienen lugar en las células después de la activación de estos receptores. Como resultado se activan los genes responsables de que median la respuesta inflamatoria.

En los macrófagos MyD88-deficientes no se induce la activación de NF- κ B o de las MAPKs en respuesta a peptidoglicano o lipoproteínas. En cambio, tras una estimulación con LPS o dsDNA sí se activan estas vías. Estos datos indican la existencia de una vía independiente de MyD88 que interviene tanto en la señalización de TLR3 como de TLR4 (Takeda and Akira, 2003; Hawaii *et al.*, 1999). Esta vía de señalización activa principalmente el factor de transcripción IRF-3, que induce la expresión de IFN- β y, consecuentemente, la activación de Stat1, el cual, a su vez, induce la expresión de genes inducidos por IFN en

macrófagos y células dendríticas (Doyle, 2002; Hoshino, 2002; Kawai, 2001; Toshchakov, 2002). Aunque los mecanismos de la vía de señalización MyD88 independiente sean poco conocidos se ha identificado una molécula denominada TRIF (o TICAM-1) crucial para la señalización inducida por TLR3 y TLR4 y otra proteína llamada TRAM (o TIRP) específica para la vía MyD88 independiente de TLR4 (Yamamoto, 2003 a y b) (**Fig. 5**)

En el caso de NOD1 y NOD2 los dominios CARD se asocian con una proteína-quinasa RIP2, también conocida como RICK o CARDIAK, lo que conlleva la activación de la cascada de señalización intracelular del NF- κ B y de las MAP quinasas (Janeway and Medzhitov, 2002; Park *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009) (**Fig. 5**).

1.3.3.1 Vía de señalización del NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B es activado por numerosos estímulos y regula un gran número de genes, es por ello que ha sido, y todavía es, ámpliamente estudiado. La forma activada del NF- κ B es un heterodímero, formado generalmente por dos proteínas, la subunidad p65 (también llamada RelA) y la subunidad p50. Otras subunidades que también pueden formar parte del NF- κ B activado pueden ser Rel, v-rel o p52 y es probable que las diferentes formas del NF- κ B puedan activar diferentes grupos de genes diana. En células no estimuladas, el factor de transcripción NF- κ B se encuentra unido a I κ B en el citoplasma lo que evita su translocación al núcleo. También existen diferentes proteínas I κ B (I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ).

La vía del NF- κ B se puede activar de forma canónica y no canónica según intervenga I κ B o p100. Nos vamos a centrar en la vía canónica que es la principal forma activada en respuesta a los diferentes PAMPs. Tras una estimulación, se activa el complejo IKK formado por dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora NEMO (también conocida como IKK γ). Experimentos genéticos han demostrado que IKK β , y no IKK α , fosforila a I κ B α . Esta fosforilación causa la poli-ubiquitinación de I κ B y su posterior degradación por el sistema del ubiquitin proteosoma, lo que permite la translocación al núcleo del NF- κ B. La ubiquitinación regula al menos tres pasos en la vía del NF- κ B: la degradación de I κ B (inhibidor del NF- κ B), el

procesamiento de los precursores del NF- κ B y la activación de la kinasa I κ B (IKK) (Barnes, 1997; Chen, 2005; Han and Ulevitch, 2005; Hayden and Ghosh, 2008; Skaug *et al.*, 2009) (**Fig. 6**).

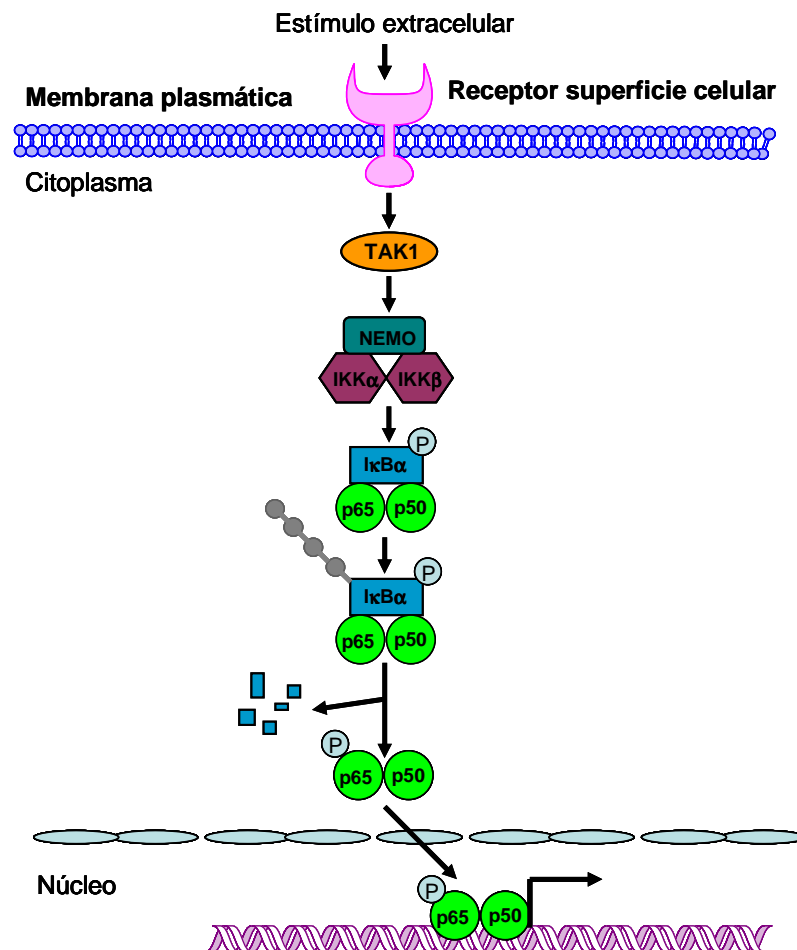


Figura 6. Diagrama de activación del NF- κ B. Después de la activación del receptor con su ligando se reclutan una serie de proteínas adaptadoras que conducen a la activación canónica del NF- κ B. La activación de IKK conduce a la fosforilación y posterior degradación de I κ B. NF- κ B fosforilado se transloca al núcleo donde se une a los elementos κ B del ADN e induce la transcripción de los genes diana.

1.3.3.2 Vía de señalización de las MAP quinasas

Las MAP quinasas son un grupo de proteínas quinasas serina/treonina muy conservadas que tienen un papel importante en procesos celulares como en la proliferación, respuestas de estrés, apoptosis y en la defensa inmune (Diamond *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007).

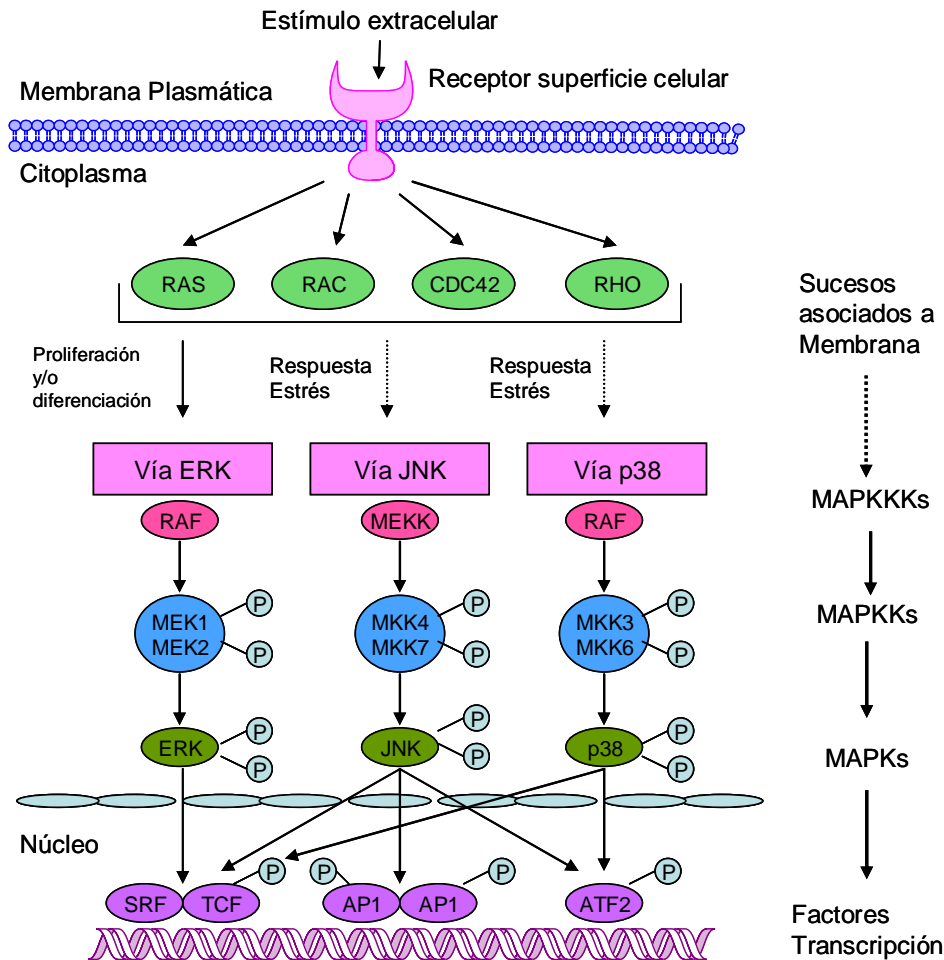


Figura 7. Diagrama de activación de las MAP quinasas (MAPK). Un estímulo externo activa la vía de las MAPK a través de unos mecanismos mediados por GTPasas, como RAS, RAC, CDC42 y RHO. Unas MAPKKKs (MAPK quinasa quinasa), como RAF, MEKK (MAPK/ERK quinasa quinasa) y TAK (quinasa activada TGFb), son activadas y fosforilan las MAPKKs (MAPK quinasa) en dos residuos de serina. Las MAPKKs fosforilan las MAPKs: ERK (quinasa regulada por la señal extracelular), JNK (quinasa terminal N JUN) y p38 en ambos residuos de treonina y tirosina, que resultan en la activación catalítica de estas MAPKs. La activación de las MAPKs puede translocar al núcleo diversos factores de transcripción, como el TCF, AP-1 o el ATF2 dando lugar a la transcripción de diversos genes.

Existen tres vías de señalización de MAP quinasas bien definidas en las células de mamíferos (Pearson, 2001; Liu, 2007) (**Fig. 7**):

* Vía de la MAPK ERK 1/2 (p44/42) (del inglés *extracellular-signal-regulated kinase*). Esta vía se activa por diferentes estímulos tales como factores de crecimiento, citoquinas, infecciones virales, etc.

* Vía de la MAPK JNK (p46/54) (del inglés *JUN N-terminal kinase*) conocida también como MAPK8. Es responsable de la unión y fosforilación de la proteína

de unión al ADN c-Jun y por tanto, regulan su actividad transcripcional. c-Jun es un componente del complejo transcripcional AP-1, que es un importante regulador de la expresión génica. Las JNK son importantes reguladoras de la apoptosis.

* Vía de la MAPK p38, conocida también como MAPK14. Regula la expresión de algunas citoquinas, desempeñando, de esta manera, un papel importante en la activación de la respuesta inmune.

Tanto la MAP quinasa JNK como la p38 están activadas por citoquinas inflamatorias, hormonas y situaciones de estrés entre otros, y juegan un papel importante en la activación de la respuesta inmune. Las tres vías de MAPK también se activan a través de una cascada de fosforilaciones secuenciales. (Liu *et al.*, 2007; Johnson and Lapadat, 2002).

2. EL GÉNERO *Klebsiella*

El género *Klebsiella* debe su nombre al científico alemán Edwin Klebs (1834-1913). La primera clasificación del género *Klebsiella* se basó en criterios clínicos y permitió diferenciar tres especies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Esta clasificación original fue revisada en repetidas ocasiones debido a la utilización de métodos taxonómicos moleculares. En la actualidad predomina la clasificación establecida por Orskov en 1984, que agrupa bajo el nombre de *K. pneumoniae* las subespecies *K. pneumoniae* subespecie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespecie *ozaenae* y *K. pneumoniae* subespecie *rhinoscleromatis*. Posteriormente, se han incluido otras especies dentro del género *Klebsiella*, como *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. mobilis*, *K. planticola* y *K. terrigena* (Podschun and Ullmann, 1998).

2.1. Características generales

Las bacterias que forman el género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos que se pueden encontrar de manera individual, formando pares o incluso cadenas cortas. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y son anaerobias facultativas y no móviles. Las especies de *Klebsiella* generalmente se identifican y diferencian en base a reacciones bioquímicas. El género *Klebsiella* es ubicuo. Así, cepas de este género se encuentran en el ambiente (aguas superficiales y residuales, suelos, efluentes industriales), en plantas y también colonizan las superficies mucosas de humanos y algunos animales (Sahly and Podschun, 1997). En humanos, *K. pneumoniae* se aísla en la nasofaringe y en el tracto intestinal (Podschun and Ullmann, 1998).

2.2. *Klebsiella pneumoniae* como agente causante de infecciones nosocomiales

K. pneumoniae ha sido clásicamente asociada a la neumonía adquirida en la comunidad (neumonía de Friedländer), que afecta predominantemente a individuos de edad avanzada y con alguna otra patología como diabetes mellitus o alcoholismo (Carpenter, 1990). Aunque apenas causa un 5% de las neumonías bacterianas extrahospitalarias (Prince *et al.*, 1997), en los últimos años, esta bacteria, se ha convertido en un destacado patógeno nosocomial

(hasta un 8% de las infecciones bacterianas nosocomiales diagnosticadas en Europa y Estados Unidos se atribuyen a este patógeno). El mal pronóstico de los pacientes aquejados de esta patología y la elevada prevalencia de cepas resistentes a todos los antibióticos (Podschun and Ullmann, 1998; Timko, 2004) hacen que *K. pneumoniae* sea uno de los ocho patógenos más relevantes desde el punto de vista clínico (Power *et al.*, 2004).

La facilidad con la que *K. pneumoniae* se transmite en el ambiente hospitalario la ha convertido en un agente causante de serios brotes epidémicos e infecciones endémicas, especialmente en unidades de neonatos (Hervas *et al.*, 1993). La infección sistémica es rápida y difícilmente controlable, con tasas de mortalidad entre el 25% y el 60% (Sahly and Podschun, 1997).

Aunque la infección por *Klebsiella* puede darse en diversas partes del organismo, es el tracto urinario el lugar más usual. Concretamente, *K. pneumoniae* causa un 9% de las infecciones del tracto urinario, lo que lo convierte en uno de los cinco patógenos más frecuentes causantes de infecciones nosocomiales urinarias (Podschun *et al.*, 1993; Schaberg, 1976). El tracto respiratorio también es uno de los sitios más comunes de infección por *K. pneumoniae*. Las neumonías nosocomiales son una complicación frecuente entre los pacientes hospitalizados, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos. Más del 60% de las neumonías de adquisición hospitalaria están producidas por bacilos Gram negativos, principalmente *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (la Force, 1985).

En general, *K. pneumoniae* no es un miembro habitual de la microbiota nasofaríngea, con niveles de detección en individuos sanos inferiores al 6%. Sin embargo, los índices de colonización aumentan en los pacientes hospitalizados y de manera proporcional a la duración de la hospitalización, llegando a ser del 19% (Rosenthal and Tager, 1975; Kloos and Musselwhite, 1975).

El incremento de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* a los antibióticos dificulta el tratamiento de las infecciones (Timko, 2004). En la década de los 70 ya se aislaron cepas resistentes a aminoglicósidos (Sadowski *et al.*, 1979) y en la década de los 80 se incrementó el número de aislamientos de cepas productoras de β - lactamasas de amplio espectro y resistentes a cefalosporinas (Jacoby and Medeiros, 1991; Philippon *et al.*, 1989). La fácil transmisión y

elevada estabilidad de los plásmidos que contienen genes codificantes para β -lactamasas ha posibilitado la acumulación de múltiples resistencias en una misma cepa. Actualmente, la terapia más utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por *K. pneumoniae* implica el uso de antibióticos de la familia de las cefalosporinas en monoterapia o en combinación con algún aminoglicósido (Brun-Buisson *et al.*, 1987).

2.3 Factores de virulencia

A pesar de la indudable importancia clínica de *K. pneumoniae*, los factores de virulencia de este microorganismo todavía son poco conocidos. No obstante, la mayor parte de los estudios han explorado la contribución del **CPS** (polisacárido capsular) y el **LPS** (lipopolisacárido). En cualquier caso, existen varios trabajos que, utilizando la técnica de STM (del inglés *signature-tagged mutagenesis*), han identificado varios factores de virulencia de *K. pneumoniae*:

* En un trabajo donde se analizó la capacidad de colonizar el tracto intestinal de 2200 mutantes (Maroncle *et al.*, 2002), sólo se encontró uno que mostró una capacidad reducida para colonizar el intestino de los ratones. Este mutante presentaba una inserción del transposón en un homólogo putativo de Hmw1A, una adhesina de *H. influenzae* (Giufre *et al.*, 2006).

* En otro trabajo (Struve *et al.*, 2003) se encontraron que 13 de 1440 mutantes resultaron atenuados en su habilidad para colonizar el tracto intestinal y urinario: 3 de estos mutantes presentaban inserciones del transposón en genes implicados en la síntesis del LPS y uno presentaba el transposón en la proteína OmpA. El resto de mutantes presentaba inserciones en *loci* sin clara homología con otros genes.

* En un tercer trabajo se evaluó la capacidad de 4800 mutantes para colonizar el pulmón (Lawlor *et al.*, 2005). De entre los mutantes que no fueron capaces de colonizar el pulmón se encontraron inserciones en el operón implicado en la síntesis del CPS, en el operón requerido para la síntesis del ECA (del inglés *enterobacterial common antigen*) y el operón de la cadena O del LPS, además

de inserciones en reguladores y transportadores, en concreto en el transportador para el sideróforo yersiniobactina (*ybtQ*).

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de bacterias, necesario para la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y para un correcto transporte de electrones (Earhart, 1996). En ambientes aeróbicos y en los tejidos de mamíferos, la mayoría del hierro se encuentra en forma de Fe^{3+} y está secuestrado por la lactoferrina y transferrina (Wandersman and Delepelaire, 2004). Para un correcto crecimiento en los tejidos del huésped, las bacterias deben ser capaces de obtener el hierro de esas proteínas transportadoras del huésped. Para ello, la familia de las enterobacterias ha desarrollado quelantes de hierro de alta afinidad y bajo peso molecular llamados **sideróforos**. Hasta el momento se han descrito 3 sistemas de sideróforos: enterobactina, aerobactina y yersiniobactina (Lawlor *et al.*, 2007). Prácticamente todas las cepas de *K. pneumoniae* producen enterobactina, mientras que un porcentaje más pequeño producen aerobactina (Podschun *et al.*, 1992b) o yersiniobactina. Lawlor y colaboradores (Lawlor *et al.*, 2007) han demostrado que, en condiciones de hierro limitante, el sideróforo enterobactina es más importante que yersiniobactina. Sin embargo, en el pulmón del ratón la yersiniobactina parece ser el sideróforo más importante. Los resultados de este trabajo sugieren, por primera vez, que yersiniobactina contribuye a un fenotipo más virulento de *K. pneumoniae*. Para contrarrestar el efecto de la enterobactina, los neutrófilos y los epitelios de las superficies mucosas producen una proteína inmune innata conocida como lipocalina 2 (Lcn2) (Cowland and Borregaard, 1997; Nelson *et al.*, 2005), que compite con los receptores de enterobactina y es bacteriostática (Goetz *et al.*, 2002). Además, Lcn2 induce la expresión de IL-8 y promueve la migración de neutrófilos al parénquima pulmonar en respuesta a infecciones con *K. pneumoniae* (Bachman *et al.*, 2009). Sin embargo, Lcn2 no se une a yersiniobactina y, por tanto, aquellas cepas de *K. pneumoniae* que expresan este sideróforo son más virulentas (Bachman *et al.*, 2011).

Un factor crítico en el proceso infeccioso es la proximidad del microorganismo a las superficies del huésped. En las enterobacterias, existen diferentes tipos de **factores de adhesión** y **fimbrias**, que son proyecciones filamentosas no flagelares de la superficie bacteriana implicadas en la adhesión a los tejidos

(Podschun and Ullmann, 1998). Existen dos tipos de fimbrias en la especie *Klebsiella* (Klemm and Schembri, 2000), las fimbrias tipo 1, que reconocen glicoproteínas del huésped que contienen manosa (Klemm and Schembri, 2000), y las fimbrias tipo 3, que median la adhesión a células endoteliales, al epitelio del tracto respiratorio y a las células del tracto urinario (Tarkkanen *et al.*, 1990). Se ha descrito que las fimbrias tipo 1 actúan como factores de virulencia en infecciones con *Klebsiella* en el tracto urinario, pero no interfieren en la habilidad de colonizar el intestino o de infectar los pulmones (Struve *et al.*, 2008; Schroll *et al.*, 2010). En un trabajo reciente se ha demostrado que las fimbrias tipo 3 sí intervienen en la habilidad de *Klebsiella* de formar biopelículas (Struve *et al.*, 2009).

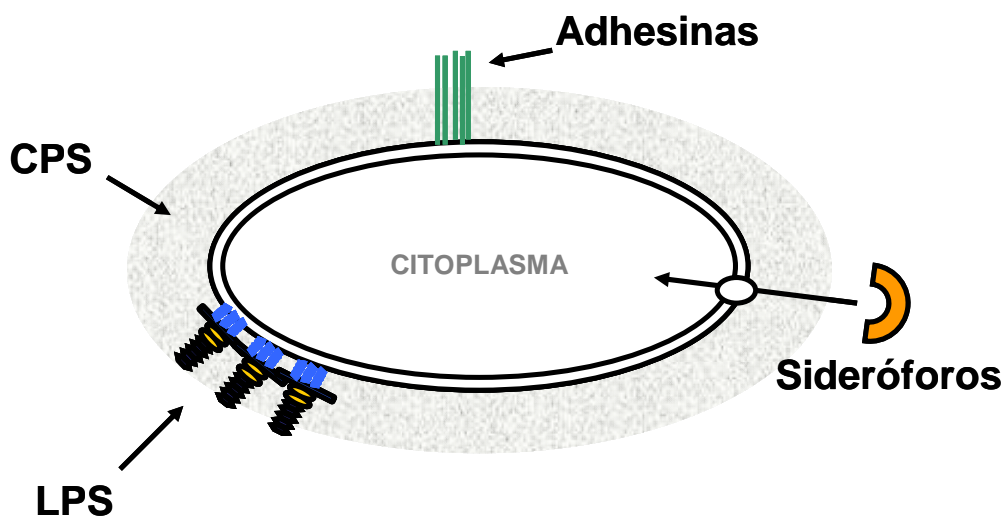


Figura 8: Representación esquemática de los principales factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

Todos estos factores contribuyen en mayor o menor medida a la virulencia de *K. pneumoniae*, aunque es difícil determinar la contribución relativa de cada uno de estos factores de virulencia (**Fig. 8**).

A continuación se explica con mayor detalle la contribución del LPS y del CPS a la virulencia de *K. pneumoniae*.

2.3.1. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es una molécula glicolípida anclada en la cara externa de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas. El LPS

consta de tres dominios estructurales: la cadena O, el núcleo y el lípido A (**Fig. 9**).

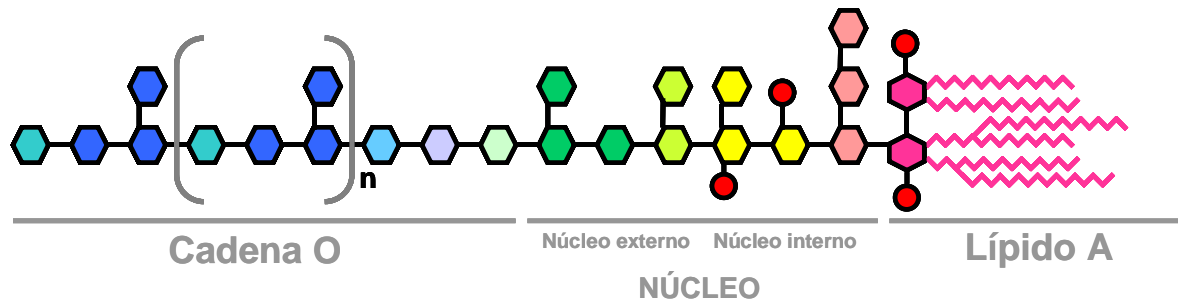


Figura 9: Representación esquemática del LPS de una bacteria Gram negativa.

(a) La **cadena O** forma parte de la porción polisacáridica del LPS y es la región que presenta una mayor heterogeneidad entre las distintas cepas de *K. pneumoniae*. La unión de la cadena O al núcleo externo del LPS se produce a través de un residuo de β -GlcNAc conservado en todos los serotipos de *K. pneumoniae* (Vinogradov *et al.*, 2002). Se conocen hasta 11 estructuras químicas diferentes de cadena O, sin embargo el número de estructuras que pueden ser discriminadas mediante métodos inmunológicos apenas alcanza la cifra de 9, debido a la existencia de motivos estructurales similares que producen reacciones serológicas cruzadas. Así, los serotipos descritos en *K. pneumoniae* son O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8, y O12. El serotipo O1 es el más común entre los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (Hansen *et al.*, 1999).

La cadena O de *K. pneumoniae* tiene un papel principal en la resistencia frente al efecto bactericida del suero ya que enmascara otras estructuras de la superficie bacteriana, como el lípido A y las porinas, capaces de activar el sistema del complemento por vía clásica (Albertí *et al.*, 1993). Además, la cadena O activa, aunque débilmente, la vía alternativa del sistema del complemento, impidiendo la formación del complejo de ataque a la membrana y la lisis del microorganismo (Albertí *et al.*, 1996a).

Varios estudios han examinado la importancia de la cadena O en la virulencia de *K. pneumoniae* aunque con resultados contradictorios. Por una parte, utilizando un modelo de neumonía de ratón, dos estudios no encontraron diferencias entre la virulencia de la cepa silvestre y un mutante que no expresaba cadena O (Cortés *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2003), mientras que

otro trabajo concluyó que un mutante sin cadena O es incapaz de diseminarse más allá del tracto respiratorio (Shankar-Sinha *et al.*, 2004).

(b) El **núcleo** representa el punto de anclaje al cual se une el antígeno O y el lípido A. Constituye la fracción más interna y conservada de la región polisacáridica. La estructura química de los núcleos presentes en diversos serotipos del LPS de *K. pneumoniae* ha sido elucidada por Vinogradov y colaboradores (Vinogradov *et al.*, 2002; Vinogradov and Perry, 2001). El núcleo interno está formado principalmente por Kdo y heptosa. El Kdo sirve como punto de unión al lípido A. Es una región bastante conservada dentro de la familia de las enterobacterias (Holst and Brade, 1992). El núcleo externo presenta cierto grado de variabilidad y está formado por hexosas, mayoritariamente glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. La mayoría de los genes necesarios para la biosíntesis del núcleo se agrupan formando un operón en una agrupación génica denominada *waa* (Regué *et al.*, 2001), fuera de dicha agrupación se localizan los genes *kdsA* y *kdsB*, implicados en la síntesis del Kdo y la mayoría de los genes relacionados con la síntesis de la L, D-Hep (Holst and Brade, 1992). Las bases genéticas y el papel de la virulencia del núcleo han sido caracterizadas en gran detalle por el grupo del Prof. Juan Tomás. En 2002 aislaron y caracterizaron genéticamente el cluster *waa* implicado en la biosíntesis del núcleo del LPS y describieron los 6 genes implicados en la biosíntesis del núcleo interno: *hldD* y *waaC*, *-F*, *-Q*, *-A* y *-C*. Además, este grupo caracterizó el gen *waaL*, que codifica para la ligasa responsable de unir la cadena O al núcleo (Regué *et al.*, 2001; Izquierdo *et al.*, 2002). En el año 2003, demostraron la importancia del núcleo en virulencia. Así, en un modelo de neumonía en ratón, los mutantes $52145\Delta waaC$, $52145\Delta waaF$ y $52145\Delta wabG$ son avirulentos. Más aún, la virulencia aumentaba a medida que el núcleo interno era más completo hasta que el mutante $52145\Delta waaL$ y la cepa silvestre mostraban valores similares. Se pudo concluir que, a parte de que la cápsula es esencial, *K. pneumoniae* necesita un LPS completo con cadena O para colonizar el tracto urinario (Izquierdo *et al.*, 2003). Este grupo de investigación también ha demostrado que *K. pneumoniae* posee dos tipos de núcleos, denominados tipo 1 y 2, siendo el tipo 2 el presente en los aislados clínicos más virulentos (Regué *et al.*, 2005) (**Fig. 10**).

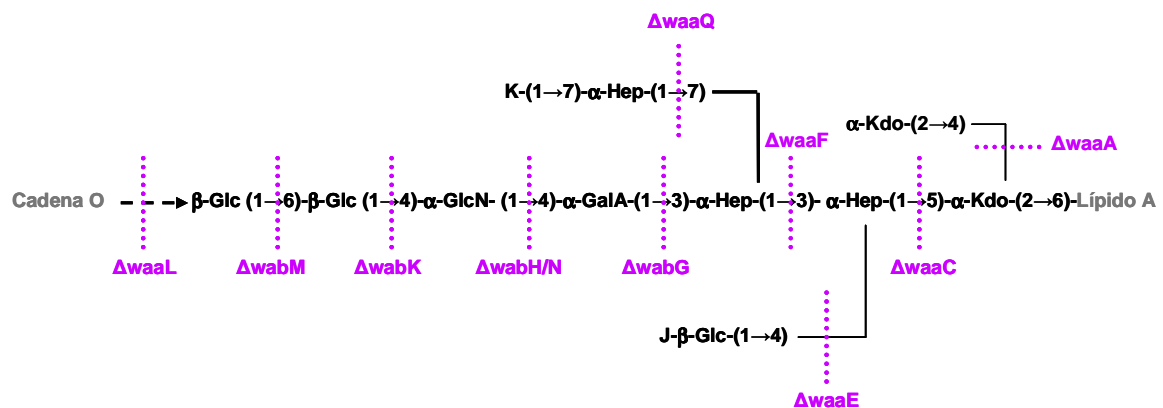


Figura 10: Estructura del núcleo tipo 2 del LPS de *K. pneumoniae*. Se indican los genes implicados en la síntesis tanto del núcleo interno (*waaC*, *F*, *G*, *Q*, *A*, *E*) como del núcleo externo (*wabM*, *K* y *H/M*) y el gen responsable de la unión de la cadena O al núcleo externo (*waaL*).

Un hecho llamativo del núcleo de *K. pneumoniae* es que, a diferencia de otras enterobacterias, no posee grupos fosfatos y sí residuos de ácido galacturónico. Estos residuos son importantes para la formación del escudo iónico asociado al LPS y, por tanto, para la estabilidad de la membrana externa (Firdich *et al.* 2005; Firdich and Whitfield, 2005; Izquierdo *et al.*, 2003; Nikaido, 2003). Además, Fresno y colaboradores (Fresno *et al.*, 2006; Fresno *et al.*, 2007) demostraron que el CPS de *K. pneumoniae* está asociado a la superficie bacteriana mediante interacciones iónicas a estos residuos de ácido galacturónico.

(c) El **lípidio A** químicamente es un fosfolípido que ocupa la parte más interna de la molécula y es responsable de las propiedades endotóxicas del LPS. El lípidio A es la parte del LPS reconocida por TLR4 (Miller *et al.*, 2005; Munford and Varley, 2006). La estructura del lípidio A de *K. pneumoniae* es relativamente similar a la de otros lípidos A expresados por bacterias de la familia de las enterobacterias (Raetz and Whitfield, 2002), aunque presenta algunas modificaciones como la presencia de aminoarabinosa, 2-hidroximiristato y la adición de un séptimo ácido graso, palmitato (Helander *et al.*, 1996; Clements *et al.*, 2007; Llobet *et al.*, 2011). En otros patógenos, éstas

modificaciones están asociadas a la resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Nizet, 2006).

En la **Figura 11A** se representa el lípido A de la cepa silvestre Kp52145 caracterizado por nuestro grupo mediante espectrometría de masas (Llobet *et al.*, 2011).

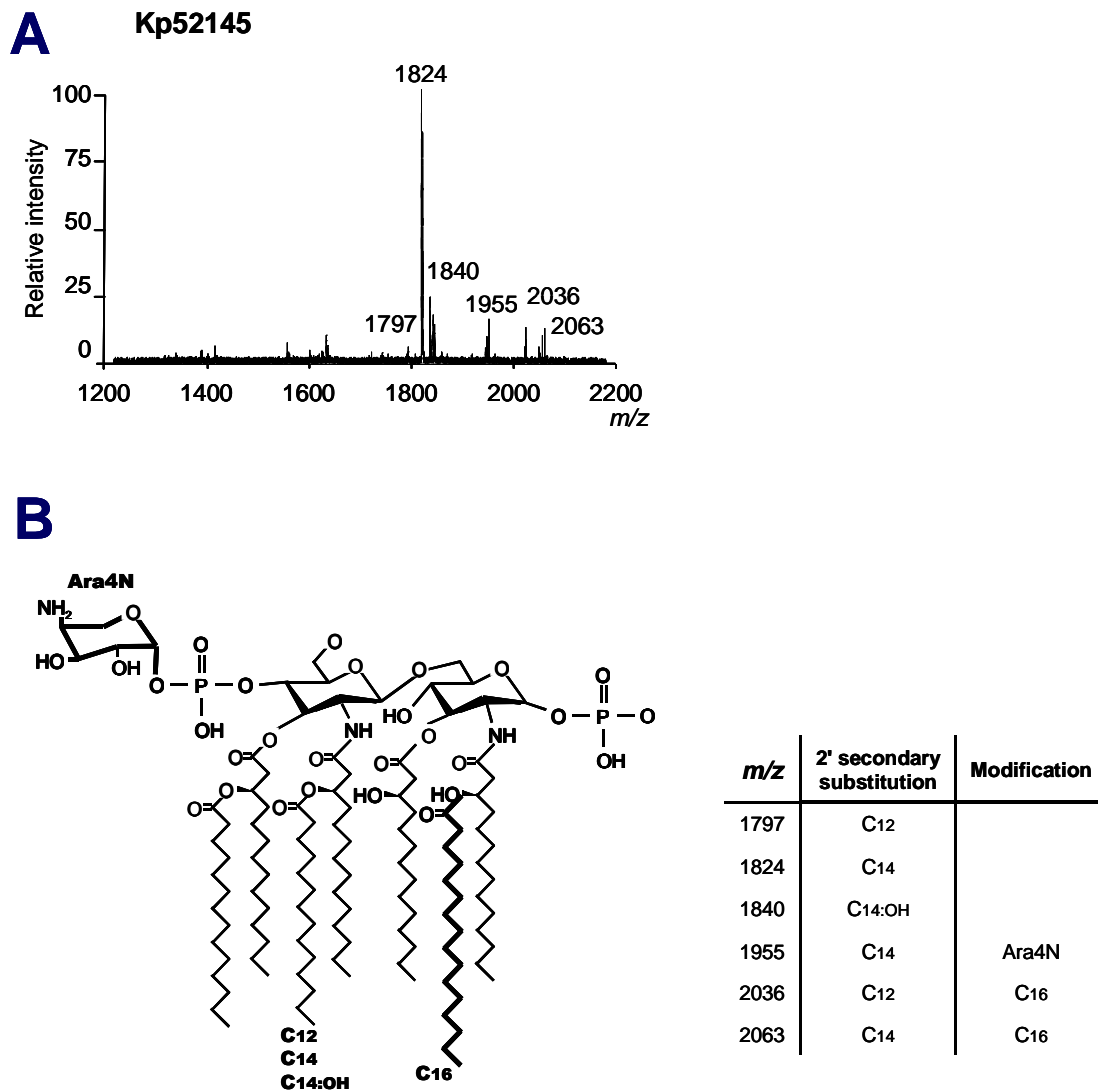


Figura 11: Lípido A de *K. pneumoniae*. (A) Análisis del lípido A por espectrometría de masas. (B) Representación esquemática de las diferentes especies del lípido A de *K. pneumoniae*.

Este lípido A presenta mayoritariamente especies hexaciladas (*m/z* 1824), correspondientes a dos glucosaminas, dos grupos fosfato, cuatro 3-OH-C₁₄ y dos C₁₄. El pico correspondiente a *m/z* 1840 representa un lípido A hexacilado, con dos glucosaminas, dos grupos fosfato, cuatro 3-OH-C₁₄, un C₁₄ y un C_{14:OH}. El pico minoritario *m/z* 1797 corresponde a un lípido A hexacilado, con cuatro

3-OH-C₁₄, un C₁₂ y un C_{14:OH}. Otras especies minoritarias detectadas se corresponden con la adición de aminoarabinosa (m/z 1955) a la forma hexacilada predominante (m/z 1824) o de palmitato a las especies hexaciladas (m/z 1797 y 1824), dando lugar a formas heptaciladas del lípido A (m/z 2036 y 2063, respectivamente) (**Fig. 11**; Llobet *et al.*, 2011). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que los PAs, en concreto la PxB, incrementan las especies minoritarias de lípido A conteniendo aminoarabinosa y palmitato (Llobet *et al.*, 2011).

Los productos del gen *ugd* y del operón *pmrHFIJKLM* son necesarios para la síntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A: *ugd* convierte la UDP-D-glucosa en UDP-D-ácido glucurónico que después es modificado por el gen *pmrF* (segundo gen del operón *pmrHFIJKLM*) encargado de la síntesis de aminoarabinosa (Raetz *et al.*, 2007). En la **Figura 12A** se muestra como en un mutante *pmrF* de *K. pneumoniae*, cepa 52- $\Delta pmrF$, desaparece el pico correspondiente a la adición de aminoarabinosa (Llobet *et al.*, 2011) mientras que en un mutante *pagPGB*, cepa 52- $\Delta pagPGB$, desaparece la especie correspondiente a la adición de palmitato al lípido A (Llobet *et al.*, 2011). **PagPGB** es la aciltransferasa que añade palmitato al lípido A (Guo *et al.*, 1998; Llobet *et al.*, 2011) (**Fig. 12B**).

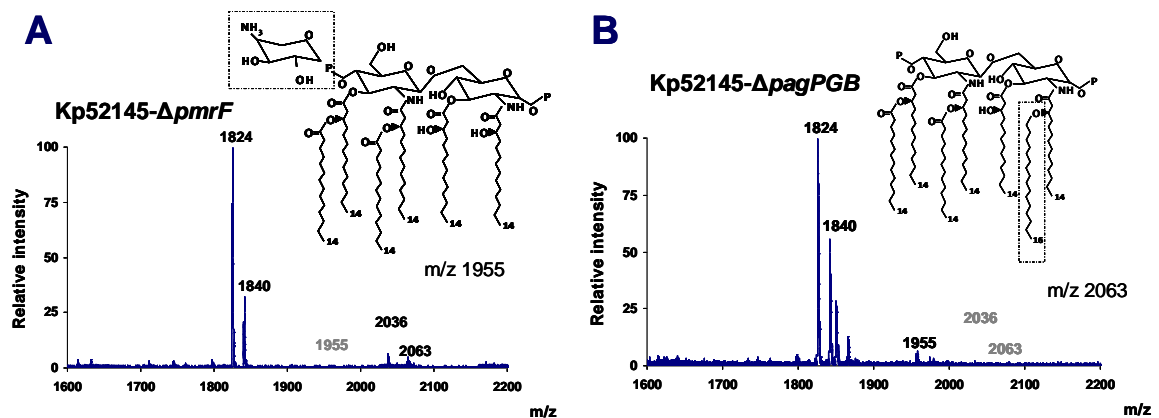


Figura 12: Lípido A de los mutantes 52- $\Delta pagPGB$ y 52- $\Delta pmrF$ de *K. pneumoniae*. Análisis por espectrometría de masa (MALDI-TOF) y estructura propuesta del lípido A extraído de las cepas 52- $\Delta pmrF$ (A) y 52- $\Delta pagPGB$ (B).

Nuestro grupo ha demostrado que la adición de aminoarabinosa y palmitato contribuyen a la resistencia frente a los PAs en *K. pneumoniae* (Llobet *et al.*, 2011). Además, demostramos, y por primera vez en la literatura, que estas modificaciones del lípido A son importantes para la supervivencia de las bacterias en el pulmón (Llobet *et al.*, 2011). *lpxO* es otro gen responsable de otra de las modificaciones del lípido A. LpxO genera 2-hidroximiristato por hidroxilación del ácido graso miristato transferido al lípido A por la aciltransferasa LpxL (Gibbons *et al.*, 2000; Llobet and Bengoechea, resultados no publicados).

2.3.2 Polisacárido capsular (CPS)

Todos los aislados clínicos de *K. pneumoniae* expresan CPS que cubre la superficie bacteriana, si bien existen diferencias en la cantidad de CPS expresada por los distintos aislados. Los datos disponibles indican que cuanto mayor es esta cantidad, mayor es la virulencia del aislado (Cano *et al.*, 2009; Cortés *et al.*, 2002a; Cortés *et al.*, 2002b; Sahly *et al.*, 2000). Por todo ello, el CPS es considerado como uno de los factores de virulencia más importantes de *K. pneumoniae*. El CPS se forma por la repetición de una subunidad oligosacáridica que contiene de cuatro a seis azúcares neutros y ácidos urónicos, estos últimos cargados negativamente. Estos complejos polisacáridicos originan gruesos haces de estructuras fibrilares que, organizados en capas, dan lugar a una matriz altamente hidratada que recubre la superficie celular bacteriana. La variabilidad estructural ha permitido clasificar más de 77 serotipos capsulares (Orskov and Orskov, 1984). Se han realizado diversos estudios que han permitido asociar una mayor virulencia de *Klebsiella* con ciertos tipos de antígeno capsular, así los serotipos capsulares K1 y K2 son más virulentos en ratón y presentan una prominente cápsula (Podschun and Ullmann, 1998; Mizuta *et al.*, 1983). Además son los más frecuentemente aislados en infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad (Tsay *et al.*, 2002). Las diferencias en el grado de virulencia también pueden estar relacionadas con el contenido de manosa del CPS, así los serotipos K7 o K21 presentan secuencias repetidas de manosa- α -2/3-manosa o L-ramnosa- α -2/3-L-ramnosa y están relacionados con serotipos capsulares de menor virulencia (Podschun *et al.*, 1992a; Podschun and Ullmann, 1992). La importancia del

CPS como factor de virulencia de *K. pneumoniae* se demostró empleando el modelo de ratón de neumonía. Así, un mutante descapsulado es avirulento tras infección intratraqueal (Cortés *et al.*, 2002b). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Lawlor y colaboradores empleando una infección intranasal (Lawlor *et al.*, 2005). En este estudio, un mutante descapsulado de *K. pneumoniae*, cepa *cpsB*, fue atenuado. Sin embargo, el mutante *cpsB* no fue totalmente avirulento ya que todavía se aislaba en los pulmones de los ratones infectados tras 5 días, si bien en bajas cantidades (Lawlor *et al.*, 2005). El CPS se ha relacionado con la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos y al sistema del complemento (Alvarez *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2004; Llobet *et al.* 2011). También se apunta al efecto enmascarador del CPS para proteger a la bacteria de ser fagocitada por las células epiteliales o por los fagocitos profesionales (Cortés *et al.*, 2002a; Cortés *et al.*, 2002b; de Astorza *et al.*, 2004).

3. EL SISTEMA INMUNE INNATO DE PULMÓN Y *K. pneumoniae*

K. pneumoniae es capaz de resistir al sistema del complemento y a los péptidos antimicrobianos, dos armas del sistema inmune innato humoral. En el 2004 nuestro grupo describió, por primera vez, que el CPS está implicada en la **resistencia frente a proteínas y péptidos antimicrobianos** (Campos *et al.*, 2004). Además, concentraciones subletales de PAs incrementan la transcripción del operón de *cps*, lo que se correlaciona con un incremento en la cantidad de cápsula (Campos *et al.*, 2004; Llobet *et al.*, 2011). Nuestros resultados demuestran que el CPS dificulta la interacción de los péptidos con la superficie de la membrana externa bacteriana. La protección frente a los péptidos antimicrobianos y la susceptibilidad de las defensinas no está relacionada ni con el serotipo capsular ni con la composición química del CPS, pero sí es dependiente de la cantidad de CPS expresado por la bacteria (Campos *et al.*, 2004). Pero, además, los PAs inducen la liberación de CPS al medio y este CPS liberado une PAs bloqueando así su actividad bactericida (Llobet *et al.*, 2008). Este nuevo mecanismo de resistencia frente a los PAs también es compartido por los CPS aniónicos de *S. pneumoniae* y el CPS expresado por los aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Llobet *et al.*, 2008). Recientemente, nuestro grupo también ha descrito que el CPS no solo protege al patógeno de la acción bactericida de los PAs sino que también impide su expresión por las células epiteliales del pulmón (Moranta *et al.*, 2010). Señalar que nuestro grupo ha publicado que *Klebsiella* activa un programa de defensa contra los PAs controlado, al menos, por tres sistemas de transducción de señales, que controlan tanto la expresión de CPS como las modificaciones del lípido A anteriormente descritas (Llobet *et al.*, 2011). Pero no sólo el CPS y el lípido A contribuyen a la resistencia frente a los PAs sino también la proteína OmpA y el sistema de expulsión de antibióticos AcrAB (Llobet *et al.*, 2009; Padilla *et al.*, 2010).

Como hemos comentado anteriormente, *K. pneumoniae* es capaz de **resistir al sistema del complemento** siendo, otra vez, el CPS el principal factor de resistencia al complemento (Álvarez *et al.*, 2000). Los aislados clínicos de *K. pneumoniae* del serotipo K activan la vía alternativa del complemento ya que

se ha demostrado que unen C3b, pero no se forma el complejo de ataque a la membrana (C5b-9) y la bacteria no muere. La diferencia con las cepas sensibles, es que éstas activan tanto la vía clásica como la alternativa del complemento, unen suficiente C3b para formar el complejo de ataque a la membrana y la bacteria muere (Merino *et al.*, 1992). Unos años más tarde, Albertí y colaboradores, demostraron que las porinas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas eran las típicas moléculas a las que se une el componente C1q, lo que también activa la vía clásica del complemento en las cepas sensibles (Albertí *et al.*, 1993; Albertí *et al.*, 1996b). En las cepas resistentes al complemento, la cadena O del LPS evita la unión de C1q a las porinas lo que hace que solo se active la vía alternativa del complemento y por tanto se une poco C3b que es degradado rápidamente evitando que se forme C5b-9, y como consecuencia las bacterias no mueren (Albertí *et al.*, 1996a).

El CPS juega un importante papel en las primeras fases de patogénesis. Así, actúa como una barrera antifagocítica frente a las células epiteliales del pulmón, los neutrófilos y los macrófagos alveolares, protegiendo la bacteria de la inmunidad innata celular (Podschun *et al.*, 1992a; Oelschlaeger and Tall, 1997; Favre-Bonte *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2002a; Cortes *et al.*, 2002b; Sahly *et al.*, 2000). En numerosos trabajos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado la relación inversa en cuanto a la cantidad de CPS y la internalización de las bacterias por parte de las células. Así, las bacterias con un prominente CPS invaden poco, mientras que las bacterias poco capsuladas o completamente descapsuladas son internalizadas con una gran eficiencia por las células del sistema inmune innato (Favre-Bonte *et al.*, 1999, Cortés *et al.*, 2002a; Cortés *et al.*, 2002b; de Astorza *et al.*, 2004). Desde el punto de vista molecular, los datos apuntan que el CPS dificulta el reconocimiento de las estructuras superficiales bacterianas, tanto por los receptores de los fagocitos como por las opsoninas séricas. Así, se demuestra que las bacterias desprovistas de CPS son opsonizadas con C3 por el complemento presente en el pulmón y rápidamente internalizadas por las células epiteliales pulmonares en un proceso dependiente de CD46 (Cortés *et al.*, 2002a; Cortés *et al.*, 2002b; de Astorza *et al.*, 2004). Además, la opsonina SP-D del surfactante pulmonar es capaz de interactuar con el LPS de las cepas descapsuladas, las cuales serán rápidamente internalizadas. En experimentos *in vivo*, las bacterias

descapsuladas interactúan con SP-D y son eliminadas rápidamente por los macrófagos alveolares residentes (Ofek *et al.*, 2001; Kostina *et al.*, 2005).

Por otro lado, *K. pneumoniae* ha sido ampliamente utilizada como modelo para desentrañar los **mecanismos defensivos del pulmón** frente a las infecciones. Así, se demostró la importancia de una activación rápida de la expresión de citoquinas y quimioquinas que, a su vez, causaban el reclutamiento y activación de neutrófilos, para reducir la carga bacteriana (Tsai *et al.*, 1998). Es más, animales transgénicos que sobreexpresaban una de estas quimioquinas, KC, fueron menos susceptibles a la infección por *K. pneumoniae* que los animales controles (Tsai *et al.*, 1998). La importancia de esta respuesta en la defensa frente a *Klebsiella* ha sido reforzada recientemente. El uso de compuestos como CpG y di-GMP cíclico, que estimulan la expresión de una respuesta inflamatoria, han sido propuestas para tratar las infecciones por *K. pneumoniae* (Deng *et al.*, 2004a; Karaolis *et al.*, 2007).

Los mecanismos por los que las células epiteliales detectan una infección con *K. pneumoniae* y las vías de señalización intracelulares activadas han sido objeto de estudio de nuestro grupo. Para ello, se empleó un mutante desprovisto de CPS, ya que como se ha comentado anteriormente el CPS es un importante factor de virulencia y previene a la bacteria de ser detectada e internalizada. Nuestro grupo demostró que esta cepa descapsulada incrementó los niveles de ICAM-1 (molécula de adhesión) de las células epiteliales y desencadenó la translocación al núcleo del NF- κ B activando los genes responsables de la secreción de la citoquina inflamatoria IL-8 vía TLR2 y TLR4. Dado que la cepa silvestre no provocó estas respuestas, se concluyó que el CPS de *K. pneumoniae* impide la secreción de IL-8 por las células epiteliales del pulmón y evita la activación del sistema inmune innato (Regueiro *et al.*, 2006). En un trabajo posterior, Lawlor y colaboradores (Lawlor *et al.*, 2006) demostraron que, efectivamente, un mutante *cps* de *K. pneumoniae* induce una potente respuesta inflamatoria en los pulmones, lo que sugiere, por otra parte, que las infecciones con *K. pneumoniae* se pueden caracterizar por la falta de activación de una respuesta inflamatoria inmediata. Confirmando esta hipótesis, nuestro grupo ha demostrado que *K. pneumoniae* es capaz de bloquear la activación de respuestas inflamatorias inducidas por diversos agonistas

inflamatorios (Regueiro *et al.*, 2011). Molecularmente, *Klebsiella* impide la activación de las vías de señalización dependientes de NF- κ B y de las MAPKs ya que induce la expresión de la deubiquitinasa CYLD y de la fosfatasa MKP-1, respectivamente (Regueiro *et al.*, 2011). Estas dos proteínas son claves en el propio control de la respuesta inflamatoria, siendo, por consiguiente, *K. pneumoniae* el primer patógeno que subvierte la funcionalidad de proteínas implicadas en la homeostasis de la respuesta inmune. Señalar que la expresión de CYLD y MKP-1 es dependiente de la activación de NOD1, asociada a la inhibición de Rac1 (Regueiro *et al.*, 2011). En este trabajo, también se demostró que el CPS es necesario pero no suficiente para desencadenar este efecto antiinflamatorio (Regueiro *et al.*, 2011).

Otros trabajos han demostrado la importancia de las citoquinas IL-12 e IL-23 para establecer una respuesta adecuada frente a *K. pneumoniae*. La primera es necesaria para la activación de mecanismos defensivos dependientes de IFN γ mientras que la segunda es necesaria para la activación de respuestas dependientes de IL-17, en un proceso en el que interviene el factor de transcripción STAT-4 (Deng *et al.*, 2004b; Happel *et al.*, 2005). IL-17 favorece el reclutamiento de neutrófilos debido a la expresión de quimioquinas y, además, induce la secreción de PAs (Kao *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2001a; Ye *et al.*, 2001b). En la activación de todas estas respuestas, TLR4 junto con TLR9 parecen ser los principales receptores implicados. Así, ambos receptores son necesarios tanto para la inducción de las respuestas IL-17-dependientes como para la secreción de diversos mediadores inflamatorios incluyendo moléculas de adhesión (Happel *et al.*, 2003; Schurr *et al.*, 2005; Bhan *et al.*, 2007; Bhan *et al.*, 2010).

La importancia de los macrófagos alveolares en la protección contra *K. pneumoniae* se demuestra por el hecho de que su eliminación disminuye la eliminación bacteriana y la supervivencia de los ratones infectados (Broug-Holub *et al.*, 1997). Señalar que diversos trabajos demuestran que las neumonías producidas por *K. pneumoniae* se caracterizan por elevados niveles de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y reducidos niveles de IL-12 y de las quimioquinas CXCL10 (IP10) y CXCL9 (MIG) dependientes de IFN γ (Yoshida *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2005). CXCL10 y CXCL9 son moléculas típicamente

asociadas al fenotipo M1 de activación del macrófago, mientras que la IL-10 se asocia a M2. Por tanto, esto sugiere que *Klebsiella* puede interferir con la polarización M1 y promover un fenotipo M2 (con tendencia a actividades inmunoreguladoras y con pobre actividad microbicida) en los macrófagos alveolares, lo que le permitiría crear un nicho adecuado para la bacteria en el pulmón. La prevención de la polarización es una estrategia usada por determinados patógenos para sobrevivir en el interior del macrófago. En cualquier caso, el resultado de la interacción entre *K. pneumoniae* y los macrófagos alveolares es prácticamente desconocido.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha comentado en la introducción, la activación de respuestas inflamatorias adecuadas son esenciales para eliminar infecciones causadas por *K. pneumoniae* (Greenberger *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2001a) y que los receptores tipo TLR juegan un papel importante en la detección de este patógeno (Cai *et al.*, 2009; Schurr *et al.*, 2005). Por otra parte, los datos claramente indican que *Klebsiella* intenta contrarrestar la inducción de estas respuestas defensivas, siendo el CPS fundamental para este proceso (Lawlor *et al.*, 2006; Regueiro *et al.*, 2006). Sin embargo, es muy probable que *K. pneumoniae* utilice factores adicionales para modular las respuestas inflamatorias. Pero, además, también es posible que algunas moléculas de *K. pneumoniae* sean eficazmente reconocidas por el sistema inmune innato y, por tanto, desencadenen las respuestas defensivas del huésped. En este contexto, algunos estudios muestran que la proteína OmpA purificada de *K. pneumoniae* induce la expresión de moléculas inflamatorias vía TLR2 en distintos tipos celulares (Jeannin *et al.*, 2000; Jeannin *et al.*, 2003; Jeannin *et al.*, 2005) y se ha postulado que es uno de los principales factores responsables de la activación de respuestas inflamatorias frente a *K. pneumoniae*.

En esta Tesis Doctoral, en primer lugar, nos planteamos estudiar si la proteína OmpA puede contribuir en la activación de respuestas inflamatorias cuando se expresa en la membrana externa de las bacterias.

Para el estudio de esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la ausencia de la proteína OmpA afecta a la inducción de respuestas inflamatorias mediadas por diferentes tipos celulares.
2. Estudiar qué vías de señalización celular están implicadas en la activación de la respuesta inmune.
3. Estudiar qué receptores celulares son necesarios para la activación de las respuestas inflamatorias.

Por otro lado, y dado el desconocimiento existente sobre el resultado de la interacción entre *K. pneumoniae* y los macrófagos alveolares, nos planteamos analizar qué estrategias emplea este patógeno para reducir la fagocitosis por estos fagocitos profesionales. Además, quisimos comprobar si estas

estrategias también eran útiles en la interacción con otro fagocito profesional, la ameba *Dictyostelium discoideum*.

Los principales objetivos que se plantearon fueron:

4. Estudiar el papel de las estructuras de superficie de *K. pneumoniae* en la interacción con fagocitos profesionales.
5. Caracterizar la vida de *K. pneumoniae* en el interior del macrófago alveolar.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en este trabajo, así como sus características más relevantes están descritas en los **Anexos I y II**.

Las bacterias se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) a 37 °C en agitación 180 rpm/min o en LB agar (LB con 1,5% de agar bacteriológico) a 37 °C en caso de cultivar las bacterias en placa. En todos los experimentos de microbiología celular, las bacterias se recogieron en la fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron (2500 x g; 20 min, TA) y se ajustaron a una DO 600nm de 1,2 (correspondiente aproximadamente a 10⁹ ufc/ml). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos al medio de cultivo a las siguientes concentraciones:

- Rifampicina (Rif), utilizada a una concentración final de 50 µg/ml.
- Kanamicina (Km), utilizada a una concentración final de 50 µg/ml.
- Cloranfenicol (Cm), utilizada a una concentración final de 25 µg/ml.
- Ampicilina (Amp), utilizada a una concentración final de 50 µg/ml.

2. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES

2.1 Construcción de los mutantes 52OmpA2 y 52145-Δwca_{k2}OmpA

Se amplificó por PCR un fragmento interno de 378 pb del gen *ompA* empleando como molde ADN genómico de la cepa silvestre *K. pneumoniae* 52145 (Kp52145) (Nassif *et al.*, 1989), polimerasa *Taq* (Promega) y los cebadores IntOmpAKpnF y IntOmpAKpnR (**Anexo III**). Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia disponible de *K. pneumoniae* (MGH78578). El fragmento de PCR se purificó de un gel de agarosa y se clonó en el vector pGEM-T[®] Easy (Promega) para obtener pGEM-T IntKpnOmpA. Posteriormente, el fragmento interno se obtuvo por digestión con EcoRI y se clonó en el vector suicida pKNOCK-Cm (Alexeyev, 1999) para obtener pKNOCK-IntKpnOmpA. Este vector se electroporó a la cepa Kp52145 y por recombinación homóloga se obtuvo el mutante 52OmpA2 (**Fig. 13**). La correcta inserción del vector se comprobó mediante PCR y Southern blot. Se comprobó que el mutante no expresaba OmpA (tal y como se describe en el apartado 4 de material y métodos, página 71) (**Fig. 17A**).

Para la construcción de un doble mutante sin CPS y sin OmpA, se electroporó la construcción pKNOCK-IntKpnOmpA obtenida anteriormente a la cepa 52145-

Δwca_{k2} , un mutante desprovisto de CPS isogénico de Kp52145 (Llobet *et al.*, 2008) (**Fig. 13**) para obtener $52145\Delta wca_{k2}OmpA$. La correcta inserción del vector se comprobó mediante PCR y Southern blot. Se comprobó que el mutante no expresaba OmpA (ta y como se describe en el apartado 4 de material y métodos, página 71) (**Fig. 17B**). Las curvas de crecimiento de los mutantes *ompA* en LB y a 37 °C en agitación no fueron diferentes de las correspondientes curvas de las cepas parentales.

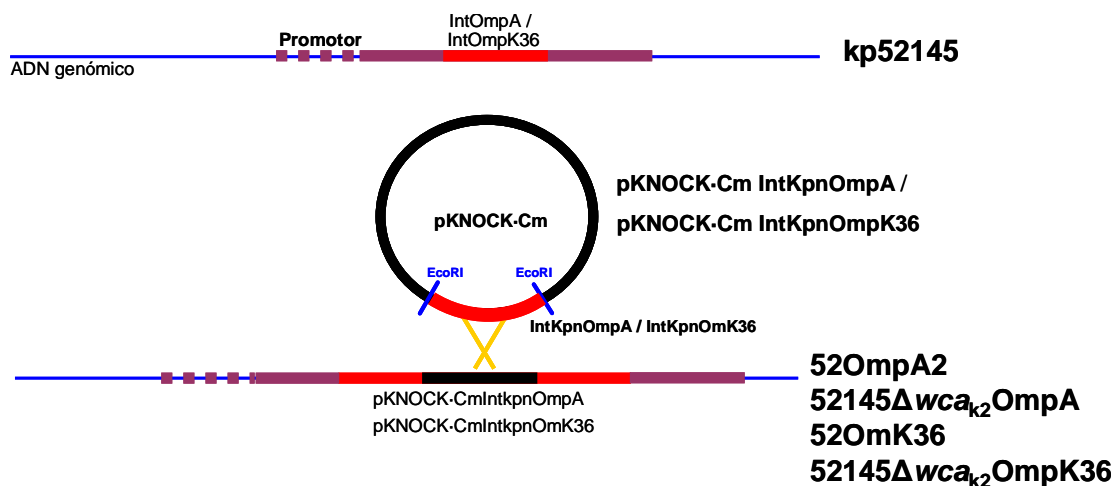


Figura 13: Construcción de los mutantes *ompA* y *ompK36* mediante recombinación homóloga.

2.2 Construcción de los mutantes 52OmpK36 y 52145- Δwca_{k2} OmpK36

Para construir los mutantes deficientes en *ompK36* se siguió la misma estrategia descrita anteriormente. Mediante PCR se amplificó un fragmento de 524 pb del gen *ompk36* usando como molde el ADN de la cepa Kp52145, los cebadores *KnmpOmpK36F* y *KnmpOmpK36R* [**AnexoIII**] y la polimerasa GoTaq[®]Flexi (Promega). El fragmento se purificó de un gel de agarosa y se clonó primero en pGEM-T[®] Easy (Promega) para obtener pGEM-T *IntKpnOmpK36* y, después, en pKNOCK-Cm (Alexeyev, 1999) digerido con *EcoRI* para obtener pKNOCK-*IntKpnOmpK36*. Finalmente, este vector se electroporó tanto a la cepa Kp52145 como a $52145\Delta wca_{k2}$ y por recombinación homóloga se obtuvieron los mutantes 52OmpK36 y $52145\Delta wca_{k2}OmpK36$ (**Fig. 13**). La correcta inserción del vector se comprobó mediante PCR y Southern blot. Se comprobó que el mutante no expresaba OmpK36 como se describe en el apartado 4 (página 71) (**Fig. 17 C-D**). Las curvas de crecimiento

de los mutantes *ompk36* en LB y a 37 °C en agitación tampoco fueron diferentes de las correspondientes curvas de las cepas parentales.

2.3 Complementación de las mutaciones en los genes *ompA* y *ompK36*

Para complementar las mutaciones anteriores se utilizó el transposón mini-Tn7T codificado en el vector pUC18R6KT-mini-Tn7T que se inserta en copia única y en una sola orientación en un sitio determinado del genoma, concretamente en el sitio *attTn7* localizado tras el gen *glmS* (DeBoy and Craig, 2000; Choi *et al.*, 2005). Para seleccionar los eventos de transposición, se amplificó por PCR el casete que confiere resistencia a Km del plásmido pKD4 (Datsenko and Wanner, 2000) con la polimerasa *Vent* (New England Biolabs) y los cebadores cassette-F1 y cassette-R1 (**Anexo III**). El producto de PCR se clonó en pUC18R6KT-mini-Tn7T digerido con EcoRV para obtener el vector pUC18R6KT-mini-Tn7TKm.

Los genes codificantes para *ompA* y *ompk36*, incluyendo su región promotora, se amplificaron mediante PCR como un fragmento de 1,5 kb y 1,7 kb respectivamente, empleando la polimerasa *Vent* (New England Biolabs) y las parejas de cebadores KpnOmpAcomF/KpnOmpAcomR y ComKpnompK36F/ComKpnompK36R descritos en el **Anexo III**.

Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pUC18R6KT-mini-Tn7TKm digerido con *SmaI* para obtener pUC18R6KT-mini-Tn7TKmOmpA y pUC18R6KT-mini-Tn7TKmOmpK36. La misma cantidad de estos vectores (100 ng) se electroporó juntamente con el plásmido pTNS2 (100 ng; **Anexo II**) a las cepas a complementar (52OmpA2, 52145- Δwca_{k2} OmpA, 52OmpK36 y 52145- Δwca_{k2} OmpK36). La correcta inserción del transposón se verificó por PCR de colonia con la pareja de cebadores KpnglmSup/Ptn7L y KpnglmSdown/Ptn7R (Choi and Schweiser, 2006) (**Anexo III; Fig. 14**).

Las cepas resultantes, 52OmpA2com, 52145- Δwca_{k2} OmpAcom, 52OmpK36com y 52145- Δwca_{k2} OmpK36com expresaban cantidades similares de proteína OmpA o OmpK36 que sus cepas parentales (Kp52145 o 52145- Δwca_{k2}) (**Fig. 17 A-D**).

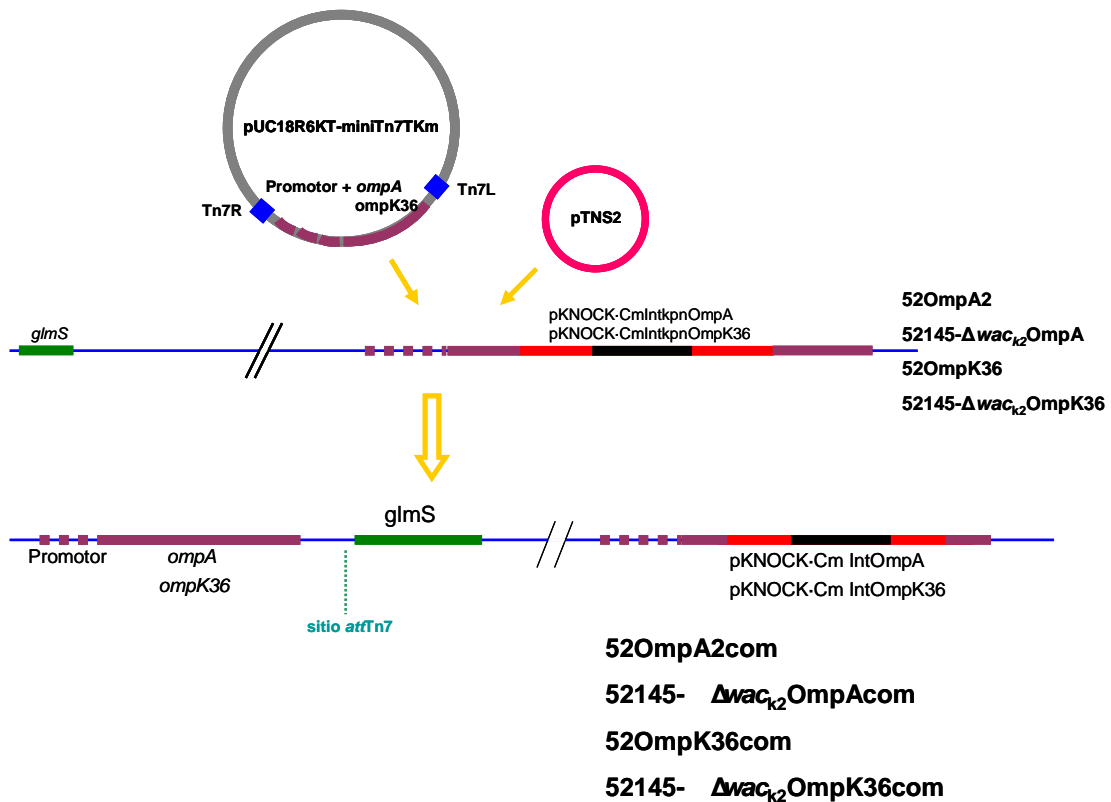


Figura 14. Complementación de los mutantes *ompA* y *ompK36* usando el vector de transposición mini-Tn7TKm.

2.4 Construcción de un mutante descapsulado en la cepa Kp43816

Para la construcción de un mutante en el gen *manC* de *K. pneumoniae* 43816 se siguieron los pasos resumidos en la **Figura 15**.

En primer lugar, se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes a ambos extremos del gen *manC*, utilizando como molde el ADN de la cepa Kp4386, la polimerasa GoTaq[®]Flexi (Promega) y las parejas de cebadores *manCupF/manCupR* y *manCdownF/manCdownR* (**Anexo III**). El cebador inverso, de la primera pareja de cebadores, y el directo, de la segunda pareja de cebadores, fueron diseñados de manera que en su extremo 5' incluían la diana de la enzima de restricción *Bam*HI. A continuación, uno de los dos fragmentos se defosforiló con la enzima fosfatasa antártica y luego, los dos fragmentos se purificaron y se ligaron. El fragmento de ADN obtenido se usó como molde para una reacción de PCR utilizando una mezcla de las polimerasas *Vent* (0,2 u / reacción) y GoTaq[®]Flexi (2,5 u / reacción) y los cebadores *manCupF* y *manCdownR*. El fragmento de PCR obtenido, de

aproximadamente 2 kb, se clonó en el pGEM-T[®] Easy (Promega), obteniéndose pGEMT- Δ *manC*.

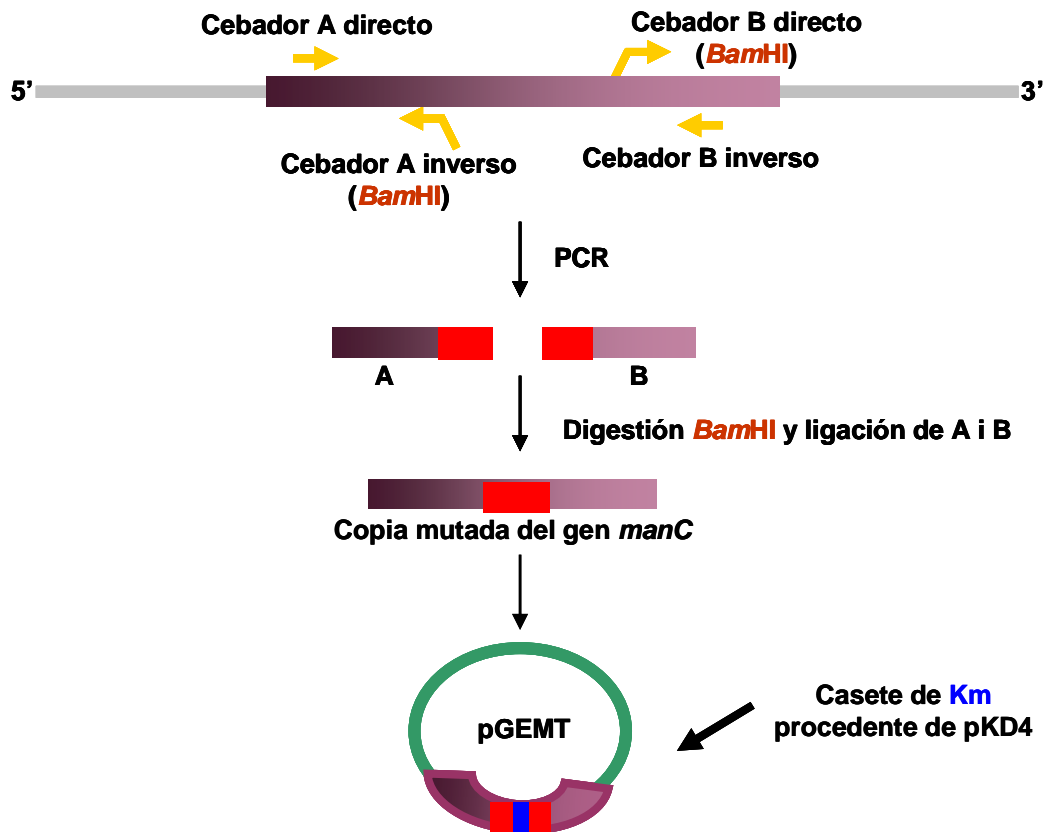


Figura 15: Esquema de la construcción de un mutante descapsulado en *Klebsiella*.

Por otra parte, se amplificó por PCR un casete de resistencia a Km usando como molde el plásmido pKD4, la polimerasa *Vent* y los cebadores cassette-F1 y cassette-R1, que contienen la diana de la enzima de restricción *Bam*HI. El producto de PCR se purificó por columna, se digirió con *Bam*HI y se clonó en pGEMT- Δ *manC*, previamente digerido con *Bam*HI para obtener pGEMT- Δ *manCKm*. Usando como molde este plásmido, la polimerasa GoTaq[®]Flexi y los cebadores *manCupF* y *manCdownR*, se amplificó un fragmento de aproximadamente 3,5 kb, que se electroporó a la cepa Kp43816 que contenía el vector pKOBEG-sacB. El plásmido pKOBEG-sacB contiene una trasposasa que se activa con arabinosa 0,2%, lo que permite la integración por recombinación homóloga de fragmentos de ADN lineal, en este caso el alelo Δ *manC*:Km obtenido se insertó en el genoma de *Klebsiella*. El gen *sacB*

permite la eliminación del plásmido pKOBEG por selección en placas conteniendo 10% de sacarosa.

3. CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL *Procps::gfp* EN LA CEPA Kp43816

La región promotora del operon *wca* se amplificó por PCR utilizando como molde el ADN de la cepa Kp43816 de *K. pneumoniae*, los cebadores k2ProcpsF y k2ProcpsR (**Anexo III**) y la polimerasa *Vent.* El cebador k2ProcpsF contiene una diana para el enzima de restricción *EcoRI* lo que permite la inserción del fragmento en la orientación adecuada. El fragmento de PCR obtenido (1,2 kb) fue digerido con *EcoRI*, fosforilado con PNK y purificado. Posteriormente, se clonó en el vector pPROBE'gfp(LVA) digerido previamente con *SmaI* / *EcoRI* (Miller *et al.*, 2000) para obtener pPROBE'(LVA)ProCPS43 (**Anexo II**; **Fig. 16**). El fragmento clonado se secuenció para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación Finalmente, el vector obtenido fue electroporado a la cepa Kp43816 (cepa 43816*Procps::gfp*, **Anexo I**).

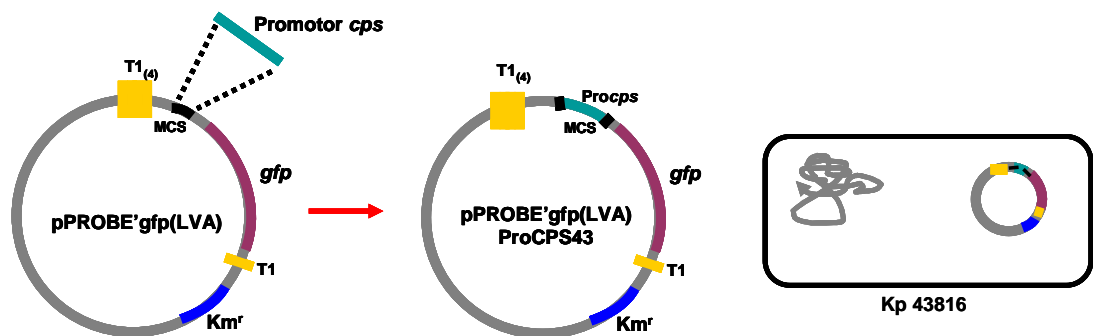


Figura 16: Fusión transcripcional entre la región promotora del operon *wca* y la *gfp*. Se utilizó el vector pPROBE'gfp(LVA) que contiene el gen *gfp* sin promotor. Después de clonar el promotor de CPS, el vector resultante pPROBE'(LVA)ProCPS43 se mantiene como plásmido en la cepa Kp43816.

4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

Para comprobar que los mutantes 52OmpA2, 52145- Δwca_{k2} OmpA, 52OmpK36 y 52145- Δwca_{k2} OmpK36 no expresaban las correspondientes proteínas mutadas, se realizó una extracción de proteínas de membrana externa (OMPs) de las bacterias crecidas en LB siguiendo un protocolo previamente descrito (Domenech-Sanchez *et al.*, 2003; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2010). Brevemente, se recogió 1,5 ml del cultivo y se centrifugó (12000 rpm, 3 min, TA). El precipitado se lavó con 1 ml de solución TE (10 mM Tris-HCl [pH 8] y 1mM ácido etilen-diamino-tetraacético [EDTA]) y se resuspendió en 800 μ l de la misma solución. A continuación, para lisar las bacterias, las muestras se sonicaron (3 ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de descanso) utilizando un sonicador (BRANSON digital sonifier) con la micropunta de 1/8" diámetro y una amplitud del 10%. Se centrifugó la suspensión (3000 rpm, 2 min, TA), se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar (13000 rpm, 30 min, 4°C). El precipitado obtenido, que contenía las membranas totales, externas e internas, se resuspendió en 400 μ l de agua con ayuda de un sonicador. A continuación, para solubilizar la membrana interna se añadieron 400 μ l de una solución de sarcosinato al 4% en agua y se incubó durante 20 min a TA. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras (13000 rpm, 30 min, TA) y se repitió una vez más el proceso de eliminación de la membrana interna. Finalmente, el precipitado obtenido, conteniendo las membranas externas, se resuspendió en 40 μ l de agua y el mismo volumen de solución de carga (10% glicerol, 2,5% β -mercaptoetanol, 1% SDS, 0,01% azul de bromofenol en 62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8]) con ayuda de un sonicador. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

4.1 SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie

Se utilizó un gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS al 12%. Se cargaron 15 μ l por pocillo de las muestras previamente hervidas durante 10 min a 100 °C. La electroforesis se realizó en geles de 8x7 cm con una intensidad constante de 15 mA/gel.

Tras la electroforesis, el gel se tiñó durante 2h en agitación con una solución azul de Coomassie (0,25% azul Coomassie, 50% metanol y 10% ácido acético). A continuación, el gel se lavó durante 4h en agitación con una

solución 10% metanol y 10% ácido acético. Transcurrido este tiempo el gel se mantuvo en agua d.o.i.

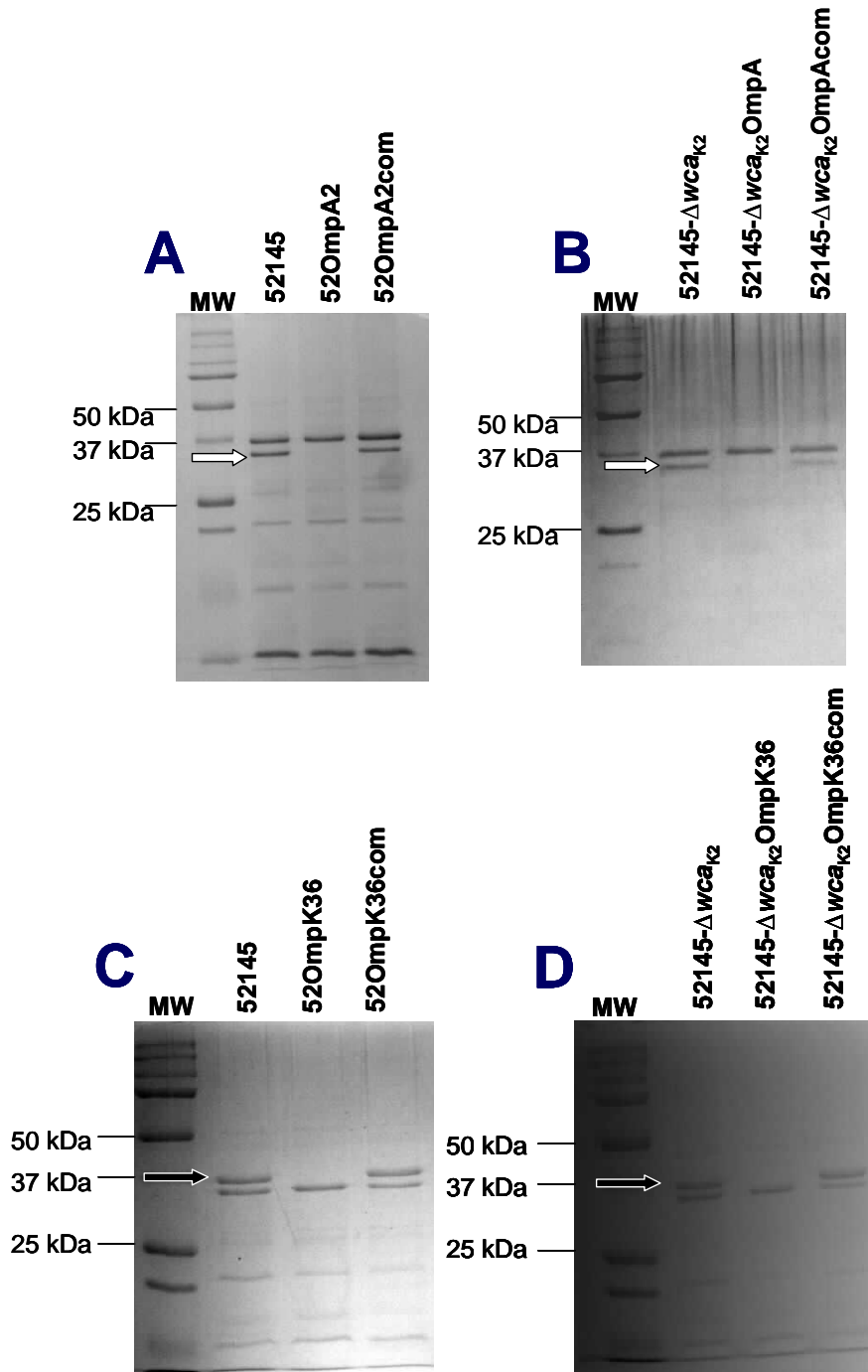


Figura 17: Visualización de las OMPs de *K. pneumoniae*. Gel de electroforesis con SDS al 12% de acrilamida seguido por una tinción con azul Coomassie de las OMPs. (A) OMPs de la cepa silvestre Kp52145, el mutante *ompA* y la cepa complementada. (B) OMPs de la cepa descapsulada, el mutante *ompA* y la cepa complementada. (C) OMPs de la cepa silvestre, el mutante *ompK36* y la cepa complementada. (D) OMPs de la cepa descapsulada 52145Δwca_{K2}, el mutante *ompK36* y la cepa complementada. MW, marcador de peso molecular. La flecha blanca indica la proteína OmpA y la negra marca OmpK36.

5. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPS

Para obtener el CPS a partir de las cepas de *K. pneumoniae*, las bacterias se crecieron en 5 ml de medio LB y se recuperaron por centrifugación (5000 x g, 15 min, 5 °C). El sobrenadante se descartó y las células se lavaron y resuspendieron en 500 µl de agua destilada. Seguidamente, se incubó la suspensión 2 min a 68 °C, se añadieron 500 µl de fenol ultrapuro y la mezcla se volvió a incubar otros 30 min a TA. Tras la incubación, rápidamente se colocaron las muestras en un baño de agua-hielo durante 5 min y se añadieron 500 µl de cloroformo. Se mezcló bien con la ayuda de un agitador tipo vórtex. La fase acuosa se recuperó por centrifugación (13000 rpm, 15 min, TA). El CPS se precipitó con 1,5 ml de etanol durante aproximadamente 12 horas a -20 °C, se centrifugó (13000 rpm, 15 min, TA) y se resuspendió en 1 ml de agua destilada.

La cuantificación de CPS se realizó midiendo la concentración de ácido urónico presente en las muestras. Se utilizó un ensayo modificado con carbazol como ha sido previamente descrito (Bitter and Muir, 1962; Rahn and Whitfield, 2003). Brevemente, se mezclaron 0,5 ml de la muestra con 3 ml de tetraborato sódico 0,025 M en ácido sulfúrico. Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 10 min y al enfriarse se añadieron 0,1 ml de carbazol 0,125% (p/v; Sigma) en etanol absoluto. Las muestras se volvieron a hervir durante 15 min y, tras dejarse enfriar a TA, se midió la DO_{530nm} y se comparó con una curva estándar generada con ácido D-Glucurónico- γ -lactona (Sigma). La cuantificación de cada muestra se determinó en tres ocasiones independientes.

6. LÍNEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se utilizaron tres líneas celulares diferentes de epitelio y dos líneas de macrófagos. Se describen en la **Tabla 3**.

Tanto las células epiteliales A549 como las dos líneas de macrófagos MH-S y THP-1, se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino inactivado (SBF; Labclinics), 10 mM de HEPES (PAA) y con un 1% de una combinación de antibióticos y antimicóticos compuesto por penicilina (10.000 u/ml), sulfato de estreptomicina (10 mg/ml), anfotericina B (25 µg/ml) y cloruro sódico (0,9%) (PAA). Las células se crecieron en frascos

de 75 cm² en una atmósfera saturada de humedad al 95% con 5% de CO₂. Los monocitos humanos THP-1, se diferenciaron a macrófagos, utilizando PMA (10 ng/ml; del inglés, *phorbol-12-myristate-13-acetate*), durante aproximadamente 12h a 37 °C, en una atmósfera saturada de humedad al 95% con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y restituidas con medio fresco antes de iniciar cualquier experimento.

Para las células HEK293T se utilizó el medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino inactivado y la combinación de antibióticos y antimicóticos mencionada anteriormente. Las células se cultivaron en placas de cultivo celular de 10 cm de diámetro a 37 °C, en una atmósfera saturada de humedad al 95% con 5% de CO₂.

Las células primarias NHBE se mantuvieron en medio BEBM suplementado con factor de crecimiento epidérmico humano (0,5 ng/ml), hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (5 µg/ml), transferrina (10 µg/ml), epinefrina (0,5 µg/ml), triiodotironina (6,5 ng/ml), Gm (50 µg/ml), anfotericina-B (50 ng/ml), extracto de pituitaria bovina (52 µg/ml) y ácido retinoico (0,1 ng/ml). Las células se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera saturada de humedad al 95% con 5% de CO₂, en frascos de 25 cm² tapizados con colágeno de piel de ternera. Los frascos se tapizaron mediante la incubación con 2,65 ml de una solución 0,1% en solución (Sigma) en ácido acético durante 24h a 4 °C. A continuación, el exceso de solución se aspiró y los frascos se secaron en la campana de flujo laminar con radiación UV. Este mismo procedimiento se siguió para tapizar de colágeno las placas de cultivo pero ajustando los volúmenes de solución al pocillo (300 µl ó 1 ml dependiendo de si se trataba de placas de 24 ó 6 pocillos).

Tabla 3: Líneas celulares usadas en este trabajo

Línea celular	Procedencia	Medio cultivo
A549 ATCC núm. catalog. CC185	Células de carcinoma de pulmón humano derivadas de neumocitos tipo II	RPMI-1640 con L-Glutamina (PAA, Labclinics; E15-840)
HEK293T ATCC núm. catalog. CRL-11268	Células epiteliales embrionarias de riñón humano	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; PAA, Labclinics; E15-843)
NHBE (Lonza)	Células primarias de epitelio	BEEM (Bronchial Epithelial

	pulmonar humano	Basal medium, Lonza; CC-3171)
MH-S ATCC núm. catalog. CRL-2019	Macrófagos alveolares de ratón	RPMI-1640 con L-Glutamina (PAA, Labclinics; E15-840)
THP-1 ATCC núm. catalog. TIB-202	Línea celular de monocitos humanos	RPMI-1640 con L-Glutamina (PAA, Labclinics; E15-840)

7. INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las células A549 se cultivaron en placas de 24 pocillos (3×10^5 células/pocillo) o de 6 pocillos (10^6 células/pocillo) hasta llegar a una confluencia del 90%. El suero fue retirado 16h antes de la infección. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas dos veces con PBS (145 mM NaCl; 7,7 mM NaHPO_4 ; 2,27 mM NaH_2PO_4 ; pH 7,2) y se les añadió 500 μl de medio fresco sin antibióticos para después ser infectadas. Todos los lavados posteriores se realizaron con PBS atemperado a 37 °C.

Las células HEK293T se cultivaron en placas de 6 pocillos (7×10^5 células/pocillo) o de 12 pocillos ($3-4 \times 10^5$ células/pocillo) hasta llegar a una confluencia del 60-70%. El suero también fue retirado 16h antes de la infección. Éstas células son muy delicadas y se despegan con mucha facilidad, por ello se lavaron durante todo el experimento con sumo cuidado con PBS sin NaCl o con el mismo medio DMEM sin suplementar.

En el caso de las células primarias NHBE, los experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos (2×10^5 células/pocillo) o de 6 pocillos ($8-9 \times 10^5$ células/pocillo) tapizados con colágeno de piel de ternera (Sigma) a una confluencia del 80% con 1 ó 4 ml de medio BEBM sin suplementar, respectivamente. En estas células, los lavados se realizaron con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Lonza), y nunca con PBS, para mantener el pH y el balance osmótico.

En cualquiera de los casos, las células epiteliales fueron lavadas e infectadas con una MOI de 100 bacterias por célula, a no ser que se indique lo contrario, en el correspondiente medio de cultivo celular sin antibióticos. Para incubaciones superiores a 120 min, se añadió 100 $\mu\text{g/ml}$ de Gm (Sigma) al medio y se mantuvo hasta el final del experimento.

Para los experimentos con macrófagos se usaron dos líneas celulares. La línea celular de macrófagos alveolares de ratón (MH-S) y la línea celular de monocitos humanos (THP-1) diferenciados a macrófagos como se ha descrito anteriormente. Los experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos (5-7x10⁵ células/pocillo) con 500 µl de medio sin antibiótico a una MOI de 50 bacterias/célula, a no ser que se indique lo contrario. Cuando el experimento requirió observación al microscopio, las células se cultivaron sobre cubreobjetos circulares de vidrio de 13 mm de diámetro. Los lavados de las células siempre se realizaron con PBS atemperado a 37 °C. Las bacterias extracelulares se eliminaron con una combinación de 300 µg/ml de Gm y 15 µg/ml de PxB durante 90 min. Para incubaciones superiores a estas 2h (30 min de contacto y los 90 min de tratamiento con Gm y PxB), las células se lavaron y se añadió medio fresco conteniendo 100 µg/ml de Gm. Para sincronizar la infección, las placas fueron centrifugadas a 200 x g durante 5 min.

La viabilidad celular en cualquiera de los tipos celulares utilizados se confirmó mediante la tinción con “*trypan blue*” y siempre fue superior al 95% durante las 8 primeras horas de la infección.

En los experimentos que requirieron infección con bacterias muertas, se depositaron 500 µl de la suspensión bacteriana (10⁹ bacterias/ml) en una placa de Petri que se expuso durante 15 min a una radiación de 1 Julio de luz UV. La infección se llevó a cabo de la misma manera que si fueran bacterias vivas. Para controlar la muerte bacteriana, se plaqueó una alícuota de la suspensión irradiada. En ningún caso se plaquearon bacterias viables.

8. ENSAYOS DE ADHESIÓN E INTERNALIZACIÓN BACTERIANA

8.1 Adhesión e internalización en células epiteliales

Para determinar la **adhesión** de las cepas de *K. pneumoniae* a las células epiteliales, los experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos. Éstas, se infectaron durante 2h, se lavaron 5 veces con PBS para eliminar todas las bacterias no adheridas y se lisaron con una solución de 0,5% de saponina (Sigma) en PBS durante 5 min a TA. El número de bacterias adheridas se determinó plaqueando diluciones seriadas. Los resultados se expresan como log de ufc/pocillo y son representativos de tres experimentos independientes.

En los experimentos de **internalización** (también llevados a cabo en placas de 24 pocillos), después de las 2h de infección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas otras 2h con medio fresco conteniendo 100 µg/ml de Gm. Este tratamiento fue suficiente para matar las bacterias extracelulares. Transcurrido este tiempo, las monocapas de células fueron lavadas 3 veces con PBS y lisadas como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresan como log ufc/pocillo y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

8.2 Adhesión, fagocitosis y vida intracelular en macrófagos

Para estos tres tipos de ensayos, tanto los macrófagos alveolares MH-S como los monocitos diferenciados a macrófagos THP-1, se infectaron con las diferentes cepas de *K. pneumoniae* durante 30 min.

En los experimentos de adhesión, pasado el tiempo de infección, las células fueron lavadas 5 veces con PBS y lisadas con 300 µl de una solución de 0,5% de saponina en PBS durante 5 min a TA. El número de bacterias adheridas se determinó por recuento de ufc plaqueando diluciones seriadas de la suspensión celular.

En los experimentos de fagocitosis, después de los 30 min de contacto, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas en 500 µl de medio conteniendo Gm (300 µg/ml) y PxB (15 µg/ml) durante 90 min. Transcurrido este tiempo, las células se volvieron a lavar 2 veces con PBS para eliminar cualquier resto de bacteria extracelular y fueron lisadas con el mismo protocolo mencionado anteriormente. Las bacterias intracelulares se cuantificaron mediante recuento en placa de ufc por diluciones seriadas.

Para el análisis de la vida intracelular de las bacterias fagocitadas, después de los 90 min con Gm (300 µg/ml) y PxB (15 µg/ml), las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron otra vez a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad con 500 µl de medio RPMI conteniendo 100 µg/ml de Gm hasta el final del experimento. Después de cada tiempo de incubación, las células se lavaron 2-3 veces con PBS y se plaquearon las bacterias intracelulares como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, cuando la infección se llevó a cabo sobre cubreobjetos de vidrio, las células fueron fijadas para su procesamiento

posterior mediante microscopía (apartado 20 de material y métodos, página 87).

Cuando fue necesario, los experimentos de infección con macrófagos se llevaron a cabo sobre células pre-expuestas a compuestos químicos que modulan distintas funciones celulares. Los compuestos, cuya actividad y condiciones de trabajo se detallan en la **Tabla 4**, se añadieron a los pocillos que contenían 500 μ l de RPMI.

Tabla 4: Descripción de los inhibidores químicos y compuestos antiinflamatorios usados en este trabajo

Compuesto	Disuelto en	Concentr. de trabajo	Tiempo pre-exposición	Actividad
LY294002	DMSO	75 μ M	1 h	Inhibe la señalización dependiente de PI3K
Citocalasina D	DMSO	5 μ g/ml	30 min	Inhibe la polimerización de filamentos de actina
Nocodazol	DMSO	10 μ g/ml 50 μ g/ml	1 h	Inhibe la polimerización de microtúbulos
MβCD (β -metilciclodextrina)	Agua d.o.i.	1 mM	1 h	Depleción del colesterol de las balsas lipídicas de la membrana plasmática
Filipina	Metanol	5 μ g/ml	1 h	Secuestra el colesterol de las balsas lipídicas de la membrana plasmática
Nistatina	Metanol	25 μ g/ml	1 h	Secuestra el colesterol de las balsas lipídicas de la membrana plasmática
Bafilomicina A1	DMSO	100 nM		Inhibe la vATPasa
Rapamicina	DMSO	50 μ g/ml		Induce la autofagia

Todos los compuestos fueron proporcionados por Sigma

Todos los compuestos se mantuvieron en los pocillos durante el tiempo de contacto bacteriano, excepto la M β CD que fue eliminado antes de la infección, aspirando el medio y lavando las células 2 veces con PBS. Tanto la bafilomicina A1 como la rapamicina se añadieron a los pocillos después de la infección, durante la incubación en medio RPMI con Gm (300 μ g/m) y PxB (15 μ g/m), y se mantuvieron hasta el final del experimento.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en al menos 3 ocasiones independientes.

9. SECRECIÓN DE IL-8

Los experimentos se realizaron usando células epiteliales en placas de 24 pocillos. La infección se llevó a cabo durante 2h y posteriormente las células se lavaron con PBS y se les añadió medio fresco con Gm (100 µg/ml). A las siguientes 2h, 4h y 6h se recogieron los sobrenadantes de cada pocillo en un tubo para microcentrífuga, se centrifugaron (14000 rpm, 1 min) para eliminar los restos celulares y se congelaron a -80 °C.

La IL-8 presente en las muestras se cuantificó con un kit comercial de ELISA (Bender MedSystems) con una sensibilidad inferior a 2 pg/ml. Los valores de absorbancia ($\lambda = 450$ nm) obtenidos fueron convertidos en concentraciones de proteína por extrapolación, usando una recta patrón de valores conocidos para las concentraciones de proteína 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15.6 pg/ml y 0 pg/ml.

Para los experimentos en los cuales se usaron inhibidores específicos para las diferentes vías de señalización, éstos se añadieron 1h ó 2h antes de la infección. Los sobrenadantes se recogieron a las 6h post-infección. El inhibidor del NF- κ B, CAPE (del inglés *caffeic acid phenethyl ester*), y el de la MAPK p38, SB203580, fueron adquiridos de Sigma; mientras que el inhibidor de la MAPK p44/42, U0126, y el de la MAPK JNK, SP600125, fueron comprados en Calbiochem.

Los experimentos se realizaron por duplicado en al menos tres ocasiones independientes.

10. OPSONIZACIÓN DE *Klebsiella* Y FAGOCITOSIS POR MACRÓFAGOS

Para opsonizar las cepas de *K. pneumoniae* se utilizó suero humano (HSN, del inglés *human serum normal*) procedente de distintos donantes, cedido por la FBSTIB (*Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears*). Las bacterias recogidas en fase exponencial se ajustaron a una $DO_{600nm}=1,2$; se mezclaron 35 µl de esta suspensión con 500 µl de RPMI con 1% de Hepes y 1% del suero HSN. La mezcla se incubó a 37 °C en agitación de 180 rpm durante 45 min. La

suspensión de bacterias opsonizadas sirvió para infectar los macrófagos tal y como se ha comentado en el apartado 8.2 de material y métodos. El número de bacterias fagocitadas se determinó plaqueando diluciones seriadas del lisado celular en placas de LB-agar.

11. Western blot

Para realizar esta técnica se utilizaron células A549 sembradas en placas de 6 pocillos infectadas con las distintas cepas de *K. pneumoniae* tal y como se ha descrito en capítulos anteriores. Tras la infección, las células se lavaron con PBS frío manteniendo las placas en hielo. A continuación, las células se lisaron con 100 µl de tampón de carga SDS 1X (62,5 mM Tris-HCl a pH 6,8; 2% p/v SDS; 10% glicerol; 50 mM DTT; 0,01% p/v azul de bromofenol) por pocillo. Se recogieron los restos celulares con un descamador celular, se sonicaron durante 15 s para desnaturalizar el ADN y se hirvieron 10 min. Estas proteínas se separaron en un gel con SDS y 10% de acrilamida con un sistema Mini-protean[®] de Bio-Rad. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia semi-húmeda (Trans-Blot[®] SD semidry transfer cell de Bio-Rad), aplicando un voltaje de 10 V durante 35 min. La eficiencia de la transferencia se controló tiñendo la membrana con una solución comercial de Ponceau S (Sigma). A continuación, la membrana se bloqueó con una solución al 4% de leche en polvo en PBS un mínimo de 1h. Para la detección de MKP-1, CYLD e IκBα se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-MKP-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CYLD (1:1000; Imgenex Corp.) y anti-IκBα (1:1000; Cell signaling). Para detectar la fosforilación de NF-κB p65 y las de las MAPK p38, p44/42 y JNK, se utilizaron anticuerpos policlonales de ratón anti-phospho-p65, anti-phospho-p38, anti-phospho-p44/42 y anti-phospho-JNK, respectivamente (todos usados a una dilución 1:1000; Cell signaling).

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C con agitación. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron utilizando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Dako P0217) y el sistema de detección SuperSignal West-dura (Pierce) en un sistema de adquisición de imágenes Gene Gnome HR (Syngene).

Como control de carga, se analizó la cantidad de tubulina presente en cada muestra. Para ello, las membranas se lavaron 2 veces con PBS-0,5% Tween20 y los anticuerpos fueron eliminados usando el kit comercial *Restore Western blot Stripping Buffer* (Pierce). La tubulina se detectó usando un anticuerpo primario de ratón anti-tubulina humana (1:3000; Sigma).

12. TRANSFECCIONES EN CÉLULAS EPITELIALES

Las células epiteliales A549, se crecieron en placas de 24 pocillos hasta obtener una confluencia del 40-60%. Antes de transfectar las células, se lavaron 2 veces con PBS. Las transfecciones se llevaron a cabo en 500 µl de medio Opti-MEM (Invitrogen), con el ADN plasmídico y/o con 20 nM de ARN de interferencia más 1,5 µl de lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) por pocillo durante 4-6h siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, el medio se cambió por RPMI-1640 suplementado con STF y Hepes. Después de 48h, las células transfectadas se infectaron con las cepas de *K. pneumoniae*.

12.1 Pequeños ARN de interferencia (siRNA)

Los siARN para TLR4 (num. catalog. HSS110818), TLR2 (num. catalog. HSS110813), y CARD4/NOD1 (num. catalog. HSS115906) fueron comprados en Invitrogen. El control negativo stealthTM siRNA con un contenido bajo en GC fue usado como control de ARN de interferencia para TLR2 y TLR4, mientras que el control negativo stealthTM siRNA con contenido medio en GC fue usado como control para NOD1. El ARN de interferencia para MyD88 (5'-AACTGGAACAGACAACTATC-3') fue comprado en Qiagen. Como control negativo se utilizó el siARN AllStars (Qiagen).

13. TRANSFECCIONES DE PLÁSMIDOS EN MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Los macrófagos alveolares de ratón MH-S se cultivaron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro (3x10⁵ células/pocillo). Tras 24h, las células se lavaron 2 veces con PBS y se les añadió 500 µl de medio RPMI sin antibióticos. La mezcla de transfección se preparó en el siguiente orden: 50 µl de Opti-MEM (Invitrogen), 750 ng de los plásmidos a transfectar y el reactivo de transfección FuGENE[®]HD (a un ratio de

3,5 µl FuGENE : 1 µg DNA; Promega). La mezcla se incubó 10 min a TA y se añadió a las células. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se infectaron con la cepa Kp43816 de *Kebsiella pneumoniae*. A los tiempos indicados, las células se fijaron con PFA 3% durante 20 min a TA y se conservaron a 4 °C hasta su posterior tinción.

Los plásmidos EGFP-Rab7 y RILP-C33-EGFP (**Anexo II**) utilizados en este trabajo fueron cedidos por el Dr. Sergio Grinstein. Para la construcción de estos plásmidos, los ADNc del gen *rab7* y el que codifica para RILP fueron subclonados en el vector de expresión pEGFP-C1 (Bucci *et al.*, 2000; Cantalupo *et al.*, 2001; Huynh *et al.*, 2010). Estos plásmidos expresan la proteína GFP (del inglés *green fluorescence protein*).

14. ACTIVACIÓN DE NF-κB

Para detectar la activación de NF-κB, las células epiteliales se transfectaron con el plásmido PathDetect[®] NF-κB *cis*-reporting (250 ng; Stratagene) y el vector luciferasa pRL-TK *Renilla* (20 ng; Promega). Después de la transfección, las células fueron lisadas con un tampón de lisis comercial (Promega) durante 15 min en agitación. La actividad luciferasa fue medida siguiendo las instrucciones del kit “*dual luciferase assay kit*” (Promega). Los valores de la luciferasa fueron normalizados con los valores control de la *Renilla*. Los resultados se expresan como actividad luciferasa de las células infectadas comparada con la actividad medida en células control no estimuladas.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en al menos 3 ocasiones independientes.

15. ACTIVACIÓN DE NF-κB VÍA NOD1

Las células HEK293T fueron transfectadas con fosfato cálcico tal y como se explica a continuación. Se preparan 2 soluciones de trabajo: la solución A que contiene CaCl₂ y los plásmidos a transfectar y la solución B, HBS (50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl; pH 7,05. Solución filtrada con filtro de 0,2 µm). Se mezcla la solución A sobre la B y se incuba 1 min a TA. Finalmente, esta solución de transfección se añade gota a gota sobre el medio

con las células a transfectar. La transfección es más eficiente si se cambia el medio a las células aproximadamente 4-5h antes de iniciar la transfección.

Los plásmidos a transfectar fueron (**Anexo II**):

- pCI-Nod1 (0,3 ng; cedido amablemente por el Dr. T. Kufer)
- plásmido pNF- κ B (75 ng; PathDetect[®] NF- κ B *cis*-reporting)
- vector luciferasa pRL-TK *renilla* (7,5 ng; Promega)
- plásmido pcDNA3 (120 ng; Stratagene) para equilibrar la concentración de ADN

A las 24h post-transfección, las células se lavaron con PBS y fueron infectadas con *Klebsiella* durante 2h. Después de la infección las células se volvieron a lavar y se incubaron 6h más con medio fresco con Gm (100 μ g/ml). Finalmente, las muestras se procesaron para medir la actividad luciferasa como ha sido descrito en el apartado anterior.

16. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INTRACELULAR DE CÁPSULA

Para estudiar la expresión de cápsula de *K. pneumoniae* en el interior de los macrófagos alveolares MH-S, éstos fueron infectados con la cepa 43816Procps::*gfp*, que contiene la fusión transcripcional del promotor de la cápsula con el gen indicador *gfp*. Como control negativo se usó la cepa 43816/pPROBE'*gfp*(LVA), que contenía el vector sin ningún promotor (**Anexo II**). La infección se llevó a cabo en placas de 6 pocillos con una MOI de 150 bacterias/célula durante 40 min. Tras el tratamiento con Gm (300 μ g/ml) y PxB (15 μ g/ml) para eliminar las bacterias extracelulares, se lavaron las células con PBS y se lisaron con 900 μ l de una solución de saponina al 0,5% en PBS. Se combinaron los lisados de dos pocillos. Una parte de los lisados se reservó para cuantificar las bacterias intracelulares mediante recuento en placa. El resto se centrifugó (13000 rpm, 1min) para eliminar los restos de saponina. Para el marcaje de las bacterias, el precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS-BSA 1% y se incubó 20 min a TA con un anticuerpo anti-*Klebsiella* (1:5000; **Tabla 6**). La suspensión se lavó con PBS y se incubó otros 20 min en oscuridad con un anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado RRX (Jackson Immunological) a una dilución 1:200 en un volumen total de 250 μ l. La rodamina-RedX (canal del rojo, PE) y la fluorescencia GFP (canal verde) de cada muestra se analizaron mediante un citómetro de flujo Cyteltek Epics XL. Al

menos se caracterizaron 10.000 eventos en cada experimento. En primer lugar, las bacterias fueron seleccionados según su tamaño y granulosidad y, posteriormente, se identificaron aquellas positivas para el marcador conjugado con RRX. Más del 95% de población bacteriana seleccionada por tamaño fue positiva para el marcador RRX. El lisado y tinción de los macrófagos MH-S no infectados no fueron RRX positivos, indicando que no había reactividad cruzada entre el anticuerpo primario o secundario con las células. Después se analizó la fluorescencia GFP de la población RRX positiva. Esta fluorescencia verde (GFP) viene determinada por la actividad de la fusión transcripcional. Los experimentos se realizaron por duplicado en al menos cuatro ocasiones independientes.

17. MEDIDA DE FLUORESCENCIA

La expresión del operón de CPS se analizó en la cepa Kp43816 que contiene el plásmido con la fusión transcripcional entre la región promotora del operón del CPS y el gen *gfp* (43816Procps::*gfp*). Las bacterias se recogieron en la fase exponencial de crecimiento y se ajustaron a una DO_{540} de 0,6. La fluorescencia se midió con un fluorímetro LS-50 (Perkin-Elmer Ltd., Beaconsfield, Inglaterra) en el modo "Read" con una longitud de onda de excitación de 485 nm, de emisión de 528 nm y un ancho de rendija de 5 nm. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF). Las URFs de las cepas conteniendo el plásmido pPROBE'*gfp*(LVA) se sustrajeron a las medidas obtenidas con la cepa 43816Procps::*gfp*. Las medidas se realizaron por triplicado en tres ocasiones independientes.

18. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

La cuantificación de los niveles de ARNm se llevó a cabo mediante RT-qPCR. El ADNc se obtuvo por retrotranscripción a partir de 1,5 – 2 µg del ARN total, previamente purificado, utilizando el kit comercial "RT² First Strand kit" siguiendo las recomendaciones del fabricante (SABioscience). La reacción incluyó un paso para eliminar las posibles trazas de ADN genómico.

La reacción de RT-qPCR se realizó en un "Smart Cycler real-time PCR instrument" (Cepheid; Sunnyvale; California) usando el kit "QuantiTect SYBR

Green PCR mix” (Qiagen). Para amplificar *TLR2* y *TLR4* se utilizaron los cebadores comerciales “QuantiTect primer assays” [Qiagen; num. catalog. QT00236131 (*TLR2*) y QT00035238 (*TLR4*)]; mientras que para amplificar *MyD88* y *NOD1* humanos se usaron los cebadores “MyD88sense”, 5'-GGCATCACCACACTT-GATGAC-3'; “MYD88antisense”, 5'ATAGACCAGACA-CAGGTGCCAG-3'; y para “NOD1sense”, 5'-TCAAGTTGGGGATGA-AGGAG-3'; y “NOD1antisense”, 5'-GCCAAACTCTCTGCCACT-TC-3'. La reacción de RT-qPCR se realizó en un volumen final de 25 µl usando como molde 500 ng de ADNc. Como control interno se amplificó el gen *GAPDH* humano, usando 50 ng de ADNc y los cebadores: “sense”, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' y “antisense”, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'.

Para la detección de *TLR2*, *TLR4*, *MyD88* y *NOD1*, el protocolo del termociclador fue:

- 1 ciclo: 15 min a 95 °C para activar la polimerasa
- 45 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 s a 95 °C
 - Anillamiento: 30 s a 60 °C (*TLRs*, *MyD88* y *NOD1*) ó 54 °C (*GADPH*).
 - o - Extensión: 30 s a 72 °C

El “SYBR Green dye” se midió a 521 nm durante la fase de anillamiento.

El ciclo umbral (*Ct*), es el ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo respecto a la señal base, y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. La cantidad relativa de ARNm en cada muestra se calcula en base a este *Ct* de la muestra con el *Ct* de *GAPDH*. El resultado se presenta, en unidades arbitrarias, como el incremento en la expresión de genes usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrita por Livak and Schmittgen (2001). La especificidad de los productos de PCR se comprobó analizando las curvas de separación de ADN según la temperatura (*melting curve analysis*). Los productos amplificados por PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 1,5% para confirmar el tamaño correcto de los amplicones (92, 102, 185, 201 y 226 pb para *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *NOD1* y *GAPDH*, respectivamente). El ADNc se obtuvo de tres extracciones independientes de ARNm y cada uno se amplificó por RT-qPCR en dos ocasiones independientes.

19. GENERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR ESTABLE MH-S/pLC3B

19.1 Producción de retrovirus

Las células HEK293T se usaron como células productoras de retrovirus. Se crecieron en placas de 6 pocillos con 4 ml de medio DMEM suplementado hasta alcanzar una confluencia del 70-80% ($7-8 \times 10^5$ células/pocillo). Entre 1 y 4h antes de transfectar se lavaron las células con medio fresco. La transfección se llevó a cabo con 2 ml de medio DMEM y el reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus transfection) a un ratio de 1 μ g ADN / 2 μ L jetPEI por pocillo. Se usó el plásmido pMMP-GFP-LC3B, que es un vector de expresión en el cual el gen humano LC3B se encuentra fusionado con la proteína GFP y utiliza el promotor viral MMP (del inglés, *mouse moloney promoter*; Alcalá *et al.*, 2008). El vector contiene un cassette de resistencia a puromicina. Además, también se co-transfectaron los plásmidos OGP (1,9 μ g/pocillo) y VSV-G (0,7 μ g/pocillo) necesarios para el ensamblaje del virus (**Anexo II**). 24h post-transfección se aspiró el medio a las células, con mucho cuidado para que no se despegaran, y se añadieron 2 ml más de medio precalentado a 37 °C con el fin de concentrar el virus. Tras 48h se recuperó el virus para infectar las células diana de la siguiente manera: se recogió el sobrenadante, se centrifugó (1500 rpm, 5 min, TA), se filtró (0,45 μ m) y se añadió a un tubo con una mezcla de 1,5 ml de DMEM con polibreno (8 μ g/ml) por pocillo. El polibreno (Sigma) es un polímero que favorece las interacciones electrostáticas negativas entre la membrana celular y la envoltura del virus. La mezcla del medio con el virus y el polibreno fue la que se empleó para infectar los macrófagos MH-S.

19.2 Infección a macrófagos alveolares MH-S

Los macrófagos alveolares se crecieron en placas de 6 pocillos con medio RPMI ($1-2 \times 10^6$ células/pocillo). Antes de la infección con los retrovirus, las células se lavaron con PBS y después, se añadieron 3 ml de la mezcla preparada anteriormente conteniendo los virus y el polibreno. Seguidamente, las placas con las células infectadas se centrifugaron a 2000 rpm, 32 °C durante 1h sin freno y se volvieron a incubar a 37 °C y una atmósfera al 5% de CO₂.

Al día siguiente se cambió el medio y se añadió medio fresco con 1 µg/ml de puromicina (Sigma) para ir seleccionando, durante dos semanas aproximadamente, los clones que expresaban GFP-pLC3B.

19.3 Selección de clones

Todas las células MH-S/GFP-pLC3B obtenidas, seleccionadas con puromocina, fueron positivas, pero no todas expresaban la misma cantidad de fluorescencia. Para la realización de los experimentos se seleccionaron los clones que expresaron baja intensidad de fluorescencia mediante diluciones del cultivo inicial. Se fueron subcultivando durante aproximadamente 1 mes hasta alcanzar los clones individuales con la intensidad de fluorescencia deseada. El riesgo de trabajar con clones que expresen una alta fluorescencia es que se pueden dar agregaciones inespecíficas de GFP-LC3B.

20. TINCIONES Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN MACRÓFAGOS

Tanto los macrófagos alveolares MH-S como los monocitos humanos diferenciados a macrófagos THP-1, fueron crecidos e infectados con cepas de *Klebsiella* sobre cubreobjetos de vidrio circulares de 13 mm de diámetro. A los tiempos indicados, los macrófagos se fijaron y se conservaron a 4 °C en PBS-NH₄Cl 14 mM hasta su posterior tinción. El método de fijación fue diferente según el anticuerpo usado (**Tabla 5**).

Las bacterias y las moléculas/estructuras celulares de interés se tiñeron mediante inmunofluorescencia directa o indirecta, según cada caso. Los anticuerpos primarios usados en este trabajo se describen en la **Tabla 6**. Los anticuerpos secundarios usados fueron burro anti-conejo, burro anti-ratón, burro anti-rata y burro anti-cabra, conjugados con RRX, Cy5 o Cy2 (rojo, azul o verde, respectivamente). Todos se utilizaron a una dilución 1:200 y fueron proporcionados por Jackson Immunological. Cuando fue necesario, el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina conjugada con rodamina (Faloidina-RRX, Invitrogen) diluida 1:100. El ADN se tiñó con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido 1:2500.

Tabla 5: Métodos de fijación en MH-S y THP-1

Anticuerpo / fluido	Fijación en MH-S	Fijación en THP-1
EEA-1 (1:50)	PFA 2,5% ; 10 min, TA + PFA 5%(1):MetOH(4) ; 5min, -20°C	PFA 2,5% ; 10 min, TA + PFA 5%(1):MetOH(4) ; 5min, -20°C
Lamp-1 (1:150)	PFA 3%; 20 min, TA	PFA 3%; 20 min, TA
Lysotracker	PFA 3%; 20 min, TA (0,5 µM; 45-60 min antes infección)	PFA 3%; 20 min, TA (0,5 µM; 45-60 min antes infección)
Dextrano	PFA 3%; 20 min, TA (250 µg/ml; 2h+1h)	PFA 3%; 20 min, TA (100 µg/ml; 5h+1h)
CatD G19 (1:100)	PFA 3%; 20 min, TA + 1 min MetOH frío antes de empezar tinción	PFA 3%; 20 min, TA + 1 min MetOH frío antes de teñir
Golgi GM130 (1:400)	PFA 3%; 20 min, TA	PFA 3%; 20 min, TA
RE-Calnexina (1:100)	PFA-Lisina; 20 min TA	PFA-Lisina; 20 min, TA

Tabla 6: Anticuerpos primarios usados en este trabajo

Antígeno	Origen	Nombre Ac	Marcaje	Dilución	Proveedor/Fuente
<i>Klebsiella</i>	Conejo	-	Kp43816	1:5000	Proporcionado por el Dr. Sebastián Albertí
EEA1	Cabra	N19	Endosoma temprano	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Lamp-1	Rata	1D4B	Endosoma tardío	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
Catepsina D	Cabra	G19 (sc-6494)	Lisosoma	1:100	Santa Cruz Biotechnology
GM130	Ratón	-	Cis-Golgi	1:400	BD Laboratorios
Lumen RE	Conejo	GRP94 (ab18055)	RE	1:200	Abcam
Calnexina	Conejo	SPA-860	RE	1:100	Enzo Life Sciences

No todos los anticuerpos probados funcionaron bien en MH-S o THP-1, así como no todos los métodos de fijación. En los **anexos IV y V** se resumen los tipos de fijaciones y anticuerpos probados tanto en MH-S como THP-1.

Está descrito que al añadir dextrano a las células, éste sigue una ruta endocítica. En este trabajo se usó Dextrano 70.000 (peso molecular) conjugado con Texas Red (D1864; Life Technologies) a una concentración de 250 µg/ml para MH-S y de 100 µg/ml para THP-1. Antes de las infecciones, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el dextrano. Se usaron protocolos distintos para marcar los macrófagos MH-S y los monocitos diferenciados a macrófagos THP-1. En el caso de los macrófagos MH-S, se añadió al medio 250 µg/ml de dextrano durante 2 h (pulso), este tiempo fue suficiente para que las células se cargaran con el dextrano. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los restos de dextrano y se incubaron durante 1 h más (caza). Con esta segunda incubación nos aseguramos de que el dextrano cargado en los endosomas haya llegado hasta los lisosomas. En el caso de los THP-1 los tiempos de incubación fueron un poco más largos, necesitando 5h de pulso y 1h de caza. En ambos casos, las células se lavaron 4 veces con PBS antes de la infección con cepas de *Klebsiella*.

Los compartimentos subcelulares ácidos se analizaron mediante el marcador fluido LysoTracker RedDN99 (Invitrogen), que se añadió a una concentración de 0,5 µM, 45-60 min antes de la fijación.

Las tinciones se realizaron en un volumen final de 40 µl de PBS con 10% de suero de caballo, 0,1% de saponina (para permeabilizar las membranas; Sigma) y los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 6/Anexo V**). Los cubreobjetos se lavaron dos veces con saponina 0,1%, una vez con PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad con los anticuerpos primarios durante 30-60 min. A continuación, los cubreobjetos se volvieron a lavar dos veces con saponina 0,1% en PBS, una vez con PBS y se incubaron en la cámara húmeda y oscura con el anticuerpo secundario otros 30 min. En las tinciones que requirieron fijaciones con metanol (**Tabla 5/Anexo IV**) se usó el mismo protocolo descrito anteriormente sin usar saponina ya que el metanol también permeabiliza las membranas celulares.

Cuando las infecciones se realizaron con la cepa 43816/pFPV25.1Cm, que expresa la proteína GFP de forma constitutiva y en un microscopio de fluorescencia se visualizan de color verde, los diferentes compartimentos se tiñeron con el anticuerpo correspondiente conjugado con RRX (rojo). En el caso de trabajar con la línea celular de macrófagos MH-S/pLC3B (ver apartado 19

de material y métodos, página 86-87), que expresan fluorescencia GFP (verde), las infecciones se realizaron con la cepa Kp43816 y posteriormente las bacterias se marcaron con los anticuerpos de conejo anti-*Klebsiella* (**Tabla 6**). Los inmunocomplejos se detectaron con anticuerpos secundarios de burro anti-conejo (1:200) conjugados con RRX para su visualización (rojo).

En caso de querer diferenciar las bacterias intracelulares de las extracelulares, se llevó a cabo una tinción diferencial. Así, se realizaron las infecciones sobre cubreobjetos de vidrio, con la cepa 43816/pFPV25.1Cm. Los cubreobjetos, previamente fijados con PFA, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 20-30 min con 40 μ l de PBS con 10% de suero de caballo y el anticuerpo conejo anti-*Klebsiella* (**Tabla 6**). No se usó saponina ya que no interesaba permeabilizar la membrana. A continuación, los cubreobjetos se volvieron a lavar 3 veces con PBS y se incubaron 20-30 min más con el anticuerpo secundario burro anti-conejo conjugado con RRX o Cy2. De esta manera, al visualizar las muestras en un microscopio, las bacterias extracelulares son rojas o azules (según el anticuerpo secundario usado), mientras que las intracelulares siguen viéndose solo de color verde. Este tipo de tinción diferencial no se pudo llevar a cabo con muestras fijadas con metanol.

Tras las incubaciones correspondientes con los anticuerpos, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS saponina 0,1%, una vez con PBS y una vez con agua destilada y se montaron sobre un portaobjetos con gel montador Prolong Gold antifade (Invitrogen) o con Aqua Poly/Mount (Polysciences). Las muestras se conservaron a 4 °C en oscuridad. Las muestras se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica CTR6000 y las imágenes se tomaron con una cámara Leica DFC350FX. La microscopía confocal se llevó a cabo con un microscopio confocal Leica TCS SP5. En los experimentos de colocalización de las bacterias con los diferentes marcadores de la ruta endocítica, los datos se calcularon a partir del recuento de 300 células infectadas en al menos tres experimentos independientes.

21. HIBRIDACIÓN DE FLUORESCENCIA *IN SITU* (FISH)

La técnica de hibridación fluorescente *in situ* fue usada para visualizar bacterias metabólicamente activas durante la infección de células en cultivo. Este procedimiento se basa en la hibridación del ARN de los ribosomas bacterianos

con oligonucleótidos complementarios conjugados con fluorocromos (DeLong *et al.*, 1989) y su posterior procesamiento mediante microscopía de fluorescencia.

Los cubreobjetos fueron fijados con PFA 3%, lavados con agua destilada e hibridados con oligonucleótidos siguiendo el método descrito por Neef y colaboradores (1996). Las sondas de ADN EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAG-GAGT-3') y GAM42a (5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'), conjugadas con Cy3 o con Alexa 488 (rojo), fueron diseñadas para marcar específicamente ARNr de Eubacterias y ARNr de la subclase Gamma-Proteobacterias, respectivamente (Manz *et al.*, 1992). Ambas sondas se usaron simultáneamente para amplificar la señal fluorescente, a una concentración de 5 nM cada una en tampón de hibridación (0,01% SDS, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4 y 35% formamida). Tras lavar los cubreobjetos tres veces con agua destilada, la hibridación se llevó a cabo en una cámara húmeda a 46 °C durante 90 min. Seguidamente, los cubreobjetos se sumergieron en tampón de lavado durante 30 min a 48 °C. El tampón de lavado está compuesto por 80 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,01% de SDS y 5 mM EDTA (pH 8). De esta manera, los ribosomas bacterianos se visualizan de color rojo. Tras el lavado, los núcleos de los macrófagos fueron teñidos con Hoechst 33342 en PBS durante 20 min, lo que permitió marcar las células de color azul. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS, una con agua destilada y se montaron sobre portaobjetos de vidrio usando gel montador Prolong Gold antifade.

22. CITOTOXICIDAD Y MEDICIÓN DE APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS

La citotoxicidad se analizó con el método de cristal violeta descrito por Alegado y colaboradores (Alegado *et al.*, 2011). Brevemente, las células se crecieron en una placa de 96 pocillos ($3,5 \times 10^4$ células/pocillo) y se infectaron con la cepa Kp43816 con una MOI de 100 bacterias por célula durante 1h. Pasado el tiempo de infección, las células fueron lavadas con PBS y se les añadió medio fresco conteniendo 200 µg/ml de Gm durante 20-21h. Para determinar la citotoxicidad, las células se lavaron 5 veces con 200 µl de PBS y se incubaron con 100 µl de una solución de cristal violeta al 0,1% en agua durante 10 min. Después de la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con agua destilada y se añadieron 200 µl de etanol al 95% para solubilizar las

membranas celulares. Los pocillos control no fueron infectados pero se trataron como se ha descrito anteriormente. La cantidad de cristal violeta presente en cada pocillo se determinó con un lector de placas leyendo a una DO_{570nm} y se determinó el porcentaje de citotoxicidad con la fórmula siguiente:

$$\% = \frac{DO \text{ pocillo control} - DO \text{ pocillo infectado}}{DO \text{ pocillo control}} \times 100$$

Como control de citotoxicidad se utilizaron pocillos no infectados a los cuales se les añadió 200 μ l de Triton X100 durante 10 min antes de la incubación con la solución de cristal violeta. El detergente lisa todas las células y por tanto los pocillos no presentaban cristal violeta (azul).

Para analizar la muerte por apoptosis se analizó la presencia de fosfatidilserina (PS) en la membrana y la integridad de la membrana usando Anexina-V y 7-AAD respectivamente (BD Biosciences) mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con la Anexina-V conjugada con APC (del inglés, *allophycocyanin*) y 7AAD en una solución de unión a anexina durante 15 min. Después, las células fueron lavadas dos veces con PBS, fijadas con PFA al 4% durante 30 min a TA y se volvieron a lavar otra vez con PBS. Tanto el PBS como el PFA contenían 2,5 mM de $CaCl_2$. Los experimentos de apoptosis fueron realizados por el Dr Ignacio Aguiló del grupo de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza dirigido por el Prof Carlos Martín.

23. MANEJO DE LA AMEBA *Dictyostelium discoideum*

Las esporas de la cepa silvestre AX2 de *D. discoideum* (cedidas por la Dra. Teresa Suárez; Centro de Investigaciones Biológicas, CIB) (**Anexo I**) se conservaron en silica gel en un ambiente frío, oscuro y con poca humedad. Cuando se quiso cultivar la ameba, se colocaron las esporas sobre una placa con medio SM-agar (10 g/l glucosa, 10 g/l peptona, 1 g/l extracto de levadura, 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,9 g/l KH_2PO_4 , 0.6 g/l K_2HPO_4 , 20 g/l agar; pH 6,3; Sussmann, 1966) conteniendo un césped de *Klebsiella aerogenes*. La placa se

incubó a 21-22 °C entre 2 - 4 días hasta que se observó un halo de crecimiento. Este halo corresponde a una zona de crecimiento activo de la ameba. Se recogió una pequeña muestra y se cultivó en una placa de cultivo celular de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio HL5 (pH 6,3-6,5; Formedium™) suplementado con 6,25% de glucosa 1,25 M, 20 µg/ml de estreptomicina y 10 µg/ml de tetraciclina a pH 6,3-6,5. El cultivo se fue subcultivando en matraces cada 3-4 días para no superar una densidad de 10^7 *D. discoideum* por ml. Cuando el cultivo contuvo $2-4 \times 10^6$ células/ml se consideró óptimo para la realización de los experimentos (Mercanti *et al.*, 2006).

24. CRECIMIENTO DE *D. discoideum* SOBRE BACTERIAS

Se utilizaron 300 µl de una suspensión de bacterias (10^9 ufc/ml) para formar un césped sobre placas con un 5% de medio HL5. Se dejó secar durante 15-30 min en una campana de flujo laminar y se depositaron sobre el césped 4 gotas de 5 µl cada una conteniendo diferentes cantidades de *D. discoideum* (10, 100, 1000 y 10.000). La placa se incubó 4-5 días a 21 °C hasta que se hicieron aparentes los halos de crecimiento de *D. discoideum* y se midieron (Froquet *et al.*, 2009). Los datos se obtuvieron en tres experimentos independientes realizados por triplicado.

25. SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS EN CONTACTO CON *D. discoideum*

En este caso, las cepas de *K. pneumoniae* se ajustaron a una $DO_{600} = 1,2$ (lo que corresponde a 10^9 ufc/ml) en tampón fosfato QQ2 (16,5 mM KH_2PO_4 y 3,9 mM K_2HPO_4 ; pH 6,3). Se incubaron $1,5 \times 10^4$ ufc de la suspensión anterior con 10^6 células de *D. discoideum* AX2 en 500 µl de QQ2 durante 90 y 180 min a 21 °C en agitación de 180 rpm. Después de cada tiempo de contacto, se recogió una alícuota de 10 µl de la suspensión y se diluyó en 40 µl de sacarosa (400 g/l) fría. Posteriormente, se añadieron 200 µl de una solución con 0,5% saponina en QQ2 y se incubó durante 5 min a TA (Lelong *et al.*, 2011). Las bacterias se cuantificaron mediante recuento de ufc plaqueando 100 µl del lisado en placas de LB-agar. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia, calculando las ufc de bacterias en contacto con la ameba respecto a las ufc de bacterias totales; es decir, que se incubaron siguiendo el

protocolo descrito anteriormente pero sin la ameba. Los experimentos se realizaron por duplicado en al menos tres ocasiones independientes.

26. SUPERVIVENCIA DE *D. discoideum* EN CONTACTO CON *Klebsiella*

Para este tipo de experimentos se pusieron en contacto en un tubo tipo microcentrífuga $1,5 \times 10^4$ bacterias procedentes de una suspensión de un cultivo en fase exponencial con 10^6 células de *D. discoideum* en un volumen final de 500 μ l de medio QQ2. La mezcla se incubó a 21 °C en agitación de 180 rpm durante 3h. Como control siempre se creció un tubo solo con la ameba bajo las mismas condiciones (Pukatzki *et al.*, 2006). Tras las 3h de incubación se plaquearon diluciones seriadas de la suspensión en placas de medio SM en las que previamente se había sembrado un césped de *K. aerogenes*. Las placas se dejaron 3 - 4 días a 21 °C hasta que la ameba empezó a crecer y los halos se hicieron evidentes. Cada halo corresponde al crecimiento de una única célula de *D. discoideum*. Se cuantificó el número de halos en cada placa, tanto de las placas que solo contenían la ameba (usada como control) como de las placas que contenían la ameba junto con la bacteria de interés. Los resultados se expresan como media del número de halos formados por condición.

27. VISUALIZACIÓN DE BACTERIAS INTRACELULARES EN LA AMEBA *D. discoideum*

La cepa AX2/RFP de *D. discoideum* (**Anexo I**) fue utilizada para los experimentos de microscopía confocal. Esta cepa contiene un vector de expresión de la proteína *red fluorescent protein* que tiene un espectro de emisión de fluorescencia en la longitud de onda correspondiente al color rojo (543 nm). Para mantener el plásmido es necesario que las células se cultiven en medio HL5 con 20 μ g/ml del antibiótico de selección G418. Por otra parte, las cepas bacterianas utilizadas contenían el plásmido pFPV25.1Cm, con lo que expresaban la proteína GFP y se visualizaron de color verde en el microscopio.

Para visualizar las bacterias intracelulares en *D. discoideum*, se pusieron en contacto 5×10^5 células de *D. discoideum* con $2,5 \times 10^7$ bacterias (procedentes de un ajuste conteniendo 10^9 ufc/ml) en 500 μ l de medio HL5 sin antibiótico en una

placa de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro. La placa se centrifugó (200 x g; 5 min) y se incubó a 21 °C durante 90 min (Lelong *et al.*, 2011). Pasado este tiempo, las células se fijaron con PFA 3% durante 20 min a TA, se lavaron 2 veces con medio QQ2 y los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos con gel montador Aqua Poly/Mount. Las muestras se conservaron a 4 °C en oscuridad hasta su posterior observación. El material teñido se analizó con un microscopio confocal Leica TCS SP5.

28. MODELO MURINO INTRANASAL DE INFECCIÓN

Para analizar la virulencia *in vivo* de las distintas cepas de *Klebsiella* se utilizaron como modelo de infección ratones hembras de 5-7 semanas de edad de la línea C57BL/6J01aHsd (Harlan). Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Para preparar los inóculos bacterianos, se recogieron por centrifugación (2500 x g, 20 min., 22 °C) las bacterias de un cultivo de 18h, y se prepararon suspensiones en PBS (5×10^6 ufc/ml para el análisis de la expresión de citoquinas y a 5×10^4 ufc/ml para determinar la carga bacteriana). Los ratones fueron inoculados intranasalmente con un total de 20 µl de la suspensión bacteriana, administrada en alícuotas de 5 µl. Se usaron 5 ratones infectados para cada condición. Los ratones no infectados fueron inoculados de la misma manera pero utilizando 20 µl de PBS estéril. Para eliminar variables y facilitar que las administraciones de bacterias o PBS fueran consistentes, los ratones fueron sostenidos verticalmente durante las inoculaciones e inclinados con un ángulo de 45 °C mientras se estaban recuperando de la anestesia. Después de los tiempos indicados los ratones fueron eutanasiados por dislocación cervical. Los pulmones fueron diseccionados rápidamente para determinar la carga bacteriana y congelados inmediatamente a -80 °C en nitrógeno líquido para poder llevar a cabo la purificación del ARN.

Para la purificación del ARN presente en los pulmones, éstos se pesaron y homogeneizaron con 1 ml de TRI Reagent (Ambion) con un “Ultra-Turrax T10 basic (IKA)” en hielo. Primero, el ARN total fue purificado con cloroformo/isopropil y después con el kit “Nucleospin RNAII kit” (Macherey-Nagel) siguiendo exactamente las recomendaciones del fabricante. La integridad del ARN se comprobó en un gel de agarosa con formaldehído, y fue

cuantificado espectrofotométricamente con un NanoDrop (260-280 nm) y se guardó a -80 °C. La expresión del ARNm se llevó a cabo mediante análisis por RT-qPCR tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 18 de material y métodos, página 84). Los cebadores usados para *tnf- α* fueron “sense” 5'-CCACATCTCCCTCCAGAAAA-3' y “antisense” 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'; para *il-6*: “sense” 5'-CCGGAGAG GAGACTTCACAG-3' y “antisense” 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'; y para *kc*: “sense” 5'-GACAGACTGCTCTGATGGCA-3' y “antisense” 5'-TGCACTTCTTTTCGCACAAC-3'. Como controles internos se amplificaron los genes *actin* y *gapdh* de ratón (“sense” 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' y “antisense” 5'-CTGGGTTCATCTTTTCACGGT-3' para la actina y “sense” 5'-CCCCTAACATCAAATGGGG-3' y “antisense” 5'-CCTTCCACAATGCCAAA GTT-3' para *gapdh*). Los tamaños de los amplicones fueron de 259, 134, 292, 139 y 274 pb para *tnf- α* , *il-6*, *kc*, *actin* y *gapdh*, respectivamente.

Para determinar la carga bacteriana de los pulmones diseccionados, éstos fueron homogeneizados en 500 μ l de PBS con un “Ultra-Turrax TIO basic (IKA)” en hielo. Se plaquearon diluciones seriadas del homogeneizado en placas de LB con Rif para la cepa silvestre de *K. pneumoniae* y en placas de Rif/Cm para el *mutante ompA*. Los resultados se presentan como log ufc / g de tejido.

Los ratones fueron tratados de acuerdo con la convención europea para la protección de animales vertebrados usados con fines experimentales y otros propósitos científicos (86/609/EEC) y según un protocolo experimental aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de las Islas Baleares (España).

29. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección de Bonferroni, el test “t” de Student de dos colas y cuando las muestras no eran homocedásticas se utilizó el test de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa

informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de p fue inferior a 0,05.

RESULTADOS

1. IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA OmpA EN LA PREVENCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL PULMÓN

1.1 La infección con un mutante *ompA* de *K. pneumoniae* induce la secreción de IL-8 por células del epitelio respiratorio

Confirmando resultados previos de nuestro laboratorio (Regueiro *et al.*, 2006), la cepa silvestre de *K. pneumoniae* 52145 (Kp52145) no indujo secreción de IL-8 en las células A549 (**Fig. 18A**). A continuación, nos planteamos si la cepa 52OmpA2, mutante que no expresa la proteína OmpA, induce la secreción de IL-8. Efectivamente, se observó una correlación entre el tiempo de infección con la cepa 52OmpA2 y los niveles de IL-8 secretados por las células A549, siendo estos niveles mayores a 8h que a 4h post-infección (**Fig. 18A**). Además, tanto a 6h como a 8h post-infección, las células infectadas con la cepa 52OmpA2 indujeron una secreción de IL-8 significativamente mayor que las células infectadas con Kp52145 a los mismos tiempos, las cuales, por otra parte, secretaron similares cantidades de IL-8 que las células no infectadas (**Fig. 18A**).

En trabajos anteriores (Regueiro *et al.*, 2006) ya demostramos que un mutante de *K. pneumoniae* desprovisto de CPS induce la secreción de IL-8 en células epiteliales de pulmón. Por lo tanto, la inducción de IL-8 por la cepa 52OmpA2 podría ser debida a una reducción en la cantidad de cápsula expresada por este mutante. No obstante, las cepas Kp52145 y 52OmpA2 expresaron cantidades similares de CPS ($360 \pm 15 \mu\text{g}/10^6$ células y $339 \pm 23 \mu\text{g}/10^6$ células respectivamente; $p < 0,05$; test t student de una cola). Comprobamos si la ausencia de OmpA incrementaba más los niveles de IL-8 inducidos por 52145- Δwca_{K2} , un mutante de CPS isogénico de la cepa Kp52145. Efectivamente, a las 8h post-infección las células infectadas con el doble mutante, cepa 52145- $\Delta wca_{K2}ompA$, indujeron una mayor secreción de IL-8 que las células infectadas con los mutantes simples, cepa 52145- Δwca_{K2} ó 52OmpA2 (**Fig. 18B**). Los niveles de IL-8 inducidos por las cepas 52OmpAcom y 52145- $\Delta wca_{K2}OmpAcom$ (cepas complementadas de 52OmpA2 y 52145- $\Delta wca_{K2}OmpA$ respectivamente, descritas en Llobet *et al.*, 2009) no fueron significativamente diferentes de las inducidas por Kp52145 y 52145- Δwca_{K2}

respectivamente, lo que confirma que es la ausencia de OmpA la responsable de la secreción de IL-8 inducida en las células epiteliales por los mutantes *ompA*.

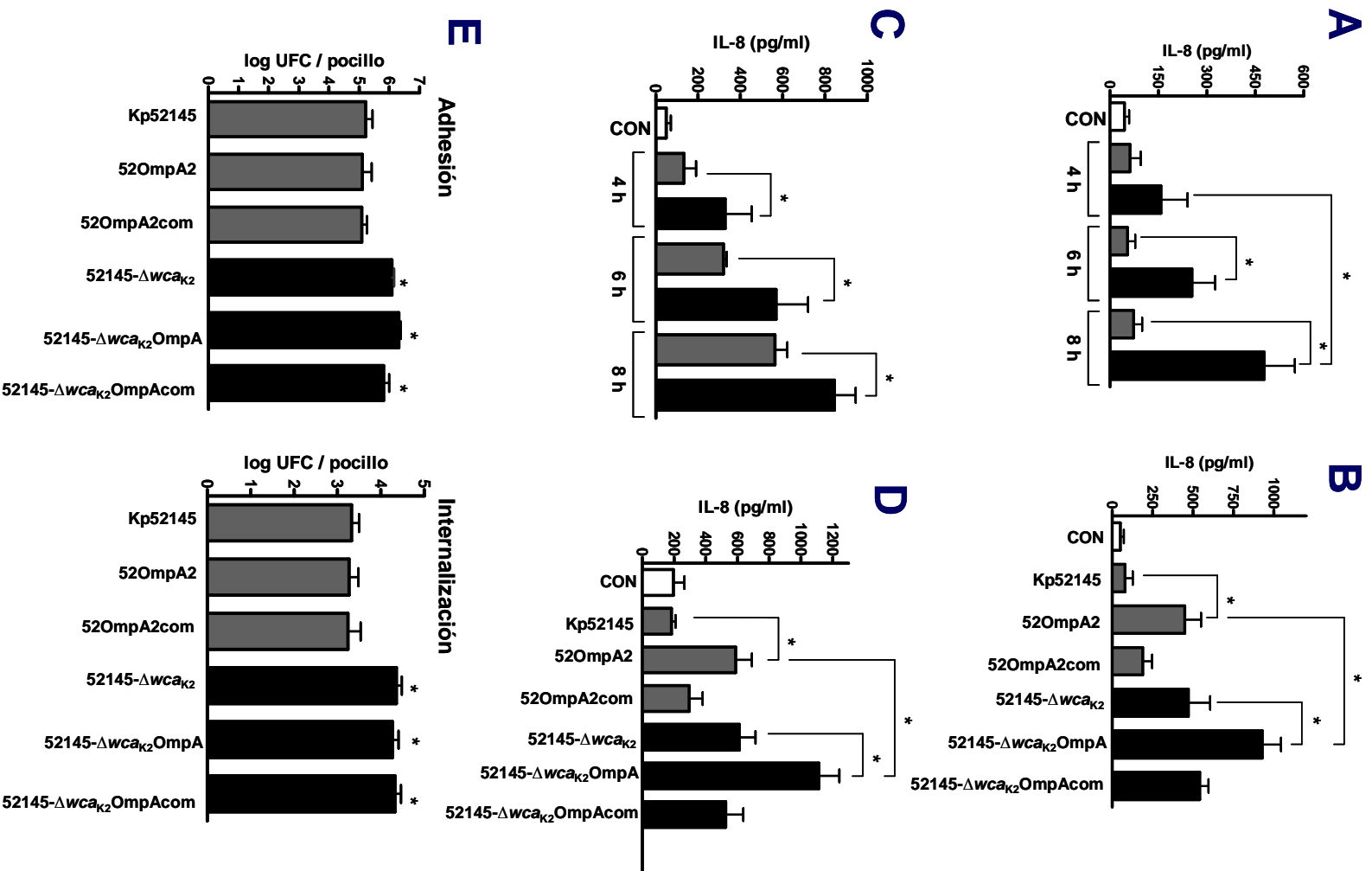


Figura 18. Un mutante *ompA* de *K. pneumoniae* induce una mayor secreción de IL-8 que la cepa silvestre en las células epiteliales de pulmón A549. (A) ELISA de la IL-8 liberada

por las células A549. La barra blanca indica células no tratadas (CON) y las barras grises y negras células infectadas a diferentes tiempos con Kp52145 y 52OmpA2, respectivamente (n=3). (B) ELISA de la IL-8 liberada por las células A549. La barra blanca indica células no tratadas (CON). Las barras grises y negras corresponden a las células infectadas con diferentes cepas *K. pneumoniae* tras 8h de infección (n=3). (C) ELISA de la IL-8 liberada por las células A549. La barra blanca indica células no tratadas (CON) y las barras grises y negras células infectadas con 52OmpA2 y 52145- Δwca_{K2} OmpA, respectivamente, a diferentes tiempos de infección (n=3). (D) ELISA de la IL-8 liberada por las células NHBE. La barra blanca indica células no tratadas (CON) y las barras grises y negras células infectadas con diferentes cepas de *K. pneumoniae* tras 8h de infección (n=3). (E) Adhesión (izquierda) e internalización (derecha) de diferentes cepas de *Klebsiella* por células A549 (n=3). Barras grises: cepas con CPS; barras negras: cepas carentes de CPS. Los datos (A-E) son medias y error estándar (barras de error). (A-D) *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a las comparaciones indicadas (análisis de varianza de una cola, ANOVA). (E) *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a los resultados de Kp52145 (t test de una cola).

En la **Figura 18C** se comparan los niveles de IL-8 secretados por las cepas 52OmpA2 y 52145- Δwca_{K2} OmpA después de 4 h, 6 h y 8 h de infección. En cualquiera de los tiempos analizados, los niveles de IL-8 secretados por las células infectadas con la cepa 52145- Δwca_{K2} OmpA fueron significativamente mayores que aquellos secretados por las células infectadas con 52OmpA2 (**Fig. 18C**). Se obtuvieron resultados similares a los ya descritos cuando se infectaron células primarias de epitelio pulmonar humano NHBE (**Fig. 18D**). Por tanto, todos estos resultados nos muestran que tanto CPS como OmpA son factores bacterianos necesarios para reducir la secreción de IL-8 por las células epiteliales infectadas con *K. pneumoniae*.

Los datos de adhesión e internalización en las células epiteliales A549 mostraron que no hay diferencias significativas entre los mutantes *ompA* y sus respectivas cepas parentales (**Fig. 18E**) (para cada comparación entre las cepas que expresan CPS y las que no, $p < 0,05$, test t student de una cola). Resultados previos (Cortés *et al.*, 2002a; Sahly *et al.*, 2000), ya demostraron que cepas desprovistas de CPS se adhieren y son internalizadas con mayor eficiencia que las cepas capsuladas.

1.2 El mutante *ompA* atenúa la secreción de IL-8 inducida por IL-1 β

Recientemente, hemos publicado que Kp52145 ejerce un efecto antiinflamatorio en células epiteliales y, así, reduce la secreción de IL-8 inducida por agonistas inflamatorios como la IL-1 β (Regueiro *et al.*, 2011). Molecularmente, este efecto antiinflamatorio es dependiente de la deubiquitinasa CYLD y de la fosfatasa MKP-1 (DUSP1) que Kp52145 induce activando el receptor NOD1 (Regueiro *et al.*, 2011).

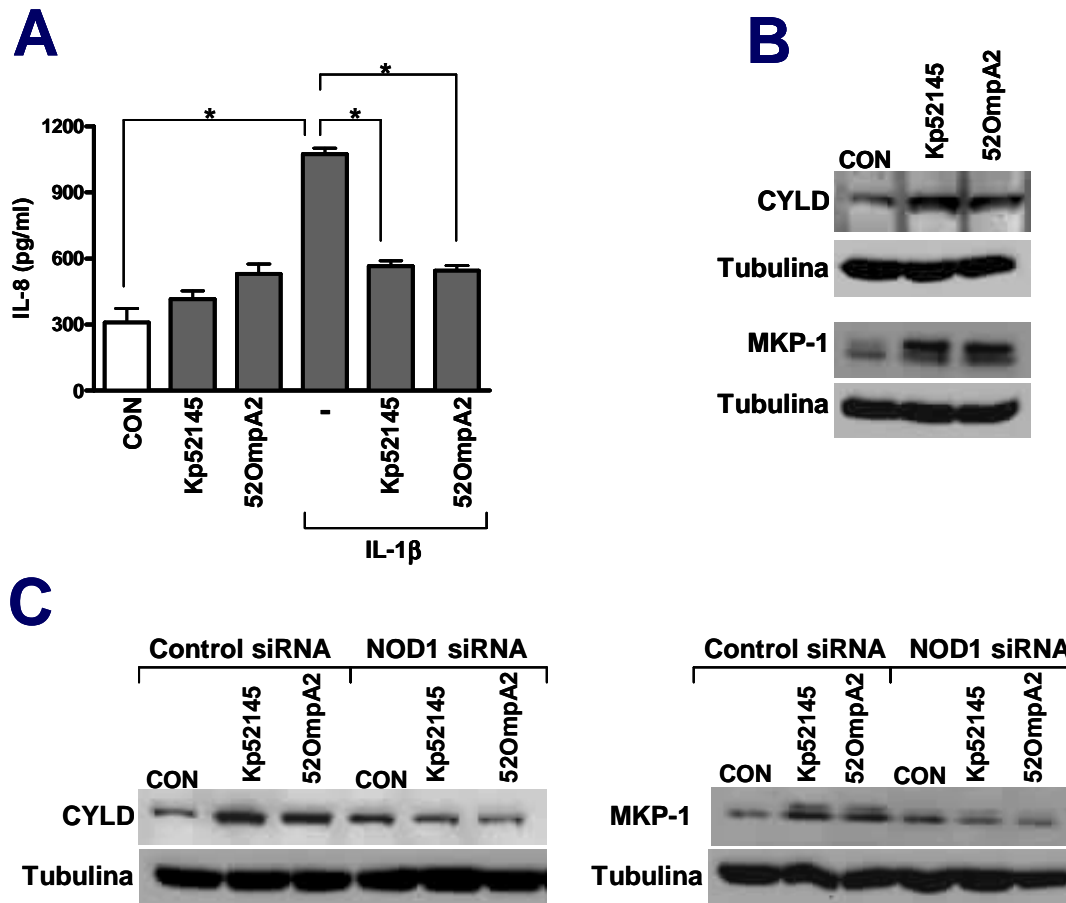


Figura 19. *K. pneumoniae* atenúa la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β . (A) ELISA de la IL-8 liberada por las células A549. La barra blanca indica células no tratadas (CON) y las barras grises células infectadas con Kp52145 o 52OmpA2 durante 1h y, posteriormente, tratadas durante 2 h con IL-1 β (50 ng/ml) (n=3). *, $p < 0,05$ (para las comparaciones indicadas; análisis de varianza de una cola, ANOVA). (B) Análisis por *Western blot* de los niveles de CYLD, MKP-1 y tubulina en células A549. CON indica células no infectadas y los otros 2 carriles indican células infectadas con Kp52145 o 52OmpA2 durante 3h. Los datos son representativos de tres experimentos diferentes. (C) Análisis por *Western blot* de los niveles de CYLD, MKP-1 y tubulina en células A549 transfectadas con el siARN control o con el siARN para NOD1. CON indica células no infectadas y los otros 2 carriles células infectadas con

Kp52145 ó 52OmpA2 durante 3h. Los datos son representativos de tres experimentos diferentes.

Para determinar si OmpA pudiera contribuir a este efecto antiinflamatorio, estudiamos el efecto de la cepa 52OmpA2 en la secreción de IL-8 inducida por IL-1 β en células A549 exactamente tal y como hemos descrito (Regueiro *et al.*, 2011). La cepa 52OmpA2 atenuó la secreción de IL-8 inducida por IL-1 β , de manera semejante a como lo hizo Kp52145 (**Fig. 19A**). Además, los análisis mediante *Western blot* revelaron que 52OmpA2 también indujo la expresión de CYLD y MKP-1 (**Fig. 19B**), fenómeno dependiente de NOD1 ya que 52OmpA2 no incrementó los niveles de ambas proteínas en células deficientes para NOD1 (**Fig. 19C**).

1.3 El mutante *ompA* de *K. pneumoniae* induce *in vivo* mayores niveles de citoquinas proinflamatorias que los inducidos por la cepa silvestre.

A continuación, se analizaron los niveles de citoquinas inflamatorias inducidas *in vivo* tanto por la cepa 52OmpA2 como por la cepa silvestre. Como se ha descrito en el apartado 28 de Material y Métodos (página 95), se midió la expresión de las citoquinas *kc*, *tnf α* e *il6* por RT-qPCR a las 6h, 12h y 24h post-infección en los pulmones de los ratones infectados. Los niveles de *kc*, *tnf α* e *il6* fueron mayores en los pulmones de ratones infectados que en pulmones de ratones no infectados ($p < 0,05$ para todas las comparaciones respecto a ratones no infectados (test t student de una cola) (**Fig. 20**). A cualquiera de los tiempos analizados, los niveles de *kc* fueron mayores en los pulmones de ratones infectados con 52OmpA2 que en aquellos infectados con Kp52145 (**Fig. 20**). Sólo a las 12h post-infección, los niveles de *tnf α* fueron superiores en los pulmones de los ratones infectados con 52OmpA2 que en aquellos infectados con Kp52145 (**Fig. 20**). Únicamente a las 12h y 24h post-infección, los niveles de expresión de *il6* fueron superiores en los pulmones de ratones infectados con 52OmpA2 que en los infectados con Kp52145. La cepa 52OmpA2com indujo los mismos niveles de las tres citoquinas que la cepa silvestre a cualquiera de los tiempos post-infección analizados (**Fig. 20**). En resumen, estos datos muestran que OmpA también contribuye *in vivo* a la atenuación de respuestas inflamatorias.

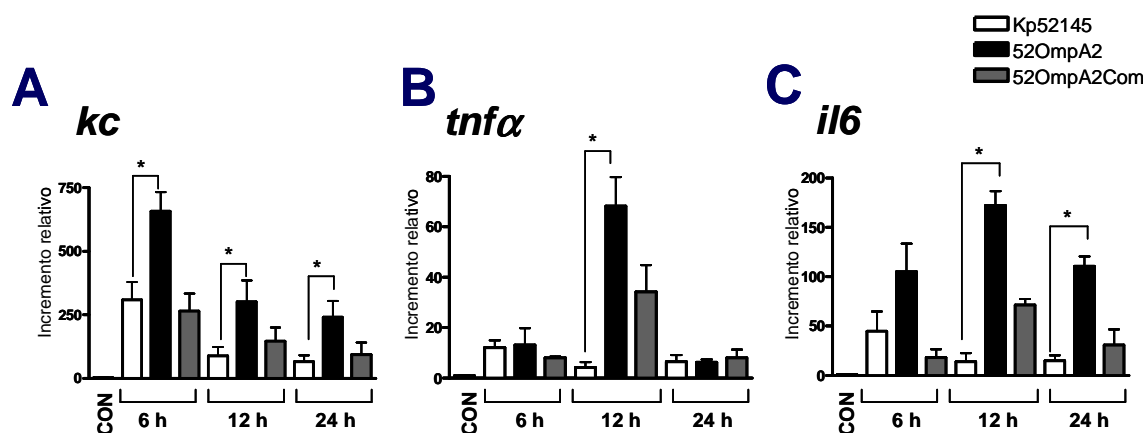


Figura 20. Expresión de citoquinas proinflamatorias en los pulmones de ratones infectados con *K. pneumoniae*. La expresión de los ARNm de *kc* (A), *tnfa* (B) e *il6* (C) se determinó mediante RT-qPCR a diferentes tiempos post-infección. (5 ratones/tiempo). Los ratones control no infectados se señalan como CON (n=5), las barras blancas indican ratones infectados con la cepa silvestre kp52145 (n=15), las barras negras ratones infectados con el mutante 52OmpA2 (n=15) y las barras grises ratones infectados con la cepa complementada 52OmpA2com (n=15). Media \pm error estándar (barras de error). *, $p < 0,05$ (para las comparaciones indicadas; análisis de varianza de una cola, ANOVA)

1.4 La expresión de IL-8 inducida por un mutante *ompA* de *K. pneumoniae* es dependiente de la activación de NF- κ B.

Nuestro próximo objetivo fue identificar que vías de señalización eran las responsables de la respuesta inflamatoria activada por la cepa 52OmpA2. Numerosos estudios muestran que NF- κ B participa en la activación de la expresión de genes inducibles involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo *il-8* (Ghosh *et al.*, 1998). Por tanto, analizamos si 52OmpA2 activaba la vía canónica del NF- κ B. Para ello, en primer lugar, se infectaron células A549 transfectadas con una construcción en la que la expresión del gen de la luciferasa es dependiente de NF- κ B. Al contrario que Kp52145, la cepa 52OmpA2 sí indujo la expresión del sistema indicador (**Fig. 21A**). La cepa complementada 52OmpA2com indujo similares niveles de actividad luciferasa que la cepa silvestre. Los niveles inducidos por el mutante doble 52145- Δwca_{k2} OmpA fueron superiores que aquellos inducidos por el mutante descapsulado, cepa 52145- Δwca_{k2} , mientras que la cepa complementada, 52145- Δwca_{k2} OmpAcom, indujo la misma actividad luciferasa que el mutante descapsulado (**Fig. 21A**).

En condiciones basales de activación celular, NF- κ B se encuentra unido a I κ B α en el citoplasma lo que evita su translocación al núcleo. Tras una estimulación, quinasas específicas fosforilan I κ B α permitiendo su rápida degradación por parte del sistema ubiquitin proteosoma y la translocación al núcleo del NF- κ B, proceso unido a la fosforilación de su subunidad p65 (Hayden and Ghosh, 2008). Por consiguiente, para confirmar que efectivamente el mutante *ompA* activaba la vía canónica del NF- κ B, analizamos por *Western blot* los niveles de p65 fosforilado y de I κ B α en los extractos de células infectadas con la cepa 52OmpA2 a distintos tiempos. A los 90 min post-infección se detectó p65 fosforilada en los extractos de las células infectadas (**Fig. 21B**). Además, estos niveles fueron superiores en los extractos de las células infectadas con la cepa 52OmpA2 que en aquellos infectados con la cepa Kp52145. La cepa complementada indujo los mismos niveles de p65 fosforilado que la cepa silvestre (**Fig. 21B**). En cuanto a I κ B α , a los 15 min post-infección ya se detectó su degradación en los extractos celulares infectados con 52OmpA2 y fue más aparente a los 90 min de infección (**Fig. 21C**). Por el contrario, en los extractos de células infectadas con la cepa Kp52145 la degradación de I κ B α sólo se detectó a los 15 y 30 min post-infección. En tiempos posteriores, los niveles de I κ B α fueron similares al los de las células no infectadas (**Fig. 21C**). También se analizaron los niveles de I κ B α en células infectadas con los mutantes desprovistos de CPS. Así, en las células infectadas con 52145- Δwca_{K2} OmpA la degradación de I κ B α se detectó claramente a los 15 min después de la infección y prácticamente fue total a los 90 min. La degradación de I κ B α en los extractos de células infectadas con 52145- Δwca_{K2} fue aparente a los 30 min post-infección y todavía se detectó tras 90 min. (**Fig. 21C**).

Para determinar la contribución de *ompA* en la expresión de IL-8 inducida por la activación de NF- κ B, nos preguntamos si CAPE (inhibidor químico usado para bloquear la vía de señalización del NF- κ B [Natarajan *et al.*, 1996]), alteraría la expresión de IL-8 inducida por la infección. Tal y como se muestra en la **Figura 21D**, los niveles de IL-8 inducidos por las cepas 52OmpA2 y 52145- Δwca_{K2} OmpA fueron inferiores en las células tratadas con CAPE (15 μ g/ml) que en aquellas tratadas con DMSO, solvente para CAPE. La adición de DMSO a las células infectadas con 52OmpA2 o con 52145- Δwca_{K2} OmpA no

afectó a los niveles de IL-8 inducidos por la infección (sin DMSO, 457 ± 28 y 721 ± 70 pg/ml, respectivamente; con DMSO, 490 ± 35 y 747 ± 64 pg/ml, respectivamente). Las células sin infectar tratadas con CAPE (15 μ g/ml) secretaron los mismos niveles de IL-8 (110 ± 85 pg/ml) que las células sin infectar no tratadas (97 ± 50 pg/ml).

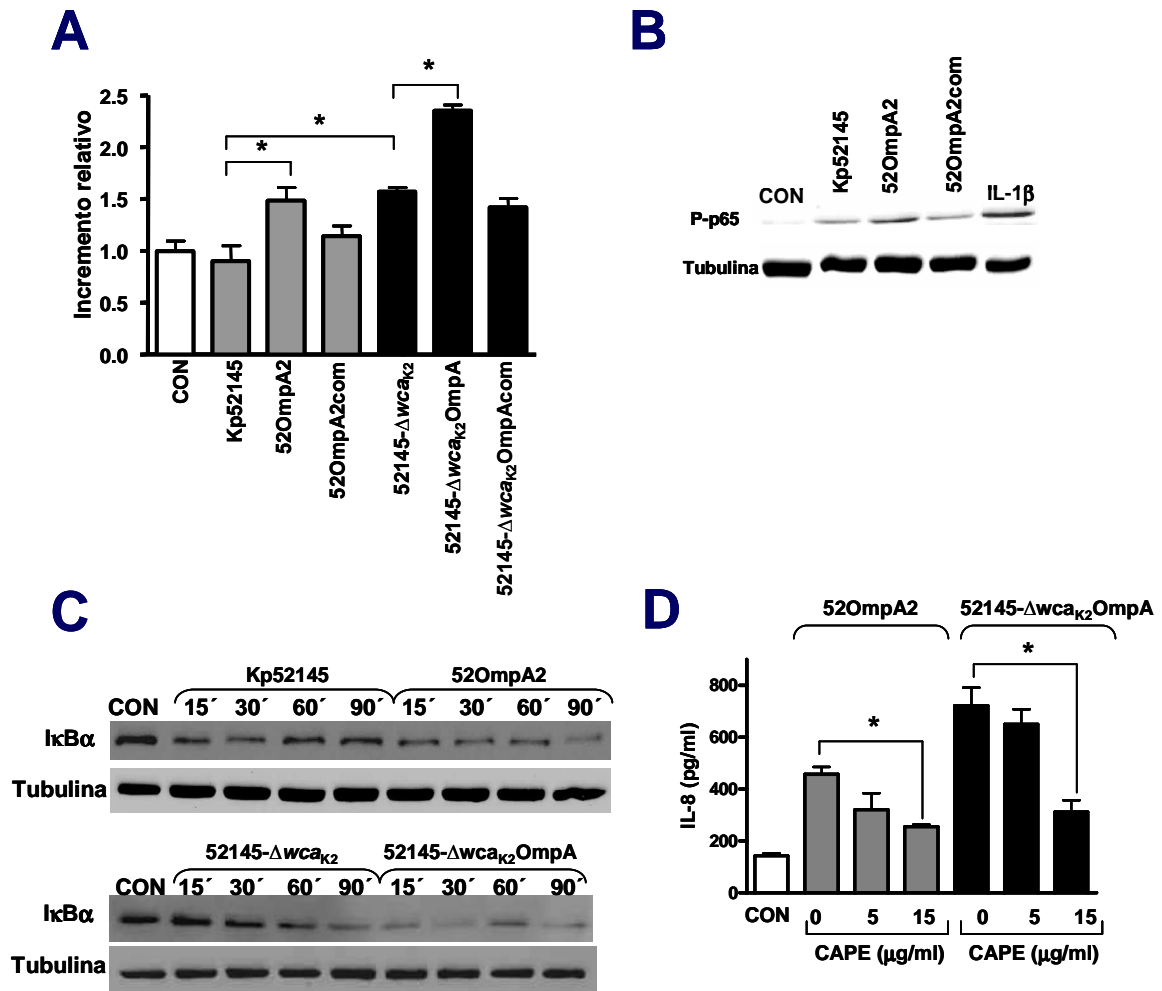


Figura 21. La activación del NF- κ B es necesaria para la expresión de IL-8 inducida por un mutante *ompA* de *K. pneumoniae*. (A) Activación del sistema indicador NF- κ B-luciferasa en células A549 infectadas con distintas cepas de *K. pneumoniae* durante 8h. La barra blanca indica células no tratadas (CON), las barras grises indican células infectadas con cepas capsuladas y las barras negras representan células infectadas con cepas descapsuladas. Los valores de luciferasa están corregidos por los valores de *Renilla* y se representan como valores relativos respecto a las células no tratadas (n=3). *, $p < 0,05$ (para las comparaciones indicadas; one-way ANOVA). (B) Análisis por *Western blot* de los niveles de p65 fosforilada (P-p65) y tubulina detectados en lisados celulares infectados con cepas de *K. pneumoniae* durante 90 min. Como control positivo IL-1 β (20 ng/ml 30 min). Los resultados son

representativos de tres experimentos diferentes. (C) Análisis por *Western blot* de los niveles de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y tubulina en los lisados de células A549 no infectadas (CON; tiempo 0) o de células infectadas a diferentes tiempos con las cepas de *K. pneumoniae*. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes. (D) ELISA de la IL-8 liberada por las células A549. La barra blanca representa las células no infectadas (CON), las barras grises células infectadas con la cepa 52OmpA2 y las negras células infectadas con la cepa 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$ OmpA durante 6h en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de CAPE, el cual se añadió 1h antes de la infección y se mantuvo durante todo el experimento (n=3). Los datos de A y D son medias y errores estándar (barras de error).

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que la activación de la vía canónica de NF- κ B es necesaria para la expresión de IL-8 inducida por *ompA* en células A549. Más aún, tanto el CPS como OmpA contribuyen a limitar la activación de esta vía de señalización.

1.5 La expresión de IL-8 inducida por un mutante *ompA* de *K. pneumoniae* es dependiente de la activación de las MAPKs.

Además de la cascada de señalización del NF- κ B, es muy frecuente que los agonistas inflamatorios también activen las vías de señalización de las MAPKs (Dong *et al.*, 2002). La activación de las tres MAPKs: p38, p44/42 y JNK se realiza a través de una cascada de fosforilaciones secuenciales de residuos de serinas y treoninas. Por consiguiente, se analizaron los niveles de fosforilación de las tres MAPKs en extractos de células A549 infectadas con la cepa 52OmpA2. Los experimentos de *Western blot* revelaron que 52OmpA2 indujo la fosforilación de las tres MAPKs pero, además, este hecho ocurrió antes en las células infectadas con 52OmpA2 que en aquellas infectadas con Kp52145 (**Fig. 22A**). Los niveles de fosforilación de las MAPKs también se estudiaron en células infectadas con las cepas 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$ OmpA y 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$. En las células infectadas con 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$ OmpA, la fosforilación de p38 fue aparente a los 30 min mientras que ésta sólo fue clara a los 60 min post-infección en células infectadas con la cepa 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$. En ambos casos, los niveles máximos de fosforilación de p38 se detectaron a los 120 min post-infección. No se observaron diferencias claras en la fosforilación de p44/42 entre las células infectadas con 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$ OmpA y con 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$. En las células infectadas con 52145- $\Delta\text{wca}_{\text{K}2}$ OmpA, los máximos niveles de

fosforilación de la MAPK JNK se observaron a los 30 min post-infección, mientras que la fosforilación de JNK en células infectadas con 52145- Δwca_{K2} fue aparente a los 30 min de infección y los niveles máximos se detectaron a los 120 min después de la infección (Fig. 22A).

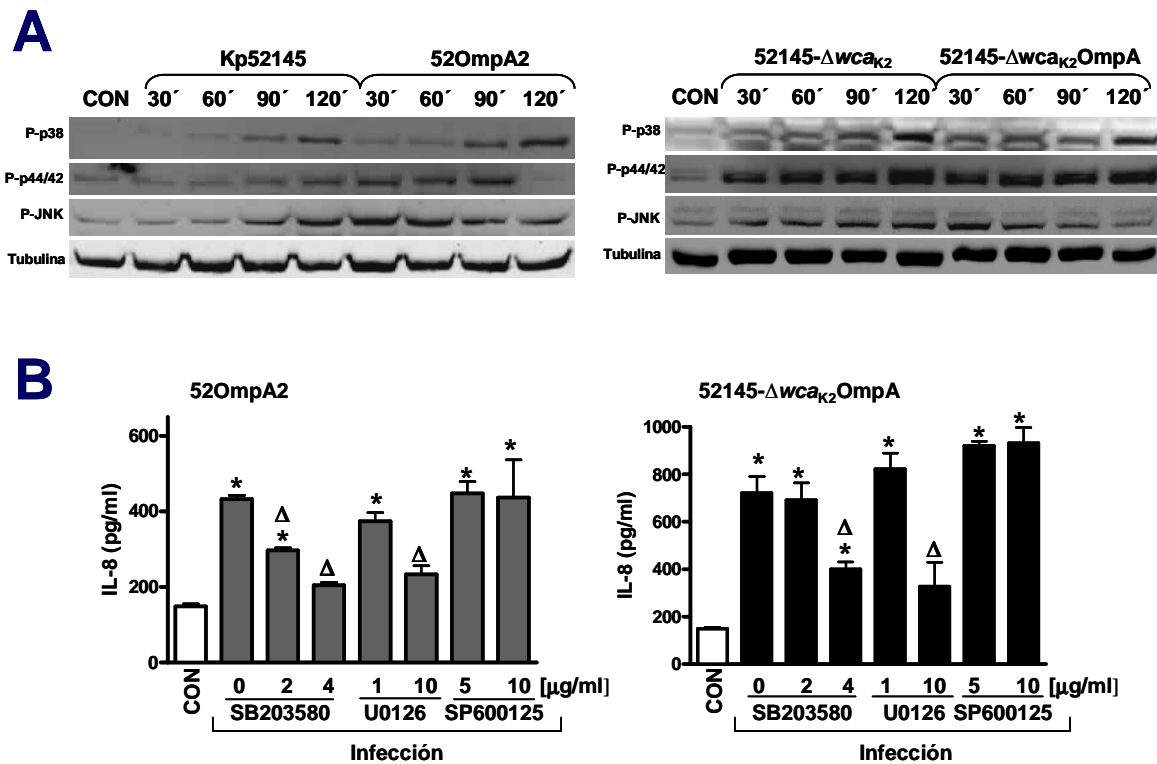


Figura 22. La activación de las MAPKs es necesarias para la expresión de IL-8 inducida por un mutante *ompA* de *K. pneumoniae*. (A) Western blot de los niveles de p38 fosforilada (P-p38), p44/42 fosforilada (P-p44/42), JNK fosforilada (P-JNK) y tubulina en extractos celulares de A549. CON indica células no infectadas mientras que el resto de carriles corresponden a infecciones con cepas de *K. pneumoniae* a diferentes tiempos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (B) ELISA de la IL-8 liberada por las células A549. La barra blanca representa las células no infectadas (CON), las barras grises células infectadas con la cepa 52OmpA2 y las negras células infectadas con la cepa 52145- Δwca_{K2} OmpA durante 6h en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de SB203580 (2 y 4 μ g/ml; inhibidor de la MAPK p38), U0126 (1 y 10 μ g/ml; inhibidor de la MAPK p44/42) o SP600125 (5 y 10 μ g/ml; inhibidor de la MAPK JNK) que fueron añadidos 2h antes de las infecciones y mantenidos durante todo el experimento (n=3). Los datos (B) representan medias y error estándar (barras error). *, $p < 0,05$ (los resultados son significativamente diferentes de los resultados de las células no tratadas; análisis de varianza de una cola, ANOVA). Δ , $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes de los resultados de las células infectadas en ausencia de inhibidores).

Para estudiar si la activación de las MAPKs está implicada en la expresión de IL-8 inducida por la cepa 52OmpA2, se infectaron las células en presencia de inhibidores químicos específicos para cada una de las MAPKs. SB203580, inhibidor específico de la MAPK p38 redujo los niveles de IL-8 inducidos por la cepa 52OmpA2 (**Fig. 22B**). El inhibidor de la p44/42, U0126, también redujo la cantidad de IL-8 inducida por la infección con 52OmpA2 aunque únicamente a la concentración más alta probada (**Fig. 22B**). Finalmente, SP600125, inhibidor de JNK, no alteró los niveles de IL-8 inducidos por 52OmpA2 (**Fig. 22B**). A continuación, se realizaron los mismos experimentos en células infectadas con 52145- Δwca_{K2} OmpA. Los inhibidores SB203580 y U0126, y sólo a las máximas concentraciones probadas, también redujeron los niveles de IL-8 inducidos por 52145- Δwca_{K2} OmpA, mientras que el inhibidor SP600125 no redujo los niveles de IL-8 (**Fig. 22B**). Señalar que las células tratadas sólo con SB203580, U0126 y SP600125 secretaron cantidades similares de IL-8 (120 ± 95 , 95 ± 67 , y 135 ± 87 pg/ml, respectivamente) que aquellas no tratadas (130 ± 75 pg/ml). Todos estos resultados indican que la activación de las MAPKs p38 y p44/42 están implicadas en la secreción de IL-8 inducida por un mutante *ompA* de *K. pneumoniae* en células A549.

1.6 Disección de los receptores necesarios para la activación de las respuestas inflamatorias inducidas por los mutantes *ompA* de *K. pneumoniae*

Los PRRs tienen un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos por parte de las células epiteliales del tracto respiratorio y en la subsecuente activación de las vías de señalización y respuestas inflamatorias. Por consiguiente, nos planteamos identificar qué receptor(es) era el responsable del reconocimiento de los mutantes *ompA* de *K. pneumoniae* empleando tanto la activación del NF- κ B como la secreción de IL-8 o marcadores de activación celular. Casi todos los TLRs activan vías de señalización celulares mediante interacciones de sus dominios TIR con la molécula adaptadora MyD88 (Kenny and O'Neill, 2008). Para estudiar la participación de los TLRs en la activación celular inducida por los mutantes *ompA*, se redujo la expresión de MyD88 empleando RNA de interferencia. En las células deficientes en MyD88, la cepa 52OmpA no indujo ni la activación de NF- κ B ni la secreción de IL-8 (**Fig. 23A y**

B, respectivamente). Sin embargo, la cepa 52145- Δwca_{K2} OmpA sí indujo la activación de NF- κ B y la secreción de IL-8 en las células deficientes en MyD88, aunque los niveles fueron significativamente inferiores a aquellos obtenidos en las células infectadas pero transfectadas con RNA de interferencia control (**Fig.23 A-B**). Se obtuvieron resultados similares cuando las células se infectaron con la cepa 52145- Δwca_{K2} (**Fig. 23A-B**). Para determinar el papel de los receptores TLR2 y TLR4 en la activación celular inducida por el mutante *ompA*, también se redujo su expresión mediante RNA de interferencia. Los resultados que se muestran en la **Figura 23C-F**, indican que los dos receptores contribuyen a la activación celular inducida tanto por 52OmpA2 como por 52145- Δwca_{K2} OmpA. No obstante, la cepa 52145- Δwca_{K2} OmpA todavía desencadenó activación de NF- κ B e indujo la secreción de IL-8 en aquellas células deficientes en TLR2 ó TLR4 (**Fig. 23E-F**, respectivamente). Todos estos resultados sugieren que la activación de NF- κ B y la secreción de IL-8 inducidas por la cepa 52OmpA2 está mediada por la vía TLR2-TLR4-MyD88 y que 52145- Δwca_{K2} OmpA podría activar una vía adicional de señalización independiente de MyD88.

NOD1 es otro PRR expresado de manera constitutiva por las células epiteliales del tracto respiratorio (Girardin *et al.*, 2001; Hisamatsu *et al.*, 2003; Inohara and Núñez, 2003; Strober *et al.*, 2006) y también controla las cascadas de señalización dependientes de NF- κ B y de las MAPKs (Inohara and Núñez, 2003). Por tanto, nos planteamos si NOD1 pudiera ser el otro receptor responsable de la activación celular independiente de MyD88 inducida por 52145- Δwca_{K2} OmpA. Tal y como se muestra en la **Figura 23G y H**, se observó una reducción en la activación de NF- κ B y en la secreción de IL-8 en las células deficientes en NOD1 infectadas con la cepa 52145- Δwca_{K2} OmpA en comparación con las células transfectadas con el ARN de interferencia control e infectadas. Se obtuvieron resultados similares cuando las células fueron infectadas con la cepa 52145- Δwca_{K2} (**Fig. 23G y H**).

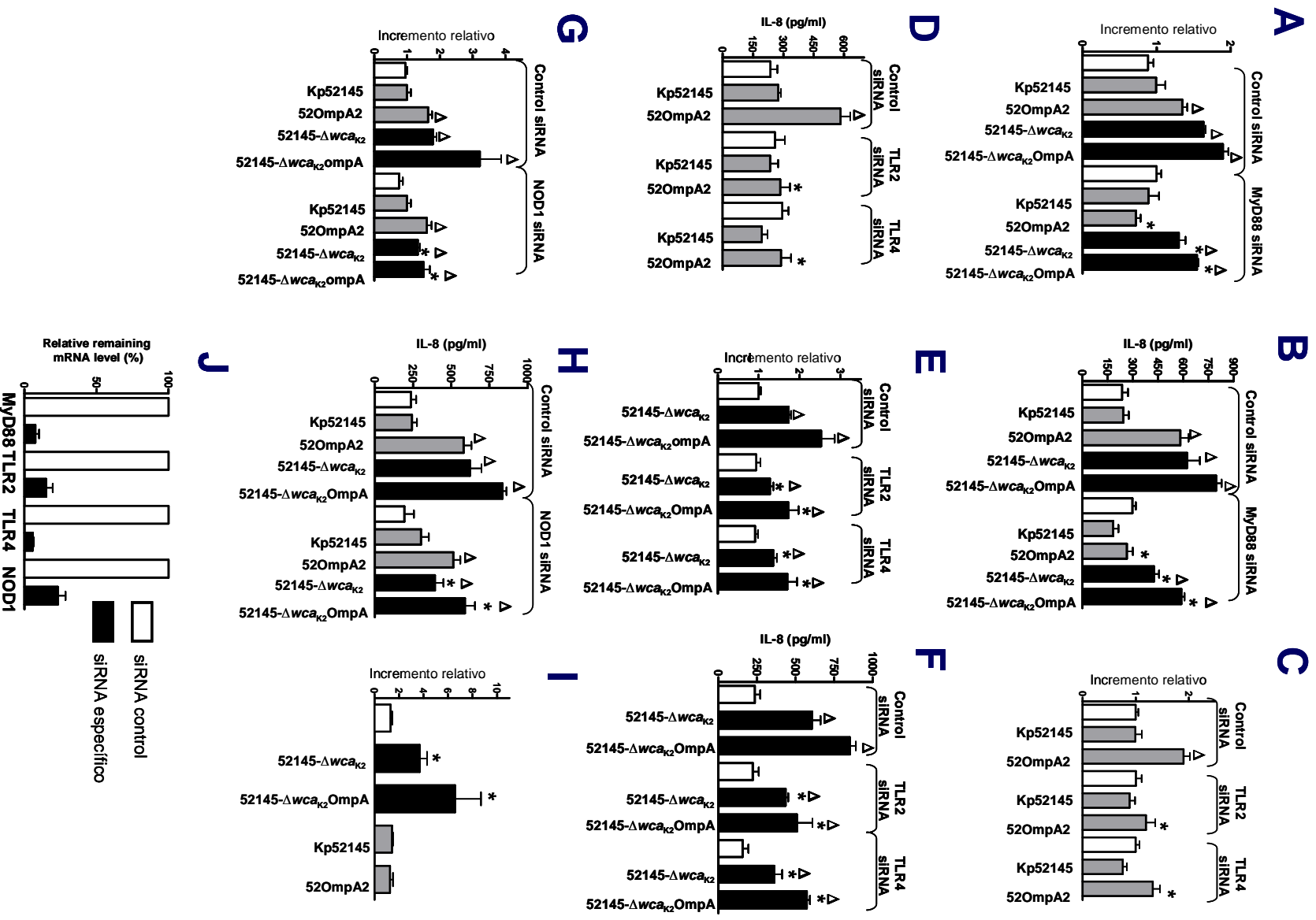


Figura 23. Papel del MYD88, TLR2, TLR4 y NOD1 en la activación celular inducida por los mutantes OmpA de *K. pneumoniae*. Las barras blancas indican células no tratadas, las barras grises, células infectadas con cepas que expresan CPS durante 8h y las barras negras

células infectadas con cepas desprovistas de CPS durante 8h. (A, C, E y G) Activación del sistema indicador NF- κ B-luciferasa en células A549 transfectadas con el siARN control o los siARNs indicados para los diferentes PRRs. Los valores luciferasa están corregidos por los valores de *Renilla* y se representan como valores relativos respecto a células no tratadas (n=3). (B, D, F y H) ELISA de la IL-8 liberada por las células A549 transfectadas con el ARN de interferencia control o los ARNs indicados para los diferentes PRRs (n=3). (I) Activación del sistema indicador NF- κ B-luciferasa en células HEK293T transfectadas con el plásmido HA-NOD1. Los valores luciferasa están corregidos por los valores de *Renilla* y se representan como valores relativos respecto a células no tratadas (los datos son medias y error estándar (barra de errores; n=3)). (J) Eficiencia de los distintos ARNs de interferencia cuantificada por RT-qPCR en muestras del mismo experimento mostradas en A-H. Los niveles de ARNm fueron normalizados a los de GADPH, y después se compararon los niveles relativos de ARNm en células transfectadas con el ARN de interferencia control o específico. A los niveles de ARNm en células transfectadas con el ARN control se les dio el valor arbitrario de 100% (los datos son medias y desviación estándar; n=3). (A-H) Δ , $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes de los resultados obtenidos con células no tratadas; análisis de varianza de una cola, ANOVA; *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes entre las células transfectadas con el siARN específico y las células transfectadas con el siARN control e infectadas con la misma cepa). (I) *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes de los resultados de las células no tratadas; análisis de varianza de una cola, ANOVA)

La activación de NF- κ B y la secreción de IL-8 inducidas por la cepa 52OmpA2 en células deficientes en NOD1 fueron similares a las observadas en las células tratadas con el ARN control (**Fig. 23G y H**). Al contrario que Kp52145 y 52OmpA2, las cepas 52145- Δwca_{K2} OmpA y 52145- Δwca_{K2} activaron NF- κ B en las células HEK293T que sobreexpresan NOD1 (**Fig. 23 I**). Este sistema experimental ha sido empleado por numerosos autores para documentar la activación de respuestas dependientes de NOD1 (Cheng *et al.*, 2010; Girardin *et al.*, 2003a; Girardin *et al.*, 2003c; Inohara *et al.*, 2001).

En resumen, todos estos resultados indican que la otra vía de señalización utilizada por la cepa 52145- Δwca_{K2} OmpA para activar NF- κ B e inducir la secreción de IL-8 es dependiente de la activación de NOD-1.

1.7 Virulencia del mutante *ompA* de *K. pneumoniae*

Para determinar la contribución de *ompA* a la virulencia de *K. pneumoniae*, se infectaron ratones C57BL/6JOlaHsd intranasalmente y se determinó la carga bacteriana en pulmón y tráquea transcurridas 24h y 96h de la infección.

Transcurridas 24h post-infección, tanto la cepa Kp52145 como 52OmpA2 colonizaron la tráquea y los pulmones, aunque la carga bacteriana de la cepa 52OmpA2 fue menor que la de la cepa silvestre (**Fig. 24A**). A las 96h post-infección, se observó un aumento de la carga bacteriana en la tráquea (**Fig. 24**, comparar A y B) y ésta no fue significativamente diferente entre las dos cepas (**Fig. 24B**). Por el contrario, la carga bacteriana de la cepa 52OmpA2 en los pulmones fue significativamente inferior que la de la cepa silvestre (**Fig. 24B**).

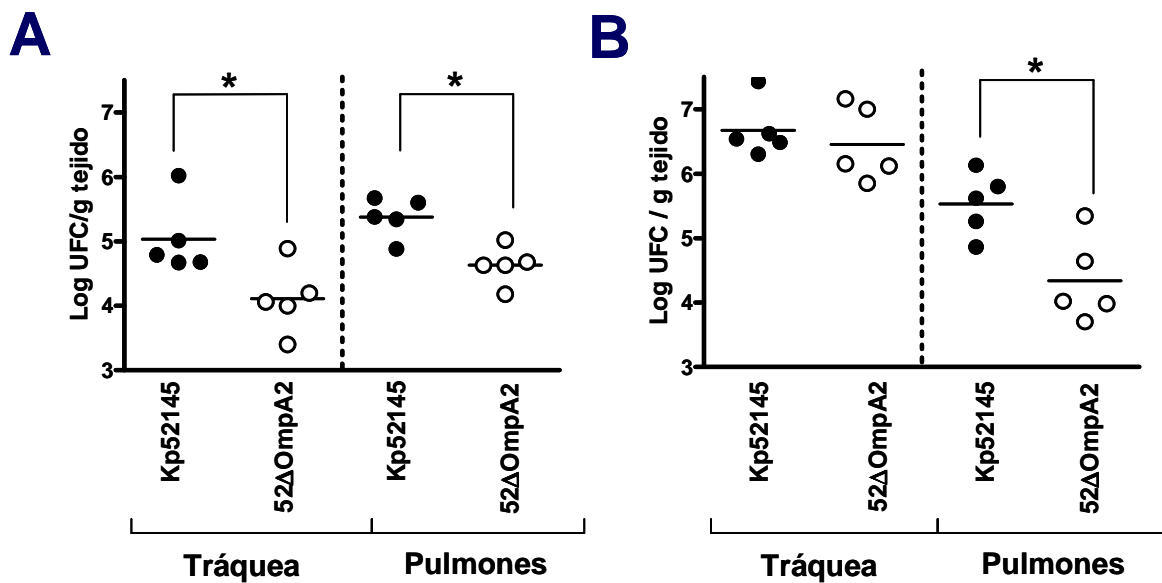


Figura 24. Recuento de las bacterias en dos órganos de ratón a 24h post-infección (A) o a 96 h post-infección (B). Los ratones fueron infectados intranasalmente con 5×10^4 ufc de la cepa Kp52145 (●) o la cepa 52OmpA2 (○). Los resultados se presentan como log de ufc/g de tejido. *, resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$; test t student de una cola) comparados con los resultados de la cepa Kp52145.

2. INTERACCIÓN DE *K. pneumoniae* CON FAGOCITOS PROFESIONALES: LA AMEBA SOCIAL *D. discoideum* Y LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Las amebas son organismos unicelulares que pertenecen al reino de los protistas. Son aerobios estrictos, su nutrición es heterótrofa y su temperatura óptima de crecimiento es de 21 °C ya que a temperaturas superiores pueden llegar a morir. Estos organismos son capaces de agregarse en función de un gradiente de AMPc, cuando las condiciones son adversas, para formar una matriz extracelular de proteínas, celulosa y polisacáridos (Escalante and Vicente, 2000; Jang and Gomer, 2011). *D. discoideum* se emplea como modelo para el estudio de este tipo de organismos ya que existen numerosas herramientas de genómica funcional ya desarrolladas. Su genoma, de 34 megabases, ha sido completamente secuenciado (Eichinger *et al.*, 2005) y se ha demostrado que contiene muchos genes homólogos a los de eucariotas superiores que no están presentes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. No es sorprendente, que *D. discoideum* se haya convertido en un modelo para el estudio de la movilidad celular, señales de transducción o diferenciación celular, entre otros. Pero, además, hay que señalar que *D. discoideum* también comparte muchas características con los macrófagos de mamíferos, en concreto la habilidad de fagocitar y matar bacterias. Por consiguiente, esta ameba social también se ha empleado como modelo para el estudio de la interacción entre bacterias y células fagocíticas (Cosson *et al.*, 2002; Strmecki *et al.*, 2005; Clarke, 2010; Hasselbring *et al.*, 2011). En este modelo, la resistencia bacteriana a la predación por la ameba, así como la persistencia intracelular se consideran marcadores de virulencia.

Numerosos trabajos indican que la fuente de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* es el ambiente. Sin embargo, los factores implicados en la supervivencia de este patógeno en el ambiente son prácticamente desconocidos. En este sentido, las amebas son algunos de los principales depredadores de los microorganismos tras su ingestión mediante fagocitosis. Por otra parte, cuando *Klebsiella* se encuentra en el pulmón, las principales células fagocíticas son los macrófagos alveolares. Este patógeno ha tenido que desarrollar estrategias para defenderse tanto de los macrófagos alveolares en el huésped como de las amebas en el ambiente. En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos del estudio de la interacción entre *K.*

pneumoniae y dos fagocitos profesionales, *D. discoideum* y los macrófagos alveolares.

2.1 PAPEL DE LAS ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE DE *K. pneumoniae* EN LA INTERACCIÓN CON FAGOCITOS PROFESIONALES

Se ha demostrado que las estructuras de superficie (CPS, LPS y OMPs) de *K. pneumoniae* juegan un papel importante en la virulencia de este patógeno (Lawlor *et al.*, 2006; March *et al.*, 2011; Moranta *et al.*, 2010; Raetz and Whitfield, 2002; Regueiro *et al.*, 2006; Regueiro *et al.*, 2009; Regueiro *et al.*, 2011). En esta parte de la Tesis Doctoral, nos centramos en el análisis del posible papel de estas estructuras en la interacción con los fagocitos profesionales.

2.1.1 Estudio de la interacción entre *K. pneumoniae* y la ameba *D. discoideum*

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Teresa Suárez del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, CSIC) gracias a una estancia de la doctoranda en el laboratorio mencionado.

En primer lugar, se determinó el medio de cultivo más adecuado para estudiar la interacción entre *K. pneumoniae* y *D. discoideum* (Froquet *et al.*, 2009). En este trabajo se empezó utilizando placas con medio SM sobre el que se plaqueaba la bacteria problema: la cepa de *K. aerogenes* control, Kp51245 ó 52145- Δwca_{K2} . A continuación, se colocaron sobre el césped bacteriano 4 gotas de 5 μ l cada una conteniendo diferentes cantidades de la ameba (desde 100 hasta 100.000). Las placas se incubaron a 21 °C durante 3 - 4 días hasta confirmar el crecimiento de *D. discoideum* sobre la bacteria. Sin embargo, la ameba sólo creció sobre la cepa de *K. aerogenes* control. A continuación, se realizó el ensayo empleando el medio HL5 pero a distintas concentraciones (5%, 10%, 20%, 30%, 40% y 100%). En el medio HL5 al 5%, se observó claramente que la ameba sólo creció sobre *K. aerogenes* y 152145- Δwca_{K2} (**Fig. 25**). Estos resultados indican que en el modelo de *D. discoideum*, al igual que en otras líneas celulares y en modelos de infección de ratón, una cepa desprovista de cápsula es menos virulenta que la cepa silvestre.

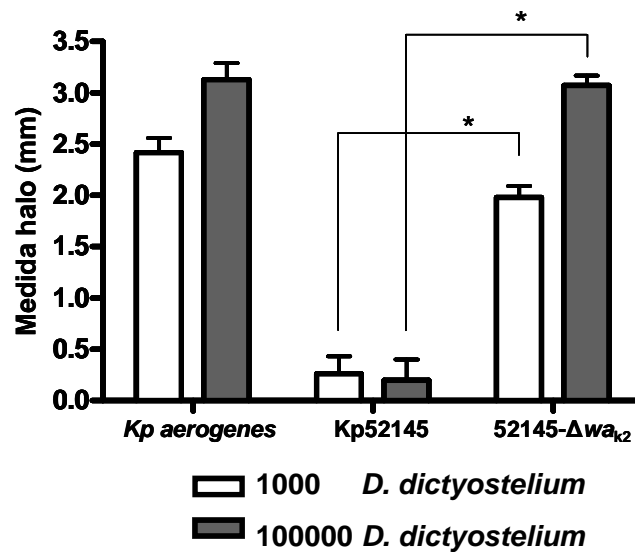


Figura 25: Estudio de la virulencia de *K. pneumoniae* en la ameba *D. discoideum*. Cuantificación de los halos (mm) correspondiente al crecimiento de 1000 (barras blancas) o 100.000 (barras grises) amebas *Dictyostelium* sobre céspedes formados con la cepa control (*K. aerogenes*), la cepa silvestre de *Klebsiella* (Kp52145) y la cepa descapsulada (52145- Δwca_{k2}). Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes. *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes para las comparaciones indicadas; test t student de dos colas).

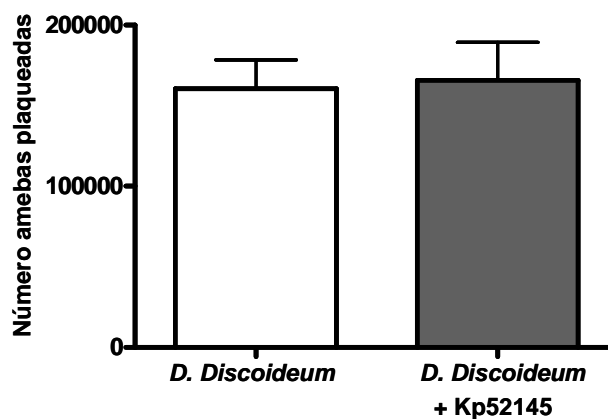


Figura 26: Citotoxicidad de Kp52145 hacia *D. discoideum*. La virulencia de la bacteria se determinó cuantificando el número de amebas vivas tras 3h de contacto. Los datos son medias y error estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como número de amebas plaqueadas por condición.

La ausencia de crecimiento de *D. discoideum* sobre el césped bacteriano de Kp52145 podría indicar un posible efecto citotóxico de la bacteria hacia la

ameba. Para comprobarlo, se pusieron en contacto las células de *D. discoideum* con la cepa Kp52145 durante 3h a 21 °C en agitación (180 rpm). Como control se incubó, bajo las mismas condiciones, solamente la ameba y la ameba en contacto con la cepa control *K. aerogenes*. Tras la incubación, se plaquearon diluciones seriadas de las amebas y las amebas con las bacterias, sobre placas de SM conteniendo un césped con *K. aerogenes* y se contaron el número de halos de crecimiento. Los resultados mostraron, en estas condiciones, que la cepa silvestre de *Klebsiella* no es citotóxica para *D. discoideum* (Fig. 26).

2.1.2 Papel del CPS en la interacción con fagocitos profesionales.

Se llevaron a cabo experimentos de fagocitosis tanto en macrófagos alveolares (línea MH-S) como en *D. discoideum* AX2. En el caso de los macrófagos alveolares, éstos se infectaron durante 30 min y el número de bacterias fagocitadas se cuantificó por plaqueo del lisado celular después de 90 min de tratamiento con Gm y PxB para eliminar las bacterias extracelulares. Las mismas infecciones se llevaron a cabo utilizando células crecidas sobre cubreobjetos de vidrio y procesadas para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. En la **Figura 27A** se puede observar que los macrófagos alveolares fagocitaron la cepa descapsulada con mayor eficiencia que la cepa silvestre. Esto se correlacionó perfectamente con el número de bacterias intracelulares detectadas en los experimentos de microscopía (Fig. 27B).

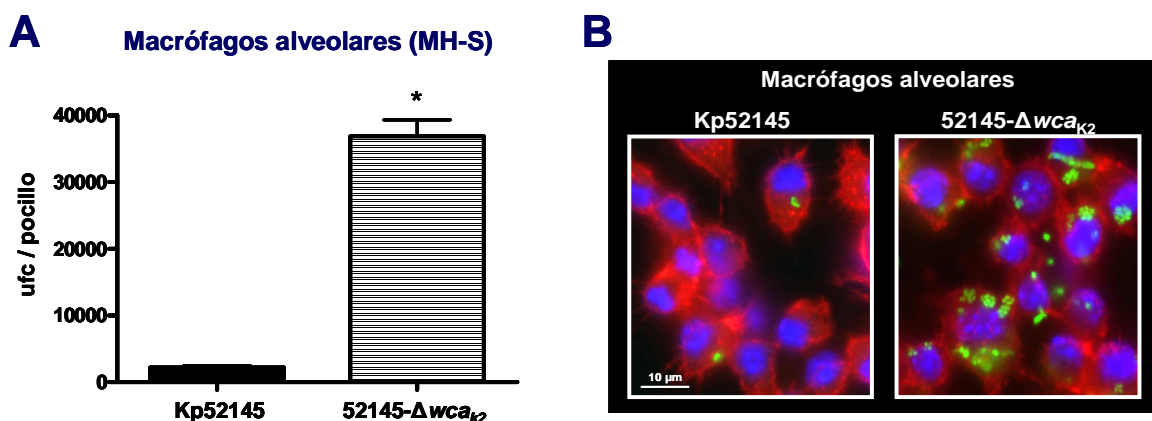


Figura 27: Efecto del CPS en la interacción con macrófagos. (A) Cuantificación del número de ufc por pocillo tras infectar los macrófagos MH-S (MOI 50:1) con Kp52145 (barra negra) o 52145- Δwca_{K2} (barra rayada) durante 30 min de contacto seguidos de 90 min de tratamiento

(300 µg/ml de Gm y 15 µg/ml de PxB) para eliminar las bacterias extracelulares. Los datos son medias y error estándar de tres experimentos independientes. *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes comparado con los resultados obtenidos de la cepa silvestre Kp52145; t test de 2 colas). (B) Microscopía confocal donde se observan los macrófagos alveolares con las cepas Kp52145 o 52145- Δwca_{K2} . Las bacterias expresan GFP (pFPV25.1Cm, verde). El núcleo de los macrófagos está teñido con Hoescht (azul) y el citoesqueleto con faloidina conjugada con RRX (rojo). Los macrófagos se fijaron con PFA 3% durante 20 min a TA.

En el caso de la interacción entre las cepas de *Klebsiella* y *D. discoideum*, se determinó el porcentaje de supervivencia (apartado 25 de Material y Métodos, página 93) de las bacterias después de 90 y 180 min de contacto a 21 °C en agitación. El porcentaje de supervivencia de la cepa Kp52145 fue de aproximadamente el 80 % tras 90 min de contacto y éste se mantuvo hasta los 180 min (**Fig. 28A**). Sin embargo, los valores de supervivencia de la cepa 52145- Δwca_{K2} no fueron significativamente diferentes que los presentados por la cepa control *K. aerogenes* (**Fig. 28A**). Igual que antes, las infecciones también se realizaron en amebas depositadas sobre cubreobjetos de vidrio para su posterior observación al microscopio (**Fig. 28B**). Para estos experimentos se empleó una cepa de *D. discoideum* que expresa de forma constitutiva la proteína RFP (cedida amablemente por la Dra. Teresa Suárez). En este caso, el porcentaje de amebas infectadas con la cepa silvestre no fue superior al 10 %, mientras que superó el 65 % cuando las amebas se infectaron con la cepa 52145- Δwca_{K2} . Por consiguiente, existe una perfecta correlación entre el número de amebas con bacterias intracelulares y la supervivencia de la bacteria en presencia de *D. discoideum*.

En conjunto, todos estos datos indican que la CPS juega un papel importante en la inhibición de la fagocitosis tanto por los macrófagos alveolares MH-S como por la ameba *D. discoideum*.

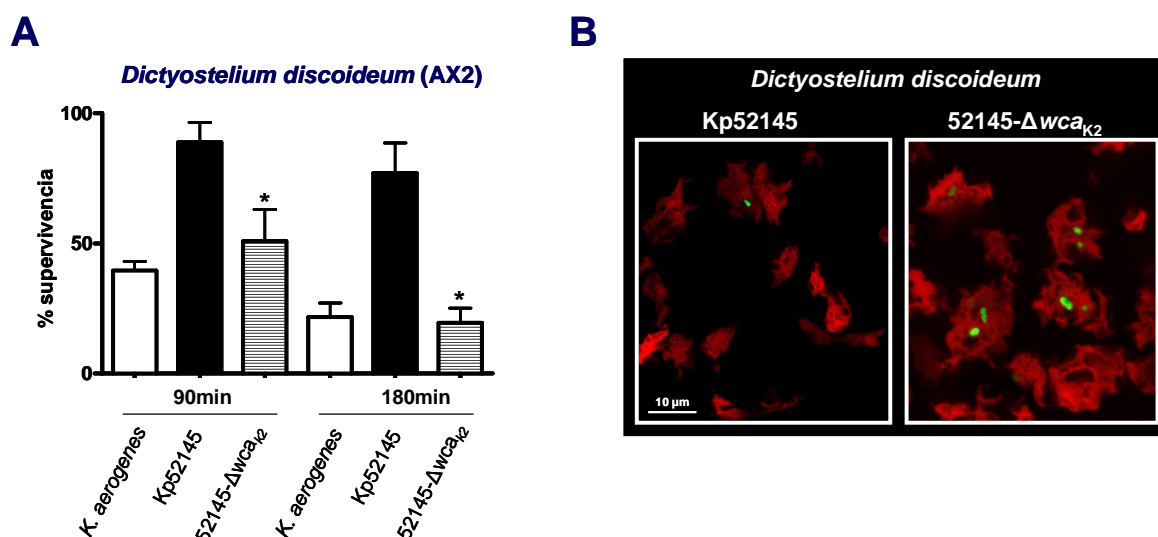


Figura 28: Efecto del CPS en la interacción con la ameba *D. discoideum*. (A) Porcentaje de supervivencia de la cepa Kp52145 (barras negras) y 52145- Δwca_{K2} (barras rayadas) tras 90 y 180 min de contacto con la cepa AX2 de *D. discoideum*. Como control se utilizó la cepa *K. aerogenes* (barras blancas). Los datos son medias y error estándar de tres experimentos independientes. *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes comparado con los resultados obtenidos de la cepa silvestre Kp52145; t test de 2 colas). (B) Microscopía confocal donde se observa la cepa AX2 de *D. discoideum* con las cepas bacterianas Kp52145 y 52145- Δwca_{K2} . Las bacterias expresan GFP y las amebas contienen un plásmido que expresa la proteína RFP (rojo). El núcleo de los macrófagos está teñido con Hoescht (azul) y el citoesqueleto con faloidina conjugada con RRX (rojo). Las fijaciones se llevaron a cabo tras 90 min de contacto con PFA 3% durante 20 min a TA.

2.1.3 Papel de la sección polisacáridica del LPS en la interacción con fagocitos profesionales

Estudios previos indican que tanto la cadena O como el núcleo del LPS son importantes para la virulencia de *K. pneumoniae* (Izquierdo *et al.*, 2003; Shankar-Sinha *et al.*, 2004). Para analizar el papel de estas dos secciones del LPS en la interacción con fagocitos profesionales, los macrófagos MH-S y la ameba *D. discoideum*, se infectaron con una serie de mutantes de *Klebsiella* que carecían de distintas secciones de la parte polisacáridica (**Fig. 29**). Así, uno de los mutantes no expresa cadena O (52O21), otro carece de cadena O y del primer azúcar del núcleo externo del LPS (52145- $\Delta wabM$), otro mutante no expresa ni cadena O ni los dos primeros azúcares del núcleo (52145- $\Delta wabK$) y, el último mutante carece de cadena O y los tres primeros azúcares que forman

parte del núcleo externo, 52145- $\Delta wabH$. Además, y con el fin de delimitar la contribución relativa del CPS, también se analizaron cepas isogénicas de la cepa 52145- Δwca_{K2} con las mutaciones descritas anteriormente (**Fig. 29**).

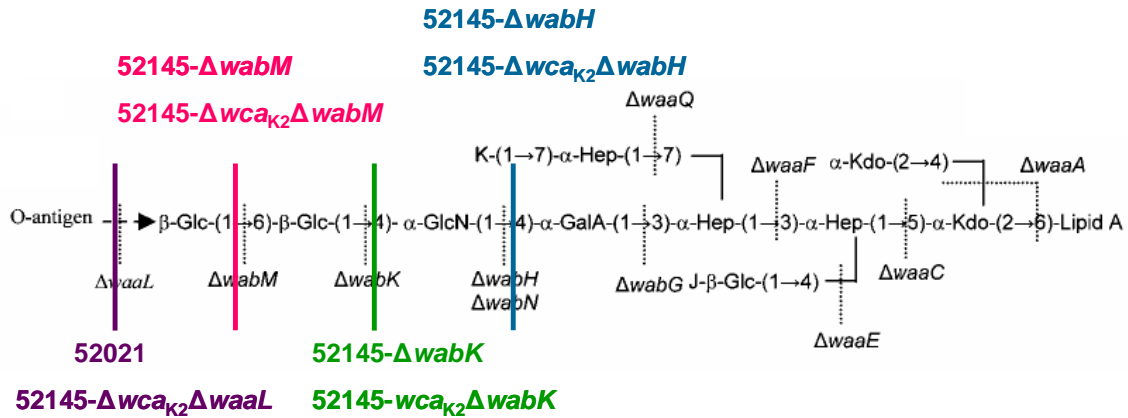


Figura 29: Representación esquemática de los mutantes de *K. pneumoniae* en la sección polisacárida del LPS.

Los macrófagos fagocitaron con igual eficiencia la cepa 52O21 y la cepa silvestre. En cambio, fagocitaron significativamente mayor número de las cepas que carecían de cadena O y de los azúcares del núcleo (**Fig. 30A**). Cuando se analizó la figura en la que aparecían las cepas sin CPS (**Fig. 30B**), no se observaron diferencias significativas entre el número de ufc fagocitadas de la cepa 52145- Δwca_{K2} y de la cepa descapsulada que no expresaba cadena O, cepa 52145- $\Delta wca_{K2}\Delta waaL$. A medida que las cepas carecían de elementos estructurales del LPS, es decir, que no expresaban cadena O y que el núcleo era cada vez menos completo, se observó un incremento en el número de bacterias internalizadas (**Fig. 30B**). Los resultados obtenidos cuando se infectó *D. discoideum* con las mismas cepas fueron parcialmente similares a los obtenidos con los macrófagos MH-S. A los 90 min de contacto, las cepas con el LPS menos completo (barras grises) presentaron valores de supervivencia inferiores que los que presentaban las cepas silvestre y descapsulada (barras negras y blancas rayadas, respectivamente; **Fig. 30 C y D**). Señalar que no se encontraron diferencias en el porcentaje de supervivencia entre el mutante descapsulado y el mutante que carecía de cadena O (cepa 52O21; $p < 0,05$, t test de dos colas). Al contrario que en el caso de la cepa silvestre

Kp52145, tras 180 min de contacto, los porcentajes de supervivencia de todas las cepas se redujeron, aunque se mantuvieron las diferencias relativas entre las cepas.

Macrófagos alveolares (MH-S)

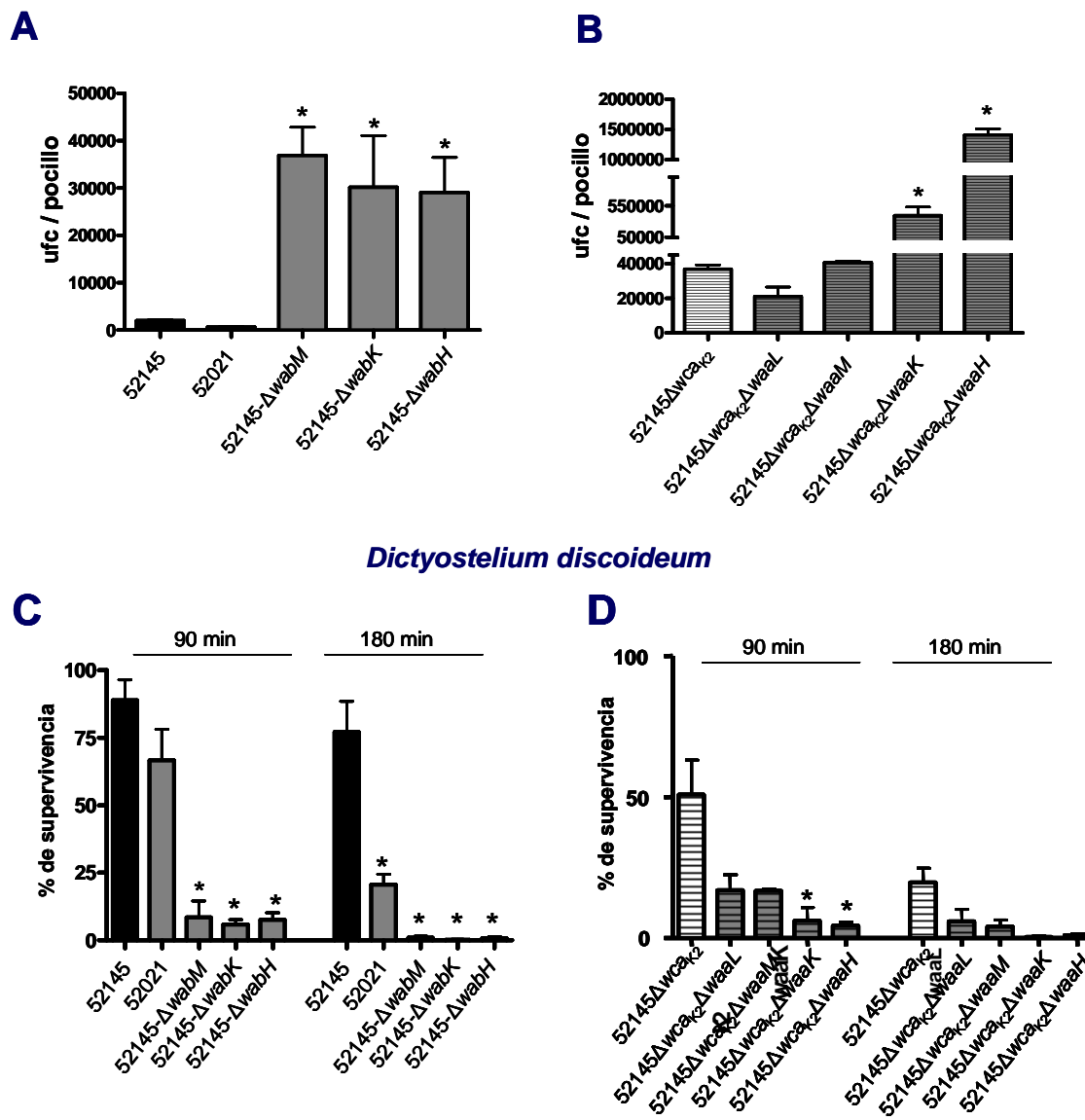


Figura 30: Papel de la sección polisacáridica del LPS en la interacción con fagocitos profesionales. (A-B) Los macrófagos alveolares MH-S fueron infectados (MOI 50:1) durante 30 min con los mutantes indicados. Las bacterias intracelulares se cuantificaron tras 90 min de tratamiento con Gm y PxB. (C-D) Porcentaje de supervivencia tras 90 y 180 min de contacto de los mutantes indicados en *D. discoideum*. Las infecciones con las cepas capsuladas están representadas con barras lisas; las infecciones con cepas desprovistas de CPS se muestran en barras rayadas. Las barras negras representan la cepa silvestre Kp52145; las barras blancas, la cepa descapsulada; y las barras grises, los diferentes mutantes en la porción polisacáridica del LPS. Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes. *, p

< 0,05 (resultados significativamente diferentes comparados con los resultados obtenidos con sus cepas parentales; análisis de varianza de un cola, ANOVA).

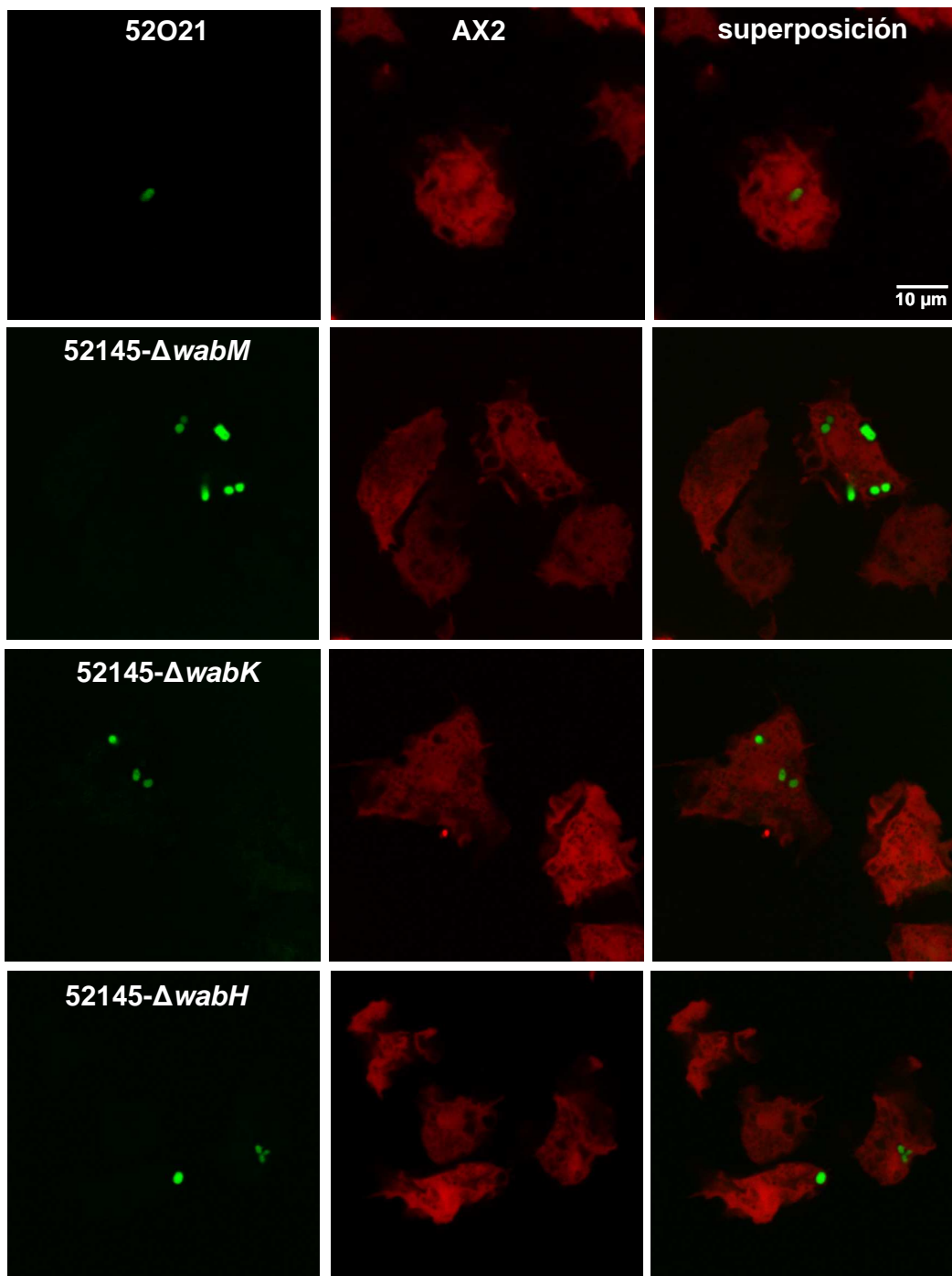


Figura 31: Fagocitosis de mutantes en la sección polisacáridica del LPS de *Klebsiella* por la ameba *D. discoideum*. Imágenes tomadas con un microscopio confocal a 63X con zoom electrónico de 3,5 después de 90 min de contacto de las bacterias con *D. discoideum*. Las células fueron fijadas con PFA 3% durante 20 min a TA. La cepa AX2 de *D. discoideum*

contiene un plásmido que expresa la proteína (rojo). Las bacterias expresan la proteína GFP (codificada en el plásmido pFPV25.1Cm, verdes).

Los experimentos de contacto entre las cepas de *Klebsiella* y *D. discoideum* también se realizaron depositando la ameba sobre cubreobjetos de vidrio con el fin de observar al microscopio la interacción (**Fig. 31**). En la tabla siguiente se muestra el porcentaje de amebas infectadas con los distintos mutantes tras 90 min de contacto.

Tabla 7: Porcentaje de amebas infectadas con los mutantes de la sección polisacáridica del LPS

Kp52145	52O21	52145-ΔwabM	52145-ΔwabH	52145-ΔwabK
10,9 %	7,65 %	38 %	17 %	21 %

En conjunto, los resultados obtenidos indican que no sólo el CPS juega un papel importante en la interacción con los fagocitos, sino que también el núcleo del LPS es importante. Señalar que los resultados obtenidos fueron independientes del modelo celular usado (macrófagos o amebas).

2.1.4 Papel del lípido A del LPS en la interacción con fagocitos profesionales

Como se ha descrito en la Introducción el lípido A de *K. pneumoniae* presenta tres modificaciones: la presencia de aminoarabinosa, la presencia de palmitato y la acilación con 2-hidroxi miristato. A continuación nos planteamos estudiar el posible papel de estas modificaciones en la interacción con fagocitos profesionales. Con este fin, se construyeron los mutantes 52- Δ *pmrF*, que no presenta aminoarabinosa en el lípido A; 52- Δ *pagPGB*, que carece de palmitato, y 52- Δ *lpxO*, que carece de 2-hidroxi miristato. Todos estos mutantes también se construyeron en la cepa descapsulada.

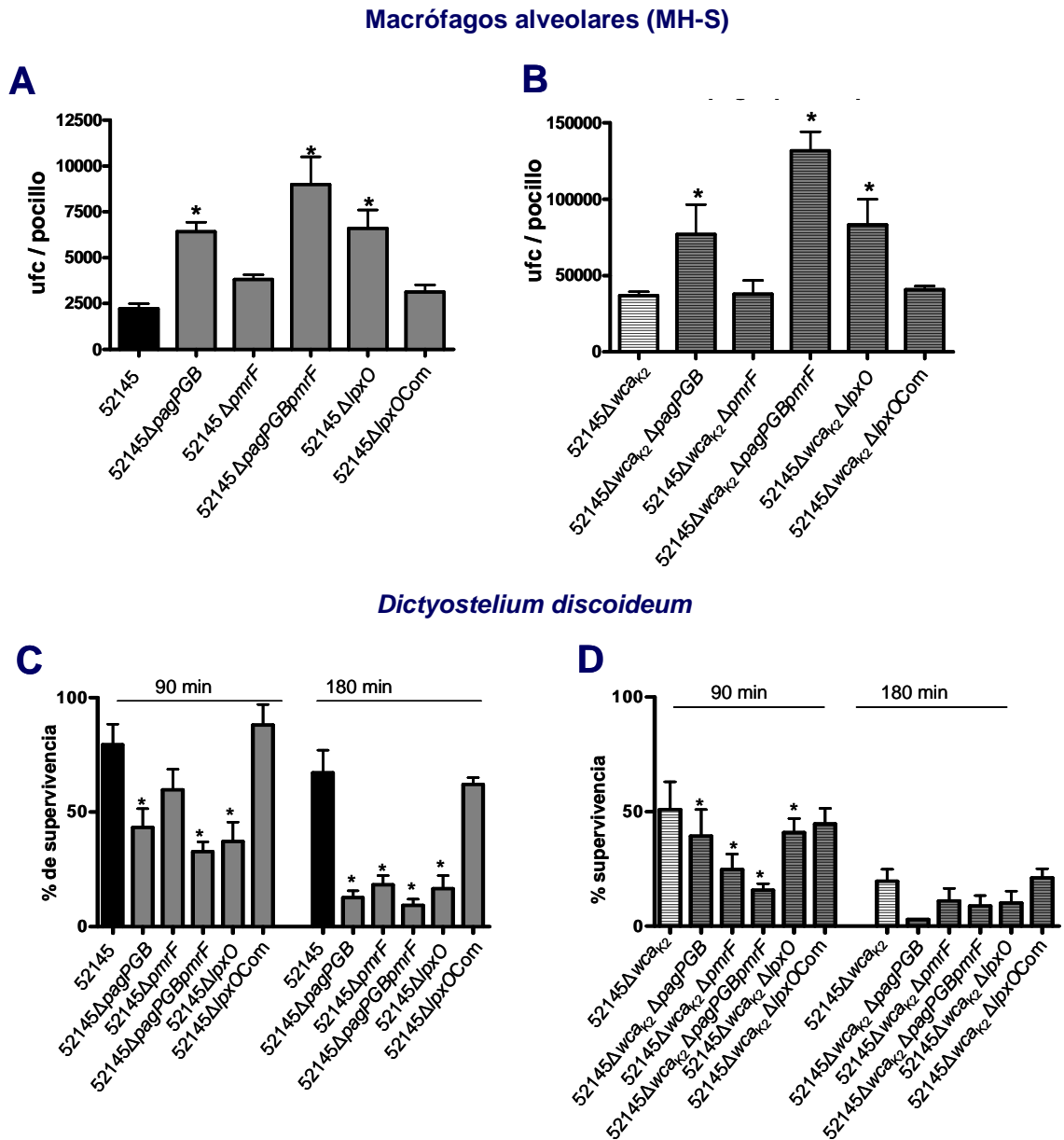


Figura 32: Papel del lípido A en la interacción con fagocitos profesionales. (A-B) Los macrófagos alveolares MH-S fueron infectados (MOI 50:1) durante 30 min con los mutantes indicados. Las bacterias intracelulares se cuantificaron tras 90 min de tratamiento con Gm y PxB. (C-D) Porcentaje de supervivencia tras 90 y 180 min de contacto de los mutantes indicados en *D. discoideum*. Las infecciones con las cepas capsuladas están representadas con barras lisas; las infecciones con cepas desprovistas de CPS se muestran en barras rayadas. Las barras negras representan la cepa silvestre Kp52145 y las barras blancas, la cepa descapsulada. Las mutaciones de *Klebsiella* en los genes que determinan las modificaciones del lípido A se muestran con barras grises (mutantes *pagP*, *pmrF*, doble mutante *pagPpmrF*, *lpxO* y la cepa complementada). Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes. *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes comparados con los resultados obtenidos con sus cepas parentales; análisis de varianza de un cola, ANOVA).

Los resultados muestran que los mutantes *pagP* y *lpxO* son internalizados en mayor número que sus cepas parentales, Kp52145 y el mutante isogénico descapsulado, por los macrófagos MH-S. Esto no ocurre en el caso de los mutantes *pmrF*. Sin embargo, el mutante triple 52145 Δ *wca*_{K2}- Δ *pag*PGB Δ *pmrF* fue la cepa mejor fagocitada. (**Fig. 32 A-B**).

Se obtuvieron resultados similares a los descritos empleando el modelo de supervivencia de *D. discoideum*. Así, el porcentaje de supervivencia de los mutantes *pagP*, *lpxO* y el mutante doble *pagP*-*pmrF* fueron significativamente menores que el correspondiente a la cepa parental (**Fig. 32 C-D**).

En conjunto, los datos muestran que las modificaciones del lípido A dependientes de PagP y LpxO, y en menor medida la adición de aminoarabinosa, juegan un papel importante en la interacción con los fagocitos profesionales.

2.1.5 Papel de las OMPs en la interacción con fagocitos profesionales

Las proteínas de membrana externa (OMPs) son proteínas importantes para mantener la integridad de la membrana y permitir el transporte de moléculas a través de ella (Lin *et al.*, 2002). La OMP más abundante y mejor caracterizada es la proteína OmpA, seguida de OmpC, denominada OmpK36 en *K. pneumoniae* (Firdich *et al.*, 2005; Hernandez-Alles, *et al.*, 1999; Vogel and Papenfort, 2006). De hecho, estas dos son las OMPs más abundantes en la membrana externa de *K. pneumoniae*. Se ha relacionado a la proteína OmpA con la adhesión e invasión y con la activación del sistema inmune innato en células epiteliales (Prasadarao *et al.*, 1996; Selvaraj and Prasadarao, 2005; Sukumaran *et al.*, 2003; Weiser and Gotschlich, 1991). Además, tanto la proteína OmpA como OmpK36 también se han relacionado con la virulencia y la resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Struve *et al.*, 2003; Llobet *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2011). Los datos mostrados en la **Figura 33** indican que los mutantes *ompA* y *ompK36* son internalizados en mayor número que sus cepas parentales, Kp52145 y el mutante isogénico descapsulado, por los macrófagos MH-S (**Fig. 33 A-B**). Además, el porcentaje de supervivencia de estos mutantes fue menor tras el contacto con *D. discoideum* (**Fig. 33 C-D**). Las complementaciones de ambas mutaciones restauraron los niveles de

fagocitosis y los porcentajes de supervivencia correspondientes a los de las cepas parentales.

En resumen, estos resultados sugieren que tanto la proteína OmpA como OmpK36 juegan un papel importante en la interacción de *K. pneumoniae* con fagocitos profesionales.

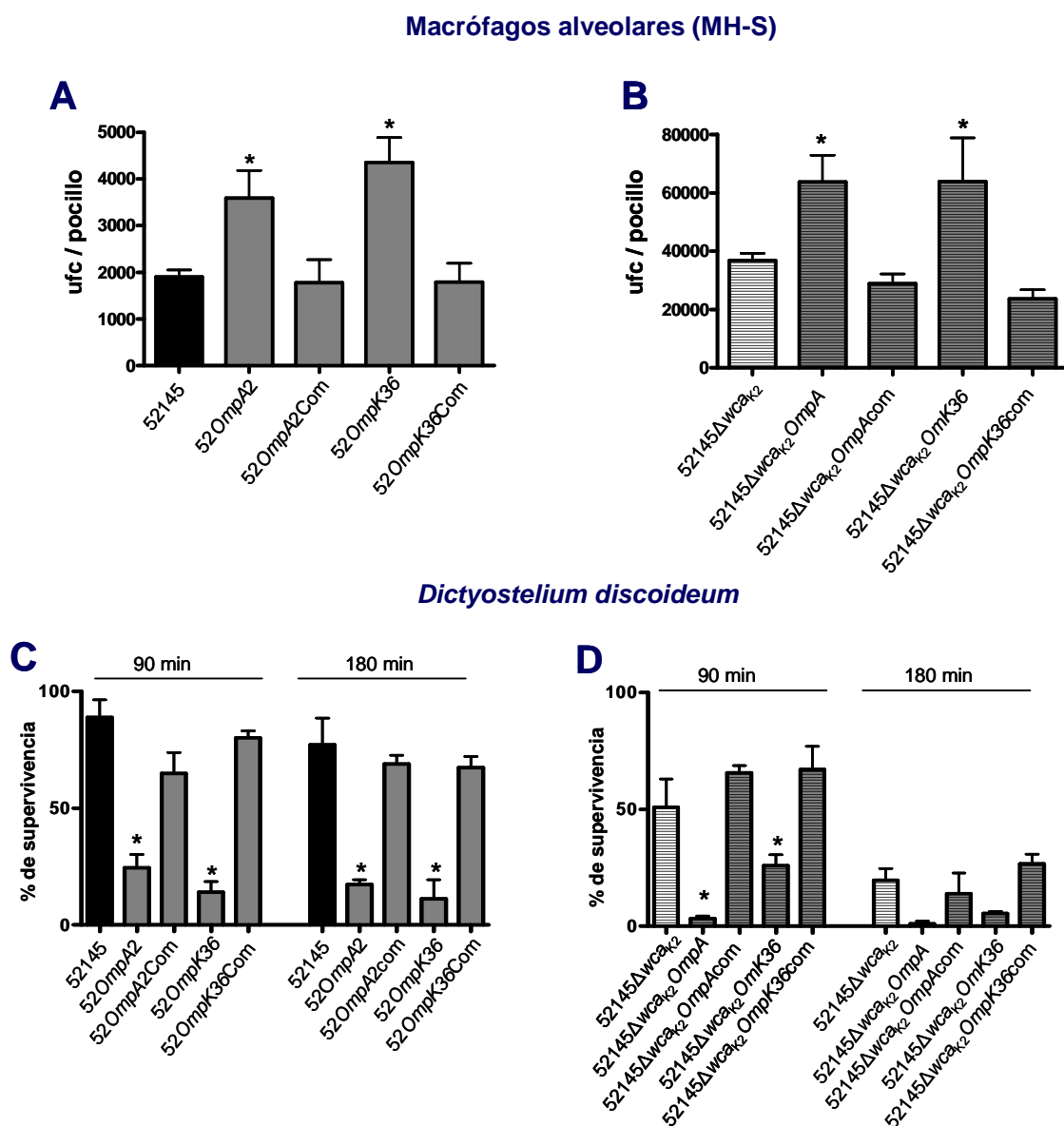


Figura 33: Papel de las OMPs (OmpA y OmpK36) de *K. pneumoniae* en la interacción con fagocitos profesionales. (A-B) Los macrófagos alveolares MH-S fueron infectados (MOI 50:1) durante 30 min con los mutantes indicados. Las bacterias intracelulares se cuantificaron tras 90 min de tratamiento con Gm y PxB. (C-D) Porcentaje de supervivencia tras 90 y 180 min de contacto de los mutantes indicados en *D. discoideum*. Las infecciones con las cepas capsuladas están representadas con barras lisas; las infecciones con cepas desprovistas de

CPS se muestran en barras rayadas. Las barras negras representan la cepa silvestre Kp52145 y las barras blancas, la cepa descapsulada. Las barras grises muestran las cepas de *Klebsiella* con las mutaciones en *ompA* y *ompK36*, así como las cepas complementadas. Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *, $p < 0,05$ (resultados significativamente diferentes comparados con los resultados obtenidos con sus cepas parentales; análisis de varianza de una cola, ANOVA).

2.2 ESTUDIO DE LA VIDA INTRACELULAR DE *K. pneumoniae* EN MACRÓFAGOS

Hasta el momento se ha considerado a *K. pneumoniae* un patógeno extracelular ya que los datos indican que el CPS reduce la fagocitosis del patógeno. Sin embargo, dado que en el apartado anterior describimos que la cepa silvestre era fagocitada por los macrófagos alveolares, quisimos analizar la vida intracelular de *K. pneumoniae* en dichas células.

Con el fin de optimizar las condiciones experimentales, se emplearon dos cepas silvestres: la 52145 (Kp52145) y la 43816 (Kp43816). Ambas son del serotipo O1:K2, virulentas y ampliamente utilizadas en la literatura. En primer lugar, se determinaron el tiempo de contacto (30 y 60 min) y la MOI (10:1, 50:1 y 100:1) más adecuados, que resultaron ser 30 min y una MOI de 50 bacterias por célula. En cualquier caso, los resultados (no mostrados) muestran que los macrófagos alveolares internalizaron en mayor número la cepa Kp43816. Los mismos experimentos se realizaron infectando macrófagos depositados sobre cubreobjetos de vidrio y procesando posteriormente las muestras para su observación en un microscopio de fluorescencia. Los resultados corroboraron que los macrófagos MH-S fagocitan mejor la cepa Kp43816 que la Kp52145 y, por tanto, para el estudio de la vida intracelular de *Klebsiella* se empleó la cepa Kp43816.

Para facilitar los estudios de microscopía, se utilizaron cepas que expresaban la proteína fluorescente GFP (pFPV25.1Cm). Señalar que no se encontraron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento, la adhesión y el número de bacterias intracelulares entre las cepas con GFP y sin GFP (resultados no mostrados). Un problema con el que nos encontramos a la hora de la observación al microscopio fue que en las muestras que requerían fijaciones con metanol, la fluorescencia de GFP era muy débil. En estos casos, la bacteria se marcó utilizando un suero de conejo anti-*Klebsiella* (1:5000; **Tabla 6**). Los inmunocomplejos se visualizaron con un anticuerpo secundario de burro anti-conejo (1:200) conjugado con el fluorocromo deseado.

Al realizarse los primeros experimentos lisando las células con una solución de PBS-Triton X-100 al 1%, se observó una clara discrepancia entre el recuento de bacterias intracelulares y el número de bacterias intracelulares observadas al microscopio, siendo este último muy superior. Esto sugería que las

condiciones de lisis afectaban a la viabilidad de *K. pneumoniae* recuperada del interior de las células. Por tanto, se optimizó la solución de lisis variando tanto el tipo como la concentración de detergente. Se probaron las siguientes soluciones de lisis: PBS-Triton X-100 (1% y 0,5%) y PBS-saponina (1%, 0,5% y 0,05%). Es bien conocido que la saponina es un detergente menos agresivo que el Triton X-100. Se observaron diferencias significativas en el número de bacterias recuperadas en función del método de lisis (datos no mostrados) y la solución que permitió recuperar el mayor número de bacterias intracelulares tras la completa lisis celular fue PBS-saponina 0,5%.

2.2.1 Caracterización de la fagocitosis de *Klebsiella* en macrófagos

Con el objetivo de determinar los elementos de la maquinaria celular implicados en la fagocitosis de *K. pneumoniae*, se realizaron ensayos de fagocitosis en presencia de compuestos químicos que inhiben funciones celulares específicas (**Tabla 4**, página 78). Experimentos preliminares demostraron que ninguno de los compuestos, a las dosis y tiempos empleados, afectaron a la adhesión o la viabilidad bacteriana.

Los tratamientos con citocalasina D y nocodazol redujeron significativamente la fagocitosis de Kp43816 (**Fig. 34**), indicando que ésta requiere una correcta polimerización del citoesqueleto de actina y un ensamblaje correcto de los microtúbulos.

Para analizar la contribución de la ruta de señalización dependiente de PI3K en la fagocitosis de Kp43816, las células se trataron con LY294002, un inhibidor específico de la actividad PI3K. Como se observa en la **Figura 34**, este inhibidor también redujo drásticamente la fagocitosis. La activación de PI3K provoca la fosforilación de la proteína Akt, y su consiguiente activación (Ji and Liu, 2008). El análisis mediante *Western blot* de los niveles de Akt fosforilada reveló que la infección con *Klebsiella* promueve la activación de Akt en las células MH-S en un proceso dependiente de la actividad PI3K (**Fig. 34B**).

Varios patógenos utilizan las balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*) de las células eucariotas para su internalización. Estas estructuras son microdominios dinámicos de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos (Mañes *et al.*, 2003; Rosenberger *et al.*, 2000). Se utilizó M β CD, un compuesto que depleciona el colesterol de las balsas lipídicas, para evaluar la implicación

de las mismas en la fagocitosis de *Klebsiella*. En la **figura 34A** se observa que la depleción redujo significativamente la fagocitosis de *Klebsiella*. Resultados similares se obtuvieron al tratar las células con filipina y nistatina, otros dos compuestos que afectan a la integridad de las balsas lipídicas (**Fig. 34A**).

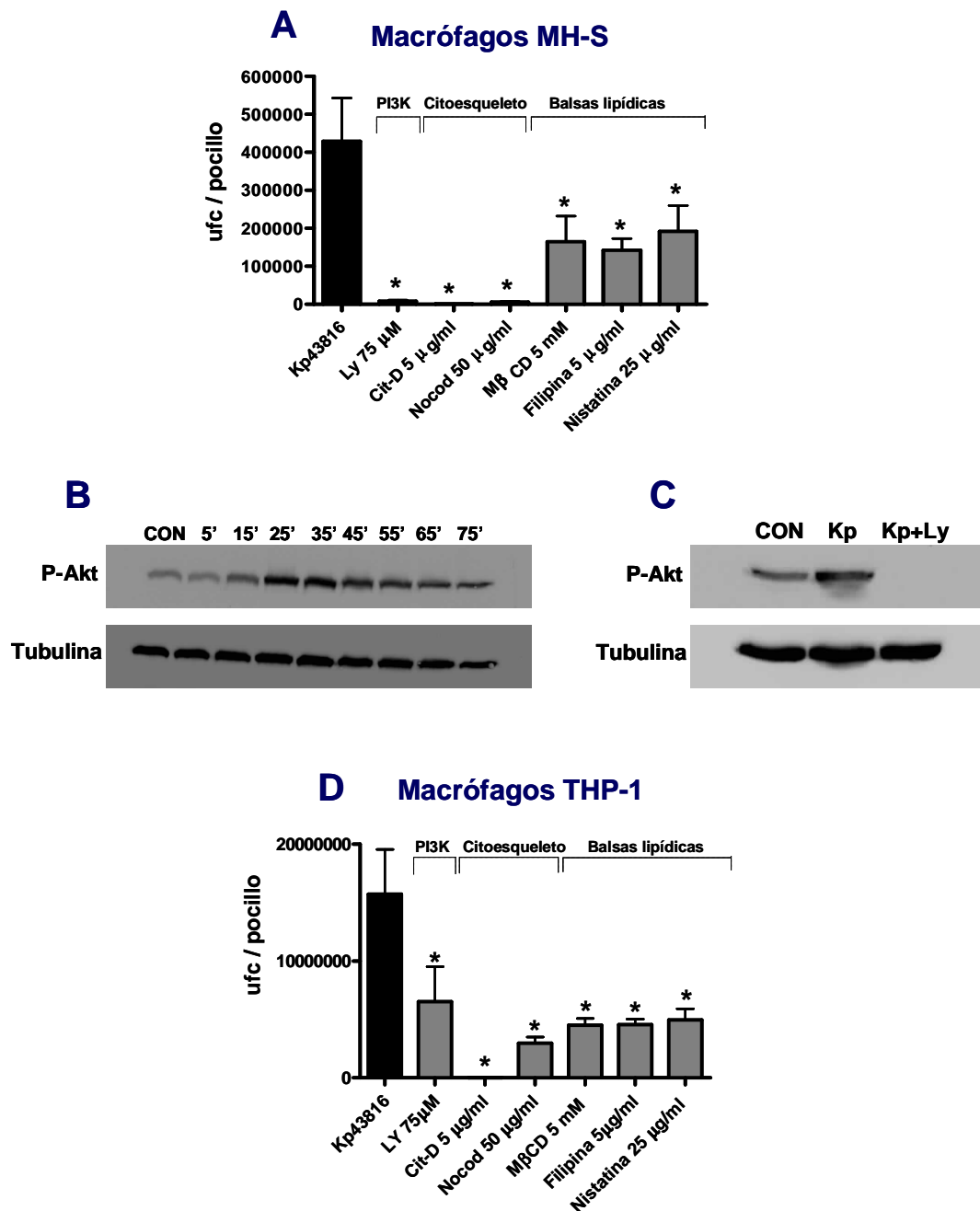


Figura 34: Mecanismo molecular de la fagocitosis de Kp43816 por macrófagos. Análisis de la fagocitosis en macrófagos alveolares de ratón MH-S (A) o en macrófagos humanos THP-1 (D) pre-tratados con los compuestos químicos: LY294002 75 μM, citocalasina D 5 μg/ml, nocodazol 10 μg/ml y 50 μg/ml, MβCD 5mM, filipina 5 μg/ml y nistatina 25 μg/ml (barras grises).

Como control, las células no tratadas fueron infectadas con la cepa Kp43816 (barras negras). Los resultados están expresados en ufc por pocillo. (B) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de Akt-Ser 473 en macrófagos MH-S con anticuerpos conejo anti-fosfoSer473Akt y cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (panel superior). Los extractos celulares se prepararon con células no infectadas (CON), o infectadas con *Klebsiella* durante 75 min a intervalos de 10 min. El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). (C) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de Akt-Ser 473, en macrófagos MH-S pre-tratados con el inhibidor Ly294002, específico de PI3K, e infectados durante 20 min con *Klebsiella*.

Los mecanismos de fagocitosis de *Klebsiella* también se estudiaron en la línea celular THP-1 (monocitos humanos diferenciados a macrófagos con PMA) y los resultados fueron similares a los obtenidos en MH-S (**Fig. 34D**).

En conjunto, estos resultados muestran que la fagocitosis de *Klebsiella* en las dos líneas celulares de macrófagos usadas (MH-S y THP-1) es un proceso dependiente de la correcta polimerización del citoesqueleto de microtúbulos y de actina, que requiere la integridad de las balsas lipídicas de la membrana plasmática y la activación de la ruta de señalización dependiente de PI3K.

2.2.2 Análisis de la vida intracelular de *K. pneumoniae* en macrófagos

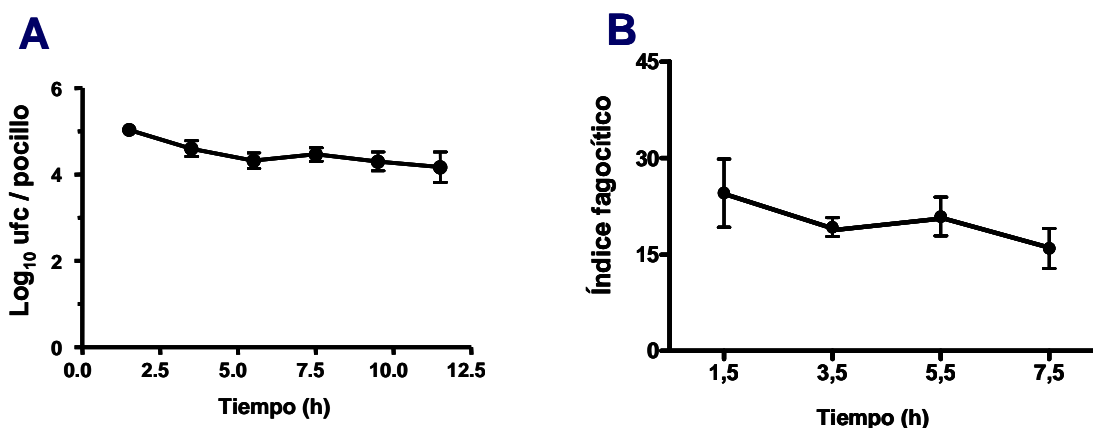
Para determinar la vida intracelular de las bacterias fagocitadas por los macrófagos, las células fueron lisadas a distintos tiempos tras el contacto y se realizó un recuento de bacterias viables mediante plaqueos en LB-agar. En paralelo, se infectaron macrófagos crecidos sobre cubreobjetos de vidrio y, mediante microscopía de fluorescencia, se determinó el porcentaje de macrófagos infectados así como el número de bacterias por macrófago. Con estos datos se calculó el índice fagocítico, que se obtuvo multiplicando el porcentaje de macrófagos que contenían al menos una bacteria por la media del número de bacterias por célula infectada.

Como se puede observar en la **Figura 35A-B**, *Klebsiella* fue capaz de sobrevivir en el interior de los macrófagos MH-S durante más de 7h. En las dos primeras horas se observó un descenso en el número de bacterias intracelulares pero, posteriormente, este número se mantuvo constante hasta el final del experimento. El porcentaje de macrófagos infectados fue del 10%

durante las dos primeras horas y prácticamente se mantuvo constante hasta la finalización del experimento (tasa de infección del 8%) (**Fig. 35A-B**).

Los macrófagos THP-1 fagocitaron más eficientemente a la cepa silvestre Kp43816 y la tasa de infección alcanzó el 30-40%. En esta línea celular también se detectó un descenso en el número de bacterias intracelulares durante las primeras horas de la infección, aunque fue menos acusado que en el caso de los macrófagos de ratón. A partir de este descenso, la tasa de infección se mantuvo más o menos constante a lo largo del tiempo hasta el final del experimento (**Fig.35C-D**). Todos los datos, en conjunto, muestran que Kp43816 es capaz de sobrevivir en el interior de macrófagos de ratón y humanos

Macrófagos MH-S



Macrófagos THP-1

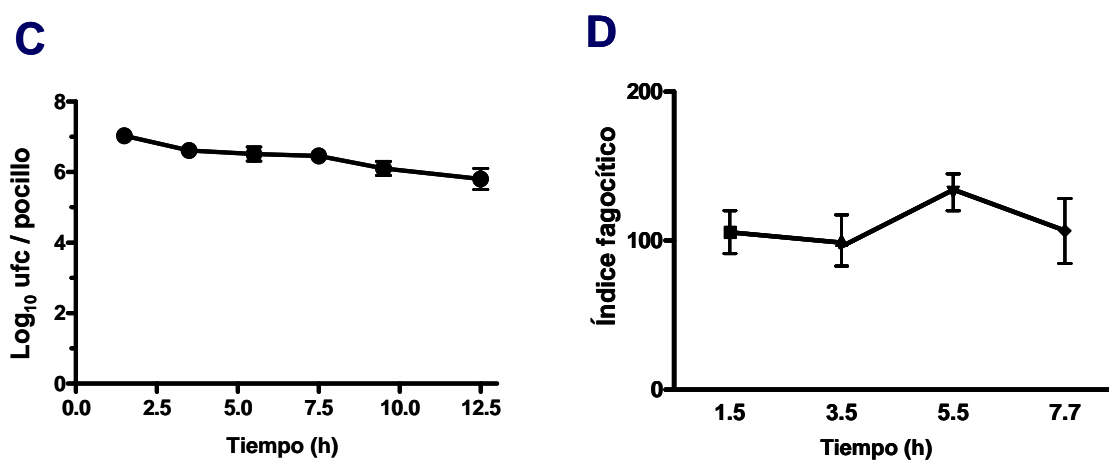
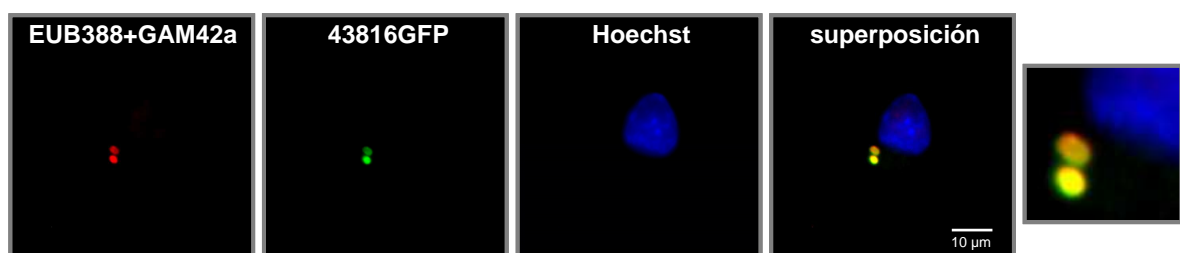


Figura 35: Supervivencia de *Klebsiella* en Macrófagos. Infección de macrófagos alveolares de ratón MH-S (A) o monocitos humanos diferenciados a macrófagos THP-1 (C) con la cepa

Kp43816. Recuento por microscopía de fluorescencia y cálculo del índice fagocítico de las bacterias intracelulares en células MH-S (B) o THP-1 (D).

Para confirmar que las bacterias intracelulares eran viables (metabólicamente activas), se marcaron los ribosomas bacterianos mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con las sondas EUB338 y GAM42a. Estas sondas son específicas para el ARNr bacteriano de las subunidades 16S y 23S, respectivamente (Manz *et al.*, 1992). El análisis mediante microscopía de fluorescencia reveló la presencia de bacterias con marcaje positivo de ribosomas en experimentos de hasta 8h post-infección (**Fig. 35**). No se observaron cambios en la morfología celular ni en los citoesqueletos de actina y microtúbulos a lo largo de la infección.

A



B

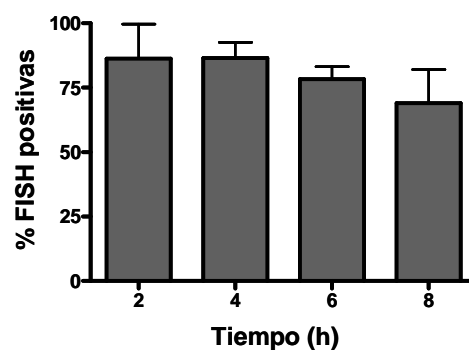


Figura 36: Observación de bacterias activas mediante FISH. (A) Observación de *Klebsiella* en un estado metabólicamente activo tras 6h de infección y tratamiento (30 min de infección más 5,5h de tratamiento con Gm) mediante hibridación fluorescente *in situ*. Los ribosomas bacterianos (rojo) se marcaron con las sondas EUB338-Cy3 y GAM42a-Cy3. El ADN de los macrófagos se tiñó con Hoechst (azul). La bacteria expresa GFP (pFPV25.1Cm, verde). Para ver con más detalle, ver el panel de la derecha. (B) Porcentaje de las bacterias intracelulares FISH positivas tras 2, 4, 6, y 8h post-gentamicina.

2.2.3 Citotoxicidad e inducción de apoptosis en macrófagos por *K. pneumoniae*

Al observar las preparaciones con el microscopio de fluorescencia se apreció una menor densidad de células a partir de las 8h de la infección comparando con un control de células sin infectar (**Fig. 37**). Esto fue más evidente tras 20-21h de infección. Para caracterizar un posible efecto citotóxico inducido por Kp43816, se evaluó la citotoxicidad midiendo la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico basado en la tinción de células viables con cristal violeta. El porcentaje de citotoxicidad de las células MH-S infectadas con la cepa Kp43816 fue de un 53,3%. Señalar que cuando se eliminó la gentamicina en los tiempos largos (6h) se empezaron a observar bacterias extracelulares pero FISH positivas lo que sugeriría que esta citotoxicidad celular era un proceso mediado por la propia bacteria.

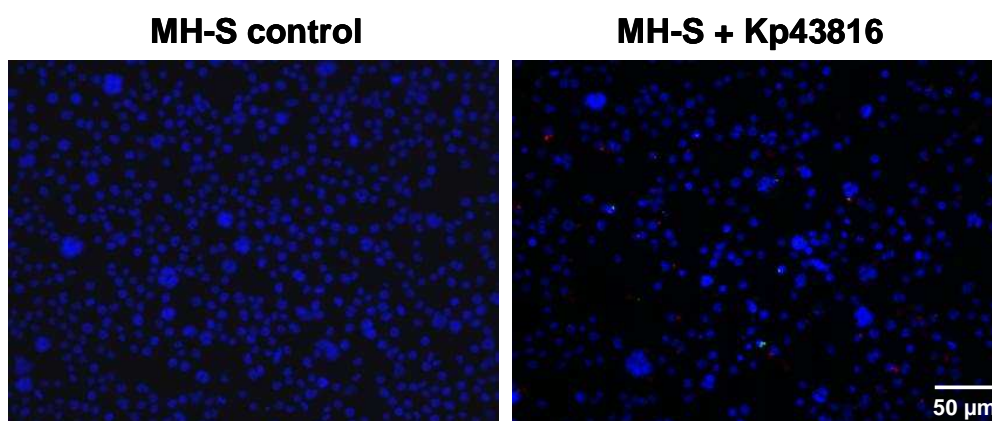


Figura 37: Efecto citotóxico de macrófagos infectados y no infectados por *Klebsiella*. Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia a 20X de macrófagos alveolares MH-S control, sin infectar (panel izquierdo) o infectados con la cepa Kp43816 (panel derecho) durante 30 min más 20h de tratamiento con gentamicina. La tinción con Hoechst (azul) marca el ADN de las células.

La apoptosis es un tipo de muerte celular inducida por diversos factores y regulada genéticamente. La apoptosis se asocia a cambios en el contenido de fosfolípidos de la cara externa de la membrana plasmática. Las moléculas de fosfatidilserina (PS) son translocadas de la cara interna a la externa de la célula para su posterior reconocimiento. Las células apoptóticas pueden ser fácilmente identificadas con la anexina V, ya que es una glucoproteína con una

alta afinidad para la PS y, por tanto, se une específicamente a la PS expuesta en la cara externa de la membrana de las células apoptóticas.

Con el fin de determinar si el efecto citotóxico responde a una muerte celular por apoptosis, se analizó, mediante citometría de flujo, y en colaboración del Dr. Nacho Aguiló del grupo del Profesor Carlos Marín, la presencia de PS en la membrana celular usando la anexina V. Como marcador de viabilidad celular, se utilizó el agente intercalante 7-amino-actinomicina D (7-AAD), que sólo penetra en el interior de las células si la membrana celular está dañada (**Fig. 38A**).

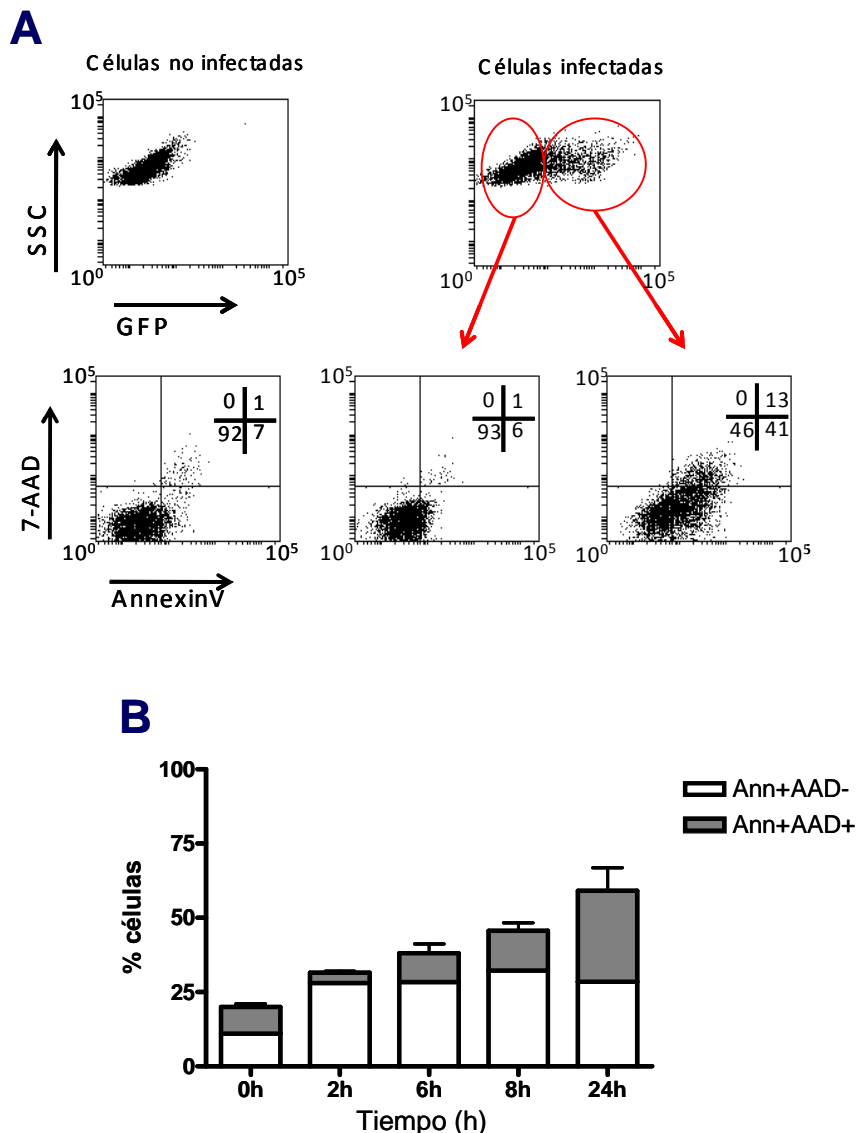


Figura 38: Apoptosis de macrófagos infectados con *Klebsiella*. Se determinó la inducción de apoptosis en células MH-S infectadas con la cepa Kp43816 que expresaba GFP y, por tanto, permitió la detección de aquellas células con bacterias intracelulares. El tiempo 0 corresponde a los 30 min de infección más los 90 min de incubación con la Gm y PxB. A partir

de este momento se analizaron las muestras a las 2h, 6h, 8h y 24h. Los resultados se expresan como porcentaje de células marcadas con anexina V y 7-AAD.

Cuando se analizó el marcaje con anexina V, únicamente en las células con bacterias intracelulares (GFP positivas) se observó un incremento en el número de células anexina V positivas a lo largo del tiempo así como un aumento de las células con doble marcaje, que responde a la necrosis celular secundaria a la apoptosis, (**Fig. 38B**).

2.2.4 Descripción de la *Klebsiella containing vacuole* (KCV) en macrófagos MH-S

Los resultados obtenidos hasta el momento nos indicaban que *Klebsiella* era capaz de sobrevivir en el interior del macrófago hasta inducir su muerte celular programada. A continuación, se determinó la dinámica de localización subcelular de Kp43816 con diversos marcadores de la ruta endocítica mediante microscopía confocal.

En primer lugar, se estudió la colocalización con EEA1 (del inglés, *early endosome antigen 1*), un elemento integrante de endosomas tempranos. La **Figura 39A** muestra una imagen tomada 30 min post-infección. El porcentaje de colocalización de la población intracelular de *Klebsiella* con el marcador de endosoma temprano EEA1 a lo largo del tiempo se muestra en la **Figura 39B**. Este porcentaje nunca fue superior al 30% y a partir de los 90 min no se observaron bacterias colocalizando con este marcador.

A continuación, se analizó la posición relativa de *Klebsiella* en relación al marcador de endosoma tardío Lamp-1. Se observaron colocalizaciones de *Klebsiella* con Lamp1 a todos los tiempos analizados. El porcentaje de colocalización de bacterias intracelulares con este marcador fue de aproximadamente el 40% a los 30 min de infección, y alcanzó porcentajes del 60% e incluso superiores a los tiempos más largos. (**Fig. 39D**). La **Figura 39C** muestra una imagen de microscopía confocal tomada tras 4h de infección y tratamiento con Gm.

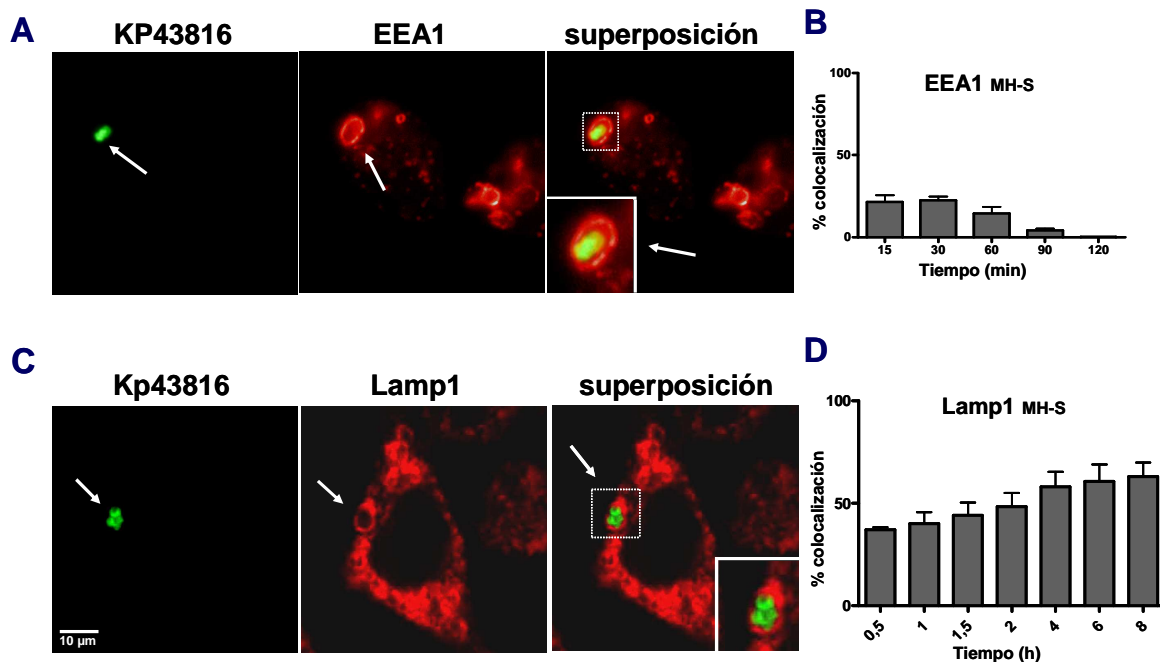


Figura 39: Localización subcelular de *Klebsiella* en compartimentos de la ruta endocítica.

(A) Colocalización de la cepa Kp43816 con el marcador de endosoma temprano EEA1. *Klebsiella* expresa GFP (pFPV25.1Cm, verde), los endosomas tempranos se tiñeron con anticuerpos cabra anti-EEA1 y burro anti-cabra conjugado con RRX (rojo). La imagen fue tomada a los 30 min de infección. (B) Porcentaje de colocalización de *Klebsiella* intracelular con el marcador EEA1 a los 15, 30, 60, 90 y 120 min post-infección. (C) Colocalización de *Klebsiella* con el marcador de endosoma tardío Lamp-1. Los endosomas tardíos se tiñeron con anticuerpos rata anti-Lamp1 y burro anti-rata conjugado con RRX (rojo); *Klebsiella* expresa GFP (pFPV25.1Cm, verde). La imagen fue tomada 4h post-infección y tratamiento con Gm. (D) Porcentaje de colocalización de *Klebsiella* intracelular con el marcador Lamp-1 a los tiempos 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 4h y 6h de infección y tratamiento con Gm.

La maduración de las vesículas endocíticas lleva asociada una acidificación progresiva del lumen debido a la acción de la vATPasa (Lukacs *et al.*, 1990). Se empleó el marcador fluido LysoTracker, una base débil conjugada con el fluorocromo Texas Red, que difunde a través de las membranas eucariotas y queda atrapado en vacuolas ácidas. Los endosomas tempranos (pH 6,0 - 6,5) no se tiñen con LysoTracker, mientras que la mayoría de los endosomas tardíos (pH 5,0 - 6,0) y lisosomas (pH 4,0 - 5,0) sí lo hacen. A las 2h post-infección y tratamiento con Gm ya se observó, mediante microscopía confocal, aproximadamente un 75% de colocalización de la cepa Kp43816 con el marcador LysoTracker que se mantuvo a lo largo del tiempo (Fig. 40 A-B).

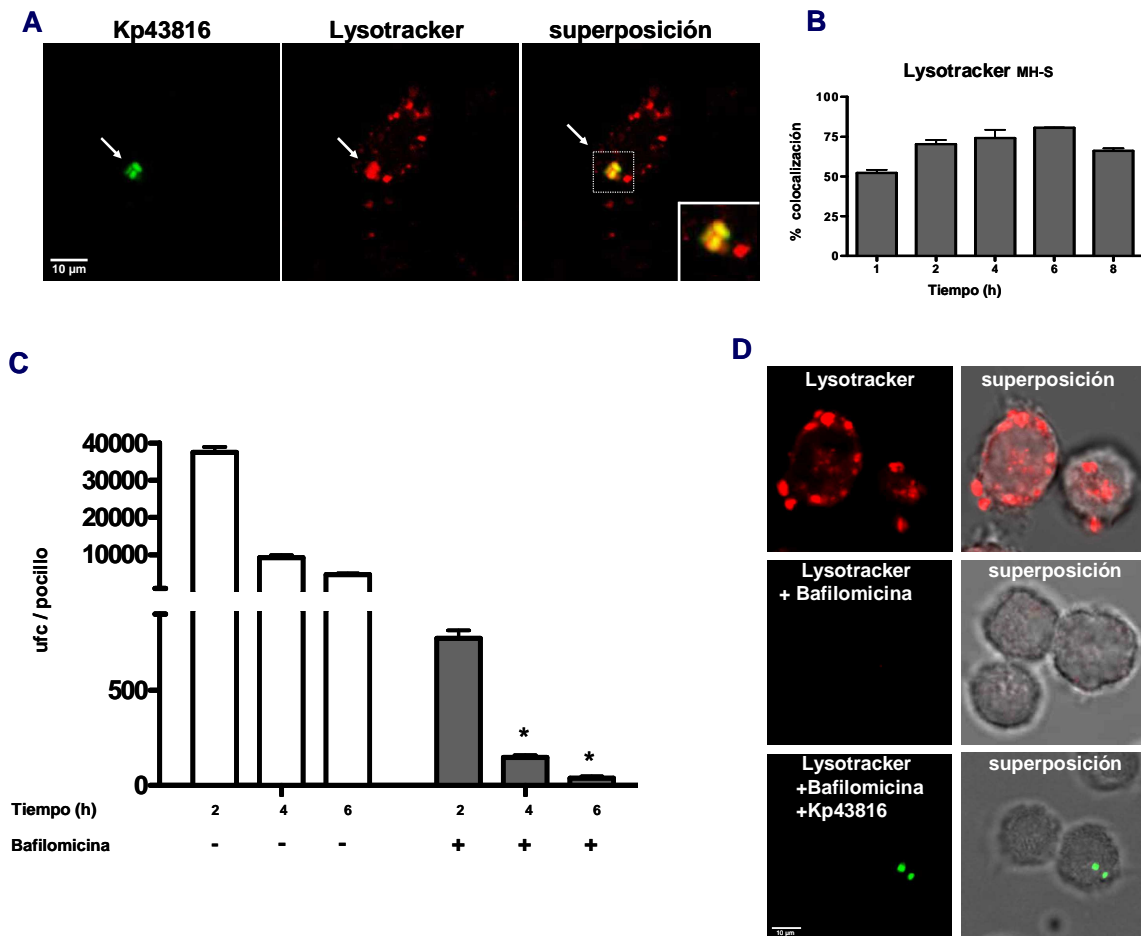


Figura 40: Marcaje con Lysotracker y tratamiento con bafilomicina A1 en macrófagos alveolares MH-S. (A) Colocalización de *Klebsiella* con el marcador Lysotracker. Las bacterias expresan la proteína GFP (pFPV25.1Cm, verde) y el Lysotracker es un fluido conjugado con RRX (rojo). La imagen fue tomada en un microscopio confocal tras 4h de infección y tratamiento con Gm. (B) Porcentaje de colocalización de Kp43816 con el marcador Lysotracker a lo largo del tiempo. (C) Efecto de la bafilomicina A1 en el número de bacterias intracelulares a lo largo del tiempo. Las barras blancas, indican células infectadas pero no tratadas con bafolomicina A1; y las barras grises indican células infectadas y tratadas. *, $p < 0,05$ (diferencias significativas respecto al mismo tiempo de infección sin tratar con bafilomicina A1; análisis de varianza de una cola, ANOVA). (D) Imágenes, tomadas tras 4h de infección y posterior tratamiento con Gm en un microscopía confocal, de macrófagos MH-S marcados con Lysotracker (panel superior); macrófagos marcados con Lysotracker y tratados con bafilomicina A1 (panel centro) y macrófagos marcados con Lysotracker, infectados con Kp43816 y tratados con bafilomicina A1 (panel inferior). Los paneles de la derecha corresponden a imágenes de contraste de fases.

Para comprobar la relevancia de este ambiente ácido en la vida intracelular de Kp43816, los macrófagos fueron infectados y, posteriormente, tratados con

bafilomicina A1. La bafilomicina A1 es un inhibidor de la vATPasa y, por tanto, de la acidificación de los compartimentos subcelulares. La adición de bafilomicina A1 (100 nM) transcurrido el tiempo de contacto se tradujo en una reducción significativa del número de bacterias intracelulares (**Fig. 40C**). La imagen mostrada en la **Figura 40D** muestra como en los macrófagos tratados con bafilomicina A1 desaparece el marcaje con LysoTracker.

Rab7 es una proteína G de la familia de las proteínas Rab que controla el transporte vesicular hacia los endosomas tardíos y lisosomas en la ruta endocítica (Haas, 2007). Para analizar la colocalización con este marcador, y dada la ausencia de un anticuerpo comercial que tiña adecuadamente esta proteína, las células se transfectaron con el plásmido EGFP-Rab7. Los compartimentos en los que encontramos a *Klebsiella* rápidamente adquieren el marcador Rab7 y éste se mantiene hasta el final del experimento, ya que se observaron bacterias intracelulares en compartimentos Rab7-positivos desde los 90 min del inicio de la infección hasta las 8h (**Fig. 41 A-B**).

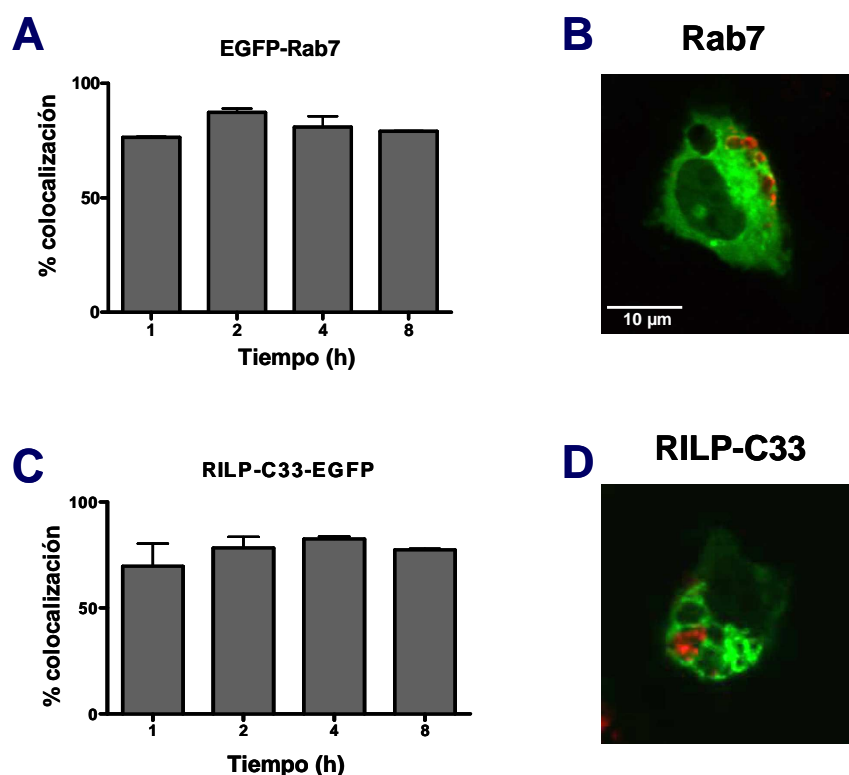


Figura 41: Colocalización de Kp43816 con la GTPasa Rab7. Los macrófagos MH-S fueron transfectados con los plásmidos EGFP-Rab7 (A) o RILP-C33-EGFP (C), e infectados con la

cepa Kp43816. (A y C) Porcentaje de las colocalizaciones de *Klebsiella* con los marcadores de endosoma tardío Rab7 y RILP-C33 tras 1h, 2h, 4h y 8h de infección y posterior tratamiento. (B y D) Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas 4h post-infección y tratamiento con Gm. *Klebsiella* se tiñó con anticuerpos conejo anti-*Klebsiella* y los inmunocomplejos se detectaron con anticuerpos de burro anti-conejo conjugados con RRX (rojo). Los macrófagos expresan EGFP (verde).

Con el fin de determinar si la GTPasa Rab7 era activa en la vacuola, los macrófagos se transfectaron con el plásmido RILP-C33-EGFP. RILP es una proteína efectora de Rab7 que reconoce exclusivamente la conformación activa de la GTPasa (Jordens *et al.*, 2001). Cuando el extremo C-terminal se fusiona con GFP el dominio de unión a Rab7 de RILP, es llamado RILP-C33, y se usa como índice fiable de presencia de Rab7 activado (Cantalupo *et al.*, 2001). Como se muestra en la **Figura 41 C-D**, la vacuola que contiene la bacteria es positiva para RILP-C33 a cualquiera de los tiempos estudiados. El porcentaje de colocalización es de aproximadamente el 80% como en el caso de la GTPasa Rab7.

En conjunto, estos datos indican que el compartimento donde reside *Klebsiella* recluta la GTPasa Rab7 en la conformación activa.

La siguiente etapa en la maduración de un endosoma es la fusión con los lisosomas. Para determinar si este era el caso de la vacuola donde reside *Klebsiella*, se analizó la posición relativa de la bacteria respecto a la catepsina D. La catepsina D es una hidrolasa lisosomal implicada en la degradación de proteínas endógenas y exógenas que es liberada en el lumen de endosomas tardíos por el receptor manosa-6-fosfato (Ludwig *et al.*, 1994; Munier-Lehmann *et al.*, 1996). Esta hidrolasa se ha utilizado ampliamente como marcador de fusión fagolisosomal (Oh *et al.*, 1996). Los resultados mostraron que un 80% de la población intracelular no colocalizaba con la catepsina D (**Fig. 42**).

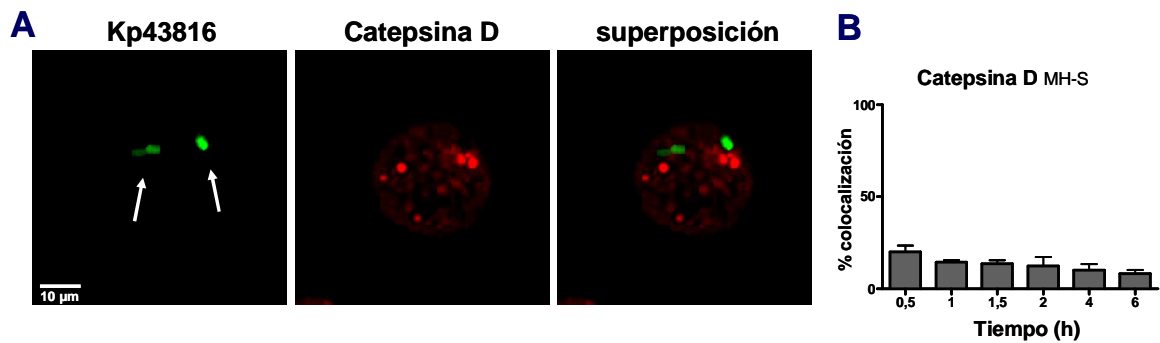


Figura 42: *Klebsiella* se localiza en un compartimento subcelular que presenta un nivel reducido de fusión con lisosomas. (A) Kp43816 no colocaliza con catepsina D. Imagen tomada con un microscopía confocal tras 2h de infección y tratamiento con Gm. Las bacterias expresan GFP (pFPV25.1Cm, verde); la catepsina D se tiñó con los anticuerpos cabra anti-catepsina D (G19) y burro anti-cabra conjugado con RRX (rojo). (B) Porcentaje de colocalización de Kp43816 con catepsina D tras 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 4h y 6h post-infección y tratamiento con Gm.

Estos datos sugerían que el fagosoma formado no se fusiona con lisosomas. Para corroborar este resultado, se estudió la colocalización entre Kp43816 y dextrano en experimentos de pulso-caza. Los protocolos de pulso-caza con dextrano han sido ampliamente utilizados en la literatura para marcar lisosomas (Eissenberg *et al.*, 1988; Racoosin and Swanson, 1993; Hewlett *et al.*, 1994; Strasser *et al.*, 1999, Hmama *et al.*, 2004). Los macrófagos se incubaron 2h con dextrano y, tras otra hora de incubación solo con medio fresco (los endosomas se cargan con dextrano y siguen la ruta endocítica hasta lisosomas), se infectaron con la cepa Kp43816. En estos experimentos se comprobó que un 75-80% de las bacterias intracelulares no colocalizaban con el marcador endocítico (**Fig. 43**).

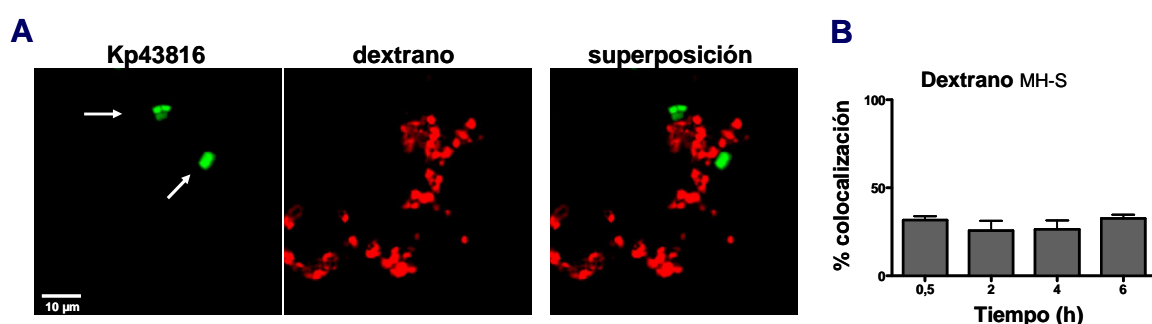


Figura 43: Las KCV no se fusionan con lisosomas. (A) En las imágenes de microscopía confocal la cepa Kp43816 no colocaliza con el marcador endocítico dextrano. La cepa Kp43816 expresa GFP (pFPV25.1Cm, verde). El dextrano está conjugado con RRX (rojo). (B) Porcentaje

de colocación de Kp43816 tras 0,5h, 2h, 5h y 6h de infección y posterior tratamiento con Gm.

Como control positivo de la funcionalidad de la maquinaria lisosomal de los macrófagos MH-S, éstos se infectaron la cepa Kp43816 muerta con luz UV. Los resultados mostraron que después de 2h de la infección y tratamiento con Gm, el porcentaje de las colonizaciones de bacterias intracelulares muertas con catepsina D (**Fig. 44A**) y dextrano (**Fig. 44B**) eran superiores al 50 %. Más aún, este compartimento es ácido ya que se observó una colocación 80-90% de las bacterias muertas intracelulares con el fluido LysoTracker (**Fig. 44C**) El experimento solamente se llevó a cabo hasta 4h, ya que a partir de este tiempo la mayor parte de lo que se observaba intracelularmente eran restos de bacterias.

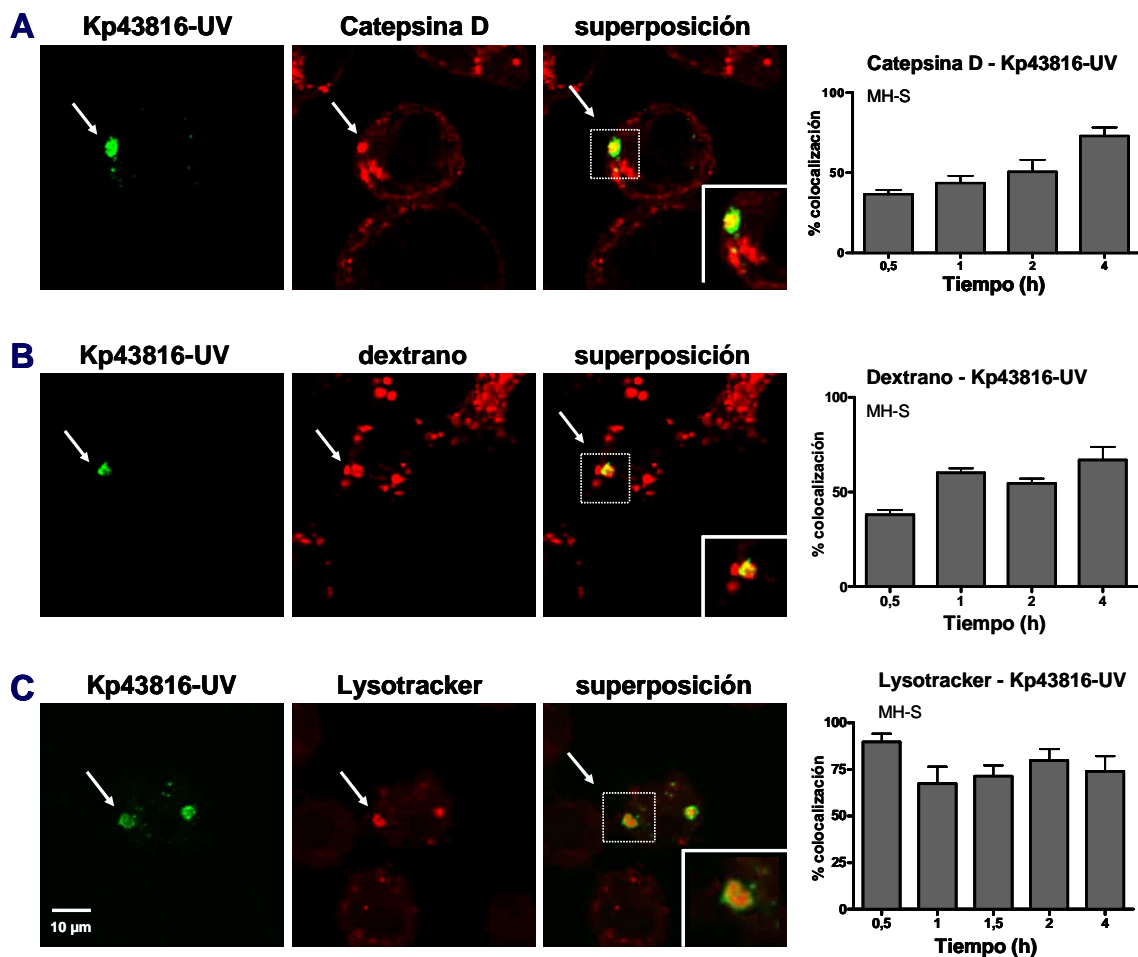


Figura 44: Funcionalidad de la maquinaria lisosomal y colocación con LysoTracker en macrófagos infectados con *Klebsiella* muerta con luz UV. Los macrófagos fueron infectados con bacterias Kp43816 expuestas durante 15 min a 1 Julio de luz UV. Para su

visualización se tiñeron con los anticuerpos conejo anti-*Klebsiella* y burro anti-conejo conjugado con Cy2 (verde). (A) Porcentaje de colocalización de Kp43816-UV con catepsina D a lo largo del tiempo. Imagen de microscopía confocal de una colocalización 2h post-infección. La catepsina D se tiñó con los anticuerpos cabra anti-catepsina D (G19) y burro anti-cabra conjugado con RRX (rojo). (B) Porcentaje de colocalización de Kp43816-UV con dextrano a lo largo del tiempo. Imagen de microscopía confocal de una colocalización 2h post-infección. El dextrano está conjugado con RRX (rojo). (C) Porcentaje de colocalización de Kp43816-UV con Lysotracker a lo largo del tiempo. Imagen de microscopía confocal de la colocalización de Kp43816-UV con un compartimento cargado con Lysotracker (2h post-infección).

En resumen, los resultados mostrados hasta el momento indican que *Klebsiella* reside en un compartimento subcelular ácido, Lamp-1 positivo, que adquiere la GTPasa Rab7 en conformación activa, y que no se fusiona con los lisosomas. A este compartimento lo pasamos a denominar KCV (del inglés, *Klebsiella* containing vacuole).

Para profundizar en la localización y características de KCV, se analizó la posición de la misma en relación al aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (RE). En primer lugar se estudió la colocalización con el Golgi empleando un anticuerpo que reconoce la proteína del cis-Golgi, GM130 (Nakamura *et al.*, 1995). Sin embargo, no se observó la colocalización de KCV con GM130 en ningún momento de la infección (**Fig. 45**).

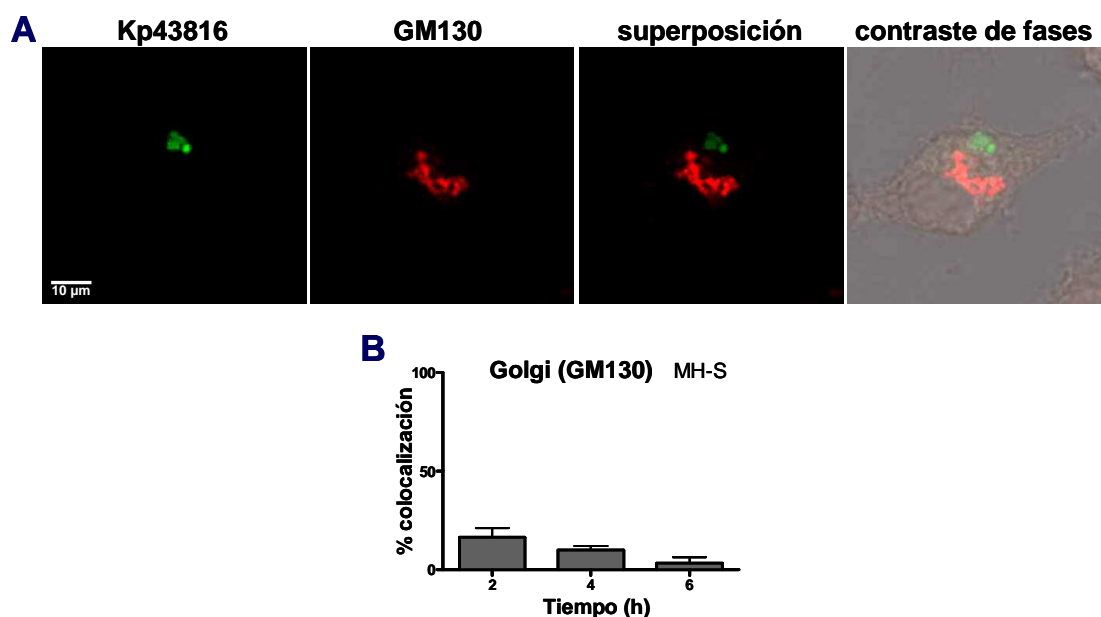


Figura 45: Colocalización entre KCV y el aparato de Golgi (A) Imagen tomada con un microscopio confocal tras 6h post-infección y tratamiento con Gm. Kp43816 expresa la proteína

GFP (pFPV25.1Cm, verde) y la proteína del sistema cis-Golgi GM130 se marcó con los anticuerpos ratón anti-GM130 y burro anti-ratón conjugado con RRX (rojo). (B) Porcentaje de colocalización de *Klebsiella* con GM130 tras 2h, 4h y 6h de infección y tratamiento con Gm.

En el caso del RE, tras la infección de los macrófagos con *Klebsiella*, las preparaciones se tiñeron con dos anticuerpos que reconocen proteínas presentes en el RE: GRP94, proteína localizada en el lumen del RE, y la calnexina, una proteína transmembrana residente del RE. Los experimentos mostraron que KCV tampoco colocaliza con el RE, ya que no se encontraron colocalizaciones ni con el GRP94 (datos no mostrados) ni con la calnexina. Así, en la **Figura 46** se muestra un doble marcaje con Lamp-1 y calnexina en macrófagos infectados tras 6h de infección. Como se puede observar *Klebsiella* reside en un compartimento Lamp-1 positivo, pero negativo para calnexina.

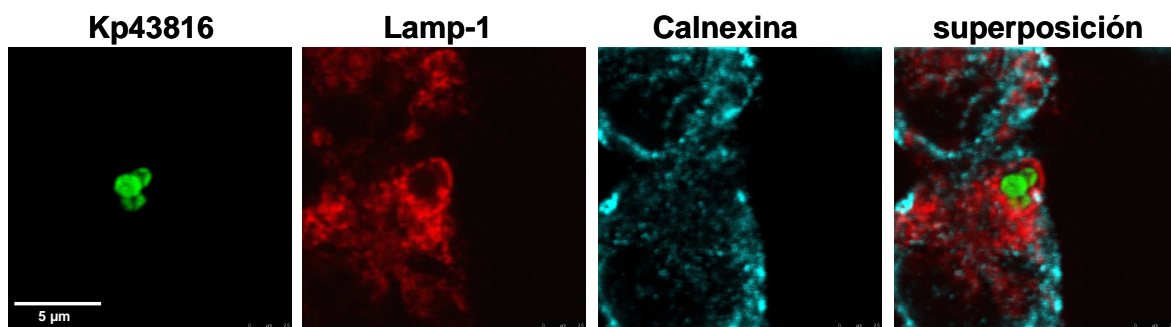


Figura 46: Las KCV no adquieren marcadores de RE. Imagen de microscopía confocal de una doble colocalización de *Klebsiella* con Lamp-1 y calnexina tomada tras 6h de infección. La bacteria expresa el plásmido GFP (pFPV25.1Cm, verde). El compartimento subcelular Lamp-1 se tiñó con los anticuerpos rata anti-Lamp1 y burro anti-rata conjugado con RRX (rojo). La calnexina se tiñó con los anticuerpos conejo anti-calnexinSPA-860 y burro anti-conejo conjugado con Cy5 (azul).

Otra estrategia de supervivencia intracelular desarrollada por varios patógenos es la manipulación de la ruta autofágica (Orvedahl y Levine, 2009). La autofagia es un mecanismo de defensa celular que atrapa partículas presentes en el citoplasma mediante la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Estos compartimentos se fusionan con lisosomas formando el autolisosoma, compartimento final de la ruta autofágica en el que la carga es degradada (Saftig y Klumperman, 2009). Algunos patógenos subvierten la maduración del compartimento autofágico y/o lo

utilizan para sobrevivir y/o multiplicarse intracelularmente. Para evaluar si *Klebsiella* utiliza elementos de la ruta autofágica, se utilizó la línea celular estable de macrófagos MH-S-GFP-pLC3B, generada en el contexto de esta Tesis Doctoral (apartado 19 de Material y Métodos, página 86). La proteína LC3 es un típico marcador de autofagosomas y la principal proteína autofágica de mamíferos, está codificada por 4 genes diferentes de entre los cuales LC3B es la más estudiada (Mizushima *et al.*, 2010). Los macrófagos MH-S/GFP-pLC3B expresan el plásmido pLC3B y en respuesta a un estímulo autofágico, como la rapamicina, se observa una acumulación de esta proteína (puntos verdes) (**Fig. 47B**). Para determinar la funcionalidad de las células MH-S/GFP-pLC3B en el contexto de una infección, se usó como control positivo una infección con una cepa de *Y. enterocolitica* (Deuretzbacher *et al.*, 2009). Tras 60 min de infección las bacterias intracelulares estaban completamente rodeadas con la proteína LC3B (**Fig. 47C**). Sin embargo, al infectar los mismos macrófagos con la cepa Kp43816 no se detectaron colocalizaciones con la proteína LC3B ni tampoco la acumulación de esta proteína en las células infectadas en ningún momento de la infección (**Fig. 47D**).

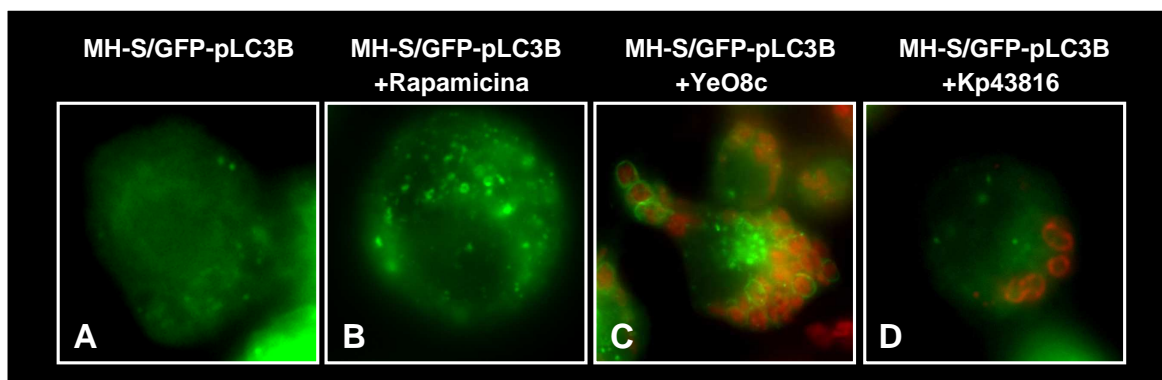


Figura 47: *Klebsiella* no colocaliza con LC3B. Imágenes tomadas en un microscopio confocal. (A) Macrófagos MH-S/GFP-pLC3B sin tratar. Los macrófagos expresan GFP (verde). (B) Inducción de autofagia con 50µg/ml de rapamicina durante 2h. Los puntos verdes son proteína LC3B. (C) Infección de los macrófagos con una cepa de *Y. enterocolitica* sin plásmido de virulencia (YeO8c) durante 1,5h. La bacteria contiene el plásmido pMMB207mCherry (rojo). (D) Macrófagos infectados con la cepa Kp43816 durante 6h. *Klebsiella* se tiñó con los anticuerpos conejo anti-*Klebsiella* y burro anti-conejo conjugado con RRX (rojo).

2.2.5 Descripción de la *Klebsiella containing vacuole* (KCV) en macrófagos THP-1

Con el objeto de extender los datos obtenidos de la vida intracelular de *Klebsiella* en los macrófagos MH-S a macrófagos humanos, se infectó la línea celular THP-1 (monocitos humanos diferenciados a macrófagos). Las condiciones de infección y los tratamientos con Gm en los macrófagos THP-1 fueron los mismos que para los macrófagos MH-S.

Se observaron bacterias intracelulares que colocalizaron de forma transitoria con el marcador de endosoma temprano EEA1. Entre los 5-10 primeros min de infección se observaron colocalizaciones del 50-60%, mientras que a los 30 min de infección el porcentaje de colocalización ya se había reducido drásticamente (**Fig. 48A**).

A continuación, la vacuola que contiene *Klebsiella* (KCV) adquirió el marcador de endosoma tardío Lamp-1 y lo mantuvo hasta el final del experimento (**Fig. 48B**), así como también se observaron colocalizaciones a todos los tiempos analizados con el marcador ácido LysoTracker (**Fig. 48C**). También se analizó la posición relativa de *Klebsiella* con la proteína lisosomal catepsina D y no se observaron colocalizaciones a ningún tiempo analizado (**Fig. 48D**). En cambio, infecciones de los macrófagos THP-1 con la cepa Kp43816-UV, usada como control, mostró más del 50% de colocalizaciones (**Fig. 48E**).

Finalmente, se analizó la posición relativa de KCV respecto al aparato de Golgi y al RE y se determinó si *Klebsiella* utiliza elementos autofágicos. No se observó relación alguna del patógeno con el aparato de Golgi (**Fig. 49**) ni con el RE, así como tampoco se observaron colocalizaciones con la proteína autofágica LC3 (datos no mostrados).

En resumen, la población intracelular de *Klebsiella* en los macrófagos THP-1, reside en compartimentos ácidos, Lamp-1 positivos y evita la fusión con los lisosomas. Además, no colocalizan con elementos del aparato de Golgi, ni del RE ni del sistema autofágico.

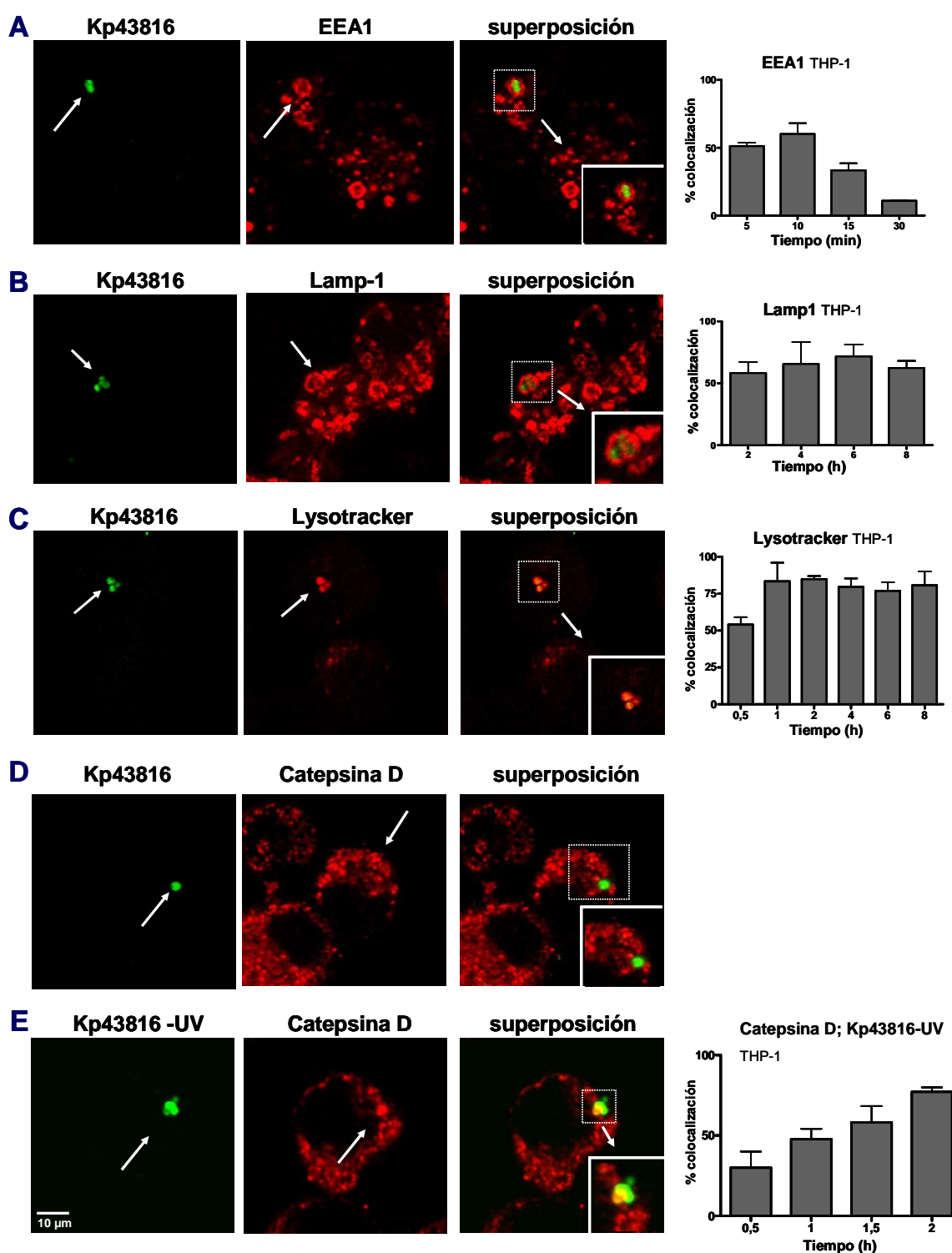


Figura 48: Maduración de KCV en macrófagos THP-1. (A) Colocalización de Kp43816 con el marcador de endosoma temprano EEA1. Los endosomas tempranos se tiñeron con anticuerpos cabra anti-EEA1 y burro anti-cabra conjugado con RRX (rojo). La imagen fue tomada con un microscopio confocal 10 min después de la infección. (B) Colocalización de Kp43816 con el marcador de endosoma tardío Lamp-1. Los endosomas tardíos se tiñeron con anticuerpos rata anti-Lamp1 y burro anti-rata conjugado con RRX (rojo). La imagen fue tomada tras 4h de infección y posterior tratamiento con Gm en un microscopio confocal. (C)

Colocalización de Kp43816 con el marcador fluido de compartimentos ácidos LysoTracker (rojo). La imagen se tomó tras 4h de infección y tratamiento en un microscopio confocal. (D) Kp43816 no colocaliza con catepsina D. Imagen de microscopía confocal tomada 4h post-gentamicina; en cambio, la cepa Kp43816-UV sí colocaliza con este marcador; imagen tomada después de 1h de infección en un microscopio confocal. (E) Las infecciones se llevaron a cabo con cepa Kp43816 que expresa la proteína GFP (pFPV25.1Cm, verde), excepto la infección con bacteria muerta que se tiñó con los anticuerpos conejo anti-*Klebsiella* y burro anti-conejo conjugado con Cy2 (verde).

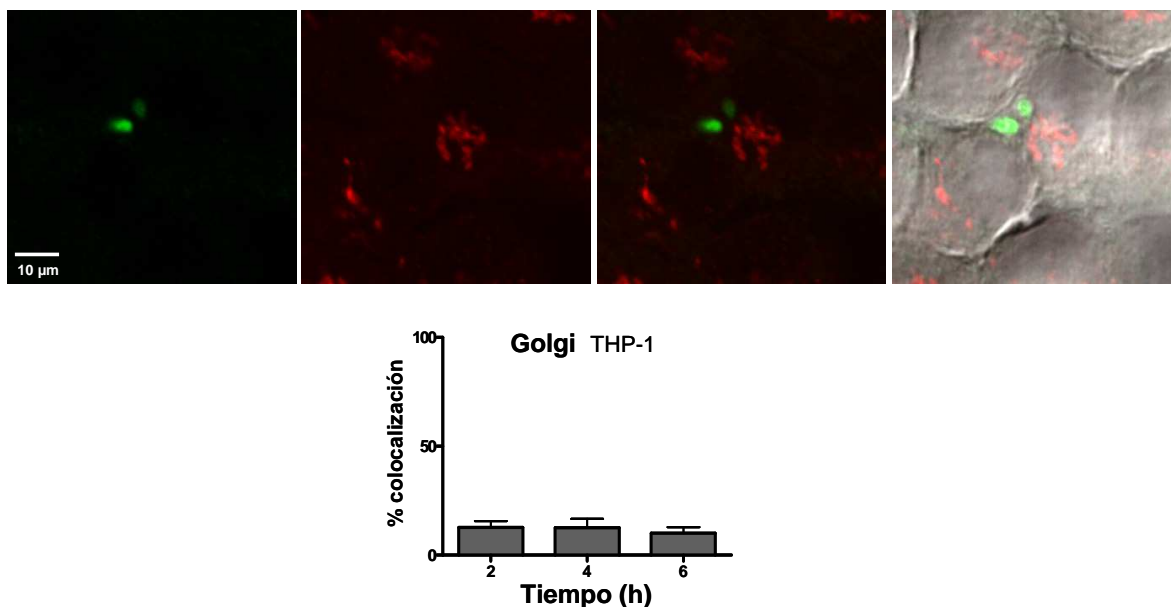


Figura 49: *Klebsiella* no colocaliza con el aparato de Golgi en los macrófagos THP-1. Microscopía confocal de una infección con *Klebsiella* en los macrófagos THP-1 tras 6h de infección y tratamiento con Gm. La cepa Kp43816 expresa la proteína GFP (verde) y el aparato de Golgi se tiñó con los anticuerpos ratón anti-GM130 y burro anti-ratón conjugado con RRX (rojo). No se encontraron colocalizaciones de *Klebsiella* con el aparato de Golgi a ningún tiempo estudiado en los macrófagos THP-1.

2.2.6 Papel del CPS en la supervivencia intracelular

El CPS es un importante factor de virulencia para *Klebsiella*. Ha sido demostrado que el CPS actúa como barrera y protege a la bacteria de ser fagocitada por células epiteliales y fagocitos (Favre-Bonte *et al.*, 1999; Sahly *et al.*, 2000). Además también se ha descrito que el grado de virulencia depende entre otras cosas de la cantidad de CPS presente en las cepas (Cortés *et al.*, 2002b; Lawlor *et al.*, 2005). Por consiguiente, nos planteamos estudiar el posible papel del CPS en la vida intracelular de *Klebsiella*. Para ello se construyó un mutante isogénico de la cepa Kp43816 que no expresaba CPS.

Se mutó el gen *manC*, perteneciente al grupo génico *wca*, del operón de cápsula ($43\Delta manC$; apartado 2.4 de material y métodos, 68).

Se realizaron experimentos de fagocitosis con las cepas silvestre y descapsulada de *K. pneumoniae*, tanto en los macrófagos MH-S como en los monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos. Las infecciones y los tratamientos con Gm y PxB se realizaron tal y como se especifica en el apartado 7 y 8.2 de material y métodos (páginas 75 y 77, respectivamente). De acuerdo con la literatura, la cepa descapsulada fue fagocitada con mayor eficiencia que la cepa silvestre Kp43816 (Fig. 50 A y C).

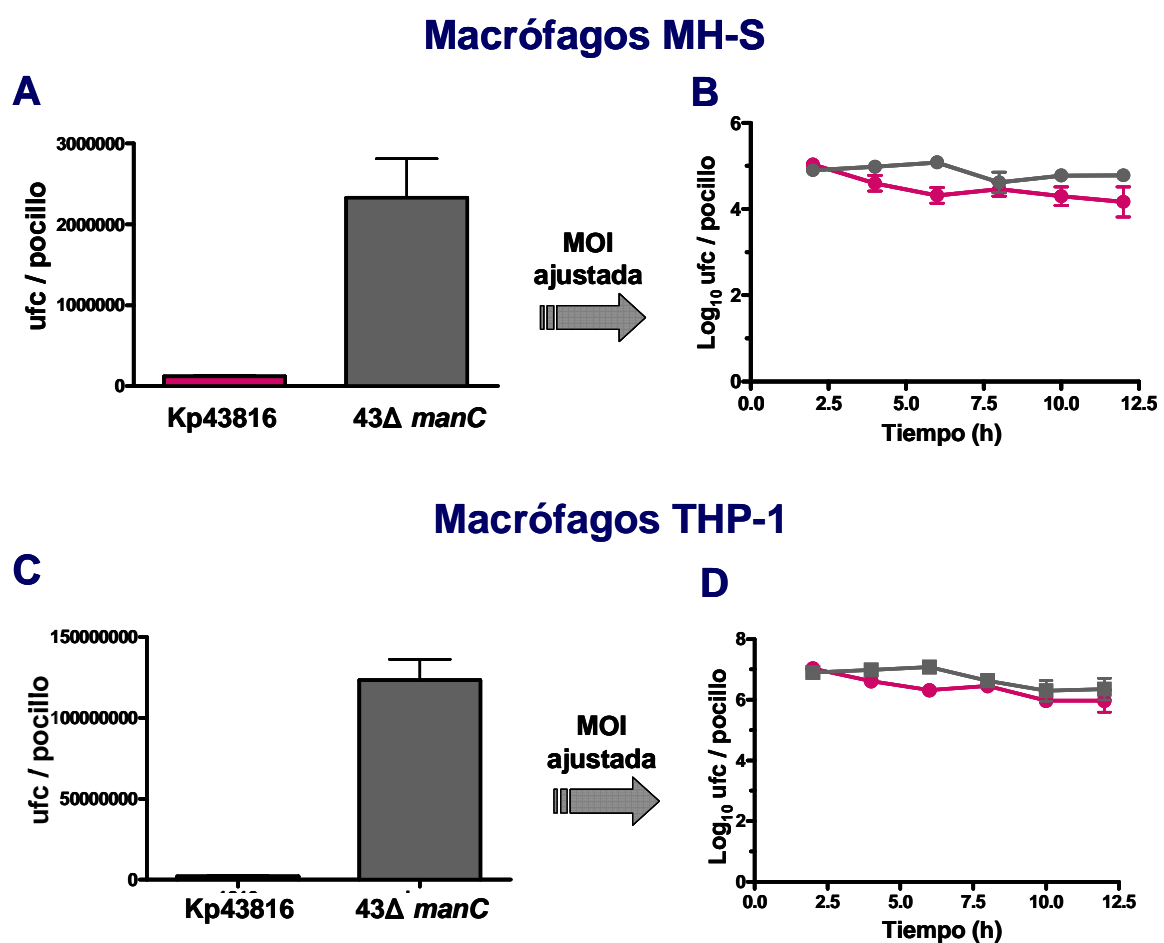


Figura 50: Efecto del CPS en la supervivencia intracelular de *Klebsiella*. (A) Fagocitosis de la cepa silvestre Kp43816 (rojo) y la cepa descapsulada, $43\Delta manC$ (gris) por los macrófagos MH-S. Los datos se obtuvieron por recuento en placa de las ufc en al menos tres experimentos independientes. (B) Cuantificación de la supervivencia intracelular de las cepas Kp43816 y $43\Delta manC$ en MH-S a lo largo del tiempo. Los datos se expresan como \log_{10} de las ufc por pocillo tras 2h, 4h, 6h, 8h, 10h y 12h de infección y tratamiento con Gm. (C) Fagocitosis de la cepa silvestre Kp43816 (rojo) y la cepa descapsulada, $43\Delta manC$ (gris) por los macrófagos

THP-1. Los datos se obtuvieron por recuento en placa de las ufc en al menos tres experimentos independientes. (D) Cuantificación de la supervivencia intracelular de las cepas Kp43816 y 43 Δ manC en THP-1 a lo largo del tiempo. Los datos se expresan como log₁₀ de las ufc por pocillo tras 2h, 4h, 6h, 8h, 10h y 12h de infección y tratamiento con Gm.

A continuación, para el estudio del papel del CPS en la vida intracelular de *Klebsiella*, se ajustó la MOI para igualar la entrada de las bacterias en el macrófago y de esta manera, igualar las condiciones experimentales. Así, antes de infectar los macrófagos, la suspensión bacteriana correspondiente a la cepa descapsulada se diluyó ¼ en PBS. La infección se llevó a cabo normalmente y después de los 90 min con Gm y PxB, el tratamiento siguió 12h más con gentamicina 100 µg/ml. No se observaron diferencias significativas entre el comportamiento intracelular de las dos cepas (**Fig. 50 B y D**), lo que indicó que el CPS no es un factor importante en la vida intracelular de *Klebsiella*. El experimento se repitió con otros dos mutantes descapsulados diferentes (un mutante en el *orf3* y otro en el *orf6* del operon de *wca*) siendo el resultado el mismo (datos no mostrados).

Dada la importancia del CPS en prevenir la opsonización (Álvarez *et al.*, 2000), los experimentos anteriores se realizaron con bacterias opsonizadas. Para ello, la cepa Kp43816 y la cepa descapsulada se incubaron con 1% de suero humano durante 45 min a 37 °C en agitación (180 rpm) (apartado 10 de material y métodos, página 79). Los macrófagos THP-1 fueron infectados con las cepas opsonizadas y no opsonizadas (control) de *Klebsiella*. Como esperábamos no se observaron diferencias significativas entre la fagocitosis de Kp43816 con o sin opsonizar (**Fig. 51A**). En cambio, y también de acuerdo con la literatura, la cepa 43 Δ manC opsonizada fue fagocitada con mayor eficiencia que la cepa 43 Δ manC (**Fig. 51A**). En el siguiente experimento, los macrófagos fueron infectados con las cepas opsonizadas y no opsonizadas ajustando la MOI y comprobando que la entrada fuera la misma para todas las cepas. En estas condiciones, únicamente se observó un progresivo descenso en el número de bacterias intracelulares en el caso de la cepa descapsulada opsonizada (**Fig. 51B**). Por consiguiente, el papel del CPS es prevenir la opsonización ya que, si este es el caso la bacteria internalizada es eliminada por el macrófago.

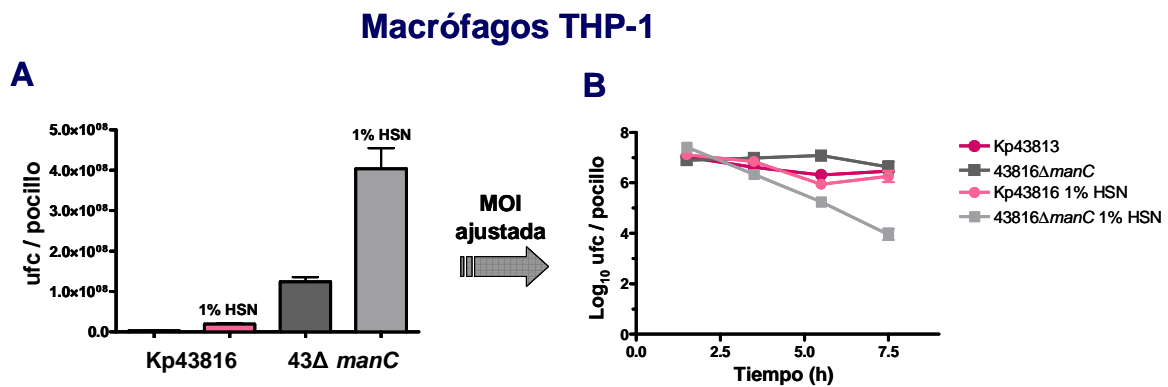


Figura 51: Papel del CPS de *K. pneumoniae* en la opsonización. (A) Fagocitosis (30 min de infección más los 90 min de tratamiento con Gm y PxB) de las cepas Kp43816 y 43Δ*manC* opsonizadas y no opsonizadas con suero humano (HSN) por los monocitos diferenciados a macrófagos THP-1. Los resultados se expresan como ufc por pocillo plaqueadas en diluciones seriadas a partir del lisado celular. (B) Cuantificación de la supervivencia intracelular de las cepas Kp43816 y 43Δ*manC* con y sin opsonizar, a lo largo del tiempo (2h, 4h, 6h y 8h de infección y tratamiento con Gm t PxB). Los datos se expresan como log₁₀ de las ufc por pocillo.

Dado que el CPS no desempeñaba ningún papel en la vida intracelular, nos planteamos analizar que ocurría con su expresión una vez *Klebsiella* reside en la KCV. Para ello, se contruyó una cepa que contenía una fusión transcripcional del promotor de cápsula con el gen indicador *gfp*, 43816Procps::*gfp*. Como control se usó la misma cepa pero sin el promotor de cápsula, 43816/pPROBE'*gfp*(LVA). Para estos experimentos las condiciones de infección fueron un poco diferentes que para el resto del trabajo con el fin de recuperar el mayor número de bacterias intracelulares. La infección de los macrófagos MH-S se llevó a cabo en placas de 6 pocillos a una MOI de 150 bacterias por célula durante 40 min. Transcurrido el tiempo de contacto el experimento se realizó normalmente (apartado 8.2 de material y métodos, página 77). A los tiempos indicados (2h, 4h y 6h), se lisaron los macrófagos (apartado 16 de material y métodos, página 83) y una parte del lisado se empleó para determinar el número de bacterias intracelulares y, otra parte, se incubó con anticuerpos de conejo anti-*Klebsiella*. Los inmunocomplejos se marcaron con un anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado con RRX. Las bacterias así marcadas se analizaron mediante citometría de flujo seleccionando, en primer lugar, la población bacteriana según su tamaño y

granulosidad, y en segundo lugar, detectando su fluorescencia roja. Y, de esta población, correspondiente a las bacterias intracelulares, se analizó su fluorescencia verde. Ésta es dependiente de la expresión del gen indicagor *gfp* controlado por la región promotora del operón de la cápsula. Experimentos control determinaron que no había diferencias significativas en el número de bacterias intracelulares entre la cepa con o sin el promotor de cápsula a ninguno de los tiempos analizados (datos no mostrados). En cambio, se observó que la expresión de la fusión transcripcional disminuyó con el tiempo de permanencia intracelular (**Fig. 52**).

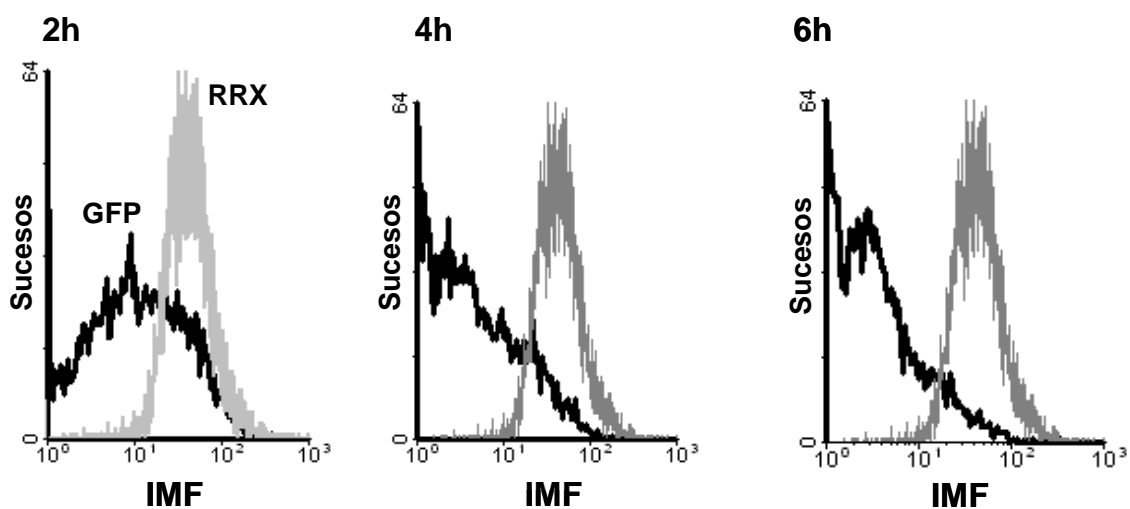


Figura 52: Expresión de CPS dentro del macrófago. Histograma de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del promotor de cápsula por los macrófagos MH-S tras 2h, 4h y 6h de la infección con las cepas 43816/pPROBE'*gfp*(LVA) y 43816Pro*cps* y posterior tratamiento con Gm.

Con el fin de determinar si la acidez de la KCV pudiera ser la señal responsable de la menor actividad de la fusión transcripcional, se cultivó la bacteria, 43816Pro*cps*::*gfp* en un medio con distintos pH, pobre en nutrientes y con bajo contenido en magnesio. Estas dos últimas condiciones han sido consideradas por otros autores como representativas del medio intracelular (Gibbons *et al.*, 2005) (**Fig. 53**).

Los datos mostrados en la **Figura 53** indican que, efectivamente, la expresión de la fusión transcripcional disminuye significativamente al crecer la bacteria en pH ácido en el contexto de un medio mínimo con bajo contenido en magnesio.

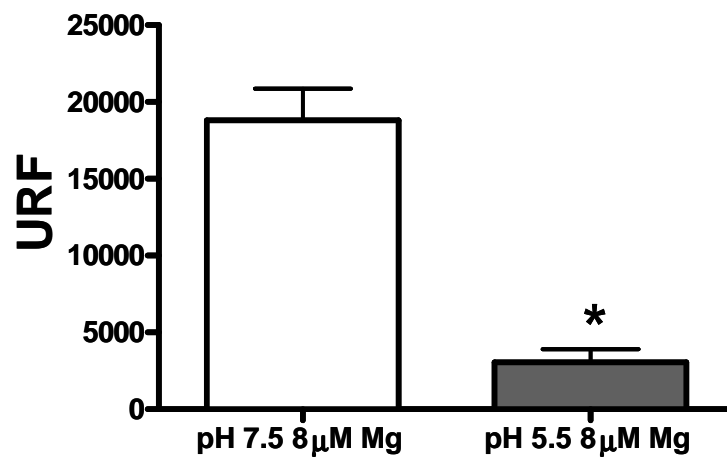


Figura 53: La acidez y el bajo magnesio disminuyen la expresión de cápsula en la cepa Kp43816. Actividad de la fusión transcripcional *cps::gfp*, determinada en unidades relativas de fluorescencia (URF), de la cepa Kp43816 crecida en un medio mínimo M9 a pH 7,5 (barra blanca) o a pH 5,5 (barra gris). *, $p < 0,05$ (indica una diferencia significativa con respecto a la cepa crecida a pH 7,5; t test de dos colas).

DISCUSIÓN

1. LA PROTEÍNA OmpA DE *K. pneumoniae* ES NECESARIA PARA PREVENIR LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES

En un trabajo previo de nuestro laboratorio habíamos demostrado que la proteína OmpA de *K. pneumoniae* desempeña un papel en la resistencia de *Klebsiella* frente a los péptidos antimicrobianos (Llobet *et al.*, 2009). Y, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que un mutante *ompA*, cepa 52OmpA2, induce niveles superiores de mediadores inflamatorios que la cepa silvestre tanto *in vitro* como *in vivo* al activar las vías de señalización de NF- κ B y de las MAPKs p38 y p44/42. Además, la inducción de las respuestas inflamatorias es dependiente de la activación de TLR2 y TLR4 vía MyD88. Por consiguiente, toda esta evidencia apoya el concepto de que OmpA juega un papel importante en la evasión del sistema inmune innato. Apoyando esta idea, los resultados muestran que el mutante *ompA* está atenuado en un modelo de neumonía en ratón.

La activación de una rápida respuesta inmunitaria es esencial para una defensa efectiva del pulmón contra los patógenos. Para activar estas respuestas, receptores específicos del huésped tienen que reconocer determinadas moléculas expresadas por el patógeno, llamados PAMPs. Estos PAMPs son relevantes para la supervivencia/virulencia del patógeno ya que pueden jugar un papel importante en la evasión del sistema inmune innato, pero, a la vez, son dianas para el sistema inmune (péptidos antimicrobianos y sistema del complemento). Nuestros resultados, junto con otros, apoyan el hecho que OmpA sea considerado un PAMP. OmpA es degradada por la elastasa de los neutrófilos y las bacterias que expresan OmpA son más susceptibles de ser eliminadas por los neutrófilos que los mutantes que no expresan la proteína. Además, los datos indican que la proteína SAA (del inglés *serum amyloid A*) se une a OmpA y esto facilita la fagocitosis así como la activación de sistemas defensivos oxígeno dependientes en neutrófilos y macrófagos peritoneales (Belaouaj *et al.*, 2000; Hari-Dass *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2006). No obstante, OmpA protege a la bacteria contra la acción bactericida de las colectinas del pulmón y los péptidos antimicrobianos (Wu *et al.*, 2003; Llobet *et al.*, 2009) y en este trabajo se muestra como evita la activación de respuestas inflamatorias.

Otros estudios muestran que la proteína OmpA purificada de *K. pneumoniae* induce la expresión de moléculas pro-inflamatorias en varios tipos celulares,

incluyendo las células del epitelio respiratorio. Por tanto, se postuló que el reconocimiento de OmpA contribuiría a la activación de las respuestas del huésped necesarias para la eliminación de *K. pneumoniae* (Jeannin *et al.*, 2000; Jeannin *et al.*, 2002; Jeannin *et al.*, 2003; Jeannin *et al.*, 2005). En esta Tesis Doctoral se utilizó un mutante *ompA* de *Klebsiella* en lugar de usar proteína recombinante, con lo que pensamos que los resultados obtenidos determinan las funciones de OmpA en su contexto más fisiológico, la membrana externa. Cabe destacar que nuestros datos, concuerdan con los obtenidos con un mutante *ompA* de *E. coli*, el cual induce una mayor expresión de mediadores inflamatorios que la cepa silvestre (Selvaraj and Prasadarao, 2005).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que *K. pneumoniae* contrarresta la activación de las respuestas inflamatorias induciendo la deubiquitinasa CYLD y la fosfatasa MKP-1 (DUSP1) vía NOD1. Además se demostró que éste es un proceso estrictamente dependiente del contacto entre la bacteria viva y la célula (Regueiro *et al.*, 2011). Considerando que el CPS era necesaria pero no suficiente para atenuar la inflamación (Regueiro *et al.*, 2011), en esta Tesis Doctoral nos planteamos si OmpA también podría mediar esta atenuación. Los datos mostrados en la **Figura 19** no apoyan esta idea, aunque no contradicen otros resultados de este trabajo que muestran que 52OmpA2 sí activa respuestas inflamatorias. Cabe decir que, en la mayoría de experimentos de este trabajo, la gentamicina se usó para eliminar las bacterias tras 2h de infección y, por ejemplo, la IL-8 liberada por las células se midió a las 4h y 6h post-infección. A su vez, el hecho que las respuestas inducidas por el mutante 52OmpA2 dependieron de la activación de TLR2-TLR4-MyD88 sugieren que OmpA, junto con el CPS, alteran el reconocimiento de *K. pneumoniae* dependiente de TLR. En conjunto, nuestra hipótesis de trabajo postula que la escasa respuesta inflamatoria inducida por *K. pneumoniae* se explica por el efecto antiinflamatorio (efectores todavía no identificados) inducido por el patógeno (Regueiro *et al.*, 2011) y por el hecho que factores bacterianos como la CPS y la proteína OmpA previenen el reconocimiento de *Klebsiella* por los TLR.

Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea que las células del epitelio respiratorio inducen una respuesta defensiva activando las vías de

señalización dependientes de NF- κ B y de las MAPKs en respuesta a una infección (Hippenstiel *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009; Medzhitov, 2007; Mogensen, 2009). Aunque la secreción de IL-8 inducida por el mutante *ompA* depende de la activación de las MAPKs p38 y p44/42, los mutantes también activan la MAPK JNK, sugiriendo que pudiera haber respuestas celulares adicionales dependientes de la MAPK-JNK. Estudios futuros abordarán la identificación de estas respuestas.

Los mutantes *ompA* utilizados en este trabajo activan diferentes PRRs dependiendo de la expresión de CPS en su superficie. La cepa capsulada 52OmpA2 activa TLR2 y TLR4; mientras que la cepa descapsulada 52145- Δwca_{K2} OmpA activa no sólo TLR2 y TLR4, sino también NOD1. Estos datos, junto con otros previos de nuestro laboratorio, implican a los receptores TLR2 y TLR4 en el reconocimiento de un mutante CPS de *K. pneumoniae* (Regueiro *et al.*, 2006; Moranta *et al.*, 2010) y sugieren que el reconocimiento de *Klebsiella* por los TLRs es un evento clave en la inducción de las respuestas defensivas del huésped contra este patógeno. Datos *in vivo* confirman que las respuestas dependientes de TLR4-MyD88 son esenciales para una eficaz respuesta inmune contra *K. pneumoniae* en ratones (Schurr *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009). La implicación de NOD1 en el reconocimiento de *K. pneumoniae* pudiera resultar sorprendente. Sin embargo, en un trabajo previo ya demostramos que 52145- Δwca_{K2} también activa respuestas defensivas vía NOD1 (Moranta *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que las cepas descapsuladas de *K. pneumoniae* son internalizadas por las células epiteliales (Sahly *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2002a) y que estos PRRs participan en el reconocimiento de los patógenos internalizados (Inohara *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004), los resultados del reconocimiento de *Klebsiella* por NOD1 son consistentes con la internalización de 52145- Δwca_{K2} y 52145- Δwca_{K2} OmpA. Una cuestión todavía sin resolver es cómo las bacterias que no se encuentran en el citosol pueden activar NOD1. Estudios recientes indican que hay una conexión entre la maduración fagosomal/acidificación y las respuestas dependientes de NOD1 (Herskovits *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Marina-García *et al.*, 2009). Además, los datos indican que los productos bacterianos son activamente transportados desde el fagosoma al citosol para activar los receptores NOD1 y NOD2 (Herskovits *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Marina-

García *et al.*, 2009). El hecho de que ambas cepas residen en vacuolas ácidas con características de endosomas tardíos en el interior de las células A549 (resultados no mostrados) sugiere que los ligandos de NOD1 serían transportados al citosol como ha sido descrito por otros autores (Herskovits *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Marina-García *et al.*, 2009).

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado por primera vez que OmpA es importante para la supervivencia de las bacterias en el pulmón, usando un modelo de neumonía de ratón. En los últimos 20 años se ha demostrado una correlación entre la activación de las respuestas inflamatorias y la eliminación de *Klebsiella* de las vías respiratorias (Greenberger *et al.*, 1996; Standiford *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001a; Ye *et al.*, 2001b). De este modo, la elevada respuesta inflamatoria inducida por la cepa 52OmpA2 sin duda puede contribuir a la eliminación del mutante. Cualquier estudio *in vivo* es complejo, y el resultado final de una neumonía resulta de la acción conjunta de los factores antimicrobianos (entre otros el sistema del complemento y los péptidos antimicrobianos) y diversos tipos celulares como los macrófagos alveolares, células epiteliales y neutrófilos. Es importante tener en cuenta que tanto las citocinas como las quimiocinas liberadas por las células epiteliales aumentan la actividad bactericida de los fagocitos profesionales. Por tanto, en el momento presente no podemos precisar cuál es el principal mecanismo innato implicado en la eliminación del mutante *ompA*. De hecho, nos planteamos que es necesaria la acción concertada de varios de ellos.

2. INTERACCIÓN DEL PATÓGENO *K. pneumoniae* CON FAGOCITOS PROFESIONALES

El factor de virulencia mejor caracterizado en *K. pneumoniae* es el CPS que actúa como escudo protector previniendo la adhesión e internalización a células epiteliales y macrófagos. Por esta razón se ha considerado a *Klebsiella* como un patógeno extracelular (Cortés *et al.*, 2002b; Lawlor *et al.*, 2005). Sin embargo, es cada vez más frecuente la descripción de patógenos que, aunque considerados primariamente extracelulares, son capaces de sobrevivir en el interior de algunas células. Uno de los ejemplos más recientes es *Helicobacter pylori*, que puede invadir y vivir intracelularmente en las células del epitelio gástrico (Dubois and Borén, 2007). En esta Tesis Doctoral se ha descrito por

primera vez que *Klebsiella* es capaz de sobrevivir en el interior de diferentes tipos de macrófagos (macrófagos alveolares de ratón, MH-S; y monocitos humanos diferenciados a macrófagos con PMA, THP-1). La internalización de un gran número de patógenos, como por ejemplo *Salmonella*, por las células fagocíticas requiere la activación de una serie de señales intracelulares como una correcta reorganización del citoesqueleto de actina en las zonas de ingestión o la activación de PI3K (Aderem and Underhill, 1999; Underhill and Ozinsky, 2002). Además, otros patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Neisseria gonorrhoeae* modulan el citoesqueleto de microtúbulos para internalizarse (Yoshida and Sasakawa, 2003). Patógenos como *Brucella* necesitan la participación tanto del citoesqueleto de actina como de los microtúbulos para internalizarse en células no fagocíticas, además de la fosforilación de PI3K (Gorvel and Moreno, 2002). No es sorprendente, por tanto, que nuestros datos indiquen que la fagocitosis de *K. pneumoniae* es un proceso dependiente de la correcta polimerización tanto del citoesqueleto de actina como de los microtúbulos y además, requiere la activación de la ruta de señalización de PI3K. También se demuestra que la internalización de *Klebsiella* es un proceso dependiente de la correcta conformación de las balsas lipídicas en la membrana plasmática eucariota, de igual manera que se ha descrito para otros patógenos como *S. typhimurium*, *Mycobacterium* spp., *Chlamydia* spp., o *L. monocytogenes*, entre otros (Lafont and van der Goot, 2005).

K. pneumoniae 43816 presenta una tasa de infección relativamente baja en macrófagos, siendo de aproximadamente 10-15% en MH-S y un poco superior en THP-1 (35% aproximadamente). Sin embargo, existen algunos ejemplos de patógenos bacterianos con una tasa de infección similar o incluso inferior a la obtenida con *Klebsiella*, cuyas adaptaciones intracelulares contribuyen significativamente a la progresión global de la infección. Entre otros, cabe destacar *Neisseria* spp, o *H. pylori* (Lambotin *et al.*, 2005; Virji *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 2004).

Una vez que *Klebsiella* ha sido internalizada por los macrófagos, los resultados de este trabajo muestran que el patógeno se localiza en un compartimento al que hemos denominado KCV (del inglés *Klebsiella containing vacuole*) y persiste a lo largo del tiempo sin prácticamente multiplicarse. Este

compartimento presenta características de endosoma temprano (EEA1) de forma transitoria. El compartimento maduro adquiere los marcadores de endosoma tardío Lamp-1 y Rab7 en conformación activa, y presenta un pH ácido en su lumen. Además, los datos muestran que KCV evita la fusión con lisosomas y no adquiere marcadores ni del Golgi ni del RE (Fig. 54). Tras 10h de infección se empieza a observar un efecto citotóxico que nuestros datos sugieren que está mediado por una muerte por apoptosis. Un punto importante que no se debe olvidar para la interpretación de los resultados es que las infecciones en macrófagos son procesos dinámicos, en el que no todas las bacterias son fagocitadas a la vez ni todas adquieren el marcador al mismo tiempo. Por esta razón, y teniendo en cuenta que el marcador de endosomas tempranos EEA1 se adquiere y se pierde rápidamente, se puede explicar que los valores de colocalización con este marcador sean de poco más del 50%.

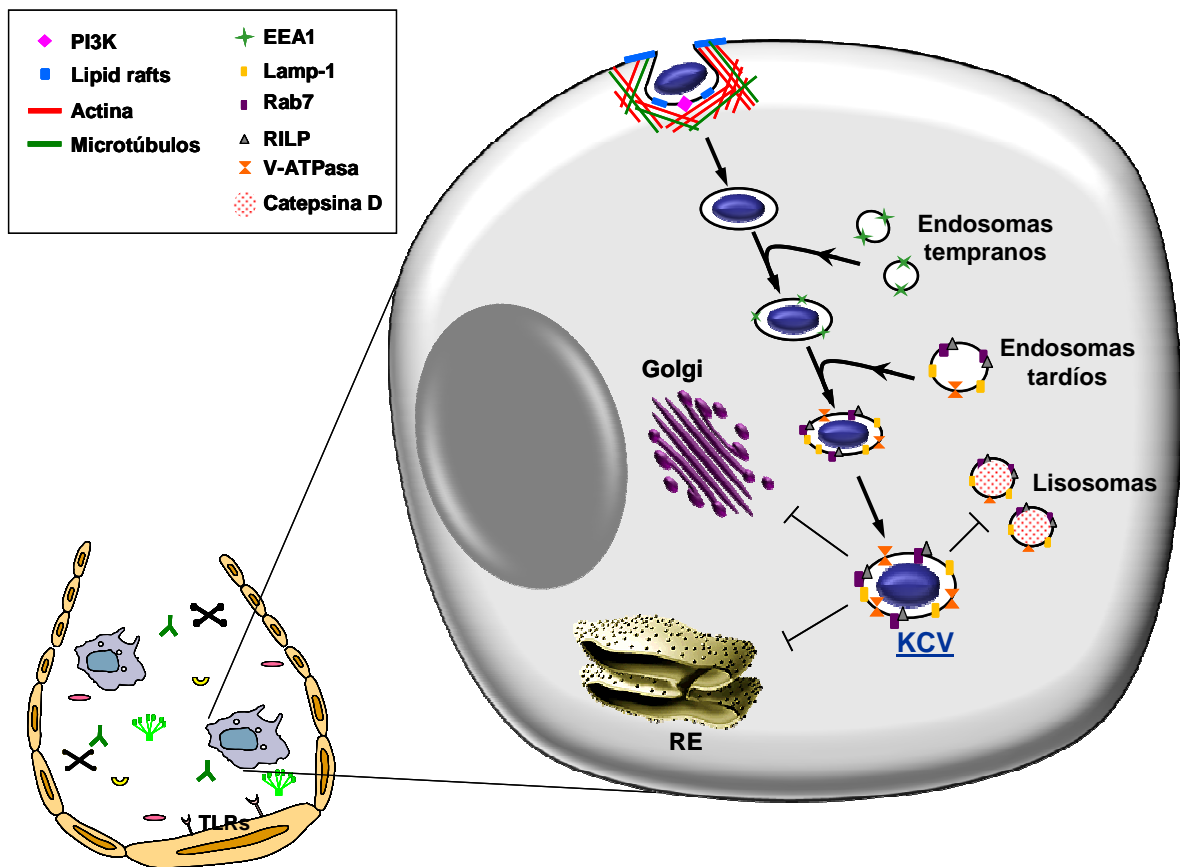


Figura 54: Modelo propuesto para explicar las infecciones de *Klebsiella* en macrófagos alveolares. Parte izquierda, alveolo pulmonar en el que encontramos los macrófagos

alveolares y *K. pneumoniae*. Parte derecha, el mecanismo por el cual *Klebsiella* es internalizada por los macrófagos alveolares es dependiente del citoesqueleto de microtúbulos y de actina, de la integridad de las balsas lipídicas de la membrana plasmática eucariota y de la cascada de señalización dependiente de PI3K. Tras la internalización, la vacuola que contiene *Klebsiella* (KCV) adquiere transitoriamente marcadores de endosoma temprano. El patógeno se localiza en una vacuola ácida con características de endosoma tardío (Lamp-1 positivo y presencia de Rab7 activado). KCV no adquiere marcadores ni del RE ni del aparato de Golgi. EEA1, *early endosome antigen*; Lamp1, *lysosomal associated marker protein*; PI3K, *fosfoinositol-3-quinasa*; RILP, *Rab-interacting lysosomal protein*.

Los patógenos intracelulares han desarrollado diversas estrategias para evitar su degradación a lo largo de la ruta endocítica (Gruenberg and van der Goot, 2006). Algunos patógenos como *L. monocytogenes* o *Shigella flexneri* rompen y escapan de las vacuolas fagocíticas para replicar en el citosol de las células infectadas (Ray *et al.*, 2009). Un caso particular es el del patógeno *Leishmania*, que ha desarrollado adaptaciones para sobrevivir en el ambiente hostil de los fagolisosomas, caracterizado por presentar una baja tensión de oxígeno, niveles reducidos de nutrientes, bajo pH y presencia de agentes bactericidas como péptidos antimicrobianos o enzimas lisosomales (Amer and Swanson, 2002). Otros patógenos como *Legionella pneumophila* y *Chlamydia spp.* evitan la interacción de su vacuola con la ruta endocítica (Salcedo and Holden, 2005) y, en cambio, algunos otros paran la maduración del fagosoma en algún punto de la ruta endocítica. Así, *M. tuberculosis* bloquea la maduración del fagosoma en un estado temprano Rab5, positivo mientras que otros evitan la fusión con los lisosomas adquiriendo: marcadores de endosoma tardío como *S. enterica* o *C. jejuni*, marcadores de compartimento autofágico como *Coxiella burnetii* o marcadores de RE como *Brucella abortus* (García-del Portillo *et al.*, 2008; Watson and Galán, 2008; Beron *et al.*, 2002; Alonso and García-del Portillo, 2004; Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998; Kumar and Valdivia, 2009).

Nuestros resultados sugieren que *K. pneumoniae* transita por la ruta endocítica pero que bloquea la maduración final del fagosoma en un estadio con características de endosoma tardío. Perturbaciones de este nicho resultan en una pérdida de la capacidad de *Klebsiella* para residir en el interior de la célula. Así, la inhibición de la acidificación de KCV con bafilomicina A1 redujo significativamente la supervivencia intracelular del patógeno en los macrófagos.

Esto no es algo específico de *Klebsiella* ya que la acidificación del fagosoma también es crítica para la supervivencia y replicación de otros patógenos como *Salmonella* o *Coxiella*. De hecho, de manera similar a *Klebsiella*, el tratamiento con bafilomicina A1 redujo significativamente la supervivencia de *S. typhimurium* en macrófagos (Maurin *et al.*, 1992; Rathman *et al.*, 1996).

Destacar que los experimentos de colocalización con marcadores sugirieron la existencia de dos poblaciones de bacterias intracelulares diferentes. Una población intracelular de aproximadamente el 80% que no colocaliza con marcadores lisosomales y otra, aproximadamente del 20%, que sí lo hace. Este hecho podría explicar el descenso en el número de bacterias intracelulares que se detecta en las primeras horas de la infección. En ese sentido, el tráfico intracelular de *Brucella* es similar al de *Klebsiella*, a parte de no ser homogéneo en todas las células, sólo un porcentaje de las bacterias internalizadas por macrófagos son capaces de evitar la fusión con lisosomas y crear el ambiente adecuado para replicarse (Gorvel and Moreno, 2002).

El mecanismo por el cual KCV queda en un estado de fagosoma tardío y no llega a fusionarse con los lisosomas es desconocido. En otros patógenos como *Mycobacterium*, que tienen la capacidad de detener el proceso de maduración fagosomal en un estadio temprano, se han descrito algunas estrategias utilizadas por la micobacteria que evitan la fusión con los lisosomas. Ferrari y colaboradores (1999) consiguieron separar físicamente fagosomas que contenían bacterias vivas o muertas y solamente fueron capaces de hallar la proteína denominada TACO (del inglés, *tryptophane aspartate-containing coat protein*. También llamada P57 o coronina 1) en las membranas fagosomales de los fagosomas con bacteria viva. Una posible función de TACO es evitar la fusión del fagosoma que contiene la bacteria con los lisosomas, si bien los mecanismos moleculares son todavía desconocidos. Se cree que factores secretados por la micobacteria viva o señales transmembrana generadas durante la entrada de la bacteria viva al macrófago son los responsables de mantener la proteína TACO retenida en el fagosoma (Ferrari *et al.*, 1999). Señalar que, al contrario que la KCV, el compartimento donde reside *Mycobacterium* no es ácido ni retiene marcadores de endosoma tardío (Russel, 1995). *H. pylori* también evita la maduración del fagosoma y la fusión con lisosomas reclutando y reteniendo la proteína TACO en la membrana

fagosomal que la contiene (Zheng and Jones, 2003). Además, como en el caso de *Mycobacterium*, se observó una exclusión de la ATPasa vacuolar con lo que no se acidifica el lumen del fagosoma (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). En estudios posteriores nuestro grupo determinará si KCV adquiere la proteína TACO para evitar la fusión con los lisosomas aunque no lo creemos probable ya que en los casos anteriores los fagosomas positivos para TACO no se acidifican y *Klebsiella* sí reside en compartimentos ácidos.

Las proteínas Rab están relacionadas en el proceso de fusión de las membranas y transporte vesicular (Wickner and Schekman, 2008). Sun y colaboradores (2007) publicaron que *Mycobacterium* secreta un factor que inactiva la interacción de Rab7 con RILP, unión necesaria para que ocurra la fusión con los lisosomas. De igual manera, la interacción directa de Rab7 con la proteína efectora SifA de *Salmonella* también evita la unión a RILP (Harrison *et al.*, 2004). Por tanto, el hecho de reclutar Rab7 e impedir la unión con RILP es otra estrategia utilizada por diversos patógenos que impide la maduración del fagosoma. Sin embargo, nuestros datos sugieren que *Klebsiella* no utiliza esta estrategia ya que la vacuola recluta Rab7 y además interactúa con RILP. Existe evidencia experimental de otra GTPasa, Rab14, implicada en el transporte vesicular que también impide la fusión con los lisosomas. Análisis proteómicos identifican a Rab14, entre otras Rabs, como componentes de las membranas fagosomales (Garin *et al.*, 2001). Rab14 parece participar en el control del tráfico entre el aparato de Golgi y los endosomas tempranos (Junutula *et al.*, 2004). Un estudio de 2006 sugiere que la GTPasa Rab14 es reclutada y retenida en los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* lo que impide la interacción fagosoma-lisosoma (Kyei *et al.*, 2006). En este sentido la activación de PI3K es importante ya que los productos de esta vía de señalización actúan en la formación y maduración de los fagosomas (Gillooly *et al.*, 2001). Además, PI3K activa Akt y se ha propuesto que *Salmonella* bloquea la maduración fagosomal por desactivación de la GTPasa Rab14 en un proceso dependiente de Akt (Bakowski, *et al.*, 2008). Los datos de esta Tesis Doctoral ya revelan que las infecciones con *Klebsiella* activan PI3K y la fosforilación de Akt y por consiguiente, pudiera ser que la KCV retuviera Rab14, cosa que bloquearía la fusión con el lisosoma. Estudios futuros del laboratorio tratarán de comprobar esta hipótesis. En cualquier caso, datos recientes del

laboratorio resaltan la importancia de la activación de la vía PI3K-Akt para la supervivencia intracelular de *Klebsiella*. Cuando las infecciones se realizaron en presencia del inhibidor LY294002 (inhibidor de PI3K) se observó un descenso significativo en el número de bacterias intracelulares, de acuerdo con el incremento detectado en las colocalizaciones con catepsina D y dextrano (Cano y Bengoechea, resultados no publicados).

El CPS juega un papel crítico en la virulencia de numerosos patógenos Gram positivos y Gram negativos. *Neisseria meningitidis* y *E. coli* son patógenos capsulados, Gram negativos, en los cuales se ha demostrado un papel determinante de la cápsula en la supervivencia intracelular, así, se observa un descenso en la viabilidad de bacterias intracelulares carentes de CPS en diversos tipos celulares (Kim and Elliott, 2003; Spinosa *et al.*, 2007). En patógenos Gram positivos como *Streptococcus spp.* también se ha establecido una relación entre el CPS y la adhesión, invasión y supervivencia intracelular (Benga *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Es bien conocido que la CPS reduce la adhesión e internalización de *K. pneumoniae* por las células epiteliales y es esencial para causar neumonía (Cortés *et al.*, 2002b; de Astorza *et al.*, 2004; Lawlor *et al.*, 2004). Además, la ameba *D. discoideum* también ha sido empleada recientemente para estudiar la interacción entre *K. pneumoniae* y fagocitos profesionales mediante la realización de un escrutinio para identificar los *loci* de *Klebsiella* necesarios para evitar la predación por *D. discoideum* (Pan *et al.*, 2011). El 80% de los mutantes por transposición analizados presentó inserciones bien en el operón de síntesis del CPS bien en los loci que causaban un descenso pronunciado en la cantidad de CPS expresada (Pan *et al.*, 2011), resaltando una vez más la importancia del CPS en la interacción *Klebsiella*-fagocito profesional. Nuestros datos corroboran esta evidencia ya que en nuestro trabajo hemos comprobado cómo el CPS dificulta la adhesión y la internalización de *Klebsiella* por fagocitos profesionales, tanto macrófagos alveolares MH-S como la ameba *D. discoideum* AX2. Sin embargo, en el caso de los macrófagos alveolares, nuestros resultados demuestran claramente que el CPS es dispensable una vez que la bacteria se encuentra en el interior de la célula. La aparente contradicción con la importancia del CPS *in vivo* no es tal, ya que pudimos comprobar que el papel clave del CPS es prevenir la opsonización y así evitar

la fagocitosis vía receptores del complemento. Numerosos trabajos indican que la fagocitosis mediada por estos receptores es más efectiva en la eliminación de los patógenos (Aderem and Underhill, 1999; Ukkonen *et al.*, 1986; Underhill and Ozinsky, 2002; Watson and Galán, 2008).

Resultó un tanto inesperado comprobar cómo la expresión de la fusión transcripcional de CPS disminuyó en las bacterias intracelulares a lo largo del tiempo. Los datos obtenidos *in vitro* en este trabajo sugieren que un pH ácido, entre otros factores desconocidos hasta el momento, podrían explicar la disminución de la expresión de cápsula. Estudios futuros del grupo se centrarán en desentrañar las bases moleculares del proceso así como analizar el transcriptoma de la bacteria intracelular.

El LPS es otro importante factor de virulencia de *K. pneumoniae* (Lawlor *et al.*, 2005; Podschun and Ullmann, 1998). En esta Tesis Doctoral, nuestros datos indican que la cadena O parece no desempeñar un papel importante en la interacción con fagocitos profesionales. Este resultado contradice los datos de Pan y colaboradores (Pan *et al.*, 2010) que demostraron la importancia de la cadena O en la resistencia frente a la predación por *D. discoideum*. Sólo podemos especular sobre las causas de esta discrepancia. Entre otras, podemos pensar en la cepa empleada (avirulenta en su caso), la cantidad de CPS expresada, o el serotipo de cadena O. En esta Tesis sí hemos demostrado la importancia de las modificaciones de lípido A con palmitato y 2-hidroximiristato en la interacción con fagocitos profesionales. Destacar que mutantes deficientes en ellas también están atenuados en el modelo de ratón de neumonía (Llobet *et al.*, 2011; Llobet y Bengoechea, resultados no publicados) lo que sugiere la existencia de una correlación en la resistencia frente a la predación por *D. discoideum* y la virulencia en *Klebsiella*. Apoyando esta idea, nuestros datos indican que OmpA, OmpK36 y los azúcares del núcleo también son importantes para resistir a la predación por *D. discoideum* y todos ellos están atenuados *in vivo* (March y Bengoechea, resultados no publicados; Izquierdo *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2003; Regué *et al.*, 2001; Regué *et al.*, 2004; Regué *et al.*, 2005).

El resultado final de la interacción entre patógeno-macrófago, en muchas ocasiones, resulta en la muerte del macrófago. La apoptosis, la necrosis y la piroptosis son tres procesos que describen la muerte celular de células

infectadas. La apoptosis es un proceso dependiente de la activación de la caspasa-3 y un proceso menos inflamatorio que la muerte por necrosis, que por otro lado, es un proceso independiente de caspasas. Los principales factores endógenos que desencadenan la necrosis son el ácido úrico y la proteína de unión al ADN HMGB1 (del inglés, *high-mobility group box 1*). La piroptosis es un tipo de muerte celular que comparte características con la apoptosis y la necrosis y es dependiente de la activación de la caspasa-1 mediada por el complejo multiproteico llamado inflamasoma. La activación de la caspasa-1 desencadena la maduración proteolítica y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. Por tanto, al igual que la necrosis, la piroptosis es una muerte celular inflamatoria (Lamkanfi and Dixit, 2010). Patógenos como *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Legionella* inducen piroptosis (Lamkanfi and Dixit, 2010; Lamkanfi and Dixit, 2011; Scaffidi *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003;). En esta Tesis Doctoral, se observó que *K. pneumoniae* induce un efecto citotóxico asociado a una muerte por apoptosis. Por otra parte, un trabajo reciente demuestra que NLRP3 (componente del complejo inflamasoma) y ASC (del inglés *apoptotic speck-line containing a caspase recruitment domain*) activan la necrosis en macrófagos así como la liberación de HMGB1 y la secreción de IL-1 β e IL-18 en respuesta a infecciones con *K. pneumoniae in vivo* (Willingham *et al.*, 2011). Además, los resultados sugieren que las vías predominantes de muerte celular e inflamación inducidas por *Klebsiella* corresponden a una piroptosis dependiente de NLRP3 (Willingham *et al.*, 2011). Señalar que las condiciones de infección son diferentes en los dos trabajos y, por ejemplo, la MOI y el tiempo de contacto es más alta en el trabajo de Willingham y colaboradores (Willingham *et al.*, 2011). Esto sugiere que el tipo de muerte celular inducido por *Klebsiella* varía según las condiciones de infección, de igual manera a cómo ha sido descrito para *Shigella* (Labbé and Saleh, 2008). Futuros trabajos abordarán esta cuestión.

3. CONSIDERACIONES FINALES Y DIRECCIONES FUTURAS

K. pneumoniae es uno de los principales patógenos causantes de neumonías nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Las neumonías causadas por *Klebsiella* se caracterizan por una destrucción necrótica del tejido pulmonar como resultado de la respuesta inflamatoria desencadenada por la elevada

carga bacteriana. Además, es cada vez más frecuente el aislamiento de cepas resistentes a todos los antibióticos lo que complica su tratamiento. Es indiscutible que la investigación en *Klebsiella* responde a una necesidad clínica. Pero los resultados de esta Tesis, junto con los desarrollados por nuestro grupo en los últimos años, también muestran que *K. pneumoniae* es un buen modelo para estudiar algunas de las preguntas más relevantes en el contexto de las infecciones: la atenuación de respuestas inmunes, la interacción con células fagocíticas o el descubrimiento de nuevos factores de virulencia y sistemas de regulación bacterianos.

Cualquier trabajo de investigación siempre abre nuevos interrogantes y, en esta Tesis, quedan sin resolver al menos dos preguntas relevantes: el mecanismo(s) celular que subvierte *Klebsiella* para evitar la fusión de KCV con el lisosoma y los determinantes bacterianos implicados en el proceso. Respecto a la primera pregunta, en el apartado anterior ya se han planteado varias posibilidades y los esfuerzos actuales del laboratorio se centran en el posible papel que desempeña la vía PI3K-Akt-Rab14, aunque no es descabellado plantear la necesidad de trabajar con siARN para profundizar en los mecanismos celulares. Este tipo de estudio se debiera complementar con un análisis proteómico de la KCV. En ambas aproximaciones experimentales se debieran infectar macrófagos THP-1, en lugar de MH-S, por tener una mayor tasa de infección. Respecto a la segunda pregunta, es imperativo el análisis de la vida intracelular de los distintos mutantes deficientes en las modificaciones del lípido A y en las OMPs: OmpA y OmpK36. Señalar que en estos momentos en el laboratorio, se está trabajando en la identificación de mutantes deficientes en la supervivencia intracelular (Cano y Bengoechea, resultados no publicados). Simultáneamente, se están analizando los mismos mutantes para comprobar si ejercen un efecto citotóxico, empleando para ello, el ensayo de unión de cristal violeta descrito en esta Tesis.

Por último, los resultados de esta Tesis sugieren que *K. pneumoniae* es capaz de eludir la xenofagia, proceso de autofagia implicado en la eliminación de patógenos intracelulares (Deretic and Levine, 2009). En general, la autofagia es un proceso celular que controla la calidad y la cantidad de biomasa intracelular, pero también participa en la eliminación de patógenos intracelulares localizados en el citosol o en vacuolas (Deretic and Levine, 2009). La principal proteína

utilizada como marcador de autofagia es la proteína LC3 y, en general, se detecta su acumulación en los autofagosomas, se visualiza como estructuras punteadas intracelulares mediante microscopía de fluorescencia (Mizushima *et al.*, 2010). Mediante *Western blot* se analiza la conversión de LC3-I a LC3-II, lo que indica la formación de autofagosomas (Mizushima *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en las células infectadas no se inducen las estructuras punteadas características. Más aún, en las células infectadas no se inducen estas estructuras a pesar de añadir rapamicina, un típico inductor de autofagia (Cano y Bengoechea, resultados no publicados). Por tanto, hipotetizamos que efectivamente, *Klebsiella* bloquea activamente la inducción de autofagia. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que *Klebsiella* induce la fosforilación de mTORC1, potente supresor de autofagia (Wang and Proud, 2011), en un proceso dependiente de la activación de PI3K-Akt (Regueiro y Bengoechea, resultados no publicados). Trabajos en curso están profundizando en las estrategias empleadas por *K. pneumoniae* para controlar la inducción de autofagia así como los determinantes bacterianos implicados.

CONCLUSIONES

1. Un mutante *ompA* induce la secreción de IL-8 mediante la activación de las vías de señalización del NF- κ B y de las MAPKs p38 y p44/42.
2. La activación de las respuestas inflamatorias por el mutante *ompA* depende de los receptores TLR2 y TLR4 y de la proteína adaptadora MyD88.
3. Un mutante doble que no expresa ni CPS ni OmpA también activa la vía de señalización dependiente de NOD1.
4. Tanto el CPS como la proteína OmpA de *K. pneumoniae* juegan un papel fundamental en la evasión del sistema inmune innato por este patógeno humano.
5. Un mutante *ompA* está atenuado en el modelo de ratón de neumonía empleando la ruta de infección intranasal.
6. Tanto el CPS como la sección polisacáridica del LPS, así como las modificaciones del lípido A con palmitato y 2-hidroximiristato, y las proteínas OmpA y OmpK36 de *K. pneumoniae* son factores importantes para evitar la predación por la ameba *D. discoideum*.
7. *K. pneumoniae* 43816 es fagocitada tanto por macrófagos alveolares de ratón (MH-S) como por monocitos humanos diferenciados a macrófagos (THP-1) en un proceso que requiere la polimerización del citoesqueleto de microtúbulos y de los filamentos de actina, la integridad de las balsas lipídicas de la membrana plasmática eucariota y la activación de la ruta de señalización dependiente de PI3K.
8. *K. pneumoniae* 43816 reside intracelularmente en macrófagos durante períodos de tiempo de hasta 12h post infección.

9. Tras una localización transitoria en compartimentos que presentan características de endosoma temprano, *K. pneumoniae* reside en un compartimento ácido con características de endosoma tardío que no se fusiona con lisosomas. Este compartimento ha sido denominado KCV (del inglés *Klebsiella containing vacuole*).
10. La inhibición de la vATPasa con bafilomicina A1 reduce significativamente la persistencia de *Klebsiella* en el interior de los macrófagos alveolares.
11. La KCV no adquiere marcadores ni del aparato de Golgi ni del retículo endoplasmático, así como tampoco colocaliza con LC3, un marcador de compartimentos autofágicos.
12. *K. pneumoniae* induce un efecto citotóxico y muerte por apoptosis en macrófagos alveolares.
13. La cápsula no desempeña ningún papel en la vida intracelular de *K. pneumoniae*. Además, *K. pneumoniae* reduce la transcripción de la región promotora del operón de la cápsula una vez localizada en el interior del macrófago.

REFERENCIAS

Abreu M.T., Arnold E.T., Thomas L.S., Gonsky R., Zhou Y., Hu B., and Arditi M. 2002. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**:20431-20437

Aderem A. and Underhill D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 593-623

Akashi S., Shimazu R., Ogata H., Nagai Y., Takeda K., Kimoto M., and Miyake K. 2000. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **164**:3471-3475

Alcalá S., Klee M., Fernández J., Fleisher A., and Pimentel-Muiños. 2008. A high throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene* **27**: 44-54

Alberti S., Marques G., Camprubi S., Merino S., Tomas J.M., Vivanco F., and Benedi V.J. 1993. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* **61**:852-860

Albertí S., Rodriguez-Quinones F., Schirmer T., Rummel G., Tomas J.M., Rosenbusch J.P., and Benedi V.J. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect. Immun.* **63**: 903-910

Alberti S., Alvarez D., Merino S., Casado M.T., Vivanco F., Tomas J.M., and Benedi V.J. 1996a. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**:4726-4732.

Albertí S., Marqués G., Hernández-Allés S., Rubires X., Tomás J.M., Vivanco F., and Benedí V. 1996b. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect. and Immun.* **64**: 4719-4725

Alegado R.A., Chin C-Y., Monack D.M., and Tan M-W. 2011. The two-component sensor kinase KdpD is required for *Salmonella typhimurium* colonization of *Caenorhabditis elegans* and survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* **13**: 1618-1637

Alexeyev M.F. (Benchmarks). 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene Knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *BioTechniques.* **26**: 824-826, 828

Alibaud L., Köhler T., Coudray A., Prigent-Combaret C., Bergeret E., Perrin J., Benghezal M., Reimann C., Gauthier Y., van Delden C., Attree I., Fauvarque M-O., and Cosson P. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. *Cell. Microbiol.* **10**: 729-740

Alonso A., and García del Portillo F. 2004. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International Microbiol.* **7**: 181-191

Alper C.A., Raum D., Awdeh Z.L., Petersen B.H., Taylor P.D., and Starzl T.E. 1980. Studies of hepatic synthesis *in vivo* of plasma proteins, including orosomucoid, transferrin, alpha 1-antitrypsin, C8, and factor B. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **16**: 84–89

Alvarez D., Merino S., Tomas J.M., Benedi V.J., and Alberti S. 2000. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* **68**:953-955

Amer A.O., and Swanson M.S. 2002. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 56-61

Appleyard R.K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strain derived from *escherichia coli* K12. *Genetics.* **39**: 440-452

Armstrong L., Medford A.R., Hunter, K.J. Uppington K.M., and Millar A.B. 2004a. Differential expression of Toll-like receptor TLR-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* **136**:312-319

Armstrong L., Medford A.R., Uppington K.M., Robertson J., Witherden I.R., T. D. Tetley, and A. B. Millar. 2004 b. Expression of functional Toll like receptor TLR-2 and TLR-4 on alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**: 241-245

Bachman M.A., Miller V.L., and Weiser J.N. 2009. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLoS Pathog.* **5**: e1000622

Bachman M.A., Oyler J.E., Burns S.H., Caza M., Lépine F., Dozois C.M., and Weiser J.N. 2011. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect. Immun.* **79**: 3309-3316.

Bakowski M.A., Braun V., and Brumell J.H. 2008. *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**: 2022-2031

Bals, R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* **1**:141-150

Bals R., and Hiemstra P.S. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.* **23**:327-333

Barbalat R., Lau L., Locksley R.M., and Barton G.M. 2009. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol.* **10**: 1200-1207

- Barnes P.J., and Karin M.** 1997. Nuclear factor- κ B – a pivotal transcriptional factor in chronic inflammatory diseases. *The New Eng. J. of Med.* **336**: 1066-1071
- Barton, G.M.** 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* **118**:413-420
- Belaouaj A., Kim K.S., and Shapiro S.D.** 2000. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* **289**: 1185-1188.
- Benga L., Goethe R., Rohde M., and Valentin-Weigand P.** 2004. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **6**: 867-881
- Bengoechea J.A., Díaz R., and Moriyón I.** 1996. Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides. *Infect. Immun.* **64**:4891-4899
- Benoit M., Desnues B., and Mege J.L.** 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* **181**: 3733-3739
- Beron W., Gutiérrez M.G., Rabinovitch M., and Colombo M.I.** 2002. *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect. Immun.* **70**: 5816-5821
- Bhan, U., N. W. Lukacs, J. J. Osterholzer, M. W. Newstead, X. Zeng, T. A. Moore, T. R. McMillan, A. M. Krieg, S. Akira, and T. J. Standiford.** 2007. TLR9 is required for protective innate immunity in Gram negative bacterial pneumonia: role of dendritic cells. *J. Immunol.* **179**:3937-3946
- Bhan U., Ballinger M.N., Zeng X., Newstead J., Cornicelli M.D., and Standiford J.** 2010. Cooperative interactions between TLR4 and TLR9 regulated Interleukin 23 and 17 production in a murine model of Gram negative bacterial pneumoniae. *Plos One* **5 (3)** e9896
- Bhavsar A.P., Guttman J.A., and Finlay B.B.** 2007. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* **449**: 827-834
- Birchler T., Seibl R., Buchner K., Loeliger S., Seger R., Hossle J.P., Aguzzi A. and Lauener R.P.** 2001. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human β -defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* **31**: 3131-3137
- Bitter T., and Muir H.M.** 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**: 330-334

Boddicker J.D., and Jones B.D. 2004. Lon protease causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**: 2002-2013

Bolger M.S., Ross D.S., Jiang H., Frank M. M., Ghio A.J., Schwartz D.A., et al. 2007. Complement levels and activity in the normal and LPS-injured lung. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **292**: L748-L759.

Brogden K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:238-250

Broug-Holub E., Toews G.B., van Iwaarden J.F., Strieter R.M., Kunkel S.L., Paine R. 3rd, and Standiford T.J. 1997. Alveolar macrophages are required from protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect. Immun.* **65**: 1139-1146

Brumell J.H., and Scidmore M.A. 2007. Manipulation of Rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol. And Molec. Biol. Reviews.* **71(4)**: 636-652

Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., and Duval J. 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet.* **2**:302-306

Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J., and Deurs B.V. 2000. Rab7: a key to lysosome Biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 467-480

Buchholz K.R., and Stephens R.S. 2008. The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect. Immun.* **76**: 3150-3155

Burzyn D., Rassa J.C., Kim D., Nepomnaschy I., Ross S.R., and Piazzon I. 2004. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J. Virol.* **78**: 576-584

Cai S., Batra S., Shen L., Wakamatsu N., and Jeyaseelan S. 2009. Both TRIF- and MyD88-dependent signalling contribute to host defense against pulmonary *Klebsiella* infection. *J. Immunol.* **183**: 6629-6638

Cameron C.C., Cuellar-Mata P., Matsuo T., Davidson H.W., and Grinstein S. 2002. Role of 3-phosphoinositides in the maturation of *Salmonella*-containing vacuoles within host cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 12770-12776

Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompert C.M., Alberti S., and Bengoechea J.A. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72**:7107-7114

- Cano V., Moranta D., Llobet-Brossa E., Bengoechea J.A., and Garmendia J.** 2009. *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BCM Microbiol.* **9**: 156-164
- Cantalupo G., Alifano P., Roberti V., Bruni C.B., and Bucci C.** 2001. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* **20**: 683-693
- Carabeo R.A., Mead D.J., and Hackstadt T.** 2003. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 6771-6776
- Carpenter, J.L.** 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev. Infect. Dis.* **12**:672-682
- Carroll M.C.** 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**: 981-986
- Castranova V., Raqbovsky J., Tucker J.H., and Milles P.R.** 1988. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **93**: 472-483
- Celly J., Olivier M., and Finlay B.B.** 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J.* **20**: 1245-1258
- Chamaillard M., Girardin S.E., Viala J., and Philpott D.J.** 2003. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* **5**: 581–592
- Chaveroche M.K., Ghigo J.M. and d'Enfert C.** 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**, E97
- Chen Z.J.** 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell. Biol.* **7**:758-765
- Cheng G., Sun J., Fridlender Z.G., Wang L-C.S., Ching L-M., and Albelda S.M.** 2010. Activation of the nucleotide oligomerization domain signaling pathway by the non-bacterial derived xanthone drug 5'6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (Vadimezan). *J. Biol. Chem.* **285**: 10553-10562
- Choi K.H., Gaynor J.B., White K.G., Lopez C., Bosio C.M., Karkhoff-Schweizer R.R., and Schweizer H.P.** 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**: 443-448
- Choi K-H., and Schweizer H.P.** 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. protocols.* **1**: 153-161

Clarke M. 2010. Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cell. Microbiol.* **12**: 283-291

Clements, A., D. Tull, A. W. Jenney, J. L. Farn, S. H. Kim, R. E. Bishop, J. B. McPhee, R. E. Hancock, E. L. Hartland, M. J. Pearse, O. L. Wijburg, D. C. Jackson, M. J. McConville, and R. A. Strugnell. 2007. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* **282**:15569-15577

Cortés G., Alvarez D., Saus C., and Alberti S. 2002a. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect. Immun.* **70**:1075-1080

Cortés G., Borrell N., de Astorza B., Gomez C., Sauleda J., and Alberti S. 2002b. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect. Immun.* **70**:2583-2590

Cortés G., de Astorza B., Benedi V.J., and Alberti S. 2002. Role of the *htrA* gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* **70**:4772-4776

Cossart P., Sansonetti P.J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science.* **304**: 242-248

Cosson P., Zulianello L., Join-Lambert O., Faurisson F., Gebbie L., Benghezal M., van Delden C., Curty L.K., and Köhler T. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J. Bacteriol.* **184**: 3027-3033

Cowland J.B., and Borregaard N. 1997. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics.* **45**: 17-23

Craig A., Mai J., Cai S., and Jeyaseelan S. 2009. Neutrophil recruitment to the lung during bacterial pneumoniae. *Infect. Immun.* **77**: 568-575

da Silva C.J., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., and Ulevitch R.J. 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* **276**:21129-21135

Datsenko K.A., and Wanner B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6640-6645

de Astorza B., Cortes G., Crespi C., Saus C., Rojo J.M., and Alberti S. 2004. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**:1767-1774.

- De Boy R., and Craig N.L.** 2000. Target site selection by Tn7: *attTn7* transcription and target activity. *J. Bacteriol.* **182**: 3310-3313
- DeLong, E.F., Wickham, G.S., and Pace, N.R.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.
- Deng J.C., Moore T.A., Newstead M.W., Zeng X., Krieg A.M., and Standiford T.J.** 2004a. CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary *Klebsiella* infection. *J. Immunol.* **173**:5148-5155
- Deng, J. C., X. Zeng, M. Newstead, T. A. Moore, W. C. Tsai, V. J. Thannickal, and T. J. Standiford.** 2004b. STAT4 is a critical mediator of early innate immune responses against pulmonary *Klebsiella* infection. *J. Immunol.* **173**:4075-4083
- Deretic V., and Levine B.** 2009. Autophagy, immunity and microbial adaptations. *Cell. host Microb.* **5**: 527-549
- Deuretzbacher A., Czymmeck N., Reimer R., Trülzsch K., Gaus K., Hohenberg H., Heesemann J., Aepfelbacher M., and Ruckdeschel K.** 2009. β 1 Integrin-dependent engulfment of *Yersinia enterocolitica* by macrophages is coupled to the activation of autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J. Immunol.* **183**: 5847-5860
- Diamond, G., Legarda D., and Ryan L.K.** 2000. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.* **173**:27-38
- Domenech-Sanchez A., Martinez-Martinez L., Hernandez-Alles S., del Carmen C.M., Pascual A., Tomas J.M., Alberti S., and Benedi V.J.** 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3332-3335
- Dong C., Davis R.J., and Flavell R.A.** 2002. MAPKinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:55-72
- Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng.** 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity.* **17**:251-263
- Dubois A., and Borén T.** 2007. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell. Microbiol.* **9**: 1108-1116
- Earhart C.F.** 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum, p. 1075-1090. In: F. Neidhart *et al.* (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
- Eichinger L., Pachebat J.A., Glockner G., Rajandream M.A., Sucgang R., Berriman M., et al.** 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43-57

Eissenberg L.G., Schlesinger P.H., and Goldman W.E. 1988. Phagosome-lysosome fusion in P388D1 macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. *J Leukoc. Biol.* **43**: 483-491

Erridge C., Moncayo-Nieto O., Morgan R., Young M., and Poxton I.R. 2007. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signaling. *J. Med. Microbiol.* **56**: 165-171

Escalante R., and Vicente J.J. 2000. *Dictyostelium discoideum*: a model system for differentiation and patterning. *Int. J. Dev. Biol.* **44**: 819-835

Fan J., Kapus A., Marsden P.A., Li Y.H., Oreopoulos G., Marshall J.C., Frantz S., Kelly R.A., Medzhitov R., and Rotstein O.D. 2002. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **168**: 5252-5259

Faure K., Sawa T., Ajayi T., Fujimoto J., Moriyama K., Shime N., and Wiener-Kronish J.P. 2004. TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins. *Resp. Research.* **5**

Favre-Bonte S., Joly B., and Forestier C. 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:554-561

Féréol S., Fodill R., Pelle G., Louis B., Isabey D. 2008. Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs). *Respir. Physiol. Neurobiol.* **163**: 3-16

Fernandez-Alles S., Albertí S., Alvarez D., Domenech-Sanchez A., Martínez-Martínez L., Gil J., Tomas J.M., and Benedi V.J. 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol.* **145**: 673-679

Fernandez-Mora E., Polidori M., Lührmann A., Schaible U.E., and Hass A. 2005. Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of early endosome stage. *Traffic* **6**: 635-653

Ferrari G., Langen H., Naito M., and Pieters J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *Mycobacteria*. *Cell* **97**: 435-447

Ferwerda G., Girardin S.E., Kullberg B.J., Le Bourhis L., de Jong D.J., Langerberg D.M., van Crevel R., Adema G.J., Ottenhoff T.H., Van der Meer J.W., Netea M.G. 2005. NOD2 and Toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **1**: 279-285

Figueroa J.E., and Densen P. 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 359-395

- Finlay B.B., and McFadden G.** 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* **124**: 767-782
- Flannagan R.S., Cosío G., and Grinstein S.** 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Rev.* **7**: 355-365
- Fresno, S., N. Jimenez, L. Izquierdo, S. Merino, M. M. Corsaro, C. C. De, M. Parrilli, T. Naldi, M. Regue, and J. M. Tomas.** 2006. The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiology.* **152**:1807-1818
- Fresno, S., N. Jimenez, R. Canals, S. Merino, M. M. Corsaro, R. Lanzetta, M. Parrilli, G. Pieretti, M. Regue, and J. M. Tomas.** 2007. A second galacturonic acid transferase is required for core lipopolysaccharide biosynthesis and complete capsule association with the cell surface in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **189**:1128-1137
- Frirdich, E., C. Bouwman, E. Vinogradov, and C. Whitfield.** 2005. The role of galacturonic acid in outer membrane stability in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **280**:27604-27612 114
- Frirdich, E., and C. Whitfield.** 2005. Characterization of Gla(KP), a UDPgalacturonic acid C4-epimerase from *Klebsiella pneumoniae* with extended substrate specificity. *J. Bacteriol.* **187**:4104-4115
- Froquet R., Cherix N., Burr S.E., Frey J., Vilches S., Tomas J.T., and Cosson P.** 2007. Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Applied and environmental Microbiol.* **73**: 5657.5659
- Frutuoso M.S., Hori J.I., Pereira M.S., Junior D.S., Sônego F., Kobayashi K.S., Flavell R.A., Cunha F.Q., Zamboni D.S.** 2010. The pattern recognition receptors Nod1 and Nod2 account for neutrophil recruitment to the lungs of mice infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.* **12(11)**: 819-827
- Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P.M., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J.J.M., and Desjardins M.** 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**: 119-131
- Ganz, T.** 2002. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J. Clin. Invest.* **109**:693-697
- Ganz, T.** 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:710-720
- García-del Portillo F., Núñez-Hernández C., Eisman B., and Ramos-Vivas J.** 2008. Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 46-52.

Garin J., Diez R., Kieffer S., Dermine J.F., Duclos S., Gagnon E., Sadoul R., Rondeau C., and Desjardins M. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* **152**: 165–180

Ghosh S., May M., and Kopp E.B. 1998. NF- κ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-260

Gibbons H.S., Lin S., Cotter R.J., and Raetz C.R. 2000. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymiristate moiety in *Salmonella Typhimurium* lipid A: function of LpxO, a new Fe²⁺- α -ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **275**: 32940-32949

Gibbons H.S., Kalb S.R., Cotter R.J., and Raetz C.R.H. 2005. Role of Mg²⁺ and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol. Microbiol.* **55**: 425-440

Gillooly D.J., Morrow I.C., Lindsay M., Gould R., Bryant N.J., Gaullier J.M., Oarton R.G., and Stenmark H. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* **19**: 4577-4588

Gillooly D.J., Simonsen A., and Stenmark. 2001. Phosphoinositides and phagocytosis. *The Journal of Cell Biol.* **155**:15-17

Girardin S.E., Tournebize R., Mavris M., Page A.L., Li X., Stark G.R., Bertin J., DiStefano P.S., Yaniv M., Sansonetti P.J., and Philpott D.J. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO rep.* **2**: 736-742

Girardin S.E., Sansonetti P.J., and Philpott D.J. 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens - common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* **10**: 193-199

Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., Tedin K., Taha M.K., Labigne A., Zahringer U., et al. 2003a. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* **300**: 1584-1587

Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., and Sansonetti P.J. 2003b. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**: 8869-8872

Girardin S.E., Travassos L.H., Hervé D., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., Sansonetti J., and Mengin-Lecreux D. 2003c. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* **278**: 41702-41708

Giufre M., Muscillo M., Spigaglia P., Cardines R., Mastrantonio P., and Cerquetti M. 2006. Conservation and diversity of HMW1 and HMW2 adhesin binding domains among invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Infect. Immun.* **74**:1161-1170

Goetz D.H., Holmes M.A., Borregaard N., Bluhm M., Raymond K.N., and Strong R.K. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell.* **10**: 1033- 1043

Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* **111**:927-930

Gordon S.B. and Read R.C. 2002. Macrophage defences against respiratory tract infections. *British Medical Bulletin.* **61**: 45-61

Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 23-35

Gorvel J.P., and Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* **90**: 281-297

Greenberger M.J., Kunkel S.L., Strieter R.M., Lukacs N.W., Bramson J., Gaudie J., Graham F.L., Hitt M., Danforth J.M., and Standiford T.J. 1996. IL-12 gene therapy protects mice in lethal *Klebsiella pneumoniae*. *J. Immunol.* **157**: 3006-3012

Griffiths G., Hoflack B., Simons K., Mellman I., and Kornfeld S. 1988. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**: 329-341

Gruenberg J., and Van der Goot F.G. 2006. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**: 495-504

Guillot L., Medjane S., Le Barillec K., Balloy V., Danel C., Chignard M., and Si-Tahar M. 2004. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J. Biol. Chem.* **279**: 2712–2718

Guo L., Lim K.B., Poduje C.M., Daniel M., Gunn J.S., Hackett M., and Miller S.I. 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell.* **95**: 189-198

Haas A. 2007. The phagosome: compartment with a License to kill. *Traffic* **8**: 311-330

Hajishengallis G., and Lambris J.D. 2011. Microbial manipulation of receptors crosstalk in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 187-200

Han J. and Ulevitch R.J. 2005. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat. Immunol.* **6(12)**: 1198-1205

Hanahan D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580

- Hancock R.E.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-422
- Hancock R.E., and Chapple D.S.** 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1317-1323
- Hancock R.E. and Scott M.G.** 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 8856-8861.
- Hansen, D. S., F. Mestre, S. Albertí, S. Hernández-Allés, D. Álvarez, A. Domenech-Sánchez, J. Gil, S. Merino, J. M. Tomás, and V. J. Benedí.** 1999. Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 56-62.
- Happel, K. I., M. Zheng, E. Young, L. J. Quinton, E. Lockhart, A. J. Ramsay, J. E. Shellito, J. R. Schurr, G. J. Bagby, S. Nelson, and J. K. Kolls.** 2003. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Immunol.* **170**:4432-4436
- Happel, K. I., P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, and J. K. Kolls.** 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* **202**:761-769
- Hari-Dass R., Shah C., Meyer D.J. and Raynes J.G.** 2005. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **280**: 18562-18567.
- Harrison R.E., Bucci C., Vieira O.V., Schoer T.A., and Grinstein S.** 2003. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol. Cell. Biol.* **23**(18): 6494-6506
- Harrison R.E., Brumell J.H., Khandani A., Bucci C., Scott C.C., Jiang X., Finlay B.B., and Grinstein S.** 2004. *Salmonella* impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3146-3154
- Hasegawa M., Yang K., Hashimoto M., Park J.H., Kim Y.G., Fujimoto Y., Nunez G., Fukase K., and Inohara N.** 2006. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J. Biol. Chem.* **281**: 29054-29063
- Hasegawa M., Fujimoto Y., Lucas P.C., Nakano H., Fucase K., Núñez G., and Inohara N.** 2008. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation. *The EMBO J.* **27**: 373-383
- Hass A.** 2007. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**: 311-330

- Hasselbring B.M., Patel M.K., and Schell M.A.** 2011. *Dictyostelium discoideum* as a model system for identification of *Burkholderia pseudomallei* virulence factors. *Infect. Immun.* **79**: 2079-2088
- Hayden M.S., and Ghosh S.** 2008. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**: 344-362
- Heinzen R.A., Scidmore M.A., Rockey D.D., and Hackstadt T.** 1996. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* **64**: 796-809
- Helander I.M., Kato Y., Kilpelainen I., Kostianen R., Lindner B., Nummila K., Sugiyama T., and Yokochi T.** 1996. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur. J. Biochem.* **237**:272-278
- Herskovits A.A., Auerbach V., and Portnoy D.A.** 2007. Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS Pathog.* **3**: e51
- Hervas, J. A., A. Alomar, F. Salva, J. Reina, and V. J. Benedi.** 1993. Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca, Spain, 1977-1991. *Clin. Infect. Dis.* **16**:719-724
- Hewlett L.J., Prescott A.R., and Watts C.** 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell Biol.* **124**: 689- 703
- Hippenstiel S., Opitz B., Schmeck B., and Suttorp N.** 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia-molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir. Res.* **8**:97
- Hisamatsu T., Suzuki M., Podolsky D.K.** 2003. Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 32962-32968.
- Hmama Z., Sendide K., Talal A., Garcia R., Dobos K., and Reiner N.E.** 2004. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Cell. Sci.* **117**: 2131-2140
- Hoffmann E., Dittrich-Breiholz O., Holtmann H., and Kracht M.** 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 847-855
- Hogasen AK., Wurzner R., Abrahamsen TG., and Dierich MP.** 1995. Human polymorphonuclear leukocytes store large amounts of terminal complement components C7 and C6, which may be released on stimulation. *J. Immunol.* **154**:4734-4740

Holden DW. 2002. Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* **3**:161-169

Holst O., and Brade H. 1992. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. Bacterial endotoxic lipopolysaccharides, Vol. I: molecular biochemistry and cellular biology, CRC Press, Boca Raton, Fla.

Hoshino, K., T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi, and S. Akira. 2002. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int. Immunol.* **14**:1225-1231

Huynh K.K., Plumb J., Downey G.P., Valvano M.A., and Grinstein S. 2010. Inactivation of Macrophage Rab7 by *Burkholderia cenocepacia*. *J. innate Immun.* **2**: 522-533

Hybiske K., and Stephens R. 2008. Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat. Rev.* **6**: 99-110

Imai, Y., Kuba, K., Neely, G.G., Yaghubian-malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Vedhuizen, R., Leung, Y.H., Wang, H., et al. 2008. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell.* **133**: 235-249

Inohara N., Ogura Y., Chen F.F., Muto A., and Nuñez G. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **276**: 2551-2554

Inohara N., and Nuñez G. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 371-382

Inohara, N., Chamillard, M., McDonald, C., and Nunez, G. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 355–383.

Izquierdo L., Abitio N., Coderch N., Hita B., Merino S., Gavin R., Tomás J.M., and Regué M. 2002. The inner-core lipopolysaccharide biosynthetic *waaE* gene: function and genetic distribution among some *Enterobacteriaceae*. *Microbiol.* **148**: 3485-3496

Izquierdo, L., N. Coderch, N. Pique, E. Bedini, M. M. Corsaro, S. Merino, S. Fresno, J. M. Tomas, and M. Regue. 2003. The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* **185**:7213-7221

Jacoby G.A., and Medeiros A.A. 1991. More extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **35**:1697-1704

Jang W., and Gomer R.H. 2011. Initial cell type choice in *Dictyostelium*. *Eukaryotic cell.* **10**: 150-155

- Jeannin P., Renno T., Goetsch L., Miconnet I., Aubry J.P., Delneste Y., Herbault N., Baussant T., Magistrelli G., Soulas C., Romero P., Cerottini J.-C. and Bonnefoy J.-Y.** 2000. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and antigen delivery into the MHC class I presentation pathway. *Nat. Immunol.* **1**:502-509
- Jeannin P., Magistrelli G., Goetsch L., Haeuw J-F., Thieblemont N., Bonnefoy J-Y., and Delneste Y.** 2002. Outer membrane protein A (OmpA) : a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine* **20**: A23-A27
- Jeannin P., Magistrelli G., Herbault N., Goetsch L., Godefroy S., Charbonnier P., Gonzalez A., and Delneste Y.** 2003. Outer membrane protein A renders dendritic cells and macrophages responsive to CCL21 and triggers dendritic cell migration to secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* **33**: 326-333
- Jeannin P., Bottazzi B., Sironi M., Doni A., Rusnati M., Presta M., Maina V., Magistrelli G., Haeuw J.E., Hoeffel G., Thieblemont N., Corvaia N., Garlanda C., Delneste Y., and Mantovani A.** 2005. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* **22**: 551-560
- Jenssen H., Hamill P., and Hancock R.E.** 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **19**: 491-511.
- Janeway C.A. and Medzhitov R.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216
- Ji W.T., and Liu H.J.** 2008. PI3K-Akt signaling and viral infection. *Recent Pat Biotechnol* **2**: 218-226
- Johnson G.L., and Lapadat R.** 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1012
- Jordens I., Fernandez-Borja M., Marsman M., Dusseljee S., Janssen L., Calafat J., Hanssen H., Wubbolts R., and Neefjes J.** 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* **11**: 1680-1685
- Jung D.O., Karam S.M., and Gordon J.I.** 2004. Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors. *PNAS* **102**: 5186-5191
- Junutula J.R., De Maziere A.M., Peden A.A., Ervin K.E., Advani R.J., van Dijk S.M., Klumperman J., and Scheller R.H.** 2004. Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 2218-2229

Kagan J.C. and Roy C.R. 2002. *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat. Cell Biol.* **12**: 945-954

Kalis C., Kanzler B., Lembo A., Poltorak A., Galanos C., and Freudenberg M.A. 2003. Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur. J. Immunol.* **33**: 798-805

Kanneganti T.D., Lamkanfi M., and Nunez G. 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **27**: 549-559

Kao, C. Y., Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, F. Huang, C. Kim, R. W. Harper, and R. Wu. 2004. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J. Immunol.* **173**:3482-3491

Kao, C. Y., F. Huang, Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, C. Kim, L. Tam, and R. Wu. 2005. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaBdependent signaling pathway. *J. Immunol.* **175**:6676-6685

Karaolis D.K., Newstead M.W., Zeng X., Hyodo M., Hayakawa Y., Bhan U., Liang H., and Standiford T.J. 2007. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **75**:4942-4950

Kawai T., Adachi O.T., Ogawa T., Takeda K., and Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**:115-122

Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88- independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* **167**:5887-5894

Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin. Immunol.* **19**:24-32

Kenny E.F., and O'Neill L.A. 2008. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: An update. *Cytokine.* **43**: 342-349

Kim K.J. and Elliott S.J. 2003. The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhanced intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell. Microbiol.* **5**: 245-252

Kim J.G., Lee S.J., and Kagnoff M.F. 2004. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect. Immun.* **72**: 1487-1495

Kim D.W., Lenzen G., Page A.L., Legrain P., Sansonetti P.J., and Parsot C. 2005. The *Shigella flexneri* effector OspG interfere with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 14046-14051

- Kleinschmidt JH.** 2003. Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 1547-1558.
- Klemm P., and Schembri M.A.** 2000. Bacterial adhesions: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 27-35
- Kloos, W. E., and M. S. Musselwhite.** 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* **30**:381-395
- Knapp S., Wieland C.W., Florquin S., Pantophlet R., Dijkshoorn L., Tshimbalanga N., Akira S., and van der Poll T.** 2006. Differential roles of CD14 and Toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**: 122-129
- Kobayashi T., Stang E., Fang K.S., de Moerloose P., Parton R.G., and Gruenberg J.** 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**: 193-197
- Kobayashi K.S., Chamailard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nunez G., and Flavell R.A.** 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptative immunity in the intestinal tract. *Science.* **307**: 731-734
- Kostina, E., I. Ofek, E. Crouch, R. Friedman, L. Sirota, G. Klinger, H. Sahly, and Y. Keisari.** 2005. Noncapsulated *Klebsiella pneumoniae* bearing mannose-containing O antigens is rapidly eradicated from mouse lung and triggers cytokine production by macrophages following opsonization with surfactant protein D. *Infect. Immun.* **73**:8282-8290
- Kumar H., Kawai T., and Akira S.** 2009. Pathogen recognition in the immune response. *Biochem. J.* **420**: 1-16
- Kumar Y. and Valdivia R.H.** 2009. Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe* **5**: 593-601.
- Kuroki Y., Takahashi M., and Nishitani C.** 2007. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell. Microbiol.* **9**:1871-1879
- Kurt-Jones E.A., Popova L., Kwinn L., Haynes L.M., Jones L.P., Tripp R.A., Walsh E.E., Freeman M.W., Golenbock D.T., Anderson L.J., and Finberg R.W.** 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1**: 398-401
- Kyei G., Vergne I., Chua J., Roberts E., Harris J., Junutula J., and Deretic V.** 2006. Rab14 is critical for maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *EMBO J.* **25**: 5250-5259
- Labbé K., and Saleh M.** 2008. Cell death in the host response to infection. *Cell death differ* **15**: 1339-1349

La Force F.M. 1985. Community-acquired lower respiratory tract infections. Prevention and cost-control strategies. *Am. J. Med.* **78**:52-57

Lafont F., and van der Goot F.G. 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell. Microbiol.* **7**: 613-620

Lambotin M., Hoffmann I., Laran-Chich M.P., Nassif X., Couraud P.O., and Bourdoulous S. 2005. Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *J. Cell Sci.* **118**: 3805-3816.

Lamkanfi M., and Dixit V.M. 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microb.* **8**: 44-54

Lamkanfi M., and Dixit V.M. 2011. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J. Immunol.* **187**: 597-602

Lawlor M.S., Hsu J., Rick P.D., and Miller V.L. 2005. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol. Microbiol.* **58**:1054-1073

Lawlor M.S., Handley S.A., and Miller V.L. 2006. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infect. Immun.* **74**: 5402-5407

Lawlor M.S., O'Connor C. and Miller V. 2007. Yersiniabactin is a virulent factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Inf. Immun.* **75**: 1463-1472

Lee J.S., Frevert C.W., Matute-Bello G., Wurfel M.M., Wong V.A., Lin S., Ruzinski J., Mongovin S. Goodman R.B., and Martin T.R. 2005. TLR-4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in *E. coli* pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **289**: L731-L738

Lee J., Tattoli L., Wojtal K.A., Vavricka S.R., Philpott D.J., and Girardin S.E. 2009. Ph-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J. Biol. Chem.* **284**: 23818-23829

Lelong E., Marchetti A., Guého A., Lima W.C., Sattler N., Molmeret M., Hagedorn M., Soldati M., and Cosson P. 2011. Role of magnesium and a phagosomal P-type ATPase in intracellular bacterial killing. *Cell microbial.* **13**: 246-258

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J., and Hoffman J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **86**: 973-983

Lin J., Huang S., and Zhang Q. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect.* **4**: 325-331

- Liu Y., Shepherd E.G., and Nelin L.D.** 2007. MAPK phosphatases-regulating the immune response. *Nature reviews*. **7**:202-212
- Livak K.J., and Schmittgen T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *METHODS* **25**: 402-408
- Llobet E., Tomás J.M., and Bengoechea J.A.** 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**: 3877-3886
- Llobet E., March C., Giménez P., and Bengoechea J.B.** 2009. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. **53**: 298-302
- Llobet E., Campos M.A., Jiménez P., Moranta D., and Bengoechea J.A.** 2011. Análisis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect. Immune*. **79**: 3718-3732
- Ludwig T., Munier-Lehmann H., Bauer U., Hollinshead M., Ovitt C., Lobel P., and Hoflack B.** 1994. Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose-6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J.* **13**: 3430-3437
- Lukacs G.L., Rotstein O.D., and Gristein S.** 1990. Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H-ATPase in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **265(34)**: 21099-21107
- Luster A.D., Alon R., and von Andrian U.H.** 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunol.* **6**: 1182-1190
- Manoil C., and Beckwith J.** 1985. Tn ϕ oA: A transposon for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8129-8133
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., and Locati M.** 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**: 677-686
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., and Schelifer K.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- Mañes S., del Real G., and Martínez A.** 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**: 557-568
- Marina-Garcia N., Franchi L., Kim Y.G., Hu Y., Smith D.E., Boons G.J., and Nuñez G.** 2009. Clathrin-and dynamin-dependent endocytic pathways regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J. Immunol.* **182**: 4321-4327

Maroncle N., Balestrino D., Rich C., and Forestier C. 2002. Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* **70**:4729-4734

March C., Moranta D., Regueiro V., Llobet E., Tomás A., Garmendia J., and Bengoechea J.A. 2011. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cell. *J. Biol. Chem.* **12**: 9956-9967

Martinon F., Tschopp J. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* **26**: 447-454

Mason R.J. 2006. Biology of alveolar type II cells. *Respirology.* **11**: S12-S15

Masumoto, J., Yang, K., Varambally, S., Hasegawa, M., Tomlins, S.A., Qiu, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Foster, S.J., Horie, Y., et al. 2006. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment *in vivo*. *J. Exp. Med.* **203**: 203–213.

Maurin M., Benoliel A.M., Bongrand P., and Raoult D. 1992. Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect. Immun.* **60**:5013–5016

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., and Janeway C.A. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**: 394-397

Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**: 819-826

Méresse S., Steele-Mortimer O., Finlay BB., and Gorvel JP. 1999. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J.* **18**: 4394-4403

Merino S., Camprubí S., Albertí S., Benedí V.J., and Tomás J.M. 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* **60**: 2529–2535.

Miller W.G., Leveau J.H., and Lindow S.E. 2000. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 1243-1250

Miller S.I., Ernst R.K., and Bader M.W. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 36-46

Mizgerd J.P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* **358**: 716-727

Mizushima N., Yoshimori T., and Levine B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**: 313-326

- Mizuta K., Ohta M., Mori M., Hasegawa T., Nakashima I., and Kato N.** 1983. virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect. Immun.* **40**: 56-61
- Mogensen T.H.** 2009. Pathogen recognition and inflammatory signalling in innate immune defenses. *Clin Microbiol. Rev.* **22**: 240-273
- Monick M.M., Yarovinsky T.O., Powers L.S., Butler N.S., Carter A.B., Gudmundsson G., and Hunninghake G.W.** 2003. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J. Biol. Chem.* **278**: 53035-53044
- Moore K.W., Malefyt R. de W., Coffman R.L., and O'Garra A.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 683-765
- Moranta D., Regueiro V., March C., Llobet E., Margareto J., Larrate E., Garmendia J. and Bengoechea J.A.** 2010. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of β -defensins by airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**:1135-1146
- Morona R., Klose M. and Henning U.** 1984. Escherichia coli K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *J. Bacteriol.* **159**: 570-578.
- Mosser D.M., and Edwards J.P.** 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 958-969
- Munford R.S., and Varley A.W.** 2006. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. *Plos Path.* **2**: 0467-0471
- Munier-Lehmann H., Mauxion F., Bauer U., Lobel P., and Hoflack B.** 1996. Re-expression of the mannose-6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the mannose-6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **271**: 15166-15174
- Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't V.C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., and Mantovani A.** 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:5998-6004
- Nakamura N., Rabouille C., Watson R., Nilsson T., Hui N., Slusarewicz P., Kreis T.E., and Warre G.** 1995. Characterization of a *cis*-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* **131**: 1715-1726
- Nathan, C.** 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* **420**:846-852

Nassif X., Fournier J.M., Arondel J., and Sansonetti P.J. 1989. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**:546-552

Natarajan K., Sinhg S., Burke T.R., Jr., Grunberger D., and Aggarwal B.B. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NFkB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9090-9095

Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H., and Schleifer K.H. 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4329-4339.

Nelson A.L., Barasch J.M., Bunte R.M., and Weiser J.N. 2005. Bacterial colonization of nasal mucosa induces expression of siderocalin, an iron-sequestering component of innate immunity. *Cell. Microbiol.* **7**: 1404-1417

Nicolas P., and Mor A. 1995. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:277-304

Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:593-656

Nizet, V. 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**:11-26

Oelschlaeger T.A., and Tall B.D. 1997. Invasion of cultured epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect. and Immun.* **65**: 2950-2958

Ofek I., Mesika A., Kalina M., Keisari Y., Podschun R., Sahly H., Chang D., McGregor D., and Crouch E. 2001. Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**:24-33

Oh Y.K., Alpuche-Aranda C., Berthiaume E., Jinks T., Miller S.I., and Swanson J.A. 1996. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**: 3877-3883

Okamoto S., Kawabata S., Terao Y., Fujitaka H., Okuno Y., and Hamada S. 2004. The *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacterial-viral superinfection. *Infect. Immun.* **72**: 6068-6075

Opitz B., Puschel A., Schmeck B., Hocke A.C., Rosseau S., Hammerschmidt S., Schumann R.R., Suttorp N., and Hippenstiel S. 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **279**: 36426-36432

- Orvedahl A. and Levine B.** 2009. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ.* **16**: 57-69
- Ørskov, I., and Ørskov F.** 1984. Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol.* **14**:143–164.
- Padilla E., Llobet E., Doménech-Sánchez A., Martínez-Martínez L., Bengoechea J.A., and Albertí S.** 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAb efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 177-183
- Pan Y-J., Lin T-L., Hsu C-R., and Wang J-T.** 2011. Use of a *Dictyostelium* model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **79**: 997-1006
- Park J-H., Kim Y-G., McDonald C., Kanneganti T-D., Hasegawa M., Body-Malapel M., Inohara N., and Núñez G.** 2007. RICK/RIP2 mediates innate responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J. Immunol.* **178**: 2380-2386
- Pearson G., Robinson F., Beers G.T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., and Cobb M.H.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**:153-183
- Pérez-Gutiérrez C., Llobet E., Llompart C.M., Reinés M., and Bengoechea J.A.** 2010. Role of lipid A acylation in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect. Immun.* **78**: 2768-2781
- Philippon A., Jarlier V., Legrand P., Fournier G., Nicolas M.H., and Duval J.** 1989. [Antibacterial effect of cefixime in the presence of the type of beta-lactamases produced by Enterobacteriaceae]. *Presse. Med.* **18**:1560-1566
- Pizarro-Cerdá J., Moreno E., Sanguedolce V., Mege J.L., and Gorvel J.P.** 1998. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.* **66**: 2387-2392
- Podschun R., and Ullmann U.** 1992. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol.* **36**:250-254
- Podschun R., Penner I., and Ullmann U.** 1992a. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb. Pathog.* **13**:371-379
- Podschun R., Fisher A., and Ullmann U.** 1992b. Siderophor production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentbl. Bakteriol.* **276**: 381-486

- Podschun R., Sievers D., Fischer A., and Ullmann U.** 1993. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J. Infect. Dis.* **168**:1415-1421
- Podschun R., and Ullmann U.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogen: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589-603
- Portnoy D.A.** 2005. Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 25-28
- Power M.R., Peng Y., Maydanski E., Marshall J.S., and Lin T.J.** 2004. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *J. Biol. Chem.* **279**:49315-49322
- Prasadarao N.V., Wass C.A., Weiser J.N., Stins M.F., Huang S.H., and Kim K.S.** 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **64**: 146-160
- Prince S.E., Dominger K.A., Cunha B.A., and Klein N.C.** 1997. *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Heart. Lung.* **26**:413-417
- Racoosin E.L., and Swanson J.A.** 1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* **121**: 1011-1020
- Raetz, C.R., and Whitfield C.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:635-700
- Raetz C.R., Reynolds C.M., Trent M.S., and Bishop R.E.** 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 295-329
- Rathman M., Sjaastad M.D., and Falkow S.** 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect. Immun.* **64**: 2765-2773
- Ratner A.J., Aguilar J.I., Shchepetov M., Lysenko E.S., and Weiser J.N.** 2007. Nod1 mediates cytoplasmic sensing of combinations of extracellular bacteria. *Cell Microbiol.* **9**: 1343-1351
- Ray K., Marteyn B., Sansonetti P.J., and Tang C.M.** 2009. Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 333-340
- Regué M., Climent N., Abitiu N., Coderch N., Merino S., Izquierdo L., Altarriba M., and Tomas J. M.** 2001. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**:3564-3573

Regué M., Hita B., Pique N., Izquierdo L., Merino S., Fresno S., Benedi V.J., and Tomas J.M. 2004. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* **72**:54-61

Regué M., Izquierdo L., Fresno S., Piqué N., Corsaro M.M., Naldi T., De Castro C., Waidelich D., Merino S., and Tomas J.M. 2005. A second outer-core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **187**:4198- 4206

Regueiro V., Campos M.A., Pons J., Albertí S., and Bengoechea J.A. 2006. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology* **152**: 555-566

Regueiro V., Moranta D., Campos M.A., Margareto J., Garmendia J., and Bengoechea J.A. 2009. *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of tll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect. and Immun.* **77**: 714-724.

Regueiro V., Moranta D., Frank C.G., Larrarte E., Margareto J., March C., Garmendia J., and Bengoechea J.A. 2011. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD-1-dependent manner. *Cell. Microbiol.* **13**: 135-153

Rogan M.P., Geraghty P., Greene C.M., O'Neill S.J., Taggart C.C., and McElvaney N.G. 2006. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir. Res.* **7**:29

Rosenberger C.M., Brumell J.H., and Finlay B.B. 2000. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Current Biology* **10**: R823-R825

Rosenthal S., and Tager I.B. 1975. Prevalence of gram negative rods in the normal pharyngeal flora. *Ann. Intern. Med.* **83**:355-357

Rosentiel P., Fantini M., Brautigam K., Huhbacher T., Waetzig G.H., Seegert E., Schreiber S. 2003. TNF-alfa and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* **124**: 1001-1009

Rosqvist R., Forsberg A., Rimpiläinen M., Bergman T., and Wolf-Watz H. 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defense. *Mol Microbiol.* **4**: 657-667

Rothman B.L., Despins A.W., and Kreutzer D.L. 1990. Cytokine regulation of C3 and C5 production by the human type II pneumocyte cell line, A549. *J. Immunol.* **145**:592-598

Roy C.R., and Mocarski E.S. 2007. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat. Immunol.* **8**: 1179-1187

Rubovitch V., Gershnel S., and Kalina M. 2007. Lung epithelial cells modulate the inflammatory response of alveolar macrophages. *Inflammation*. **30**: 236-243

Russel D.G. 1995. *Mycobacterium* and *Leishmania*: Stowaways in the endosomal network. *Trends Cell. Biol.* **5**:125-128

Russel D.G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 569-577

Sabbah A., Chang T.H., Harnack R., Frohlich V., Tominaga K., Dube P.H., Xiang Y., and Bose S. 2009. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat. Immunol.* **10**: 1073-1080

Sadowski P.L., Peterson B.C., Gerding D.N., and Cleary P.P. 1979. Physical characterization of ten R plasmids obtained from an outbreak of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **15**:616-624

Saftig P. and Klumperman J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**: 623-635

Sahly H., Podschun R. 1997. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**: 393-399

Sahly H., Podschun R., Oelschlaeger T.A., Greiwe M., Parolis H., Hasty D., Kekow J., Ullman U., Ofek I., and Sela S. 2000. Capsule impedes adhesion and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 6744-7649

Sahly H., Keisari Y., Crouch E., Sharon N., and Ofek I. 2008. Recognition of bacterial surface polysaccharides by lectins of the innate immune system and its contribution to defense against infection: the case of pulmonary pathogens. *Infect. Immun.* **76**:1322-1332

Salcedo S.P. and Holden, D.W. 2005. Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 92-98

Sato K., Tomioka H., Shimizu T., Gonda T. Ota F., and Sano C. 2002. Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary Mycobacterial Infections by producing proinflammatory cytokines. *J. Infect. Dis.* **185**: 1139-1147

Scaffidi P., Misteli T., and Bianchi M.E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**: 191-195

Schaberg, D.R., Weinstein R.A., and Stamm W.E. 1976. Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant Gram negative bacilli: epidemiology and control. *J. Infect. Dis.* **133**:363-366

- Schroll C., Barken K.B., Krogfelt K.A., and Struve C.** 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* **10**: 179
- Schurr J.R., Young E., Byrne P., Steele C., Shellito J.E., and Kolls J.K.** 2005. Central role of toll-like receptor 4 signalling and host defense in experimental pneumoniae caused by gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **73**: 532-545
- Selsted M.E., and Ouellette A.J.** 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* **6**:551-557
- Selvaraj S.K. and Prasadarao N.V.** 2005. Escherichia coli K-1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF-KappaB activation. *J. Leukoc. Biol.* **78**: 544-554
- Serhan C.N., and Savill J.** 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**:1191-1197
- Shah C., Hari-Dass R., and Raynes J.C.** 2006. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood.* **108**: 1751-1757.
- Shankar-Sinha S., Valencia G.A., Janes B.K., Rosenberg J.K., Whitfield C., Bender R.A., Standiford T.J., and Younger J. G.** 2004. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect. Immun.* **72**:1423-1430
- Shaughnessy L.M., Hoppe A.D., Christensen K.A., and Swason J.A.** 2006. Membrane perforations inhibit lysosomes fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. **8**: 781-792
- Shi Y., Evans J.E., and Rock K.L.** 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**: 516-521
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto.** 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**:1777-1782
- Skaug B., Jiang X., and Chen Z.J.** 2009. The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 769-796
- Somsel R.J., and Wandinger-Ness A.** 2000. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* **113**:183–192.
- Spinosa M.R., Progida C., Talà A., Cogli L., Alifano P., and Bucci C.** 2007. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect. Immun.* **75**: 3594-3603
- Standiford T.J., Wilkowski J.M., Sisson T.H., Hattori N., Mehrad B., Bucknell K.A., and Moore T.A.** 1999. Intrapulmonary tumor necrosis factor

gene therapy increases bacterial clearance and survival in murine gram-negative pneumonia. *Hum. Gene Ther.* **10**: 899-909

Strasser J.E., Newman S.L., Ciruolo G.M., Morris R.E., Howel M.L., and Dean G.E. 1999. Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* **162**: 6148-6154

Strmecki L., Greene D.M., and Pears C.J. 2005. Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Develop. Biol.* **284**: 25-36

Strober W., Murray P.J., Kitani A., and Watanabe T. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 9-20

Strunk R.C., Eidlen D.M., and Mason R.J. 1988. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J. Clin. Invest.* **81**: 1419-1426.

Struve C., Forestier C., and Krogfelt K.A. 2003. Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. *Microbiology.* **149**:167-176

Struve C., Bojer M., and Krogfelt K.A. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect. Immun.* **76**: 4055-4065

Struve C., Bojer M., and Krogfelt K.A. 2009. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect. Immun.* **77**: 5016-5024

Sturgill-Zoszycki S., and Swanson M.S. 2000. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* **192**: 1261-1272

Sturgill-Zoszycki S., Schlesinger P.H., Chakraborty P., Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K., Allen R.D., Gluck S.L., Heuser J., and Russel D.G. 1994. Lack of acidification in *Micobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**: 678-681

Sukumaran S.K., Shimada H. and Prasadarao N.V. 2003. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K-1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect. Immun.* **71**: 5951-5961.

Sun J., Deghmane A.E., Soualhine H., Hong T., Bucci C., Solodkin A., and Hmama Z. 2007. *Mycobacterium bovis* BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. *J. Leukoc. Biol.* **82**: 1437-1445

Sussman, M. 1966. In *Methods in Cell Physiology*. vol. 2, p. 397. Ed. by Prescott, D. New York: Academic Press Inc.

Takabayshi K., Corr M., Hayashi T., Redecke V., Beck L., Guiney D., Sheppard D. and Raz E. 2006. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*. **24**: 475-487

Takeda K. and Akira S. 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell. Microbiol.* **5**: 143-153

Takeda K. and Akira S. 2005. Toll-receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**: 1-14

Takeuchi O. and Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**: 805- 820

Tarkkanen A.M., Allen B.L., Westernlund B., Holthofer H., Kuusela P., Risteli L., Clegg S., Korhonen T.K. 1990. Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol. Microbiol.* **4**: 1353-1361

Timko, J. 2004. Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella* spp. *J. Infect. Chemother.* **10**:212-215

Toshchakov V., Jones B.W., Perera P.Y., Thomas K., Cody M.J., Zhang S., Williams B.R., Major J., Hamilton T.A., Fenton M.J., and Vogel S.N. 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* **3**:392-398

Travassos L.H., Carneiro L.A., Girardin S.E., Boneca I.G., Lemos R., Bozza M.T., Domingues R.C., Coyle A.J., Bertin J., Philpott D.J., Plotkowski M.C. 2005. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**: 36714-36718

Trinchieri G., and Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:179-190

Tsai, W. C., R. M. Strieter, J. M. Wilkowski, K. A. Bucknell, M. D. Burdick, S. A. Lira, and T. J. Standiford. 1998. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J. Immunol.* **161**:2435-2440

Tsay R., Siu L.K., Fung C.P., and Chang F.Y. 2002. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch. Intern. Med.* **162**: 1021-1027

Tsutsumi-Ishii Y. and Nagaoka I. 2003. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide- stimulated

mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* **170**: 4226-4236

Ukkonen P., Lewis V., Marsh M., Helenius A., and Mellman I. 1986. Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes. *J. Exp. Med.* **163**: 952-971

Underhill D.M., and Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 825-852

Valdivia R.H. and Falkow S. 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: Rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol.* **22**: 367-378.

Vergne I., Chua J., Lee H.H., Lucas M., Belisle J., and Deretic V. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **102**: 4033-4038

Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., Memet S., Huerre M.R., Coyle A.J., DiStefano P.S., Sansonetti P.J., Labigne A., Bertin J., Philpott D.J., Ferrero R.L. 2004. Nod I response to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**: 1166-1174

Vieira O.V., Botelho R.J., and Grinstein S. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* **366**: 689-704

Vinogradov, E., and M. B. Perry. 2001. Structural analysis of the core region of the lipopolysaccharides from eight serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr. Res.* **335**:291-296

Vinogradov E., Frirdich E., Maclean L.L., Perry M.B., Petersen B.O., Duus J.O., and Whitfield C. 2002. Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J. Biol. Chem.* **277**:25070-25081

Virji M., Kayhty H., Ferguson D.J., Alexandrescu C., and Moxon E.R. 1991. Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb.Pathog.* **10**: 231-245

Vogel J., and Papenfort K. 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 605-611

Wandersmann C., and Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 611-647

Wang X., and Proud C.G. 2011. mTORC1 signaling: what we still don't know. *J. Mol. Cell Biol.* **3**: 206-220

- Warren S., Mao D.P., Rodriguez A.E., Miao E.A., Aderem A.** 2008. Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during *Listeria monocytogenes* infection. *The J. of Immunol.* **180**: 7558-7564
- Watford W.T., Ghio A.J., and Wright J.R.** 2000. Complement-mediated host defense in the lung. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **279**:L790-L798.
- Watson R.O. and Galán J.E.** 2008. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog* **4**: e14.
- Weiser J.N. and Gotschlich E.C.** 1991. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* **59**: 2252-2258.
- Westphal O., and Jann K.** 1963. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.* **5**:83-91
- Wickner W. and Schekman R.** 2008. Membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 658-664
- Wieland C.W., van Lieshout M.H.P., Hoogendijk A.J., and van der Poll T.** 2011. Host defense during *klebsiella pneumoniae* relies on haematopoietic-expressed toll-like receptors 4 and 2. *Eur. Respir. J.* **37**: 848-857
- William R. Berrington, Ravilyer, Richard D. Wells, Kelly D. Smith, Shawn J. Skerrett, Thomas R. Hawn.** 2010. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *European J. of Immunol.* **40**: 3519-3527
- Williams P., and Tomás J.M.** 1990. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* **1**: 196-204.
- Willingham S.B., Allen I.C., Bergstralh D.T., Brickey W.J., Huang M.T-H., Taxman D.J., Ducan J.A., and Ting J.P-Y.** 2011. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* **183**: 2008-2015
- Wolf K., and Hackstadt T.** 2001. Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell. Microbiol.* **3**: 145-152
- Wu H., Kuzmenko A., Wan S., Schaffer L., Weiss A., Fisher J. H., Kim K.S., and McCormack F.X.** 2003. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram negative bacteria by increasing membrane permeability. *J. Clin. Invest.* **111**:1589-1602
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., and Akira S.** 2003a. Role

of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. **301**:640-643

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K., and Akira S. 2003b. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**:1144-1150

Ye P., Garvey P.B., Zhang P., Nelson S., Bagby G., Summer W.R., Schwarzenberger P., Shellito J.E., and Kolls J.K. 2001a. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **25**: 335-340

Ye P., Rodriguez F.H., Kanaly S., Stocking K.L., Schurr J., Schwarzenberger P., Oliver P., Huang W., Zhang P., Zhang J., Shellito J.E., Bagby G.J., Nelson S., Charrier K., Peschon J.J., and Kolls J.K. 2001b. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **194**:519-527

Yoshida K., Matsumoto T., Takeda K., Uchida K., Tsujimoto S., and Yamaguchi K. 2001. Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. *J. Med. Microbiol.* **50**: 456-461

Yoshida S., and Sasakawa C. 2003. Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol.* **11**: 139-143.

Zerial M., and McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:107–117.

Zeng X., Moore A., Newstead M.W., Deng J.C., Kunkel S.L., Luster A.D., and Standiford T.J. 2005. Interferon-inducible protein 10, but not monokine induced by gamma interferon, promotes protective type 1 immunity in murine *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect. Immun.* **73**: 8226-8236

Zhang P., Summer W.R., Bagby G.J., and Nelson S. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol. Rev.* **173**: 39-51

Zheng P-Y., and Jones N.L. 2003. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosomes maturation in macrophages by recruitment and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol.* **5**: 25-40

Zilbauer M., Dorell N., Elmi A., Lindley K.J., Schuller S., Jones H.E., Klein N.J., Nunez G., Wren B. W., and Bajaj-Elliott M. 2007. A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol.* **9**: 2404-2416

ANEXOS

Anexo I: Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Kp52145	Aislado clínico; serotipo O1:K2; Rif ^r	Nassif <i>et al.</i> , 1989 Cortés <i>et al.</i> , 2002b
52145- Δwca_{k2}	Mutante de Kp52145 en el gen <i>manC</i> del grupo gencio <i>wca</i> . No expresa CPS. Rif ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2008
52OmpA2	Mutante por inserción en el gen <i>ompA</i> de la cepa Kp52145. No expresa OmpA. Rif ^r , Cm ^r	Este trabajo
52145- Δwca_{k2} OmpA	Mutante por inserción en el gen <i>ompA</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . No expresa ni CPS ni OmpA. Rif ^r , Cm ^r	Este trabajo
52OmpK36	Mutante por inserción en el gen <i>ompK36</i> de la cepa Kp52145. No expresa OmpK36. Cm ^r	Este trabajo
52145- Δwca_{k2} OmpK36	Mutante por inserción en el gen <i>ompK36</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . No expresa ni CPS ni OmpK36. Rif ^r , Cm ^r	Este trabajo
52OmpA2com	Complementación del gen <i>ompA</i> en la cepa 52OmpA2. Expresión de la proteína OmpA. Rif ^r , Cm ^r , Km ^r	Este trabajo
52145- Δwca_{k2} OmpAcom	Complementación del gen <i>OmpA</i> en la cepa 52145- Δwca_{k2} OmpA. Expresión de la proteína OmpA. Rif ^r , Cm ^r , Km ^r	Este trabajo
52OmpK36com	Complementación del gen <i>ompK36</i> en la cepa 52OmpK36. Expresión de la proteína OmpK36. Cm ^r , Km ^r	Este trabajo
52145- Δwca_{k2} OmpK36com	Complementación del gen <i>ompK36</i> en 52145- Δwca_{k2} OmpK36. Expresión de la proteína OmpK36. Cm ^r , Km ^r	Este trabajo
52O21	Mutación en el gen <i>wbbM</i> del mutante espontáneo a la Rif (Kp52145). No expresa antígeno O. Rif ^r , Km ^r	Cortés <i>et al.</i> , 2002b
52145- $\Delta wabM$	Mutante por delección en el gen <i>wabM</i> de la cepa Kp52145. Rif ^r	Regué <i>et al.</i> , 2005
52145- $\Delta wabK$	Mutante por delección en el gen <i>wabK</i> de la cepa Kp52145. Rif ^r	Regué <i>et al.</i> , 2005
52145- $\Delta wabH$	Mutante por delección en el gen <i>wabH</i> de la cepa Kp52145. Rif ^r	Regué <i>et al.</i> , 2005
52145- $\Delta wca_{k2}\Delta waaL$	Mutante por delección en el gen <i>waaL</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r	Dr. Juan Tomás
52145- $\Delta wca_{k2}\Delta waaM$	Mutante por delección en el gen <i>waaK</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r	Dr. Juan Tomás
52145- $\Delta wca_{k2}:\Delta waaK$	Mutante por delección en el gen <i>waaK</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r	Dr. Juan Tomás

52145-$\Delta wca_{k2}\Delta waaH$	Mutante por delección en el gen <i>waaH</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r	Dr. Juan Tomás
52-$\Delta pagPGB$	Mutante por delección en el gen <i>pagPGB</i> de la cepa Kp52145. Rif ^r , Km ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52-$\Delta pmrF$	Mutante por delección en el gen <i>pmrF</i> de la cepa Kp52145. Rif ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52-$\Delta pagPGB-\Delta pmrF$	Mutante por delección en el gen <i>pmrF</i> de la cepa 52- $\Delta pagPGB$. Rif ^r , Km ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52-$\Delta lpxO$	Mutante de Kp52145 en el gen <i>lpxO</i> por doble recombinación. Rif ^r	Dra. Anna Tomás
52-$\Delta lpxOcom$	Complementación del gen <i>lpxO</i> en la cepa 52- $\Delta lpxO$. Rif ^r , Km ^r	Dr. Enrique Llobet
52145-$\Delta wca_{k2}-\Delta pagPGB$	Mutante en el gen <i>pagPGB</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r , Km ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52145-$\Delta wca_{k2}-\Delta pmrF$	Mutante en el gen <i>pmrF</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r , Km ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52145-$\Delta wca_{k2}\Delta pagPGB-\Delta pmrF$	Mutante en el gen <i>pmrF</i> de la cepa 52145- $\Delta wca_{k2}\Delta pagPGB$. Km ^r	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52145-$\Delta wca_{k2}-\Delta lpxO$	Mutante en el gen <i>lpxO</i> de la cepa 52145- Δwca_{k2} . Rif ^r	Dr. Enrique Llobet
52145-$\Delta wca_{k2}-\Delta lpxOcom$	Complementación del gen <i>lpxO</i> en la cepa 52145- $\Delta wca_{k2}-\Delta lpxO$. Rif ^r , Km ^r	Dr. Enrique Llobet
Kp43816	Mutante espontáneo resistente a la Rif de la cepa ATCC 43816; serotipo O1:K2; Rif ^r	Este trabajo
43816/pFPV25.1Cm	Expresión constitutiva de GFP en la cepa Kp43816 por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm. Rif ^r , Cm ^r	Este trabajo
43816/pPROBE'<i>gfp</i> (LVA)	Cepa Kp43816 conteniendo el plásmido pPROBE' <i>gfp</i> (LVA) sin ningún promotor	Este trabajo
43816Procps::<i>GFP</i>	Fusión transcripcional de Procps43 con el gen indicador <i>gfp</i> para el estudio de la expresión de CPS. Rif ^r , Km ^r	Este trabajo
43$\Delta manC$	Mutante en el gen <i>manC</i> de la cepa Kp43816 usando el vector pKOBEG-sacB. No expresa CPS. Rif ^r , Km ^r	Este trabajo
43816IntOrf3cps	Mutante en el Orf3 del operón de cápsula de la cepa Kp43816. No expresa CPS. Rif ^r , Km ^r	Este trabajo
43816Orf6inv	Mutante en el Orf6 del operón de cápsula de la cepa Kp43816. Interrumpido por PCR inversa. No expresa CPS. Rif ^r , Km ^r	Este trabajo
43$\Delta manC$/pFPV25.1Cm	43 $\Delta manC$ Km. Electroporación del plásmido pFPV25.1Cm. Expresión constitutiva de GFP; Rif ^r , Km ^r , Cm ^r	Este trabajo
52145 /pFPV25.1Cm	Expresión de GFP en la cepa Kp52145 por	Este trabajo

	electroporación del plásmido pFPV25.1Cm. Cm ^r	
52021/pFPV25.1Cm	Expresión de GFP en la cepa 52021 por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm	Este trabajo
52145-ΔwabM /pFPV25.1Cm	Expresión GFP en la cepa 52145-ΔwabM por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm	Este trabajo
52145-ΔwabK /pFPV25.1Cm	Expresión GFP en la cepa 52145-ΔwabK por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm	Este trabajo
52145-ΔwabH /pFPV25.1Cm	Expresión GFP en la cepa 52145-ΔwabH por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm	Este trabajo
52145-Δwca_{k2} /pFPV25.1Cm	Expresión GFP en la cepa 52145-Δwca _{k2} por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm	Este trabajo
Kp43816 /pFPV25.1Cm	Expresión GFP en la cepa Kp43816 por electroporación del plásmido pFPV25.1Cm	Este trabajo
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Cepa utilizada para crecer la ameba <i>Dictyostelium discoideum</i>	Dr. Teresa Suárez (CIB)

Yersinia enterocolitica

YeO8c/pMMB207mCherry	Cepa de <i>Y. enterocolitica</i> 8081 sin plásmido de virulencia conteniendo un plásmido que permite la visualización de la bacteria por microscopía	Este trabajo
-----------------------------	--	--------------

Escherichia coli

C600	<i>thi thr leuB tonA lacY supE</i>	Appleyard, 1954
CC118 λpir	Δ(<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE(Am)</i> , <i>recA1</i> , λpir phage lysogen	Mandil and Beckwith 1985
DH5α	F' <i>endA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 thi¹ recA1 gyrA (Nal^r) relA Δ(lacIZYA-argF) U169 deoR (F80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Hanahan, 1983

Dictyostelium discoideum

AX2	Cepa silvestre de <i>D. discoideum</i>	Dra. Teresa Suárez (CIB)
AX2 RFP	Cepa silvestre de <i>D. discoideum</i> que expresa el plásmido RFP	Dra. Teresa Suárez (CIB)

Anexo II: Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM-T easy	Plásmido para clonar fragmentos obtenidos por PCR con <i>Taq</i> polimerasa. Amp ^r	Promega
pKNOCK-Cm	Plásmido suicida. Cm ^r	Alexeyev (Benchmarks), 1999
pGEM-T IntKpnOmpA	pGEM-T con un fragmento interno (378 pb) del gen <i>ompA</i> de Kp52145. Amp ^r	Este trabajo
pKNOCK IntKpnOmpA	Fragmento IntKpnOmpA digerido con EcoRI a partir del plásmido pGEM-T IntKpnOmpA y clonado en el plásmido pKNOCK. Cm ^r	Este trabajo
pGEM-T IntKpnOmK36	pGEM-T con un fragmento interno (524 pb) del gen <i>ompK36</i> de Kp52145. Amp ^r	Este trabajo
pKNOCK IntKpnOmK36	Fragmento IntKpnOmpK36 digerido con EcoRI a partir del plásmido pGEM-T IntKpnOmpK36 y clonado en el vector pKNOCK. Cm ^r	Este trabajo
pUC18R6KT-mini-Tn7T	Plásmido suicida con elementos mini-Tn7 para la inserción en copia única en un sitio determinado del genoma. Amp ^r	Choi <i>et al.</i> , 2005
pKD4	<i>OriR_γ</i> ; Km ^r , Amp ^r	Datsenko and Wanner, 2000
pUC18R6KT-mini-Tn7T Km	Plásmido pUC18R6KT-mini-Tn7T con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado como fragmento EcoRI. Amp ^r , Km ^r	Este trabajo
pUC18R6KT-mini-Tn7TKm IntKpnOmpA	El fragmento KpnOmpAcom/SmaI fue clonado en el vector pUC18R6KT-mini-Tn7T Km. Amp ^r , Km ^r	Este trabajo
pUC18R6KT-mini-Tn7TKm IntKpnOmpK36	El fragmento KpnOmpK36com/SmaI fue clonado en el vector pUC18R6KT-mini-Tn7T Km. Amp ^r , Km ^r	Este trabajo
pTNS2	Plásmido necesario para la correcta inserción en el sitio <i>atn7</i> del genoma de la bacteria	Choi <i>et al.</i> , 2005
pGEM-TΔ <i>manC</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (1100 pb) e inferior (897 pb) del gen <i>manC</i> de Kp52145. Amp ^r	Este trabajo
pGEM-TΔ <i>manCKm</i>	Plásmido pGEM-TΔ <i>manC</i> con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado en los fragmentos superior e inferior del gen <i>manC</i> de Kp52145. Amp ^r , Km ^r	Este trabajo
pKOBEG- <i>sacB</i>	Plásmido que promueve la recombinación entre el producto de PCR clonado y la región homóloga en el cromosom . Rif ^r	Chaveroche <i>et al.</i> , 2000
pPROBE'gfp(LVA)	Plásmido con el gen <i>gfp</i> sin su promotor. Para construcción de cepas indicadoras mediante la fusión transcripcional entre el promotor del gen de interés y el gen <i>gfp</i> . Contiene una cola LVA para disminuir la vida media de GFP. Km ^r	Miller <i>et al.</i> , 2000

pPROBE'gfp(LVA)Procps 43	Fragmento Procps43/EcoRI obtenido del plásmido pGEM-TProcps43 y clonado en el plásmido pPROBE'gfp(LVA) digerido con EcoRI/SmaI. Km ^r	Este trabajo
pFPV25.1 Cm	Derivado de pBR322. Expresión constitutiva de GFP. Cm ^r	Valdivia and Falkow, 1996
pRL-TK	Vector de expresión eucariota de luciferasa de <i>Renilla</i> . Contiene el promotor de la Timidina Kinasa (TK) del virus <i>Herpes simplex</i>	Promega
pNF-κB-Luc cis reporter plasmid	Vector de expresión eucariota en el que el gen de la luciferasa se encuentra bajo control de un promotor con sitios de unión al NF-κB	Stratagene
pCI-Nod1	Plásmido integrativo utilizado en transfecciones en células epiteliales para silenciar el gen <i>nod</i>	Prof. T. Kufer
pcDNA3	Plásmido que equilibra la concentración de ADN en transfecciones	Invitrogen
pEGFP Rab7	Plásmido para la expresión de Rab7 unida a GFP	Dr. Sergio Greinstein (Huynh <i>et al.</i> , 2010)
pEGFP RILP-C33	Plásmido para la expresión de RILP-C33 unida a GFP	Dr. Sergio Greinstein (Huynh <i>et al.</i> , 2010)
pMMP-GFP-LC3B	Plásmido retroviral con su propio promotor para la expresión de la proteína autofágica LC3B unida a GFP	Dr. Aarne Fleischer
OGP	Plásmido que contiene los genes <i>gag-pol</i> necesarios para la producción de proteínas estructurales de nuevas partículas víricas	Dr. Aarne Fleischer
VSV-G	Plásmido que contiene los genes <i>env</i> necesarios para la producción de proteínas de la envoltura viral de nuevas partículas víricas	Dr. Aarne Fleischer

Anexo III: Cebadores utilizados en este trabajo

Nombre cebador	Secuencia (5'→3')	Uso
IntOmpAKpnF*	AGTATTTGCTGGCGGCGTAG	Construcción del mutante <i>ompA</i> en Kp52145 y 52145- Δwca_{k2}
IntOmpAKpnR*	GCTTCGGAACCGATGCGGTC	Construcción del mutante <i>ompA</i> en Kp52145 y 52145- Δwca_{k2}
kpnOmpK36F*	CGCTTTGTTAGCAAAGCCCAG	Construcción del mutante <i>OmpK36</i> en Kp52145
kpnOmpK36R*	TTGGCGACGCGGGCTCTTTC	Construcción del mutante <i>OmpK36</i> en Kp52145
manCupF*	CGCTTAAAGACCAGCGTGTCG	Construcción del mutante <i>manC</i> en Kp52145
manCupR*	CggatccgATCAGCGGGTCGTCGCCGTG	Construcción del mutante <i>manC</i> en Kp52145
manCdownF*	CggatccgCAGCGACGAGAAGCTGGTGG	Construcción del mutante <i>manC</i> en Kp52145
manCdownR*	GGATATCCCGCAGGCCGGTG	Construcción del mutante <i>manC</i> en Kp52145
KpnOmpAcomF*	AGGGAAAGAATAGCCAGGTAGG	Amplificar el gen <i>ompA</i> y su promotor para complementar la mutación en dicho gen
KpnOmpAcomR*	TTTCGCGGAATGCCTGCCAC	Amplificar el gen <i>ompA</i> y su promotor para complementar la mutación en dicho gen
ComkpnompK36F*	GGAGTGGTAGCTGAATCGCAGC	Amplificar el gen <i>ompK36</i> para complementar la mutación en dicho gen
ComkpnompK36R*	AGGGAATCATTAGCCGTAGCAC	Amplificar el gen <i>ompK36</i> para complementar la mutación en dicho gen
K2ProcpsF*	gaattcTGCTGGGACAAATTGCCACC	Amplificar la región promotora del gen <i>cps</i> para construir cepa indicadora

K2ProcpsR*	AGATGGATGACCCCGCGATC	Amplificar la región promotora del gen <i>cps</i> para construir cepa indicadora
Cassette-F1	CGCGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Amplificar el casete de Km del plásmido pKD4
Cassette-R1	CGCGGATCCCATGGGAATTAGCCATGGTCC	Amplificar el casete de Km del plásmido pKD4
KpnglmSup*	CGCACAACTGTTGCGACGGTG	Amplificar fragmento entre PA5546 y <i>glmS</i> de <i>Klebsiella</i> para verificar la inserción cromosomal en Tn7
KpnglmSdown*	TGGCTTATCACGTCGCGCTG	Amplificar fragmento entre PA5546 y <i>glmS</i> de <i>Klebsiella</i> para verificar la inserción cromosomal en Tn7
Ptn7L	ATTAGCTTACGACGCTACACCC	Cebadores universales para verificar la inserción cromosomal en Tn7
Ptn7R	CACAGCATAACTGGACTGATTTTC	Cebadores universales para verificar la inserción cromosomal en Tn7

*cebadores diseñados según la secuencia del genoma de *Klebsiella pneumoniae* disponible (*Klebsiella pneumoniae* MGH78578 [<http://genome.wustl.edu>]).

Anexo IV: Métodos de fijación probados para diferentes anticuerpos en macrófagos alveolares MH-S y THP-1

En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos de las múltiples fijaciones probadas en las dos líneas celulares de macrófagos usadas en este trabajo (MH-S y THP-1). Las celdas de color verde corresponden a las fijaciones probadas que funcionaron; las celdas rojas corresponden a fijaciones probadas que no funcionaron y las celdas en blanco significan que no se probó ningún tipo de fijación.

		TIPOS DE FIJACION MH-S					
		PFA 3% 20 min / TA	MetOH 5 min / -20 °C	PFA 2,5% + PFA-MetOH ^(A)	PFA3% + 1min MetOH frío ^(B)	Formaldehído 2% en MetOH. 5min, -20°C	PFA-Lysina 20min TA ^(C)
ANTICUERPOS - FLUIDOS	EEA1						
	Lamp1						
	Lysotracker						
	Dextrano						
	Cat. D CTSD						
	Cat. D H75						
	Cat.D Kornfeld						
	Cat. D R20						
	Cat. D G19						
	CD63						
	GM130						
	GRP94						
	PA3-16862						
	Calret 405-417						
	Calnexina						

(A) **PFA 2,5% + PFA-MetOH**: hace referencia a la fijación consistente a PFA 2,5%, 10 min a TA + PFA 5% (1) : MetOH (4), 5 min a -20 °C

(B) **PFA + 1min MetOH**: hace referencia a la tinción con PFA 3%, 20 min TA. Antes de la tinción, las células se lavan 3 veces con PBS frío, se sumergieron en MetOH durante 1 min y se volvieron a lavar 3 veces con PBS frío.

(C) **PFA-Lysine**: hace referencia a la fijación con L-lisina (0,4 M; Na₂HPO₄, 0,1 M; fosfatyo sódico pH 7,2 – 7,4, 0,1 M; y 8% de paraformaldehído).

		TIPOS DE FIJACION THP-1					
		PFA 3% 10 min TA	MetOH 5min -20 °C	PFA 2,5%+PFA- MetOH ^(A)	PFA3%+1min MetOH ^(B)	Formaldehído 2% en MetOH. 5min, -20°C	PFA-Lysina 10min TA ^(C)
A N T I C U E R P O S - F L U I D O S	EEA1						
	Lamp1						
	Lysotracker						
	Dextrano						
	Cat. D CTSD						
	Cat. D H75						
	Cat.D Kornfeld						
	Cat. D R20						
	Cat. D G19						
	CD63						
	GM130						
	GRP94						
	PA3-16862						
Calret 405-417							
Calnexina							

(A) **PFA 2,5% + PFA-MetOH:** hace referencia a la fijación consistente a PFA 2,5%, 10 min a TA + PFA 5% (1) : MetOH (4), 5 min a -20 °C

(B) **PFA + 1min MetOH:** hace referencia a la tinción con PFA 3%, 20 min TA. Antes de la tinción, las células se lavan 3 veces con PBS frío, se sumergieron en MetOH durante 1 min y se volvieron a lavar 3 veces con PBS frío.

(C) **PFA-Lysine:** hace referencia a la fijación con L-lisina (0,4 M; Na₂HPO₄ 0,1 M; fosfato sódico pH 7,2 – 7,4, 0,1 M; y 8% de paraformaldehído).

Anexo V: Anticuerpos primarios probados en macrófagos

Antígeno	Origen	Nombre Ac	Marcaje	Dilución	Proveedor/Fuente
<i>Klebsiella</i>	Conejo	-	Kp43816/ Kp52145	1:5000	Proporcionado por el Dr. Sebastián Albertí
EEA1	Cabra	N19	Endosoma temprano	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Lamp-1	Rata	D4-B	Endosoma tardío	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
Catepsina D	Conejo	CTSD	Lisosoma	1:100 1:50	DAKO
Catepsina D	conejo	DH75 (sc-10725)	Lisosoma	1:150	Santa Cruz Biotechnology
Catepsina D	Conejo	-	Lisosoma	1:100 - 1:1000	Dr. Stuart Kornfeld (Washington University, School of Medicine)
Catepsina D	Cabra	R20 (sc-6487)	Lisosoma	1:50 - 1:200	Santa Cruz Biotechnology
Catepsina D	Cabra	G19 (sc-6494)	Lisosomna	1:100	Santa Cruz Biotechnology
CD63	Ratón	H5C6	Endosoma tardío	1:100 1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
GM130	Ratón	-	Cis-Golgi	1:400	BD Laboratorios
Lumen RE	Conejo	GRP94 (ab18055)	RE	1:200	Abcam
Calreticulina	conejo	PA3-16862	RE	1:50- 1:200	Termo-scientific
Calreticulina	Conejo	Calreticulin 405-417	RE	1:50	Calbiochem
Calnexina	Conejo	Calnexin ADI-SPA-860	RE	1:100	Enzo life Sciences

Anexo VI: Artículos publicados relacionados con este trabajo

A continuación se adjuntan los artículos donde se publican parte de los resultados obtenidos:

Llobet E., March C., Jiménez P., and Bengoechea J.A. 2009. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 298-302

March C., Moranta D., Regueiro V., Llobet E., Tomás A., Garmendia J., and Bengoechea J. 2011. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **286**: 9956-9967

Klebsiella pneumoniae OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides[∇]

Enrique Llobet,^{1,2,†} Catalina March,^{1,2,†} Paloma Giménez,² and José A. Bengoechea^{1,2,3,4,*}

Program Infection and Immunity, Fundació Caubet-CIMERA Illes Balears,¹ and Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CibeRes),² Bunyola, Área de Microbiología, Facultad Biología, Universitat Illes Balears, Palma Mallorca,³ and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid,⁴ Spain

Received 19 May 2008/Returned for modification 25 July 2008/Accepted 5 November 2008

A *Klebsiella pneumoniae* ompA mutant was more susceptible to antimicrobial peptides (APs) than the wild type. Susceptibility did not result from surface changes other than the absence of OmpA. Our data suggest that OmpA is implicated in the activation of yet-unknown systems dedicated to ameliorating AP cytotoxicity.

Outer membrane proteins (OMPs) are important for membrane integrity, transport of molecules, and pathogenesis (22). OmpA is a well-characterized OMP (39), and it has been shown to mediate adhesion to and/or invasion of eukaryotic cells (32, 36) and serum resistance (31, 40) and to protect bacteria against lung collectins (31, 40). OmpA is also targeted by the innate immune system. Neutrophil elastase degrades OmpA, resulting in cell death (3), whereas binding of serum amyloid protein A to OmpA increases bacterial phagocytosis (18, 35).

Klebsiella pneumoniae infections are particularly devastating among immunocompromised patients (34). The increased prevalence of multidrug-resistant strains complicates the treatment of these infections (37). Studies indicate that recognition of *K. pneumoniae* OmpA by the innate immune system helps to clear *Klebsiella* infections (21, 25).

Antimicrobial peptides (APs) belong to the array of oxygen-independent mechanisms for killing pathogens (14, 16). Nearly all APs are amphipathic and cationic (5, 17, 27). When APs are used in concentrations close to the MIC, bacteria do not develop resistance easily (15). Since proteins from the innate immune system target OmpA, here we explore whether *K. pneumoniae* OmpA contributes to susceptibility to APs.

An *ompA* mutant was constructed by insertion mutagenesis. A 378-bp *ompA* fragment was PCR amplified (using genomic DNA from wild-type *K. pneumoniae* 52145 [26], *Taq* polymerase [Promega], and the primers IntOmpAKpnF and IntOmpAKpnR) (Table 1), cloned into pGEM-T Easy (Promega), verified by DNA sequencing, and then subcloned as an EcoRI fragment into pKNOCK-Cm (2) to obtain pKNOCK-IntKpnOmpA, which was inserted into 52145 by homologous recombination to obtain strain 52OmpA2. Correct insertion was confirmed by PCR and Southern blotting. OMPs were extracted from bacteria grown in Luria-Bertani broth and were analyzed as described previously (11). 52OmpA2 did not express OmpA (Fig. 1A). The growth rates of 52145 and

52OmpA2 in Luria-Bertani, determined by measuring the optical density at 540 nm at different time points, were not significantly different (data not shown).

Susceptibilities to APs were tested by a survival assay (6, 7). 52OmpA2 was more susceptible to protamine (Fig. 2A), human neutrophil α -defensin 1 (HNP-1) (Fig. 2B), and polymyxin B (Fig. 2C) than 52145. The structures of the APs used are different, indicating that the susceptibility of 52OmpA2 was not dependent on the AP tested. To complement 52OmpA2, we used the mini-Tn7 delivery vector pUC18R6KT-mini-Tn7T, whose insertion occurs at a single Tn7 attachment site downstream of *glmS* (8). For selection of the transposition event, a kanamycin cassette was PCR amplified from the plasmid pKD4 (10) using primers cassette-F1 and cassette-R1 and cloned into EcoRV-digested pUC18R6KT-mini-Tn7T (8) to give pUC18R6KT-mini-Tn7TKm. A 1.5-kb fragment encompassing *ompA* and its promoter was PCR amplified (using the primers KpnOmpAcomF and KpnOmpAcomR and *Vent* polymerase [New England Biolabs]) and cloned into SmaI-digested pUC18R6KT-mini-Tn7TKm to give pUC18R6KT-mini-Tn7TKmKpnOmpA. Tn7 delivery was performed as described previously (8), and insertion was verified by colony PCR with the primer pairs KpnglmSup/Ptn7L and KpnglmSdown/Ptn7R (8). 52OmpA2Com, the strain obtained, expressed amounts of

TABLE 1. Primers

Primer	Sequence (5'–3')
IntOmpAKpnF ^a	AGTATTTGCTGGCGGGCGTAG
IntOmpAKpnR ^a	GCTTCGGAACCGATGCGGTC
KpnOmpAcomF ^a	AGGGAAGAATAGCCAGGTAGG
KpnompAcomR ^a	TTTCGCGGAATGCCTGCCAC
cassette-F1	CGCGGATCCCGTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG
cassette-R1	CGCGGATCCCATGGGAATTAGCC ATGGTCC
KpnglmSup ^a	GCGACAACCTGTTGCGACGGTG
KpnglmSdown ^a	TGGCTTATCACGTCGCGCTG
Ptn7L	ATTAGCTTACGACGCTACACCC
Ptn7R	CACAGCATAACTGGACTGATTTC
KnpOmpK36F ^a	CGCTTTGTTAGCAAAGCCCAG
KpnOmpK36R ^a	TTGGCGACGCGGGCTCTTTC

^a Primers were designed based on the available *K. pneumoniae* genome sequence (*K. pneumoniae* MGH78578 [http://genome.wustl.edu]).

* Corresponding author. Mailing address: Program Infection and Immunity, Fundació Caubet-CIMERA Illes Balears, Recinto Hospital Joan March, Carretera Sóller Km 12, 07110 Bunyola. Spain. Phone: 34 971 011780. Fax: 34 971 011797. E-mail: bengoechea@caubet-cimera.es.

† These authors contributed equally to this work.

∇ Published ahead of print on 17 November 2008.

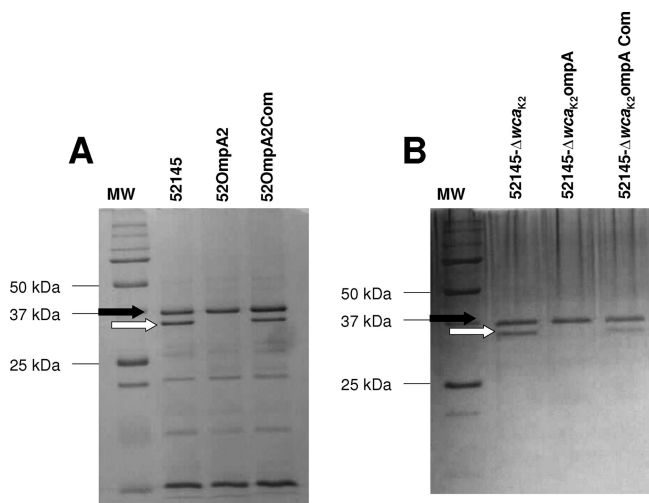


FIG. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (the acrylamide concentration was 4% in the stacking gel and 12% in the separation one) followed by Coomassie brilliant blue staining of OMPs from 52145, 52OmpA2, and 52OmpA2Com (A) or 52145- Δwca_{K2} , 52145- $\Delta wca_{K2}ompA$, and 52145- $\Delta wca_{K2}ompACom$ (B). MW, molecular size marker. A white arrow marks the OmpA protein, and a black arrow marks OmpK36 (13, 19).

OmpA similar to those of 52145 (Fig. 1A). 52OmpA2Com susceptibility to APs was similar to that of 52145 (Fig. 2A to C).

Since *K. pneumoniae* capsule polysaccharide (CPS) mediates resistance to APs (7), we examined whether the absence of

OmpA decreases the expression of CPS, thereby increasing the susceptibility to APs. However, the two strains expressed similar amounts of cell-bound CPS (7, 33) ($339 \pm 10 \mu\text{g}$ per 10^6 cells and $345 \pm 15 \mu\text{g}$ per 10^6 cells, respectively; $P > 0.05$ [two-tailed *t* test]). We investigated whether the absence of OmpA increases the susceptibility to APs of a CPS mutant. pKNOCKIntKpnOmpA was introduced into 52145- Δwca_{K2} , a 52145-derived CPS mutant (construction will be described elsewhere). 52145- $\Delta wca_{K2}ompA$ did not express OmpA (Fig. 1B), and its expression was restored by integration of pUC18R6KT-mini-Tn7TKmKpnOmpA (Fig. 1B). 52145- $\Delta wca_{K2}ompA$ was more susceptible to polymyxin B than 52145- Δwca_{K2} (Fig. 2D), and both strains were more susceptible to polymyxin B than the corresponding CPS-expressing strains (Fig. 2A and D). Our data indicate that changes in CPS expression do not account for the increased susceptibility of 52OmpA2 to APs.

We explored whether 52OmpA2 possesses a fragile outer membrane (OM), which could increase the susceptibility to APs (28, 38). However, the MICs of ciprofloxacin, imipenem, cefotaxime, amoxicillin, and gentamicin for 52145 and 52OmpA2 were similar (Table 2). The MIC of polymyxin B for 52OmpA2 was higher than that for 52145 (Table 2). We tested the susceptibilities to sodium dodecyl sulfate (SDS) and novobiocin by the disk diffusion method (4). Both strains were resistant to SDS (100 μg per disk), and 52OmpA2 was as susceptible as 52145 to novobiocin (80 μg per disk; diffusion halo, 0.85 ± 0.1 cm and 0.9 ± 0.1 cm respectively; $P > 0.05$). Both strains did not uptake propidium

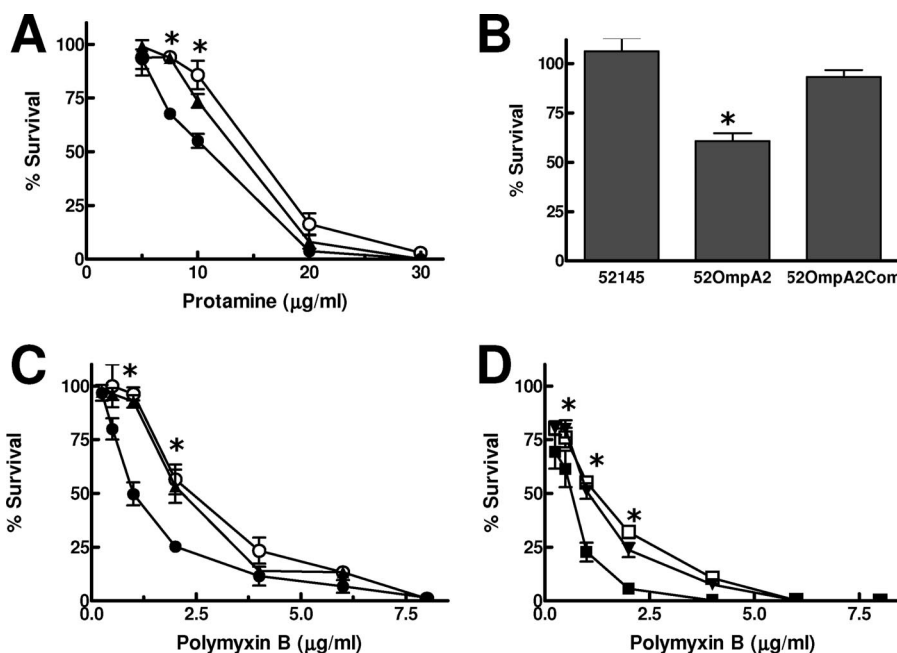


FIG. 2. A *K. pneumoniae* OmpA mutant is more susceptible to APs than the wild-type strain. Bacteria were exposed to protamine (A), HNP-1 (fixed concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (B), or polymyxin B (C and D). Bacteria were exposed to polymyxin B and protamine during 1 h and to HNP-1 during 3 h. Each point in panels A, C, and D represents the mean and standard deviation for six samples from three independently grown batches of bacteria and significant survival differences ($P < 0.05$; two-tailed *t* test) between 52145 and 52145- Δwca_{K2} , and the respective *ompA* mutants are indicated by asterisks. Error bars in panel B display standard deviations from the means of three experiments, each one run in duplicate, and an asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$; two-tailed *t* test) between 52145 and 52OmpA2. Symbols: \circ , 52145; \bullet , 52OmpA2; \blacktriangle , 52OmpA2Com; \square , 52145- Δwca_{K2} ; \blacksquare , 52145- $\Delta wca_{K2}ompA$; \blacktriangledown , 52145- $\Delta wca_{K2}ompACom$.

TABLE 2. Susceptibilities of *K. pneumoniae* strains to antibiotics

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for:		
	52145	52OmpA2	52OmpA2Com
Polymyxin B ^a	0.75 \pm 0.01	0.31 \pm 0.01 ^c	0.75 \pm 0.02
Ciprofloxacin ^b	0.05 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02	ND ^d
Imipenem ^b	0.05 \pm 0.03	0.1 \pm 0.03	ND
Gentamicin ^b	0.15 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	ND
Amoxicillin ^b	2 \pm 0.10	2 \pm 0.1	ND
Cefotaxime ^b	0.05 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	ND

^a MIC was determined using Etest strips (AB Biodisk).

^b MIC was determined using M.I.C.Evaluator strips (Oxoid).

^c Significant difference ($P < 0.05$; two-tailed t test) between results for 52145 and 52OmpA2.

^d ND, not done.

iodide, which penetrates only bacteria with damaged OM (fluorescence spectroscopy protocol, Live/Dead BAALight bacterial viability kit; Molecular Probes).

We investigated whether the absence of OmpA increases the binding of polymyxin B to whole bacteria. Bacteria (10^8) were incubated with polymyxin B (16 $\mu\text{g/ml}$; 30 min), and the amount of AP bound was determined (7). 52145 and 52OmpA2 adsorbed similar amounts of the peptide (7.4 \pm 0.1 and 8.1 \pm 0.1 $\mu\text{g/ml}$, respectively; $P > 0.05$ [two-tailed t test]). We also determined the polymyxin B bound by 52145- Δwca_{K2} and 52145- Δwca_{K2} ompA lipopolysaccharides (LPSs), obtained as described previously (7, 41). LPSs were purified from CPS mutants to avoid copurification of CPS (12). LPSs (50 $\mu\text{g/ml}$) were incubated with polymyxin B (16

$\mu\text{g/ml}$; 30 min), and the peptide bound was measured (7). 52145- Δwca_{K2} and 52145- Δwca_{K2} ompA LPSs adsorbed similar amounts of polymyxin B (4.8 \pm 0.1 and 4.4 \pm 0.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively; $P > 0.05$ [two-tailed t test]). These observations suggest that susceptibility of 52OmpA2 to APs is not caused by changes in the OM other than the absence of OmpA.

We wondered whether the absence of other OMPs would increase the susceptibility to APs. We constructed a mutant lacking OmpK36, another *K. pneumoniae* OMP (1), and tested the susceptibility to APs. A 524-bp PCR amplicon (using primers KnpOmpK36F and KnpOmpK36R) from *ompK36* was cloned into pGEM-T Easy, verified by DNA sequencing, and subcloned into EcoRI-digested pKNOCK-Cm to obtain pKNOCKIntKnpOmpK36, which was inserted into 52145 by homologous recombination to obtain 52OmpK36. Correct insertion was verified by PCR and Southern blotting. 52OmpK36 did not express OmpK36, whereas the expression of other OMPs was not affected (Fig. 3A). A lack of OmpK36 did not increase the susceptibility to polymyxin B (Fig. 3B) or HNP-1 (Fig. 3C).

We speculated that the absence of OmpA may interfere with the expression of systems dedicated to ameliorating AP cytotoxicity. If this is so, a brief exposure of *K. pneumoniae* to polymyxin B should increase its resistance to APs in an OmpA-dependent manner. In contrast to results for 52OmpA2, a 1-h treatment of 52145 with polymyxin B (1 $\mu\text{g/ml}$) during growth increased its survival with the peptide (Fig. 4). These *K. pneumoniae* OmpA-requiring systems are presently unknown. Bac-

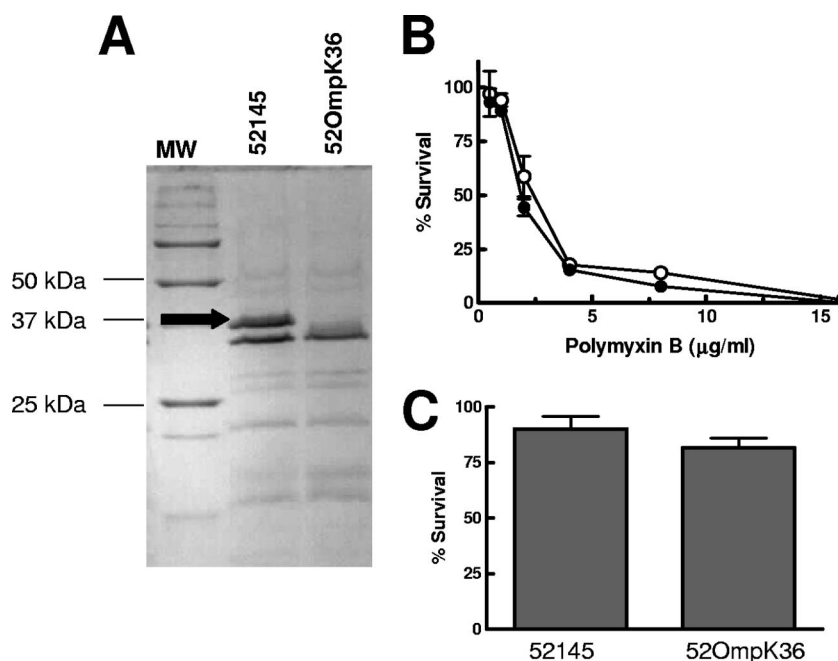


FIG. 3. (A) SDS-PAGE (the acrylamide concentration was 4% in the stacking gel and 12% in the separation one) followed by Coomassie brilliant blue staining of OMPs from 52145 and 52OmpK36. MW, molecular size marker. The black arrow marks OmpK36 (13, 19). (B) The *K. pneumoniae ompK36* mutant (●) is as resistant as the wild type (○) to polymyxin B. Bacteria were exposed to different concentrations of polymyxin B during 1 h. Each point represents the mean and standard deviation for six samples from three independently grown batches of bacteria. (C) The *K. pneumoniae ompK36* mutant is as resistant as the wild type to HNP-1 (3-h incubation with a fixed concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$). Error bars display standard deviations from the means of three experiments, each one run in duplicate.

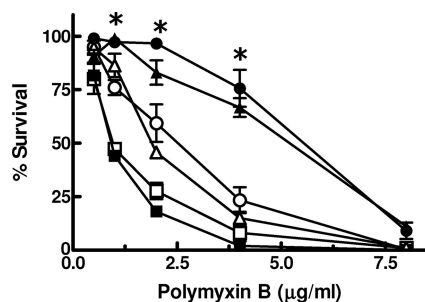


FIG. 4. Exposure of *K. pneumoniae* 52145 but not the *ompA* mutant to polymyxin B (1 h during growth; final concentration, 1 µg/ml) increases the resistance to polymyxin B. After polymyxin B treatment, bacteria were washed and the susceptibility to polymyxin B tested by the same survival assay as for Fig. 2 and 3. Each point represents the mean and standard deviation for six samples from three independently grown batches of bacteria, and significant survival differences ($P < 0.05$; two-tailed t test) between bacteria pretreated with polymyxin B (black symbols) and non-treated bacteria (white symbols) are indicated by asterisks. Symbols: ○ or ●, 52145; △ or ▲, 52OmpA2Com; □ or ■, 52OmpA2.

terial countermeasures to resist APs include alteration of surface charge, active efflux, and proteolytic degradation (29, 30). Hence, an absence of OmpA may affect the activation/function of these systems. Considering the connection between OMPs and activation of the σ^E regulon (24) and the connection between the latter and susceptibility to APs (9, 20, 23), we hypothesize that a lack of activation of the σ^E regulon might underlie the susceptibility of 52OmpA2 to APs.

Our findings may help in developing new therapeutic strategies. Compounds directed to block OmpA could render bacteria susceptible to APs, and identification of the systems activated in an OmpA-dependent fashion may lead to new targets for design of antimicrobials.

We are grateful to members of the Bengoechea lab for helpful discussions and to Christian Frank for critically reading the manuscript. We are indebted to Herbert Schweizer for sending us mini-Tn7 constructs.

This work was funded by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI05/2311) and Govern Balear (Grant for Competitive Groups) to J.A.B.

REFERENCES

- Alberti, S., F. Rodriguez-Quinones, T. Schirmer, G. Rummel, J. M. Tomas, J. P. Rosenbusch, and V. J. Benedi. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect. Immun.* **63**:903–910.
- Alexeyev, M. F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *BioTechniques* **26**:824–826, 828.
- Belaouaj, A., K. S. Kim, and S. D. Shapiro. 2000. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* **289**:1185–1188.
- Bengoechea, J. A., H. Najdenski, and M. Skurnik. 2004. Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol. Microbiol.* **52**:451–469.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:238–250.
- Campos, M. A., P. Morey, and J. A. Bengoechea. 2006. Quinolones sensitize gram-negative bacteria to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2361–2367.
- Campos, M. A., M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. Llompert, S. Alberti, and J. A. Bengoechea. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72**:7107–7114.
- Choi, K. H., J. B. Gaynor, K. G. White, C. Lopez, C. M. Bosio, R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. P. Schweizer. 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**:443–448.
- Crouch, M. L., L. A. Becker, I. S. Bang, H. Tanabe, A. J. Ouellette, and F. C. Fang. 2005. The alternative sigma factor sigma is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* to anti-microbial peptides. *Mol. Microbiol.* **56**:789–799.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
- Domenech-Sanchez, A., L. Martinez-Martinez, S. Hernandez-Alles, C. M. del Carmen, A. Pascual, J. M. Tomas, S. Alberti, and V. J. Benedi. 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3332–3335.
- Fresno, S., N. Jimenez, L. Izquierdo, S. Merino, M. M. Corsaro, C. C. De, M. Parrilli, T. Naldi, M. Regue, and J. M. Tomas. 2006. The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiology* **152**:1807–1818.
- Frirdich, E., C. Bouwman, E. Vinogradov, and C. Whitfield. 2005. The role of galacturonic acid in outer membrane stability in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **280**:27604–27612.
- Hancock, R. E. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418–422.
- Hancock, R. E., and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**:402–410.
- Hancock, R. E., and M. G. Scott. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:8856–8861.
- Hancock, R. E. W., and D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1317–1323.
- Hari-Dass, R., C. Shah, D. J. Meyer, and J. G. Raynes. 2005. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **280**:18562–18567.
- Hernandez-Alles, S., S. Alberti, D. Alvarez, A. Domenech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, J. Gil, J. M. Tomas, and V. J. Benedi. 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **145**:673–679.
- Humphreys, S., A. Stevenson, A. Bacon, A. B. Weinhardt, and M. Roberts. 1999. The alternative sigma factor, σ^E , is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **67**:1560–1568.
- Jeannin, P., G. Magistrelli, L. Goetsch, J. F. Haeuw, N. Thieblemont, J. Y. Bonnefoy, and Y. Delneste. 2002. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen-presenting cells—impact on vaccine strategies. *Vaccine* **20**(Suppl. 4):A23–A27.
- Lin, J., S. Huang, and Q. Zhang. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect.* **4**:325–331.
- Mathur, J., B. M. Davis, and M. K. Waldor. 2007. Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Mol. Microbiol.* **63**:848–858.
- Mecenas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross. 1993. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**:2618–2628.
- Mehrad, B., and T. J. Standiford. 1999. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunol. Res.* **20**:15–27.
- Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel, and P. J. Sansonetti. 1989. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**:546–552.
- Nicolas, P., and A. Mor. 1995. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:277–304.
- Nikaido, H., and M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1–32.
- Nizet, V. 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**:11–26.
- Peschel, A. 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**:179–186.
- Prasadarao, N. V., A. M. Blom, B. O. Villoutreix, and L. C. Linsangan. 2002. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J. Immunol.* **169**:6352–6360.
- Prasadarao, N. V., C. A. Wass, J. N. Weiser, M. F. Stins, S. H. Huang, and K. S. Kim. 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**:146–153.
- Rahn, A., and C. Whitfield. 2003. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Mol. Microbiol.* **47**:1045–1060.
- Sahly, H., and R. Podschun. 1997. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**:393–399.
- Shah, C., R. Hari-Dass, and J. G. Raynes. 2006. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* **108**:1751–1757.
- Sukumaran, S. K., H. Shimada, and N. V. Prasadarao. 2003. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect. Immun.* **71**:5951–5961.
- Timko, J. 2004. Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum

- beta-lactamase production in *Klebsiella* spp. strains. J. Infect. Chemother. **10**:212–215.
38. **Vaara, M.** 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. **56**:395–411.
39. **Vogel, J., and K. Papenfort.** 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. Curr. Opin. Microbiol. **9**:605–611.
40. **Wu, H., A. Kuzmenko, S. Wan, L. Schaffer, A. Weiss, J. H. Fisher, K. S. Kim, and F. X. McCormack.** 2003. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. J. Clin. Investig. **111**:1589–1602.
41. **Yi, E. C., and M. Hackett.** 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. Analyst **125**:651–656.

Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Protein A Is Required to Prevent the Activation of Airway Epithelial Cells*

Received for publication, September 1, 2010, and in revised form, January 25, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 28, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.181008

Catalina March^{‡§}, David Moranta^{‡§}, Verónica Regueiro^{‡§}, Enrique Llobet^{‡§}, Anna Tomás^{‡§}, Junkal Garmendia^{‡§¶}, and José A. Bengoechea^{‡§||2}

From the [‡]Laboratory of Microbial Pathogenesis, Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears, Recinto Hospital Joan March, Carretera Soller Km 12, 07110 Bunyola, Spain, the [§]Program Host-Pathogen Interactions, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes), 07110 Bunyola, Spain, the [¶]Instituto de Agrobiotecnología UPNA-CSIC, 31192 Mutilva Baja, Spain, and ^{||}CSIC, 28006 Madrid, Spain

Outer membrane protein A (OmpA) is a class of proteins highly conserved among the *Enterobacteriaceae* family and throughout evolution. *Klebsiella pneumoniae* is a capsulated Gram-negative pathogen. It is an important cause of community-acquired and nosocomial pneumonia. Evidence indicates that *K. pneumoniae* infections are characterized by a lack of an early inflammatory response. Data from our laboratory indicate that *K. pneumoniae* CPS helps to suppress the host inflammatory response. However, it is unknown whether *K. pneumoniae* employs additional factors to modulate host inflammatory responses. Here, we report that *K. pneumoniae* OmpA is important for immune evasion *in vitro* and *in vivo*. Infection of A549 and normal human bronchial cells with 52OmpA2, an *ompA* mutant, increased the levels of IL-8. 52145- Δwca_{K2} ompA, which does not express CPS and *ompA*, induced the highest levels of IL-8. Both mutants could be complemented. *In vivo*, 52OmpA2 induced higher levels of *tnfa*, *kc*, and *il6* than the wild type. *ompA* mutants activated NF- κ B, and the phosphorylation of p38, p44/42, and JNK MAPKs and IL-8 induction was via NF- κ B-dependent and p38- and p44/42-dependent pathways. 52OmpA2 engaged TLR2 and -4 to activate NF- κ B, whereas 52145- Δwca_{K2} ompA activated not only TLR2 and TLR4 but also NOD1. Finally, we demonstrate that the *ompA* mutant is attenuated in the pneumonia mouse model. The results of this study indicate that *K. pneumoniae* OmpA contributes to attenuate airway cell responses. This may facilitate pathogen survival in the hostile environment of the lung.

The OM³ of Gram-negative bacteria is composed of phospholipids, LPS, and outer membrane proteins. These proteins

are important for membrane integrity and transport of molecules across the membrane (for a review, see Ref. 1). OmpA (outer membrane protein A) is one of the best characterized OM proteins. Its crystal structure has been determined (at a resolution of 1.65 Å), and it consists of an eight-stranded all-next-neighbor antiparallel β -barrel with short turns at the periplasmic barrel (2). A number of studies have highlighted the role of OmpA in pathogenesis. *Escherichia coli* OmpA mediates adhesion and/or invasion to epithelial cells and macrophages (3, 4). It also mediates serum resistance and may protect bacteria against the bactericidal action of lung collectins SP-D and SP-A (5, 6). However, OmpA is also targeted by the innate immune system. Neutrophil elastase, a protein included in the array of oxygen-independent weapons of the innate immune system, degrades OmpA, resulting in cell death (7). The acute-phase protein serum amyloid protein A binds to OmpA, and this is associated with an increased uptake of bacteria by neutrophils and macrophages (8, 9).

Airway epithelial cells play a pivotal role in lung defense against infections by detecting pathogens, thereby leading to the activation of signaling pathways resulting in the production of antimicrobial molecules, the expression of co-stimulatory molecules, and the release of cytokines and chemokines (10, 11). In particular, IL-8 is a major secreted product of infected cells independent of the infecting microorganism (12, 13). This chemokine is a potent chemoattractant for polymorphonuclear cells into the infected tissue (12, 13). To launch these responses, airway epithelial cells recognize conserved molecules expressed by pathogens, the so-called PAMPs, through a set of germ line-encoded receptors referred to as PRRs (14, 15). The best characterized PRRs belong to the families of Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide binding and oligomerization domain-like receptors (NLRs) (16–18). Among TLRs, most of the studies focus on TLR4, mainly involved in the detection of LPS, and on TLR2, which responds to a variety of Gram-positive PAMPs (10, 14, 15). Among NLRs, NOD1 has received increasing attention. NOD1 is located intracellularly, and evidence indicates that it recognizes a peptidoglycan motif from Gram-negative bacteria (16, 17).

Klebsiella pneumoniae is a capsulated Gram-negative pathogen that causes a wide range of infections, from urinary tract infections to pneumonia, the latter being particularly devastating among immunocompromised patients with mortality rates between 25 and 60% (19). The best characterized virulence fac-

* This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria Grant PI06/1629, ERA-NET Pathogenomics Grants GEN2006-27776-C2-2-E/PAT and SAF2008-04353-E, and Biomedicine Program Grant SAF2009-07885 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (to J. A. B.). CibeRes is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.

¹ Recipient of a "Contrato de Investigador Miguel Servet" from the Instituto de Salud Carlos III.

² To whom correspondence should be addressed: Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears, Recinto Hospital Joan March, Carretera Soller Km 12, 07110 Bunyola, Spain. Tel.: 34-971-011780; Fax: 34-971-011797; E-mail: bengoechea@caubet-cimera.es.

³ The abbreviations used are: OM, outer membrane; CPS, capsule polysaccharide; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptor; TLR, Toll-like receptor; NLR, nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor; CAPE, caffeic acid phenethyl ester; cfu, colony-forming units; RT-qPCR, real-time quantitative PCR; ANOVA, analysis of variance.

tor of this species is CPS, which is responsible for protection against complement and antimicrobial peptide-mediated killing (20–22). In addition, isogenic CPS mutant strains are avirulent, being unable to cause pneumonia and urinary tract infections (23–25).

A wealth of evidence indicates that activation of inflammatory responses is essential to clear *Klebsiella* infections (26–28) and that TLRs seem to play a major role in detecting *K. pneumoniae* (29, 30). Conversely, this suggests that *K. pneumoniae* may somehow try to counteract the induction of these host defense responses. Indeed, we and others (31, 32) have shown that in sharp contrast to wild-type strains, avirulent CPS mutants activate an inflammatory program through TLR-dependent pathways. In fact, it has been postulated that CPS helps to suppress the host inflammatory response, thereby allowing the bacteria to replicate in a more permissive niche. Whether *K. pneumoniae* employs additional factors to modulate host inflammatory responses is still unknown. In this context, several studies have shown that recombinant purified OmpA from *K. pneumoniae* induces the expression of inflammatory molecules in a TLR2-dependent manner in various cell types (33–35). Hence, it has been postulated that detection of *K. pneumoniae* OmpA may contribute to the activation of host responses leading to the clearance of *K. pneumoniae* (36). However, there might be differences between the cellular recognition of recombinant purified OmpA and OmpA expressed in the complex lipid environment of the bacterial OM, and hence the cellular responses could be different.

The purpose of this study was to analyze whether OmpA may contribute to the activation of inflammatory responses when expressed in the bacterial OM. To this end, we compared the host responses to wild-type *K. pneumoniae* and an isogenic *ompA* mutant. We report that *K. pneumoniae* OmpA is important for immune evasion of *K. pneumoniae* *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically, we demonstrate that the *ompA* mutant induces the secretion of inflammatory mediators via activation of NF- κ B and MAPKs p38 and p44/42. In addition, we show that *ompA* mutant induction of inflammatory responses is dependent on TLR activation. Finally, we demonstrate that the *K. pneumoniae ompA* mutant is attenuated in a mouse model of pneumonia.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Growth Conditions, and Reagents—*K. pneumoniae* 52145 is a clinical isolate (serotype O1:K2) described previously (24, 37). The isogenic mutants 52OmpA2, which does not express *ompA*; 52145- Δ wca_{K2}, which does not express CPS; and 52145- Δ wca_{K2}*ompA*, which does not express CPS and *ompA*, have been described previously (38, 39). Analysis of OM proteins from these strains as well as the description of the complementing strains have been reported previously (39). Bacteria were grown in Luria-Bertani medium at 37 °C. When appropriate, antibiotics were added to the growth medium at the following concentrations: rifampicin (50 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml), and chloramphenicol (25 μ g/ml). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an NF- κ B inhibitor, and SB203580, a p38 MAPK inhibitor, were purchased

from Sigma, whereas U0126, a p44/42 MAPK inhibitor, and SP600125, a JNK inhibitor, were purchased from Calbiochem.

CPS Purification and Quantification—Cell-associated CPSs from *K. pneumoniae* strains, grown in 5 ml of LB, were obtained using the hot phenol-water method exactly as described previously (20). CPS was quantified by determining the concentration of uronic acid in the samples, using a modified carbazole assay (40), exactly as described by Rahn and Whitfield (41).

Cell Culture and Infection—Monolayers of A549 (ATCC CCL185) and NHBE (Lonza) cells were grown as described previously (32). For infections, A549 cells were seeded to 90% confluence (3×10^5 cells/well) in 24-well tissue culture plates. Cells were serum-starved for 16 h before infection. For NHBE cells, cells were seeded to 80% confluence (2×10^5 cells/well) in collagen-coated 24-well tissue culture plates using 1 ml of bronchial epithelial cell growth medium (Lonza) per well. Bacteria were prepared as described (32, 42), and infections were performed using a multiplicity of infection of 100 bacteria/cell, unless indicated otherwise. To synchronize infection, plates were centrifuged at $200 \times g$ for 5 min. For incubation times longer than 120 min, bacteria were killed by the addition of gentamicin (100 μ g/ml), which was not removed until the end of the experiment. For experiments reported in Fig. 2, infections were performed for 3 h. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion, and it was >95% even after 9 h of infection.

Adhesion and Internalization Assays—To determine the adhesion of *Klebsiella* strains to A549 cells, after 2 h of infection, monolayers were washed five times with PBS, and cells were lysed with 300 μ l of 0.5% saponin-PBS for 5 min at room temperature, and serial dilutions were plated on LB agar plates for viable counts of bacteria. The results are expressed as log cfu/well. For invasion assays, cells were infected for 2 h and washed three times with PBS and then incubated for an additional 2 h with fresh medium plus gentamicin (100 μ g/ml) to kill extracellular bacteria. This treatment was long enough to kill all extracellular bacteria. Epithelial monolayers were washed three times with PBS and lysed as described before. The results are expressed as log cfu/well. Experiments were carried out in triplicate on at least two independent occasions.

IL-8 Stimulation Assay—Epithelial monolayers were infected for different time periods. Supernatants were removed from the wells, cell debris was removed by centrifugation, and samples were frozen at -80 °C. IL-8 in the supernatants was determined by a commercial ELISA (Bender MedSystems) with a sensitivity of <2 pg/ml. Experiments were run in duplicate and repeated at least three times.

Transfections and Luciferase Assays—A549 cells were seeded into 24-well tissue culture plates to obtain a 40–60% confluence 24 h later. Cells were washed twice with PBS before transfection. Transfection experiments were carried out in 500 μ l of Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen) using Lipofectamine™ 2000 transfection reagent following the manufacturer's recommendations (Invitrogen).

For luciferase experiments, the PathDetect® NF- κ B *cis*-reporting plasmid (250 ng; Stratagene) was co-transfected with the pRL-TK *Renilla* luciferase control reporter vector (20 ng; Promega). For luciferase assays, cells were lysed with passive

K. pneumoniae OmpA Prevents Inflammation

lysis buffer (Promega). Luciferase activity was assayed using the dual luciferase assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega). Firefly luciferase values were normalized to *Renilla* control values. Results were plotted as relative luciferase activity compared with activity measured in non-stimulated control cells. The luciferase assay was carried out in triplicate on at least three independent occasions.

Small Interfering RNA (siRNA)—Interference RNA for TLR4 (catalogue number HSS110818), TLR2 (catalogue number HSS110813), and CARD4/NOD1 (catalogue number HSS115906) were purchased from Invitrogen. StealthTM RNAi negative control low GC was used as control interference RNA for TLR2 and TLR4, whereas StealthTM RNAi negative control medium GC was used as control interference RNA for NOD1. RNA-mediated interference for down-regulating MyD88 was done by the transfection of MyD88 siRNA (5'-AACTGGAA-CAGACAACTATC-3') purchased from Qiagen. The AllStars negative control siRNA (Qiagen) was used as non-silencing control interference RNA. In all cases, 20 nM siRNA/well was used for transfection using LipofectamineTM 2000 transfection reagent and following the manufacturer's recommendations (Invitrogen). Cells were infected 48 h post-transfection as described above.

Real-time Quantitative PCR (RT-qPCR)—Quantification of mRNA levels was conducted by RT-qPCR. RNA was purified using a Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) exactly as recommended by the manufacturer. cDNA was obtained by retro-transcription of 1.5–2 µg of total RNA using a commercial RT² first strand kit as recommended by the manufacturer (SABioscience). The reaction included one step to eliminate traces of genomic DNA. Real-time PCR (RT-PCR) analyses were performed with a Smart Cycler real-time PCR instrument (Cepheid, Sunnyvale, CA). To amplify human *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, and *NOD1*, 500 ng of cDNA were used as a template in a 25-µl reaction containing 1× QuantiTect SYBR Green PCR mix (Qiagen) and QuantiTect primer assays (Qiagen; catalogue numbers QT00236131 (*TLR2*) and QT00035238 (*TLR4*)) or the intron-spanning primers: 5'-GGCATCACCACACTTGATGAC-3' (sense) and 5'-ATAGACCAGACACAGGTGCCAG-3' (antisense) for *MyD88* and 5'-TCAAGTTGGGGATGAAGGAG-3' (sense) and 5'-GCCAACTCTCTGCCACTTC-3' (antisense) for *NOD1*. As an internal control, we amplified the human housekeeping gene *GAPDH* using 50 ng of cDNA and the following intron spanning primers: 5'-GAAGGTGAA-GGTCGGAGTC-3' (sense); 5'-GAAGATGGTGTGGGAT-TTC-3' (antisense). The thermocycling protocol was as follows: 95 °C for 15 min for hot start polymerase activation, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for *TLRs*, *MyD88*, and *NOD1* or 54 °C for *GAPDH* for 30 s; and extension at 72 °C for 30 s. The SYBR Green dye was measured at 521 nm during the annealing phase. The threshold cycle (*Ct*) value reflects the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses a given threshold. The *Ct* value assigned to each well thus reflects the point during the reaction at which a sufficient number of amplicons have been accumulated. The relative mRNA amount in each sample was calculated based on its *Ct* in comparison with the *Ct* of *GAPDH*. Specificity of the PCR products was determined by melting curve analysis, and amplification products were

resolved on a 1.5% agarose gel to confirm the correct size of the amplicons (92, 102, 185, 201, and 226 bp for *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *NOD1*, and *GAPDH*, respectively).

Immunoblotting—Proteins from lysed cells were separated by 10% SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose membrane, and blocked with 4% skimmed milk in PBS. Immunostainings for MKP-1, CYLD, and IκBα were performed using polyclonal rabbit antibodies anti-MKP-1 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)), anti-IκBα (1:1,000; Cell Signaling), and anti-CYLD (1:1,000) (Imgenex Corp.) Immunostainings to assess phosphorylation of NF-κB p65, p38, p44/42, and JNK MAPKs were performed with polyclonal rabbit anti-phospho-p65, anti-phospho-p38, anti-phospho-p44/42, and anti-phospho-JNK antibodies, respectively (all used at 1:1,000; Cell Signaling). Immunoreactive bands were visualized by incubation with swine anti-rabbit immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (Dako P0217) using the Super-Signal West-dura system (Pierce). Blots were reprobated with polyclonal anti-human tubulin antibody (1:3,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) to control that equal amounts of proteins were loaded in each lane.

NOD1 NF-κB Activation Assay—HEK293T, seeded in 24-well plates, were transfected overnight with pCI-Nod1 (0.3 ng; kindly donated by T. Kufer), PathDetect[®] NF-κB *cis*-reporting plasmid (75 ng), pRL-TK *Renilla* luciferase (7.5 ng), and 120 ng of pcDNA3 (120 ng) to balance the DNA concentration. Cells were transfected using calcium chloride. 24 h post-transfection, cells were washed once with PBS and infected for 2 h, washed once with PBS, and then incubated for an additional 6 h with fresh medium plus gentamicin (100 µg/ml) before performing luciferase measurements.

Intranasal Infection Model—5–7-week-old female C57BL/6J OlaHsd mice (Harlan) were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture containing ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Overnight bacterial cultures were centrifuged (2,500 × g, 20 min, 22 °C), resuspended in PBS, and adjusted to 5 × 10⁶ cfu/ml for analysis of cytokine expression and to 5 × 10⁴ cfu/ml for determination of bacterial loads. 20 µl of the bacterial suspension were inoculated intranasally in four 5-µl aliquots. Non-infected mice were inoculated intranasally with 20 µl of PBS in four 5-µl aliquots. To facilitate consistent inoculations, mice were held vertically during inoculation and placed on a 45° incline while recovering from anesthesia. At the indicated times after infection, mice were euthanized by cervical dislocation, and lungs were either rapidly dissected for bacterial load determination or immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until purification of RNA was carried out. To this end, lungs were quickly weighted and homogenized with 1 ml of TRI reagent (Ambion) using an Ultra-Turrax T10 basic (IKA) on ice. Total RNA was purified first using a standard chloroform/isopropyl alcohol protocol, and the obtained RNA was further purified using a Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) exactly as recommended by the manufacturer. RNA integrity was verified using a formaldehyde-agarose gel, quantified spectrophotometrically with a NanoDrop spectrophotometer, and stored at –80 °C. mRNA expression was measured by RT-qPCR analysis as described above. The following intron-spanning primers were used: 5'-CCACATC-

TCCCTCCAGAAAA-3' (sense) and 5'-AGGGTCTGGGCC-ATAGAACT-3' (antisense) for *tnf- α* ; 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' (sense) and 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAAC-3' (antisense) for *il-6*; and 5'-GACAGACTGCTCTGATGGCA-3' (sense) and 5'-TGCACTTCTTTTCGCACAAAC-3' (antisense) for *kc*. As internal controls, we amplified the mouse housekeeping *actin* and *gapdh* (5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' (sense) and 5'-CTGGGTCTCTTTTCACGGT-3' (antisense) for *actin* and 5'-CCCACTAACA-TCAAATGGGG-3' (sense) and 5'-CCTTCCACAATGCCAAGTT-3' (antisense) for *gapdh*). The sizes of the amplicons are 259, 134, 292, 139, and 274 bp for *tnf- α* , *il-6*, *kc*, *actin*, and *gapdh*, respectively.

Dissected lungs from those animals infected to determine bacterial loads were homogenized in 500 μ l of PBS using an Ultra-Turrax TIO basic disperser (IKA) on ice. Bacteria from the homogenates and serial dilutions thereof were recovered in LB agar plates containing rifampicin for the wild-type strain or rifampicin plus kanamycin for the *ompA* mutant. Results were reported as log cfu/g of tissue. Mice were treated in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC) and in agreement with the Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands (Spain).

Statistical Methods—Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni contrasts or the one-tailed *t* test or, when the requirements were not met, by the Mann-Whitney *U* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The analyses were performed using Prism4 for PC (GraphPad Software).

RESULTS

Infection of Airway Epithelial Cells by *K. pneumoniae ompA* Mutant Induces the Secretion of IL-8—Previous data (32), further confirmed here, had shown that wild-type *K. pneumoniae* strain 52145 (hereafter referred to as Kp52145) does not induce the secretion of IL-8 by A549 cells (Fig. 1A). We asked whether infection with strain 52OmpA2, an isogenic *ompA* mutant, would induce the secretion of IL-8. Time course experiments showed a correlation between the duration of the infection with 52OmpA2 and the levels of IL-8 secreted by A549 cells, the levels of IL-8 being higher at 8 than at 4 h postinfection (Fig. 1A). Moreover, at 6 and 8 h postinfection, 52OmpA2-infected cells secreted levels of IL-8 significantly higher than those of Kp52145-infected cells, which were similar to those of non-infected cells (Fig. 1A) ($p > 0.05$; one-tailed Student's *t* test).

Evidence indicates that *K. pneumoniae* CPS mutants induce the secretion of IL-8 by airway epithelial cells (32). Therefore, the induction of IL-8 by 52OmpA2 could be due to a reduction in the amount of CPS expressed by this mutant. However, Kp52145 and 52OmpA2 expressed similar amounts of cell-bound CPS ($360 \pm 15 \mu\text{g}/10^6$ cells and $339 \pm 23 \mu\text{g}/10^6$ cells, respectively; $p > 0.05$; one-tailed Student's *t* test). We tested whether the absence of OmpA further increases the levels of IL-8 induced by 52145- Δwca_{K2} , an isogenic CPS mutant from Kp52145. Indeed, at 8 h postinfection, 52145- Δwca_{K2} ompA-infected cells secreted higher levels of IL-8 than 52145- Δwca_{K2} - or 52OmpA2-infected cells (Fig. 1B). IL-8 levels induced

by 52OmpA2Com- and 52145- Δwca_{K2} ompACom-complemented strains of 52OmpA2 and 52145- Δwca_{K2} , respectively, were not significantly different from those triggered by Kp52145 and 52145- Δwca_{K2} , hence indicating that the absence of OmpA is responsible for the induction of IL-8 secretion by OmpA mutants. For the sake of comparison, IL-8 levels induced by 52OmpA2 and 52145- Δwca_{K2} ompA were compared in a time course experiment (Fig. 1C). At all time points, 52145- Δwca_{K2} ompA-infected cells secreted higher levels of IL-8 than 52OmpA2-infected ones. *ompA* mutants also induced higher levels of IL-8 than parental strains in normal human bronchial cells (Fig. 1D). At 8 h postinfection, *ompA* mutants induced higher levels of IL-8 than the parental strains, 52145- Δwca_{K2} ompA being the strain inducing the highest levels. Both mutants were complemented (Fig. 1D). Collectively, these data show that CPS and OmpA are bacterial factors required to reduce the secretion of IL-8 by airway epithelial cells upon *K. pneumoniae* infection.

Control experiments revealed that the adhesion and internalization to cells were not significantly different between each *ompA* mutant and its corresponding parental strain (Fig. 1E). As reported previously (43, 44), strains lacking CPS adhered and were internalized in higher numbers than CPS-expressing strains (for each comparison between CPS-expressing and CPS-negative strains, $p < 0.05$ (one-tailed Student's *t* test) (Fig. 1E).

***ompA* Mutant Attenuates IL-1 β -induced IL-8 Secretion**—Recently, we have shown that Kp52145 attenuates proinflammatory mediator-induced IL-8 secretion (45). This process requires bacteria-cell contact, and removal of bacteria by washing followed by 1-h gentamicin treatment rendered cells responsive to agonist-induced IL-8 secretion (45). To exert this anti-inflammatory effect, Kp52145 up-regulates the expression of the deubiquitinase CYLD and the phosphatase MKP-1 (DUSP1) in a NOD1-dependent manner (45). To explore whether OmpA could account for the Kp52145 anti-inflammatory effect, we determined the effect of 52OmpA2 on IL-1 β -induced IL-8 secretion by A549 cells using the assay that we have described (45). Similarly to Kp52145, 52OmpA2 did attenuate IL-1 β -induced IL-8 secretion (Fig. 2A). Furthermore, Western blot analysis revealed that 52OmpA2 induced the expression of CYLD and MKP-1 (Fig. 2B). This was dependent on NOD1 because 52OmpA2 did not increase the expression of CYLD and MKP-1 in NOD1 knockdown cells (Fig. 2C).

***K. pneumoniae ompA* Mutant Induces Higher Levels of Cytokines than Wild-type Strain in Vivo**—We investigated whether 52OmpA2 induces higher levels of cytokines than Kp52145 in the lungs of infected mice. Mice were infected intranasally and euthanized at different time points. Whole lungs were dissected, and the expressions of *kc*, *tnf α* , and *il6* were measured by RT-qPCR at 6, 12, and 24 h postinfection (Fig. 3). Levels of *kc*, *tnf α* , and *il6* were higher in lungs of infected mice than in lungs of non-infected animals ($p < 0.05$ for all comparisons versus non-infected mice (one-tailed Student's *t* test)) (Fig. 3). However, levels of *kc* were higher in lungs of mice infected with 52OmpA2 than in those infected with Kp52145 at all time points analyzed. 52OmpA2Com induced similar levels of *kc* than Kp52145. Only at 12 h postinfection, levels of *tnf α* were

K. pneumoniae *OmpA* Prevents Inflammation

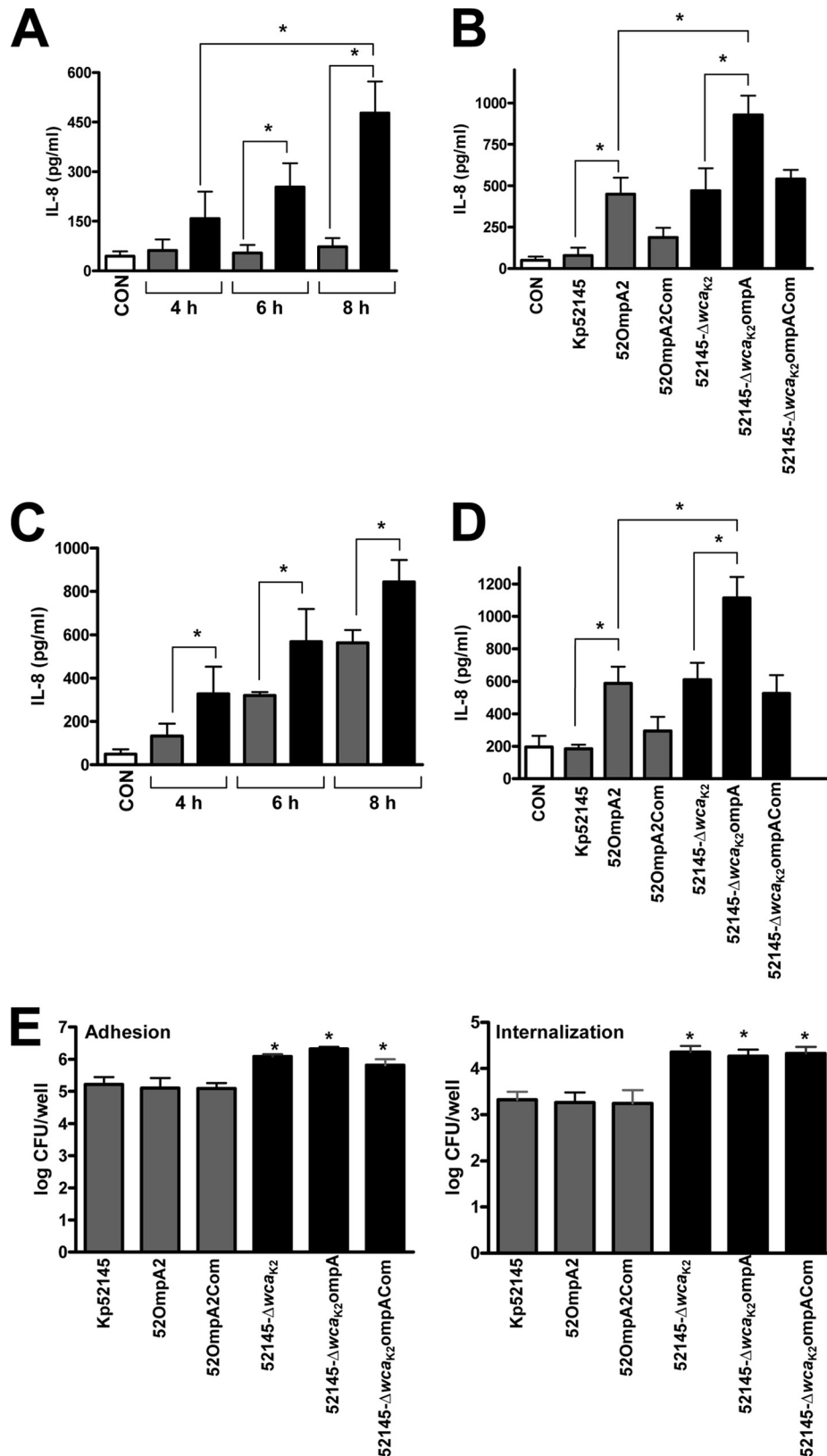


FIGURE 1. *K. pneumoniae* *ompA* mutants induce higher levels of IL-8 than wild-type strains by airway epithelial cells. A, ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON) or infected for different time points with Kp52145 (gray bars) and 52OmpA2 (black bars) ($n = 3$). B, ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON) or infected for 8 h with different *K. pneumoniae* strains ($n = 3$). C, ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON) or infected for different time points with 52OmpA2 (gray bars) and 52145-Δwca_{k2}ompA (black bars) ($n = 3$). D, ELISA of IL-8 released by NHBE cells left untreated (CON) or infected for 8 h with different *K. pneumoniae* strains ($n = 3$). E, adhesion (left) and internalization (right) of *Klebsiella* strains to A549 cells ($n = 3$). Gray bars, CPS-expressing strains; black bars, CPS negative strains. The data (A–E) are means and S.E. (error bars). A–D, *, $p < 0.05$ (for the indicated comparisons; one-way ANOVA). E, *, $p < 0.05$ (results are significantly different from the results for Kp52145; one-tailed t test).

significantly different between Kp52145- and 52OmpA2-infected mice. At 12 and 24 h postinfection, levels of *il6* were higher in lungs of mice infected with 52OmpA2 than in those infected with Kp52145. Levels of *il6* were not significantly different between mice infected with Kp52145 and animals infected with 52OmpA2Com at all time points. In summary, these data show that OmpA plays a role *in vivo* contributing to reduce host inflammatory responses.

Activation of NF- κ B Is Required for *K. pneumoniae* ompA Mutant-induced IL-8 Expression—We next aimed to identify the signaling pathways activated by the *ompA* mutant to induce an inflammatory response. Several studies show that NF- κ B participates in the inducible expression of genes involved in the inflammatory response, including IL-8 (46). Therefore, we analyzed the effect of 52OmpA2 on the NF- κ B activation pathway by studying the activation of a reporter construct controlled by synthetic NF- κ B response elements. A549 cells were transiently

transfected with a NF- κ B-dependent luciferase reporter followed by infection, and infection-induced NF- κ B activation was measured as relative luciferase activity (Fig. 4A). In contrast to Kp52145, 52OmpA2 induced the activation of the reporter construct. Complemented strain 52OmpA2Com induced a NF- κ B-dependent luciferase activity similar to Kp52145-infected cells. Supporting previous findings (22, 32), 52145- Δwca_{K2} induced the reporter construct, which was further induced by 52145- Δwca_{K2} ompA (Fig. 4A). Complementation of the mutant, strain 52145- Δwca_{K2} ompACom, restored NF- κ B-dependent luciferase activity to 52145- Δwca_{K2} -induced levels (Fig. 4A).

Upon cellular stimulation, in the canonical pathway of NF- κ B activation, I κ B α , which is normally present in the cytosol complexed to NF- κ B dimers preventing nuclear translocation, becomes phosphorylated, leading to its ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome, thereby allowing nuclear translocation of NF- κ B, a process linked to phosphorylation of the p65 subunit (47). We analyzed the levels of phosphorylated p65 by Western blot. At 60 min postinfection, phosphorylated p65 was detected in extracts from infected cells (Fig. 4B). However, these levels were higher in 52OmpA2-infected cells than in Kp52145-infected ones. Complementation of the mutant restored phosphorylated p65 levels to those of Kp52145-infected cells (Fig. 4B). I κ B α levels in cytoplasmic extracts were analyzed by immunoblot. I κ B α degradation was apparent in extracts from cells infected with 52OmpA2 already 15 min postinfection, and it was still apparent at 90 min postinfection. In contrast, I κ B α degradation was only detected at 15 and 30 min postinfection in extracts from Kp52145-infected cells, and at later time points, I κ B α levels were similar to those of non-infected cells. For the sake of comparison, the levels of I κ B α in cell extracts infected with the CPS mutants were also analyzed. In 52145- Δwca_{K2} ompA-infected cells, I κ B α degradation was clearly detected at 15 min postinfection, and it was almost total at 90 min postinfection. I κ B α degradation in 52145- Δwca_{K2} -infected cells was apparent at 30 min postinfection and was still detected at 90 min postinfection.

To determine the contribution of NF- κ B activation to *ompA* mutant-induced IL-8 expression, we asked whether CAPE, a chemical inhibitor used to block the NF- κ B signaling pathway (48), alters infection-induced IL-8 expression. As shown in Fig. 4D, CAPE (15 μ g/ml) reduced 52OmpA2- and 52145-

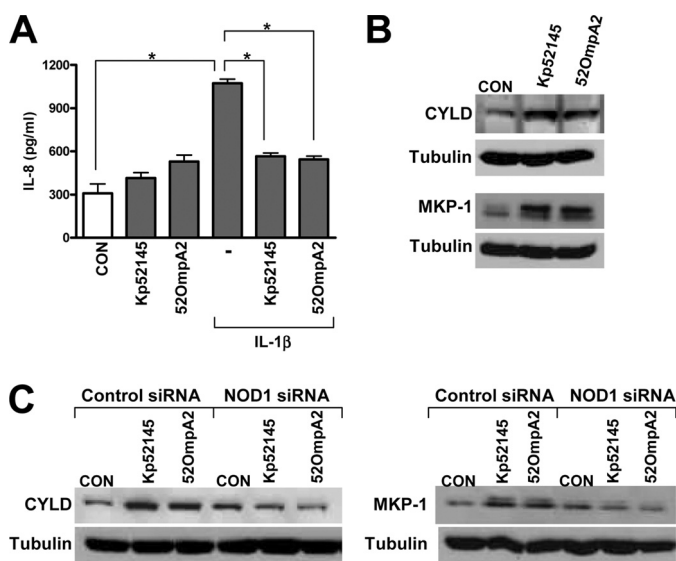


FIGURE 2. *K. pneumoniae* ompA attenuates IL-1 β -induced IL-8 expression. A, ELISA of IL-8 released by A549 left untreated (CON) or infected for 1 h with Kp52145 or 52OmpA2 and then stimulated with IL-1 β (50 ng/ml) for 2 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$ (for the indicated comparisons; one-way ANOVA). B, immunoblot analysis of CYLD, MKP-1, and tubulin levels in A549 cells left uninfected (CON) or infected with Kp52145 or 52OmpA2 for 3 h. Data are representative of three independent experiments. C, immunoblot analysis of CYLD, MKP-1, and tubulin levels in A549 cells transfected with either control or NOD1 siRNA, which were left uninfected (CON) or infected with Kp52145 or 52OmpA2 for 3 h. Data are representative of three independent experiments.

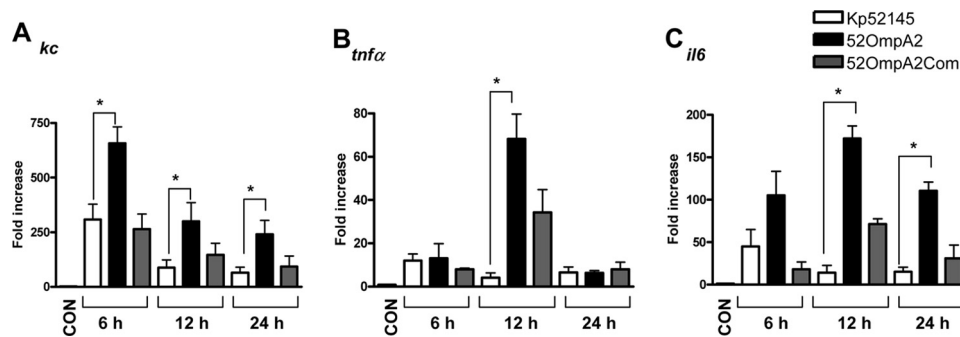


FIGURE 3. Proinflammatory cytokine expressions in mice lungs after *K. pneumoniae* infections. Mice were non-infected (white bars, $n = 5$) or infected with wild-type *K. pneumoniae* 52145 (black bars, $n = 15$), 52OmpA2 (black bars; $n = 15$), or 52OmpA2Com (gray bars; $n = 15$). *kc* (A), *tnfa* (B), and *il6* (C) mRNA expressions in whole lungs at the indicated time points postinfection were assessed by RT-qPCR (5 mice/time point). Bars, mean \pm S.E. (error bars). *, $p < 0.05$ (for the indicated comparisons; one-way ANOVA).

K. pneumoniae OmpA Prevents Inflammation

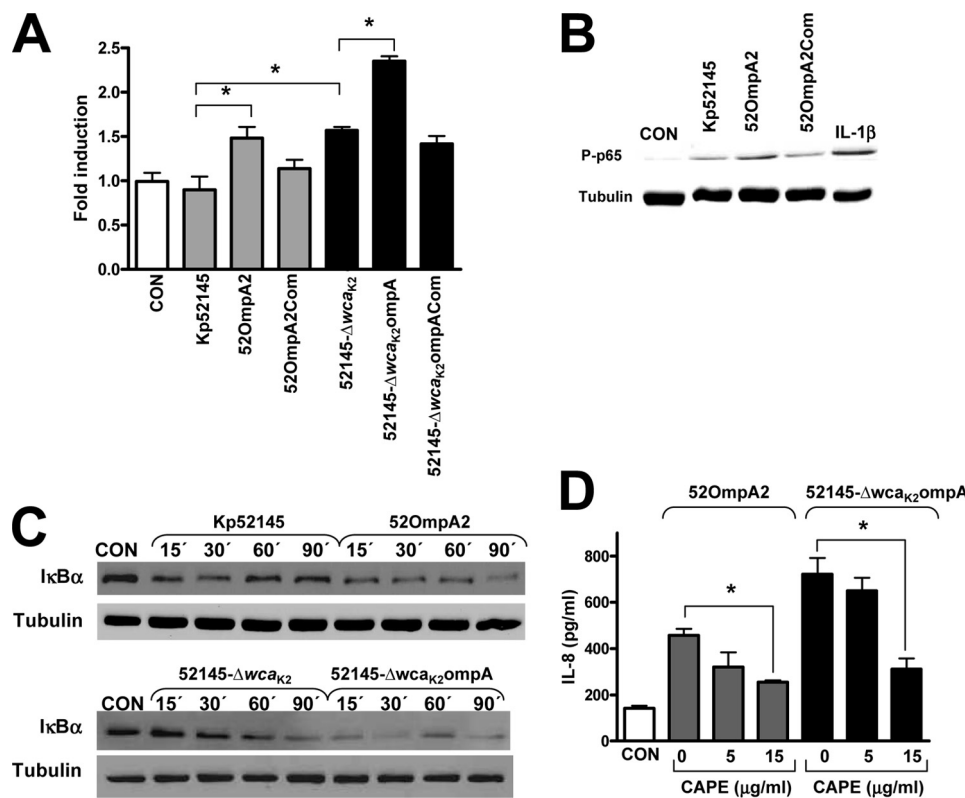


FIGURE 4. Activation of NF- κ B is required for *K. pneumoniae* ompA mutant-induced IL-8 expression. *A*, activation of a NF- κ B luciferase reporter plasmid in A549 cells left untreated (CON) or infected for 8 h with *K. pneumoniae* strains. Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to the cells untreated ($n = 3$). *, $p < 0.05$ (for the indicated comparisons; one-way ANOVA). *B*, immunoblot analysis showing phospho-p65 and tubulin levels in lysates of A549 infected with *K. pneumoniae* strains for 90 min IL-1 β (20 ng/ml for 30 min) was used as a positive control for NF- κ B activation. The results are representative of three independent experiments. *C*, immunoblots of I κ B α and tubulin levels in lysates of A549 cells left untreated (CON; time 0) or infected for different time periods with *K. pneumoniae* strains. Data are representative of three independent experiments. *D*, ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON; white bar) or infected for 6 h with 52OmpA2 (gray bars) or 52145- Δ wca_{K2}ompA (black bars) in the absence or presence of different concentrations of CAPE, an inhibitor of NF- κ B, which was added 1 h before infecting the cells and kept until the end of the experiment ($n = 3$). The data (*A* and *C*) are means and S.E. (error bars).

Δ wca_{K2}ompA-triggered IL-8 levels. Control experiments showed that addition of DMSO (the solvent used for CAPE) to either 52OmpA2- or 52145- Δ wca_{K2}ompA-infected cells did not affect IL-8 levels (in the absence of DMSO, 457 \pm 28 and 721 \pm 70 pg/ml, respectively; in the presence of DMSO, 490 \pm 35 and 747 \pm 64 pg/ml, respectively). CAPE-treated cells (15 μ g/ml) expressed levels of IL-8 (110 \pm 85 pg/ml) similar to those of non-treated cells (97 \pm 50 pg/ml).

Collectively, these data demonstrated that I κ B α -dependent activation of NF- κ B is required for ompA induction of IL-8 expression in A549 cells. Moreover, CPS and OmpA contribute to limit the activation of the canonical NF- κ B signaling pathway.

Activation of MAPKs Is Required for *K. pneumoniae* ompA Mutant-induced IL-8 Expression—In addition to the NF- κ B signaling cascade, many cellular stimuli also activate MAPK pathways (49). The activation of the three MAPKs p38, JNK, and p44/42 occurs through phosphorylation of serine and threonine residues. We sought to determine the phosphorylation levels of the three MAPKs in 52OmpA2-A549-infected cells. Western blot analysis shown in Fig. 5A revealed that infection with 52OmpA2 triggered the phosphorylation of the three MAPKs. Phosphorylation of the three MAPKs occurred at earlier time points in 52OmpA2-infected cells than in Kp52145-infected ones. MAPKs phosphorylation levels were also studied

in 52145- Δ wca_{K2}ompA- and 52145- Δ wca_{K2}-infected cells. In 52145- Δ wca_{K2}ompA-infected cells, phosphorylation of p38 was apparent at 30 min postinfection and maximum levels were observed at 120 min postinfection, whereas in 52145- Δ wca_{K2}-infected cells, p38 phosphorylation was apparent at 60 min postinfection, and maximum levels were observed at 120 min postinfection. No clear differences in the phosphorylation of p44/42 were observed between 52145- Δ wca_{K2}ompA- and 52145- Δ wca_{K2}-infected cells. In 52145- Δ wca_{K2}ompA-infected cells, maximum levels of phosphorylated JNK were observed at 30 min postinfection, whereas in 52145- Δ wca_{K2}-infected cells, phosphorylation of JNK was apparent at 30 min postinfection, and maximum levels were observed at 120 min postinfection.

To explore whether the activation of MAPKs is involved in 52OmpA2-induced IL-8 expression, infections were carried out in the presence of chemical inhibitors for each MAPK. Fig. 5B shows that SB203580, a specific inhibitor of p38 MAPK, reduced 52OmpA2-induced IL-8 expression. The p44/42 inhibitor, U0126, also reduced 52OmpA2-dependent IL-8 expression but only at the highest dose tested (Fig. 5C). Finally, SP600125, a JNK inhibitor, did not alter 52OmpA2-induced IL-8 expression (Fig. 5B). We sought to determine whether activated MAPKs are involved in 52145- Δ wca_{K2}ompA-triggered IL-8 levels. SB203580 and U0126 at the highest dose tested also reduced 52145- Δ wca_{K2}ompA-induced IL-8 expression,

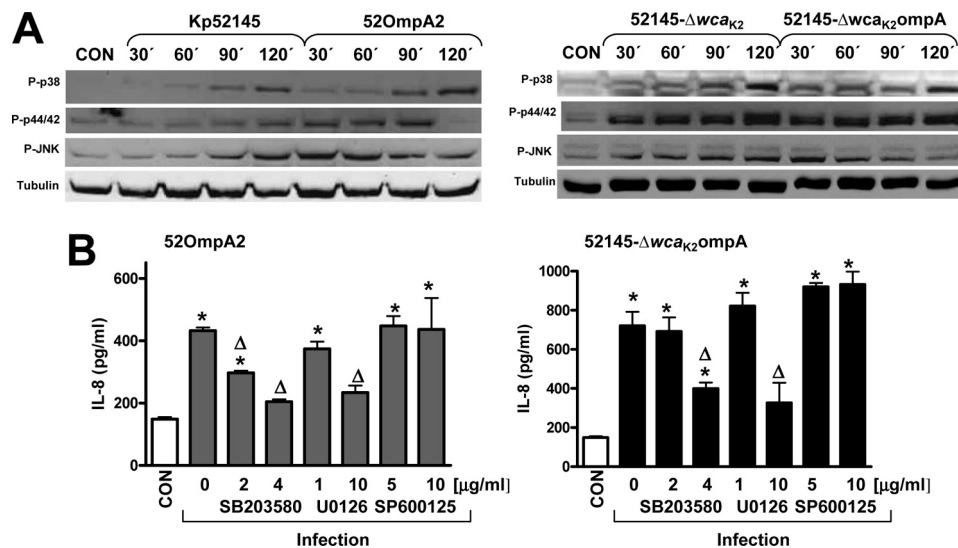


FIGURE 5. Activation of MAPKs is required for *K. pneumoniae* ompA mutant-induced IL-8 expression. *A*, immunoblots showing phospho-p38 (*P-p38*), phospho-p44/42 (*P-p44/42*), phospho-JNK (*P-JNK*), and tubulin levels in cell extracts of A549 cells left uninfected (CON; time 0) or infected with *K. pneumoniae* strains for different times. The results are representative of three independent experiments. *B*, ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON; white bar) or infected for 6 h with either 52OmpA2 (gray bars) or 52145-Δwca_{K2}ompA (black bars) in the absence or presence of different concentrations of SB203580 (2 and 4 μg/ml; p38 MAPK inhibitor), U0126 (1 and 10 μg/ml; p44/42 MAPK inhibitor), or SP600125 (5 and 10 μg/ml; JNK MAPK inhibitor), which were added 2 h before infecting the cells and kept until the end of the experiment (*n* = 3). The data (*B*) are means and S.E. (error bars). *, *p* < 0.05 (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA). Δ, *p* < 0.05 (results are significantly different from the results for infected cells in the absence of inhibitor).

whereas SP600125 did not reduce IL-8 levels (Fig. 5*B*). SB203580-, U0126-, and SP600125-treated cells secreted similar amounts of IL-8 (120 ± 95, 95 ± 67, and 135 ± 87 pg/ml, respectively) as non-treated cells (130 ± 75 pg/ml). Taken together, these findings indicate that the activation of MAPKs p38 and p44/42 is involved in *K. pneumoniae* ompA mutant-induced expression of IL-8 in A549 cells.

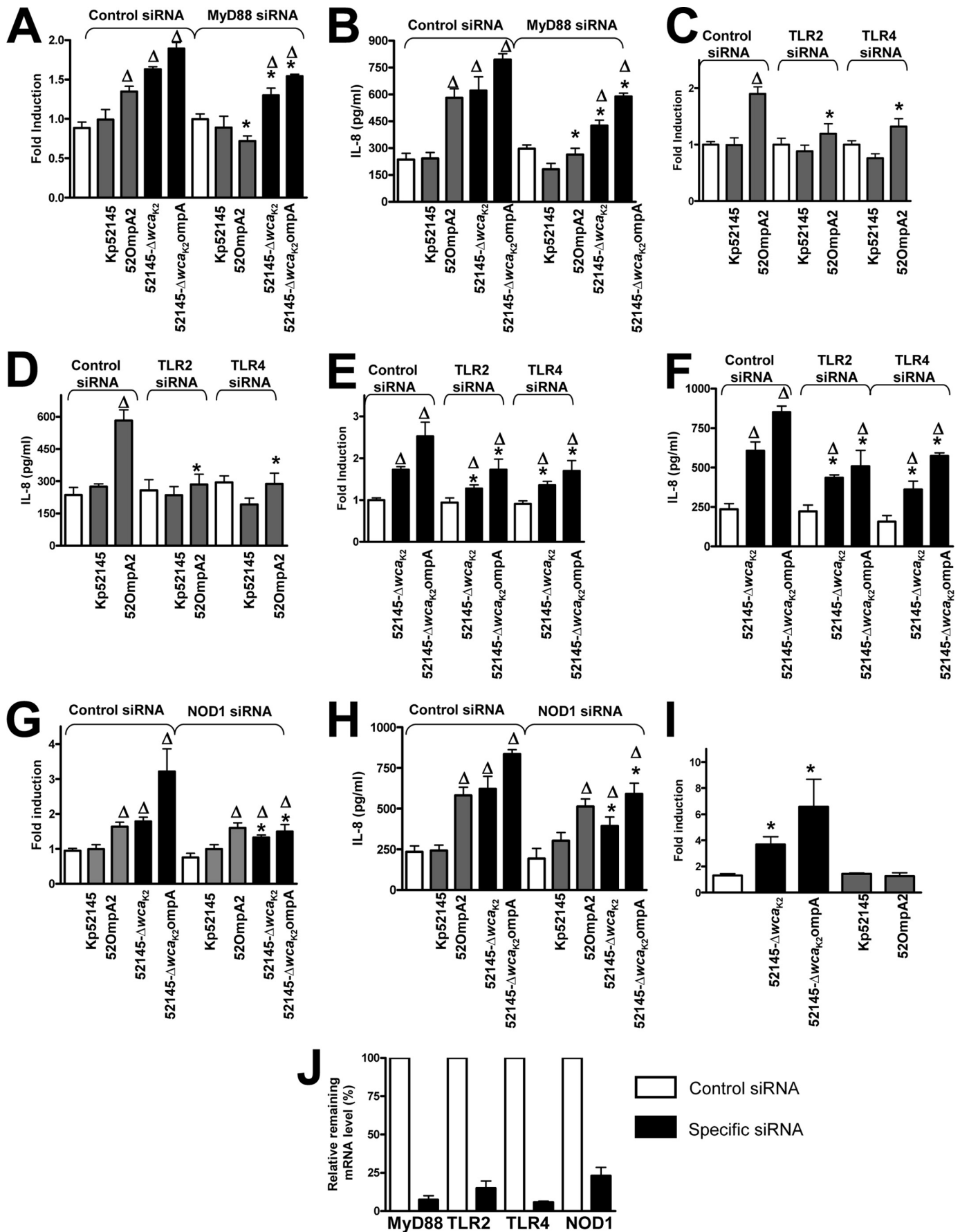
Dissection of Host Cell Receptors Required for Activation of Inflammatory Responses by *K. pneumoniae* ompA Mutant Strains—PRRs have a central role in pathogen recognition by airway epithelial cells leading to the activation of NF-κB- and MAPK-dependent signaling pathways; we therefore investigated the involvement of PRRs in recognition of *K. pneumoniae* ompA mutants by using as cellular read-outs the activation of NF-κB and the secretion of IL-8. Almost all TLRs activate cellular signaling pathways through TIR domain-mediated interactions with the adaptor molecule MyD88 (50). To explore the involvement of TLRs in ompA mutant-induced cell activation, the function of the MyD88 adaptor molecule was interrupted by siRNA. In MyD88 knocked down cells, 52OmpA2 induced neither the activation of the NF-κB reported construct nor the secretion of IL-8 (Fig. 6, *A* and *B*, respectively). 52145-Δwca_{K2}ompA still activated the NF-κB reported construct and induced the secretion of IL-8, although the levels were significantly lower than those of infected cells transfected with control siRNA (Fig. 6, *A* and *B*). Similar results were obtained when cells were infected with 52145-Δwca_{K2} (Fig. 6, *A* and *B*). To further dissect the contribution of TLR-dependent signaling to ompA mutant-induced cell activation, TLR2 and TLR4 were knocked down by siRNA. Results shown in Fig. 6, *C–F*, indicate that both receptors contributed to 52OmpA2- and 52145-Δwca_{K2}ompA-induced cell activation. However, 52145-Δwca_{K2}ompA still triggered the activation of NF-κB and

induced the secretion of IL-8 in TLR knocked down cells (Fig. 6, *E* and *F*, respectively). On the whole, these data suggest that 52OmpA2-induced NF-κB activation and IL-8 secretion is mediated by the TLR4-TLR2-MyD88 pathway and that 52145-Δwca_{K2}ompA may also activate additional MyD88-independent signaling pathway(s).

Another PRR constitutively expressed by airway epithelial cells is NOD1 (51–54), and its engagement also results in the activation of NF-κB and MAPK signaling cascades (53). This led us to explore whether NOD1 contributes to 52145-Δwca_{K2}ompA-induced cell activation by using siRNA to knock down its expression. As shown in Fig. 6, *G* and *H*, there was a reduction in 52145-Δwca_{K2}ompA-triggered NF-κB activation and IL-8 secretion in NOD1 knockdown cells compared with those found in control siRNA-treated cells. Similar results were obtained when cells were infected with 52145-Δwca_{K2} (Fig. 6, *G* and *H*). 52OmpA2-induced NF-κB activation and IL-8 secretion in NOD1 knockdown cells were similar to those found in control siRNA-treated cells (Fig. 6, *G* and *H*). In contrast to Kp52145 and 52OmpA2, 52145-Δwca_{K2}ompA and 52145-Δwca_{K2} did trigger NF-κB-dependent reporter activity in NOD1-expressing HEK293T cells (Fig. 6*I*). Altogether, these data indicate that the other signaling pathway engaged by 52145-Δwca_{K2}ompA to activate NF-κB and induce IL-8 secretion is NOD1-dependent. The efficiency of siRNA-mediated down-regulation of target gene mRNA levels was confirmed by RT-qPCR (Fig. 6*J*).

Virulence of *K. pneumoniae* ompA Mutant—To determine the ability of 52OmpA2 to cause pneumonia, C57BL/6J OlaHsd mice were infected intranasally, and 24 and 96 h postinfection, bacterial loads in trachea and lung homogenates were determined. At 24 h postinfection, Kp52145 and 52OmpA2 colonized trachea and lungs, although bacterial loads of 52OmpA2

K. pneumoniae *OmpA* Prevents Inflammation



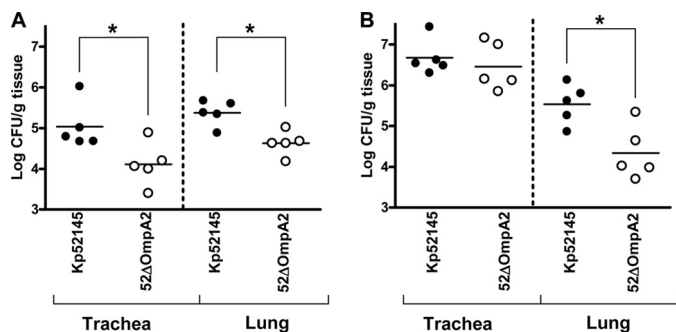


FIGURE 7. **Bacterial counts in mouse organs at 24 h postinfection (A) or 96 h postinfection (B).** Mice were infected intranasally with a bacterial mixture containing 5×10^4 bacteria of wild type (Kp52145) (●) or *ompA* mutant (52OmpA2) (○). Results were reported as log cfu/g of tissue. *, results are significantly different ($p < 0.05$; one-tailed *t* test) from the results for Kp52145.

were lower than those of the wild type (Fig. 7A). At 96 h postinfection, an increase of bacterial loads was found in tracheas (Fig. 7, compare A and B) that were not significantly different between both strains (Fig. 7B). In contrast, bacterial loads of 52OmpA2 in lungs were significantly lower than those of the wild-type strain (Fig. 7B).

DISCUSSION

In this study, we provide new insights into the role of OmpA as a virulence factor. Our findings revealed that *K. pneumoniae* OmpA plays a role in the progression of the infection and that it is important for immune evasion. Thus, we show that the *K. pneumoniae ompA* mutant, strain 52OmpA2, induces higher levels of inflammatory mediators than the wild-type strain *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically, we present evidence showing that 52OmpA2 activates NF- κ B-dependent and MAPK p38- and p44/42-dependent signaling pathways. In addition, *ompA* mutant induction of inflammatory responses is dependent on TLR2-TLR4-MyD88 activation. Finally, we demonstrate that the *ompA* mutant is attenuated in the pneumonia mouse model.

Innate immune responses, particularly inflammation, are essential for effective lung defense against pathogens. To activate these responses, the host recognizes conserved molecules uniquely expressed by pathogens, the so-called PAMPs, which are characterized by being expressed among entire classes of pathogens, are important for the survival/virulence of the pathogen, and are distinguishable from “self.” These PAMPs are also targeted by weapons of the innate system with antibacterial properties, such as antimicrobial peptides and the complement system. In turn, many PAMPs play an important role in immune evasion by the pathogen. Our findings, together

with others, give support to the notion that *K. pneumoniae* OmpA should be considered a *bona fide* PAMP. OmpA is targeted by neutrophil elastase and serum amyloid protein A, hence leading to cell death and increased bacterial phagocytosis, respectively (7–9). However, OmpA protects bacteria against the bactericidal action of lung collectins and antimicrobial peptides (6, 39), and here we have shown that it acts as immune evasin. On the whole, this evidence points out that an essential attribute of *K. pneumoniae* OmpA is to thwart the innate immune system.

Other studies have shown that recombinant purified *K. pneumoniae* OmpA induces the expression of proinflammatory molecules in various cell types, including airway epithelial cells (for a review, see Ref. 36). Hence, it has been postulated that recognition of OmpA contributes to the activation of host responses leading to the clearance of *K. pneumoniae* (36). Given that in this work we used a bacterial mutant instead of a recombinant protein, our data, far from challenging these findings, shed new light on OmpA functions in its physiological context, the OM. In fact, we emphasize that care should be taken to extrapolate findings obtained using purified products to the outcome of an infection process and that using whole live bacteria is a more likely *in vivo* scenario. It should be noted that the *ompA* mutant strain was shown to induce more inflammation *in vivo* and *in vitro* than the wild-type strain. Interestingly, and in agreement with our findings, *E. coli ompA* mutant strain induces higher expression of proinflammatory mediators than the wild type *in vitro* (55).

Recently, we have demonstrated that *K. pneumoniae* counteracts the activation of inflammatory responses by inducing the deubiquitinase CYLD and the phosphatase MKP-1 (DUSP1) in a NOD1-dependent manner (45). This action was strictly dependent on bacteria-cell contact (45). Furthermore, bacterial removal by gentamicin treatment rendered cells again responsive to proinflammatory mediators (45). Considering that CPS was necessary but not sufficient to attenuate inflammation (45), in this work we asked whether OmpA could mediate this attenuation. However, findings shown in Fig. 2 do not support this. These results do not contradict the other findings reported in this work showing that 52OmpA2 does activate inflammatory responses. It should be noted that in most experiments of this study, gentamicin is used to remove bacteria after 2 h of infection, and, for example, IL-8 in the supernatants is measured at 4 or 6 h postinfection. In turn, the fact that 52OmpA2-induced responses were dependent on TLR2-TLR4-MyD88 activation suggests that OmpA, together with CPS, perturbs TLR-dependent recognition of *K. pneumoniae*.

FIGURE 6. **Role of MyD88, TLR2, TLR4, and NOD1 in *K. pneumoniae ompA* mutant-induced cell activation.** A, C, E, and G, activation of an NF- κ B luciferase reporter plasmid in A549 cells transfected with either control or the indicated siRNA for different pattern recognition receptors, which were left untreated (white bars) or infected for 8 h with different strains. Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to the cells untreated ($n = 3$). B, D, F, and H, ELISA of IL-8 released by A549 cells transfected with either control or the indicated siRNA for different pattern recognition receptors, which were left untreated (white bars) or infected for 8 h with different strains ($n = 3$). I, activation of an NF- κ B luciferase reporter plasmid in HEK293T cells transfected with HA-NOD1 plasmid, which were left untreated (white bar) or infected with the indicated strains for 8 h. Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to untreated cells (data are means and S.E. (error bars); $n = 3$). J, siRNA efficiency was quantified by RT-qPCR in samples from the same experiment shown in A–H. mRNA level was normalized to GAPDH, and then relative mRNA levels in cells transfected with control siRNA or specific siRNA were compared. mRNA levels in cells transfected with control siRNA were set to 100% (data are means and S.E.; $n = 3$). Gray bars, CPS-expressing strains; black bars, CPS-negative strains. A–H, Δ , $p < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA); *, $p < 0.05$ (results are significantly different from those for transfected cells with control siRNA infected with the same strain). I, *, $p < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA).

K. pneumoniae OmpA Prevents Inflammation

On the whole, this evidence is consistent with a model in which the reduced inflammatory response characteristic of *K. pneumoniae* infections is the sum of prevention of TLR-dependent recognition of *Klebsiella* (mediated at least by CPS and OmpA) and the anti-inflammatory effect (*K. pneumoniae* effectors yet to be identified) recently described (45).

Our findings further sustain the notion that airway epithelial cells orchestrate a defense response upon pathogen challenge by activating NF- κ B- and MAPK-dependent signaling pathways (56). In fact, activation of these pathways seems to be a central event of pathogen-exposed epithelial cells lining mucosal surfaces. Interestingly, this is true regardless of the tissue local environment, either constantly exposed to microbes, like the intestinal tract, or essentially sterile, like the urinary and respiratory tracts. Although p38 and p44/42 MAPKs were required for *ompA* mutant strain-induced IL-8, the mutants also activated JNK MAPK, hence suggesting that there may be additional host cell responses activated in a JNK MAPK-dependent manner. Future studies will aim to identify these responses.

The *ompA* mutant strains tested in this study engaged different PRRs, depending on the expression of CPS on their surfaces. Strain 52OmpA2, expressing CPS, engaged TLR2 and TLR4, whereas strain 52145- Δwca_{K2} ompA, lacking CPS, activated not only TLR2 and TLR4 but also NOD1. These and our previous findings implicating TLR2 and TLR4 in the recognition of a *K. pneumoniae* CPS mutant (22, 32) suggest that TLR-mediated recognition of *K. pneumoniae* is a key event for the induction of host defense responses against this pathogen. Supporting this, MyD88- and TLR4-dependent responses are essential for successful mouse defense against *K. pneumoniae* pneumonia (29, 30). Our results implicate NOD1 in the recognition of *K. pneumoniae* CPS mutants, strains 52145- Δwca_{K2} ompA (this work) and 52145- Δwca_{K2} (this work and Ref. 22). Taking into account that *K. pneumoniae* CPS mutants are internalized by epithelial cells (43, 44), a NOD1-dependent recognition is consistent with the idea that this PRR participates in the recognition of internalized pathogens (53, 57, 58). Intracellular 52145- Δwca_{K2} ompA and 52145- Δwca_{K2} reside in vacuoles displaying features of acidic late endosomes,⁴ thereby raising the question of how bacteria that do not reach the cytosol could activate NOD1. However, recent studies indicate that there is a link between endosomal acidification/maturation and NOD-dependent responses (59–61). Furthermore, data indicate that bacterial products are actively transported from the phagosome to the cytosol to engage NOD receptors (59–61).

Here, we demonstrate for the first time, using a pneumonia mouse model, that OmpA is important for bacterial survival in the lung. Research over the last 20 years has demonstrated a correlation between activation of inflammatory responses and *Klebsiella* clearance from the airways (26–28). Hence, the higher inflammatory response induced by 52OmpA2 may contribute to the mutant's clearance. The *in vivo* scenario is complex, and the final outcome of pneumonia is the combination of the action of antimicrobial factors (among others complement

and antimicrobial peptides) and several types of cells, including alveolar macrophages, epithelial cells, and neutrophils. It should be noted that cytokines and chemokines released by epithelial cells do increase the bactericidal activity of professional phagocytes. Studies are ongoing to determine whether OmpA plays any role in the interaction of *K. pneumoniae* with alveolar macrophages and neutrophils.

Finally, it is worthwhile commenting on the clinical implications of our findings. We put forward the idea that compounds directed to block OmpA may be new promising therapeutic molecules to treat infections caused by Gram-negative bacteria, at least those caused by *Klebsiella*. Data from our laboratory suggest that these compounds will render bacteria susceptible to the bactericidal elements of the innate immune system (39) and will also increase TLR-mediated defense responses (this work). Both actions should facilitate the clearance of the pathogen from the airways, which might be further enhanced with the aid of antibiotics.

Acknowledgments—We are grateful to members of the Bengoechea laboratory for helpful discussions and Christian Frank for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Lin, J., Huang, S., and Zhang, Q. (2002) *Microbes Infect.* **4**, 325–331
2. Pautsch, A., and Schulz, G. E. (2000) *J. Mol. Biol.* **298**, 273–282
3. Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Weiser, J. N., Stins, M. F., Huang, S. H., and Kim, K. S. (1996) *Infect. Immun.* **64**, 146–153
4. Sukumaran, S. K., Shimada, H., and Prasadarao, N. V. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 5951–5961
5. Prasadarao, N. V., Blom, A. M., Villoutreix, B. O., and Linsangan, L. C. (2002) *J. Immunol.* **169**, 6352–6360
6. Wu, H., Kuzmenko, A., Wan, S., Schaffer, L., Weiss, A., Fisher, J. H., Kim, K. S., and McCormack, F. X. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 1589–1602
7. Belaouaj, A., Kim, K. S., and Shapiro, S. D. (2000) *Science* **289**, 1185–1188
8. Hari-Dass, R., Shah, C., Meyer, D. J., and Raynes, J. G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 18562–18567
9. Shah, C., Hari-Dass, R., and Raynes, J. G. (2006) *Blood* **108**, 1751–1757
10. Mogensen, T. H. (2009) *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–273
11. Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B., and Suttrop, N. (2006) *Respir. Res.* **7**, 97
12. Craig, A., Mai, J., Cai, S., and Jeyaseelan, S. (2009) *Infect. Immun.* **77**, 568–575
13. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002) *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847–855
14. Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009) *Biochem. J.* **420**, 1–16
15. Medzhitov, R. (2007) *Nature* **449**, 819–826
16. Chamailard, M., Girardin, S. E., Viala, J., and Philpott, D. J. (2003) *Cell Microbiol.* **5**, 581–592
17. Inohara, N., Chamailard, M., McDonald, C., and Nuñez, G. (2005) *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 355–383
18. Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 621–625
19. Sahly, H., and Podschun, R. (1997) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**, 393–399
20. Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llopart, C. M., Albertí, S., and Bengoechea, J. A. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 7107–7114
21. Merino, S., Camprubí, S., Albertí, S., Benedí, V. J., and Tomás, J. M. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 2529–2535
22. Moranta, D., Regueiro, V., March, C., Llobet, E., Margareto, J., Larrate, E., Garmendia, J., and Bengoechea, J. A. (2010) *Infect. Immun.* **78**, 1135–1146
23. Camprubí, S., Merino, S., Benedí, V. J., and Tomás, J. M. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 9–13
24. Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Saulea, J., and Albertí, S.

⁴ C. March and J. A. Bengoechea, unpublished data.

- (2002) *Infect. Immun.* **70**, 2583–2590
25. Lawlor, M. S., Hsu, J., Rick, P. D., and Miller, V. L. (2005) *Mol. Microbiol.* **58**, 1054–1073
 26. Greenberger, M. J., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Bramson, J., Gauldie, J., Graham, F. L., Hitt, M., Danforth, J. M., and Standiford, T. J. (1996) *J. Immunol.* **157**, 3006–3012
 27. Standiford, T. J., Wilkowski, J. M., Sisson, T. H., Hattori, N., Mehrad, B., Bucknell, K. A., and Moore, T. A. (1999) *Hum. Gene Ther.* **10**, 899–909
 28. Ye, P., Garvey, P. B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W. R., Schwarzenberger, P., Shellito, J. E., and Kolls, J. K. (2001) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 335–340
 29. Cai, S., Batra, S., Shen, L., Wakamatsu, N., and Jeyaseelan, S. (2009) *J. Immunol.* **183**, 6629–6638
 30. Schurr, J. R., Young, E., Byrne, P., Steele, C., Shellito, J. E., and Kolls, J. K. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 532–545
 31. Lawlor, M. S., Handley, S. A., and Miller, V. L. (2006) *Infect. Immun.* **74**, 5402–5407
 32. Regueiro, V., Campos, M. A., Pons, J., Albertí, S., and Bengoechea, J. A. (2006) *Microbiology* **152**, 555–566
 33. Jeannin, P., Renno, T., Goetsch, L., Miconnet, I., Aubry, J. P., Delneste, Y., Herbault, N., Baussant, T., Magistrelli, G., Soulas, C., Romero, P., Cerotini, J. C., and Bonnefoy, J. Y. (2000) *Nat. Immunol.* **1**, 502–509
 34. Jeannin, P., Magistrelli, G., Herbault, N., Goetsch, L., Godefroy, S., Charbonnier, P., Gonzalez, A., and Delneste, Y. (2003) *Eur. J. Immunol.* **33**, 326–333
 35. Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J. F., Hoeffel, G., Thieblemont, N., Corvaia, N., Garlanda, C., Delneste, Y., and Mantovani, A. (2005) *Immunity* **22**, 551–560
 36. Jeannin, P., Magistrelli, G., Goetsch, L., Haeuw, J. F., Thieblemont, N., Bonnefoy, J. Y., and Delneste, Y. (2002) *Vaccine* **20**, Suppl. 4, A23–A27
 37. Nassif, X., Fournier, J. M., Arondel, J., and Sansonetti, P. J. (1989) *Infect. Immun.* **57**, 546–552
 38. Llobet, E., Tomás, J. M., and Bengoechea, J. A. (2008) *Microbiology* **154**, 3877–3886
 39. Llobet, E., March, C., Giménez, P., and Bengoechea, J. A. (2009) *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 298–302
 40. Bitter, T., and Muir, H. M. (1962) *Anal. Biochem.* **4**, 330–334
 41. Rahn, A., and Whitfield, C. (2003) *Mol. Microbiol.* **47**, 1045–1060
 42. Regueiro, V., Moranta, D., Campos, M. A., Margareto, J., Garmendia, J., and Bengoechea, J. A. (2009) *Infect. Immun.* **77**, 714–724
 43. Cortés, G., Alvarez, D., Saus, C., and Albertí, S. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 1075–1080
 44. Sahly, H., Podschun, R., Oelschlaeger, T. A., Greiwe, M., Parolis, H., Hasty, D., Kekow, J., Ullmann, U., Ofek, I., and Sela, S. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 6744–6749
 45. Regueiro, V., Moranta, D., Frank, C. G., Larrarte, E., Margareto, J., March, C., Garmendia, J., and Bengoechea, J. A. (2011) *Cell Microbiol.* **13**, 135–153
 46. Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998) *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225–260
 47. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008) *Cell* **132**, 344–362
 48. Natarajan, K., Singh, S., Burke, T. R., Jr., Grunberger, D., and Aggarwal, B. B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9090–9095
 49. Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 55–72
 50. Kenny, E. F., and O'Neill, L. A. (2008) *Cytokine* **43**, 342–349
 51. Girardin, S. E., Tournebise, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 736–742
 52. Hisamatsu, T., Suzuki, M., and Podolsky, D. K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32962–32968
 53. Inohara, N., and Nuñez, G. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 371–382
 54. Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006) *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 9–20
 55. Selvaraj, S. K., and Prasadarao, N. V. (2005) *J. Leukoc. Biol.* **78**, 544–554
 56. Gribar, S. C., Richardson, W. M., Sodhi, C. P., and Hackam, D. J. (2008) *Mol. Med.* **14**, 645–659
 57. Girardin, S. E., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2002) *Trends Microbiol.* **10**, 193–199
 58. Kim, J. G., Lee, S. J., and Kagnoff, M. F. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 1487–1495
 59. Herskovits, A. A., Auerbuch, V., and Portnoy, D. A. (2007) *PLoS Pathog.* **3**, e51
 60. Lee, J., Tattoli, I., Wojtal, K. A., Vavricka, S. R., Philpott, D. J., and Girardin, S. E. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 23818–23829
 61. Marina-García, N., Franchi, L., Kim, Y. G., Hu, Y., Smith, D. E., Boons, G. J., and Nuñez, G. (2009) *J. Immunol.* **182**, 4321–4327

Anexo VII: Otros artículos publicados

A continuación se adjuntan otros artículos publicados en los que he participado

March C., Regueiro V., Llobet E., Moranta D., Morey P., Garmendia J., and Bengoechea J.A. 2010. Dissection of host cell signals transduction during *Acinetobacter baumannii* – triggered inflammatory response. *PLoSOne* 5(4): e10033

Moranta D., Regueiro V., March C., Llobet E., Margareto J., Larrate E., Gramendia J., and Bengoechea J.A. 2010. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of β -defensins by airway epithelial cells. *Infect. and Immun.* 78: 1135-1146

Regueiro V., Moranta D., Frank C.G., Larrate E., Margareto J., March C., Garmendia J., and Bengoechea J.A. 2011. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD-1-dependent manner. *Cell microbial.* 13: 135-153

López-Rojas R., Docobo-Pérez F., Pachón-Ibáñez M.E., de la Torre B.G., Fernández-Reyes M., March C., Bengoechea J.A., Andreu D., Rivas L., and Pachón J. 2011. Efficacy of cecropin A-melittin peptides on a sepsis model of infection by pan-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* DOI 10.1007/s10096-011-1233-y

Dissection of Host Cell Signal Transduction during *Acinetobacter baumannii* – Triggered Inflammatory Response

Catalina March^{1,2}, Verónica Regueiro^{1,2}, Enrique Llobet^{1,2}, David Moranta^{1,2}, Pau Morey^{1,2}, Junkal Garmendia^{1,2,3}, José A Bengoechea^{1,2,4,5*}

1 Program Infection and Immunity, Fundació Caubet-CIMERA Illes Balears, Bunyola, Spain, **2** Area Molecular Basis of Microbial Pathogenesis, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias, Bunyola, Spain, **3** Instituto de Agrobiotecnología, Pamplona, Spain, **4** Área de Microbiología, Facultad Biología, Universitat Illes Balears, Palma Mallorca, Spain, **5** Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

Abstract

Infected airway epithelial cells up-regulate the expression of chemokines, chiefly IL-8, and antimicrobial molecules including β -defensins (BD). *Acinetobacter baumannii* is a cause of hospital-acquired pneumonia. We examined whether *A. baumannii* induced the expressions of IL-8 and BD2 by airway epithelial cells and the receptors implicated in bacterial detection. A549 and human primary airway cells released IL-8 upon infection. *A. baumannii*-infected cells also increased the expression of BD2 which killed *A. baumannii* strains. IL-8 induction was via NF- κ B and mitogen-activated kinases p38 and p44/42-dependent pathways. *A. baumannii* engaged Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 pathways and A549 cells could use soluble CD14 as TLRs co-receptor. *A. baumannii* lipopolysaccharide stimulated IL-8 release by A549 cells and sCD14 facilitated the recognition of the lipopolysaccharide. Mass spectrometry analysis revealed that *A. baumannii* lipid A structure matches those with endotoxic potential. These results demonstrate that airway epithelial cells produce mediators important for *A. baumannii* clearance.

Citation: March C, Regueiro V, Llobet E, Moranta D, Morey P, et al. (2010) Dissection of Host Cell Signal Transduction during *Acinetobacter baumannii* – Triggered Inflammatory Response. PLoS ONE 5(4): e10033. doi:10.1371/journal.pone.0010033

Editor: Edgardo Moreno, Universidad Nacional, Costa Rica

Received: December 19, 2009; **Accepted:** March 12, 2010; **Published:** April 7, 2010

Copyright: © 2010 March et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been funded by a grant from Fondo de Investigacion Sanitaria (PI04/1854) to J.A.B. CIBERES is an initiative from Instituto de Salud Carlos III. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bengoechea@caubet-cimera.es

Introduction

Acinetobacter baumannii has been implicated in a variety of nosocomial infections being the pulmonary compartment the predominant site of infection [1]. The crude mortality of *A. baumannii* ventilator associated pneumonias is as high as 75% [2]. *A. baumannii* infections are extremely difficult to treat because of the widespread resistance of these bacteria to the major groups of antibiotics [1]. Despite the clinical relevance of *A. baumannii* there is little information on the virulence factors expressed by this pathogen [1].

Inflammatory response plays an essential role in lung defence against pathogens. This response includes, among others, the production of pro-inflammatory and chemoattractant cytokines [3–8]. In turn, chemokines are required for the recruitment of neutrophils into airways which is a common histological finding in patients with pneumonia, independently of the infecting microorganism [9]. Current evidence shows that IL-8 targets neutrophils to sites of attack through its chemoattractant and activating properties [10]. It has become evident that airway epithelial cells play a pivotal role in lung defense by detecting pathogens which leads to the expression of co-stimulatory molecules and the release of cytokines and chemokines that influence airway inflammation [11]. Airway epithelial cells also produce antimicrobial molecules being β -defensin (BD) 2 one of the most studied defensin [12,13].

The expression of BD2 by airway epithelial cells is induced by cytokines or by the presence of pathogens [14–17] and it has been shown that BD2 levels increase several folds in lung during pneumonia [18].

A wealth of evidence indicates that members of the Toll-like receptor (TLR) family are key receptors signaling the presence of pathogens to airway epithelial cells [11] being TLR2 and TLR4 the most extensively studied TLRs. While TLR4 seems to be mainly involved in the detection of lipopolysaccharide (LPS), TLR2 responds to a variety of products from gram positive bacteria [19–21].

It has been recently demonstrated that the release of pro-inflammatory mediators, chemokines and the recruitment of large number of neutrophils are essential for the clearance of *A. baumannii* within the lungs [22–24]. Furthermore, evidence shows that TLR4-dependent signaling plays an important role in sensing of *A. baumannii* *in vivo* because TLR4-deficient mice challenged with *A. baumannii* displayed an impaired lung inflammatory response [22]. Taken into account the important role of airway epithelial cells in orchestrating lung immunity, we hypothesized that airway epithelial cells would play a key role in sensing *A. baumannii* infections thereby leading to production of mediators necessary for the clearance of *A. baumannii*. In this study, we provide insight into the signaling pathways and receptors involved in sensing *A. baumannii* by human airway epithelial cells.

Materials and Methods

Bacterial strains, growth conditions and reagents

Non clonally related *A. baumannii* clinical isolates 1514, 670, 1064 and 1327, all of them resistant to cefotaxime, ceftazidime, imipenem, amoxicillin, amikacin, piperacillin-tazobactam, doxycycline, and colistin sulphate, were from the collection of *A. baumannii* strains at the “Virgen del Rocío” University Hospital, (Seville, Spain). *A. baumannii* strain ATCC 17978 was obtained from the ATCC. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) at 37°C.

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an NF- κ B inhibitor, and SB203580, a p38 MAPK inhibitor, were purchased from Sigma whereas U0126, a p44/42 MAPK inhibitor, and SP600125, a JNK inhibitor, were purchased from Calbiochem. Purified recombinant human sCD14 was purchased from R&D Systems.

Cell culture and infections

Monolayers of human lung carcinoma cells (A549, ATCC CCL185) and primary human airway epithelial cells (NHBE, Lonza) were grown as previously described [25]. 18 h before infection A549 cells were serum starved. Prior to the experiment, A549 and NHBE cells were washed twice with PBS. Overnight-grown bacteria were subcultured and grown to exponential phase, harvested by centrifugation (2000 \times g, 20 min, 5°C) and resuspended in PBS. Infections were performed using a multiplicity of infection of 100 bacteria per cell. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion and it was >95% even after 8 h post infection or after treatments with either CAPE, SB203580, U0126 or SP600125 for the times or concentrations used in this study.

IL-8 stimulation assay

Epithelial monolayers were infected for different time points. Supernatants were removed from the wells, cell debris removed by centrifugation, and samples were frozen at -80°C. IL-8 in the supernatants was determined by a commercial ELISA (Endogen) with a sensitivity <2 pg/ml. Experiments were run in duplicate and repeated at least three times.

Immunoblotting

Proteins from lysed cells (15 μ g) were separated by 10% SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose membrane and blocked with 4% skimmed milk in PBS. Immunostaining for I κ B α was performed with polyclonal rabbit anti- I κ B α antibody (Santa Cruz Biotechnology) whereas immunostainings to assess phosphorylation of NF- κ B p65, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) p38, p44/42 and JNK were performed with polyclonal rabbit anti-phospho p65, anti-phospho-p38 antibody, anti-phospho-p44/42 and anti-phospho-JNK antibodies respectively (Cell Signaling). Immunoreactive bands were visualized by incubation with swine anti-rabbit immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (Dako P0217) using the SuperSignal West-dura system (Pierce). Blots were reprobed with polyclonal antibody anti human tubulin to control that equal amounts of proteins were loaded in each lane.

Nuclear cytoplasmic fractionation

Nuclear and cytosolic proteins were extracted from approximately 5×10^6 cells as previously described [25]. Briefly, A549 cells were washed with ice-cold PBS and suspended in hypotonic buffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptin, 0.4 mM PMSF). The cells were left on ice for 15 min and cytosolic preparation was made by addition of Nonidet P-40 (final concentration of 0.1%) followed by centrifugation (6500

rpm, 3 min, 4°C). The supernatant was collected as the cytosolic fraction. The remaining pellet was resuspended in extraction buffer (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.1 mM PMSF) and incubated on ice for 20 min. with agitation. The nuclear proteins in the supernatant were recovered after centrifugation (12 000 \times g, 20 min, 4°C) to remove nuclear debris. Proteins present in extracts were quantified using the Coomassie protein assay (Pierce) referenced against a bovine serum albumin standard and stored in aliquots at -80°C. Extracts were used for western blot analysis using anti-NF- κ B p65 antibodies (Santa Cruz, SC372). The quality of the fractionation was confirmed using tubulin as a cytoplasmic marker and lamin A/C as a nuclear marker.

Transfections and luciferase assays

A549 cells were seeded into 24-well tissue culture plates to get a 40–60% confluence 24 h later. Cells were washed twice with PBS before transfection. Transfection experiments were carried out in 500 μ l of Opti-MEM Reduced-Serum Medium (Invitrogen) using LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent following manufacturer's recommendations (Invitrogen).

For luciferase experiments, the PathDetect[®] NF- κ B *cis*-Reporting plasmid (250 ng; Stratagene) or vector containing 5'-flanking region of human BD2 (1 μ g; [26]) were co-transfected with the pRL-TK *Renilla* Luciferase control reporter vector (20 ng; Promega). For luciferase assays, cells were lysed with Passive Lysis Buffer (Promega). Luciferase activity was assayed using the Dual Luciferase Assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega). Firefly luciferase values were normalized to *Renilla* control values. Results were plotted as Relative luciferase activity compared with activity measured in non stimulated control cells. The luciferase assay was carried out in triplicate on at least three independent occasions.

Antimicrobial peptide resistance assay

The assay was done as we have recently described [27]. Briefly, bacteria were grown at 37°C in 5 ml LB, harvested (5000 \times g, 15 min, 5°C) in the exponential phase of growth and washed three times with PBS. A suspension containing approximately 10⁵ cfu/ml was prepared in 10 mM PBS (pH 6.5), 1% Tryptone Soya Broth (TSB; Oxoid), 100 mM NaCl. Aliquots (5 μ l) of this suspension were mixed in Eppendorf tubes with various concentrations of BD2. In all cases the final volume was 30 μ l. After 3 h incubation, the contents of the Eppendorf tubes were 1:10 diluted with PBS and 100 μ l immediately plated on LB agar. Colony counts were determined and results were expressed as percentages of the colony count of bacteria not exposed to antibacterial agents. The 50% inhibitory concentration of BD2 (IC₅₀) was defined as the concentration producing a 50% reduction in the colony counts compared with bacteria not exposed to the antibacterial agent.

All experiments were done with duplicate samples on three independent occasions.

Small interfering RNA (siRNA)

RNA-mediated interference for downregulating TLR4 and TLR2 was done by the transfection of TLR4 siRNA (catalogue #HSS110818) or TLR2 siRNA (catalogue #HSS110813) purchased from Invitrogen. StealthTM RNAi Negative Control Medium and Low GC were used as control interference RNA for TLR2 and TLR4 respectively. 20 nM of siRNA per well was used for transfection using LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent and following manufacturer's recommendations (Invitro-

gen). Cells were infected 48 h post-transfection as previously described.

Real time quantitative PCR (RT-qPCR)

Quantification of mRNA levels was conducted by RT-qPCR. RNA was purified using a Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) exactly as recommended by the manufacturer. cDNA was obtained by retrotranscription of 1.5–2 µg of total RNA using a commercial RT² First Strand kit as recommended by the manufacturer (SABioscience). The reaction included one step to eliminate traces of genomic DNA. Real-time PCR (RT-PCR) analyses were performed with a Smart Cycler real-time PCR instrument (Cepheid, Sunnyvale, CA). To amplify human TLR2 and TLR4, 500 ng of cDNA were used as a template in a 25-µl reaction containing 1 x Quantitect SYBR Green PCR mix (Qiagen) and QuantiTect Primer Assays [Qiagen; catalog numbers QT00236131 (TLR2) and QT00035238 (TLR4)]. As internal control we amplified the human housekeeping *GAPDH* using 50 ng of cDNA and the following intron spanning primers: (sense, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; antisense, 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'). For detection of *TLR2* and *TLR4*, the thermocycling protocol was as follows: 95°C for 15 min for hot-start polymerase activation, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 60°C for *TLR2* or 54°C for *GAPDH* for 30 sec; and extension at 72°C for 30 sec. The SYBR Green dye was measured at 521 nm during the annealing phase. The threshold cycle (Ct) value reflects the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses a given threshold. The Ct value assigned to each well thus reflects the point during the reaction at which a sufficient number of amplicons have been accumulated. The relative mRNA amount in each sample was calculated based on its Ct in comparison with the Ct of *GAPDH*. Specificity of the PCR products was determined by melting curve analysis and amplification products were resolved on a 1.5% agarose gel to confirm the correct size of the amplicons (92, 102 and 226 bp for *TLR2*, *TLR4* and *GAPDH* respectively).

LPS purification

A. baumannii ATCC 17978 LPS was purified from 10 mg of lyophilized bacterial cells using the Tri-Reagent extraction method as previously described [28]. LPS was further purified by DNase, RNAase and proteinase K treatments [29] before precipitation with 0.375 M magnesium chloride in 95% ethanol. The pellet was resuspended in water and lyophilized. This LPS did not activate the NF-κB dependent luciferase reported gene in HEK293 cells transiently transfected with human TLR2 (for a description of the assay see [30]).

Method for lipid A extraction

A. baumannii ATCC 17978 lipid A was extracted using an ammonium hydroxide/isobutyric acid method [31] and subjected to negative ion matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis. Briefly, lyophilized cells (10 mg) were resuspended in 400 µl isobutyric acid/1M ammonium hydroxide (5:3, v/v) and incubated in a screw-cap test tube at 100°C for 2 h, with occasional vortexing. Samples were cooled in ice water and centrifuged (2,000×g for 15 min). The supernatant was transferred to a new tube, diluted with an equal volume of water, and lyophilized. The sample was washed twice with 400 µl methanol and centrifuged (2,000×g for 15 min). The insoluble lipid A was solubilized in 100–200 µl chloroform/methanol/water (3:1.5:0.25, v/v/v). Analyses were performed on a Bruker Autoflex II MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker

Daltonics, Incorporated) in negative reflective mode with delayed extraction. Each spectrum was an average of 300 shots. A peptide calibration standard (Bruker Daltonics) was used to calibrate the MALDI-TOF. The ion-accelerating voltage was set at 20 kV. Dihydroxybenzoic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was used as a matrix. A few microliters of lipid A suspension (1 mg/ml) were desalted with a few grains of ion-exchange resin (Dowex 50W-X8; H⁺) in an Eppendorf tube. A 1 µl aliquot of the suspension (50–100 µl) was deposited on the target and covered with the same amount of the matrix suspended at 10 mg/ml in a 0.1 M solution of citric acid.

Statistical methods

Results are expressed as mean ± SD. Differences between experimental groups were analyzed by non-parametric two sided Mann Whitney *U*-test or one-way analysis of variance using Kruskal-Wallis contrasts as appropriate (GraphPad Software Inc.). A *p* value lower than 0.05 was considered significant.

Results

A. baumannii induced the expression of IL-8 and β-defensin 2 by human airway epithelial cells

We assessed whether *A. baumannii* induces the expression of IL-8 by human airway epithelial cells. Time-course experiments showed that there was a correlation between the duration of the infection with *A. baumannii* strain ATCC 17978 and the levels of IL-8 secreted by A549 (Figure 1A) and NHBE cells (Figure 1B). The widespread number of *A. baumannii* strains resistant to antibiotics led us to explore whether the increased expression of IL-8 by infected cells is a general theme for *A. baumannii*. All the strains tested induced the secretion of IL-8 by A549 cells and there was a correlation between duration of the infection and the secretion of IL-8 (Figure 1C). No significant differences were found in the levels of IL-8 induced by the strains at any time point (Figure 1C).

Airway epithelial cells up-regulate the expression of BD2 upon infection [15–17]. We sought to determine whether *A. baumannii* increases the expression of BD2 in A549 cells. Cells were transiently transfected with a luciferase reporter construct controlled by the promoter region of BD2. This plasmid has been used previously to monitor the expression of BD2 in airway epithelial cells [26]. BD2-dependent luciferase activity was induced by all *A. baumannii* strains tested (Figure 2A). Survival assays shown in Figure 2B demonstrated that *A. baumannii* strains were susceptible to BD2 (final concentration of 3 µg/ml) and no significant differences were found between strains. To further confirm these findings, we performed dose-response experiments which allowed us to determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of BD2 for these strains. IC₅₀ of BD2 for strain ATCC 17978 was 1.51±0.03 µg/ml, which was similar to those found for strains 1514, 670, 1064 and 1327 (1.85±0.05 µg/ml, 1.01±0.04 µg/ml; 1.34±0.03 µg/ml and 1.65±0.06 µg/ml respectively; *p*>0.05 for all comparisons).

Activation of NF-κB and MAPKs signalling pathways is required for *A. baumannii*-induced IL-8 expression

Given that several studies show that NF-κB activation is associated with IL-8 expression [10], we sought to determine whether *A. baumannii* activates this transcriptional factor. A549 cells were transiently transfected with a NF-κB-dependent luciferase reporter followed by infection and *A. baumannii*-induced NF-κB activation was measured as relative luciferase activity. NF-κB-dependent luciferase activity was induced upon infection with

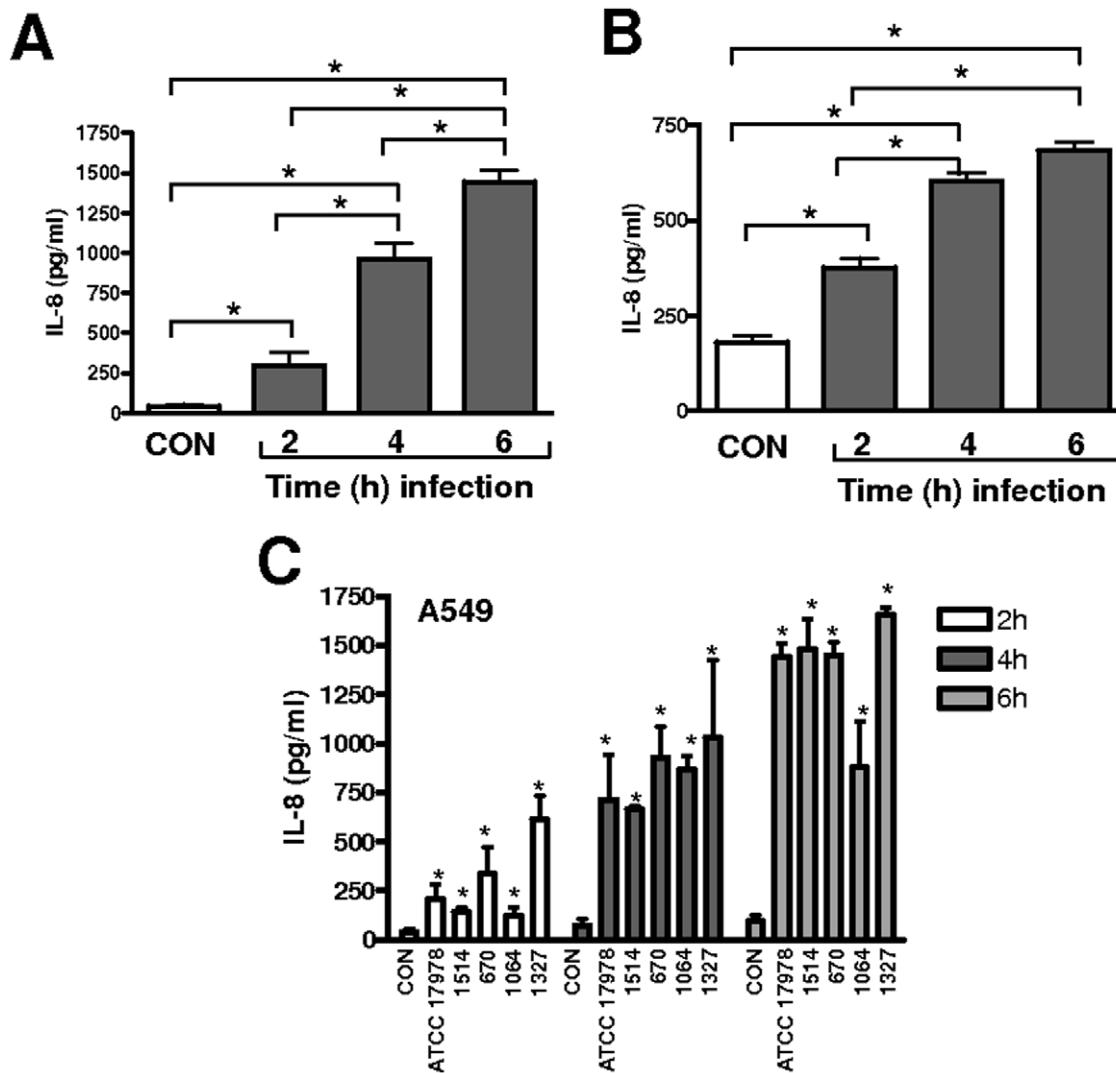


Figure 1. *Acinetobacter baumannii* induces the secretion of IL-8 by airway epithelial cells. (A–B) ELISA of IL-8 released by A549 (panel A) or NHBE (panel B) cells left untreated (CON) or infected for different time points with *A. baumannii* ATCC 17978 (n=3). *, $P < 0.05$ (for the indicated comparisons; one-way ANOVA). (C) ELISA of IL-8 released by A549 left untreated (CON) or infected for different time points with different *A. baumannii* strains (n=3). *, $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA). doi:10.1371/journal.pone.0010033.g001

A. baumannii (Figure 3A). Upon cellular stimulation, in the canonical pathway of NF- κ B activation I κ B α , present in the cytosol complexed to NF- κ B dimers preventing nuclear translocation, becomes phosphorylated which leads to ubiquitination of the protein and its subsequent degradation by the proteasome thereby allowing nuclear translocation of NF- κ B, process also linked to phosphorylation of the p65 subunit [32]. Therefore we analyzed the levels of I κ B α in cytoplasmic extracts of infected cells by immunoblot. I κ B α degradation was apparent 30 min post infection whereas 120 min post infection the I κ B α levels were similar to those of non infected cells (Figure 3B). Concomitantly, *A. baumannii* induced the nuclear translocation of NF- κ B and the phosphorylation of the p65 subunit (Figure 3C). To determine the contribution of NF- κ B activation to *A. baumannii*-induced IL-8 expression, we asked whether CAPE, a chemical inhibitor used to block NF- κ B signaling pathway [33], alters *A. baumannii*-induced IL-8 expression. As shown in Figure 3D, CAPE reduced *A. baumannii*-triggered IL-8 levels. Control experiments showed that addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) (the vehicle solution used

for CAPE) to *Acinetobacter*-infected cells did not affect IL-8 levels (pg/ml) in the absence of DMSO 433 ± 65 ; pg/ml in the presence of DMSO 505 ± 95). CAPE-treated cells (15 μ g/ml) expressed levels of IL-8 (95 ± 85 pg/ml) similar to those of non-treated cells (113 ± 50 pg/ml). Collectively, these data demonstrated that I κ B α -dependent activation of NF- κ B is required for *A. baumannii* induction of IL-8 expression in A549 cells.

MAPKs are important regulators of pro-inflammatory gene expression including IL-8 [10]. We asked whether MAPKs are involved in *A. baumannii*-induced IL-8 expression. MAPKs p38, p44/42 and JNK activations occur through phosphorylation of serine and threonine residues. Western blot analysis revealed that *A. baumannii* induced activation of the three MAPKs (Figure 3E). To explore whether the activation of MAPKs is involved in *A. baumannii*-induced IL-8 expression, the infections were carried out in the presence of chemical inhibitors for each MAPK. Figure 3F shows that SB203580, a specific inhibitor of p38 MAPK, reduced *A. baumannii*-induced IL-8 expression. The p44/42 inhibitor, U0126, also reduced *A. baumannii*-dependent IL-8 expression but

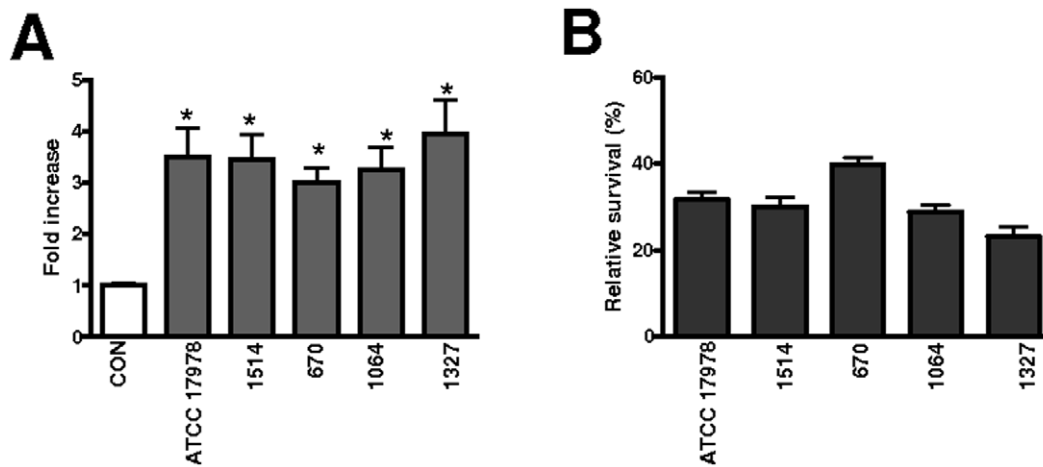


Figure 2. *Acinetobacter baumannii* up-regulates the expression of human β -defensin 2 (BD2) and it is susceptible to this defensin. (A) A549 cells were transfected with BD2 luciferase reporter gene and *Renilla* luciferase plasmid. Cells were infected with *A. baumannii* strains and BD2 promoter activation was measured 6 h post-infection. Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to the cells untreated. CON, non infected cells. Bars represent mean \pm SD ($n=3$); *, results are significantly different ($P<0.05$; one-tailed t test) from the results for non infected cells (CON). (B) Survival of bacteria (percentage of cell colonies with respect to not exposed to agents) in presence of 3 μ g/ml of BD2. Error bars display standard deviation from the mean of three experiments, each one run in duplicate. doi:10.1371/journal.pone.0010033.g002

only at the highest dose tested (Figure 3F). Finally, SP600125, a JNK inhibitor, did not alter *A. baumannii*-induced IL-8 expression (Figure 3F). SB203580, U0126 and SP600125-treated cells secreted similar amounts of IL-8 (120 ± 95 ; 95 ± 67 and 135 ± 87 pg/ml, respectively) than non-treated cells (130 ± 75 pg/ml). Taken together, these findings indicate that activation of MAPKs p38 and p44/42 is involved in *A. baumannii*-induced IL-8 expression in A549 cells.

A. baumannii-induced IL-8 expression is dependent on TLR activation

In most cases, the infection-dependent activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways is due to the engagement of TLRs [34,35]. Therefore it could be predicted that TLR-dependent signaling would be important in the recognition of *A. baumannii* by A549 cells. To assess whether TLRs are involved in *A. baumannii*-induced IL-8 expression, siRNA was used to knock-down TLR2 or TLR4 expression in A549 cells. As shown in Figure 4A, in TLR2 knock-down cells, *A. baumannii* induced significantly less IL-8 than in control cells. A decreased in the levels of IL-8 was also observed in *A. baumannii*-infected TLR4 knock-down cells in comparison to control cells (Figure 4A). The efficiency of siRNA-mediated downregulation of target gene mRNA levels was confirmed by RT-qPCR (Figure 4B).

CD14 is a 55-kDa GPI-linked glycoprotein which also participates in pathogen recognition and uses TLRs as co-receptors in signal transduction [36]. We and others have previously demonstrated that A549 cells do not express CD14 on their surface [25,37,38]. Host cells lacking CD14 on their surface can compensate its absence with soluble CD14 (sCD14) [39–41]. To test the effect of CD14 on the activation of A549 cells, recombinant human sCD14 was added to the culture medium. When infections were performed in the presence of sCD14, the secretion of IL-8 peaked when 1 ng/ml sCD14 was used (Figure 4C). Higher doses of sCD14 did not further increase *A. baumannii*-induced IL-8 levels. In fact, IL-8 levels were similar between *Acinetobacter*-infected cells with and without 100 ng/ml sCD14 (one-way ANOVA; $p>0.05$). Control experiments showed

that sCD14 alone, even at the highest dose tested, did not induce the secretion of IL-8 by A549 cells (data not shown). In order to explore the role of TLRs in sCD14-mediated signal transduction, TLR2 or TLR4 were knocked down by siRNA and infections were done in the presence of sCD14 (1 ng/ml). Results shown in Figure 4D demonstrate that sCD14 did not increase *A. baumannii*-induced IL-8 secretion in either TLR2 or TLR4 knock-down cells.

In summary, these data indicate that the recognition of *A. baumannii* by A549 cells involved TLR2 and TLR4 and that A549 cells could use sCD14 as TLR co-receptor to detect *A. baumannii*.

A. baumannii LPS induced the expression of IL-8 by human airway epithelial cells

We aim to investigate the inflammatory potential of *A. baumannii* LPS in airway epithelial cells in comparison to *Escherichia coli* LPS. Both LPSs induced the secretion of IL-8 by A549 cells being 0.01 μ g/ml the amount of both LPSs which significantly stimulated the secretion of IL-8 (one-way ANOVA; $p<0.05$) (Figure 5). When stimulations were done in the presence of sCD14 (1 ng/ml), a significant increase in the levels of IL-8 was found for both LPSs (one-way ANOVA; $p<0.05$). However, the effect was more dramatic for *A. baumannii* LPS than for *E. coli* one.

A. baumannii lipid A analysis

Given that the LPS lipid A moiety is the part of molecule responsible for its bioactivity, we characterized the lipid A moiety of strain ATCC 17978 by MALDI-TOF mass spectrometry. Previous studies determined unambiguously that lipid A disaccharide backbone of *Acinetobacter* species is composed of two 2-amino-2-deoxyglucose residues (GlcNI and GlcNII) linked by a β -(1-6) glycosidic linkage and phosphorylated at positions 1 and 4' [42–44]. In another hand, the lipid A structure of *A. radioresistens* has been recently studied by MALDI-TOF. This species contained predominantly hepta-acylated lipid A containing two phosphates, two 2-amino-2-deoxyglucose residues substituted with either four 12:0(3-OH) and three 12:0, or three 12:0(3-OH), three 12:0 and one 14:0(3-OH) [43]. Taken into account that a wealth of evidence indicates that lipid A architecture is conserved within a

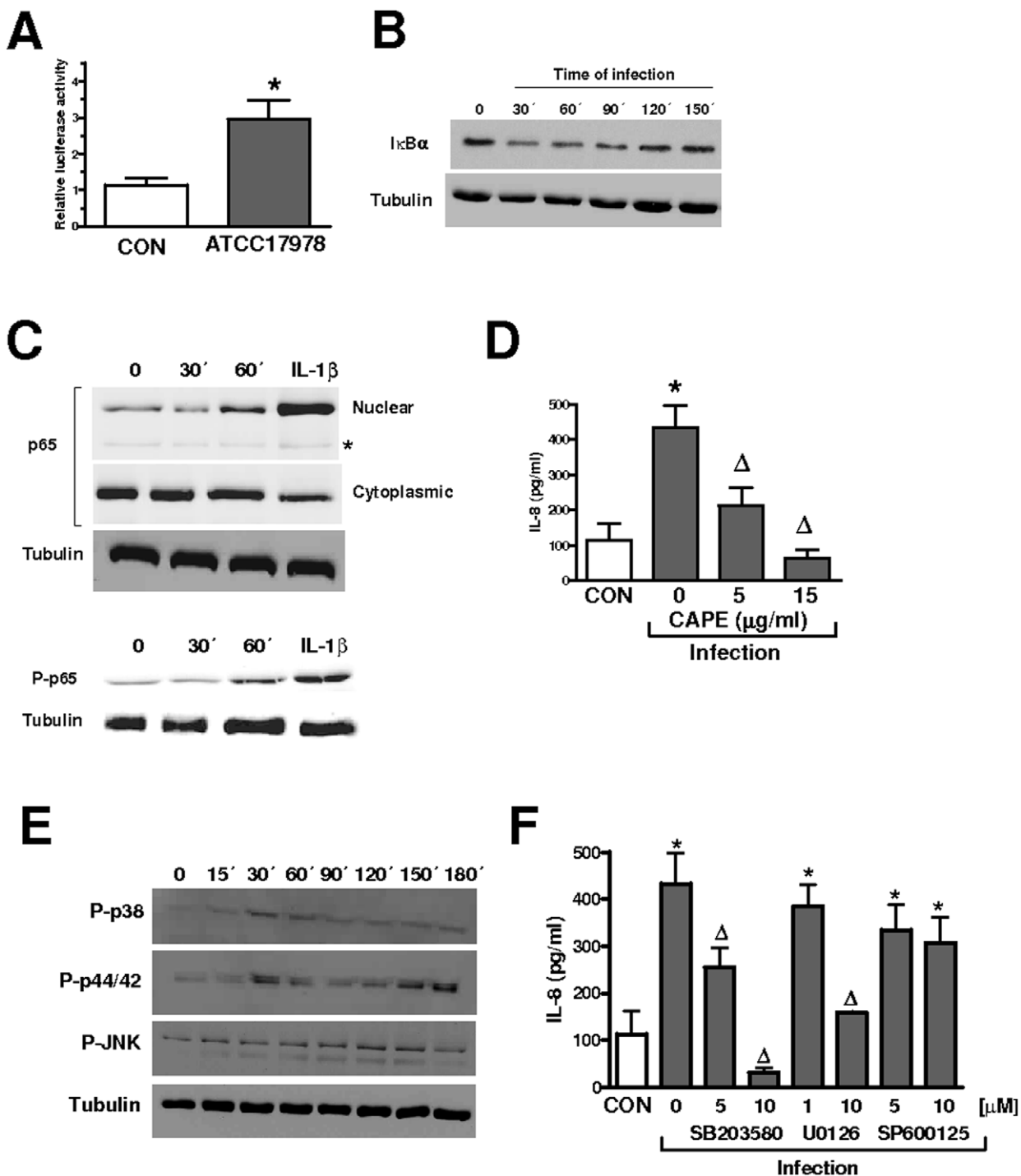


Figure 3. Activation of NF-κB and MAPKs is required for *Acinetobacter baumannii*-induced IL-8 expression. (A) Activation of a NF-κB luciferase reporter plasmid in A549 cells left non treated (CON) or infected for 6 h with *A. baumannii* ATCC 17978. Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to the cells untreated (the data are means and SD; n = 3). (B) Immunoblot analysis of IκBα levels in lysates of A549 cells left untreated (time 0) or infected for different time points with *A. baumannii* ATCC 17978. Data are representative of three independent experiments. (C) Upper panels, immunoblots showing p65 levels in nuclear and cytoplasmic extracts of A549 cells infected with *A. baumannii* ATCC 17978 for different time points. Asterisk denotes a protein recognized by the antibody which is only present in nuclear extracts and also serves as a loading control. Blots of cytoplasmic extracts were reprobbed with polyclonal antibody anti human tubulin to control that equal amounts of proteins were loaded in each lane. Lower panels, immunoblots showing phospho-p65 and tubulin levels in lysates of A549 infected with *A. baumannii* ATCC 17978 for different time points. IL-1β (20 ng/ml for 30 min) was used as a positive control for NF-κB activation. The results are representative of three independent experiments. (D) ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON, white bar) or infected for 4 h with *A. baumannii* ATCC 17978 in the absence or presence of different concentrations of CAPE, an inhibitor of NF-κB, which was added 1 h before infecting the cells (n = 3). (E) Immunoblots showing phospho-p38 (P-p38), phospho p44/42 (P-p44/42), phospho JNK (P-JNK) The results are representative of three independent experiments. (F) ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON, white bar) or infected for 4 h with *A. baumannii* ATCC 17978 in the absence or presence of different concentrations of SB203580 (5 and 10 μM; p38 MAPK inhibitor), U0126 (1 and 10 μM; p44/42 MAPK

inhibitor) or SP600125 (5 and 10 μ M; JNK MAPK inhibitor) which were added 2 h before infecting the cells ($n=3$). *, $P<0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA). Δ , $P<0.05$ (results are significantly different from the results for infected cells in the absence of inhibitor).
doi:10.1371/journal.pone.0010033.g003

genus [45]; we expected that *A. baumannii* would contain a lipid A structure similar to that from *A. radioresistens*, perhaps with minor structural modifications related to the type of acylation. Analysis of the negative ion mass spectrum of the intact lipid A fraction of strain ATCC 17978 revealed a major ion peak m/z 1,910 with two minor associated peaks m/z 1,894 ($\Delta m/z$ 16) and m/z 1,882 ($\Delta m/z$ 28) attributable to certain microheterogeneity of the sample. Proposed structure corresponding to m/z 1,910 would correspond

to a hepta-acylated lipid A with two 2-amino-2-deoxyglucose residues, two phosphates, three 12:0(3-OH), two 14:0(3-OH) and two 12:0 (Fig. 6A and B). $\Delta m/z$ 16 indicates a non-stoichiometric substitution of one 14:0(3-OH) with one 14:0. m/z 1,882 ($\Delta m/z$ 28) may represent four 12:0(3-OH), two 12:0 and one 14:0(3-OH). Molecular species at m/z 1,728 and 1,712, corresponding to a hexa-acylated lipid A, differ from m/z 1,910 and m/z 1,894 species by missing 12:0 respectively (Figure 6A and B). Ion peak m/z 1,530

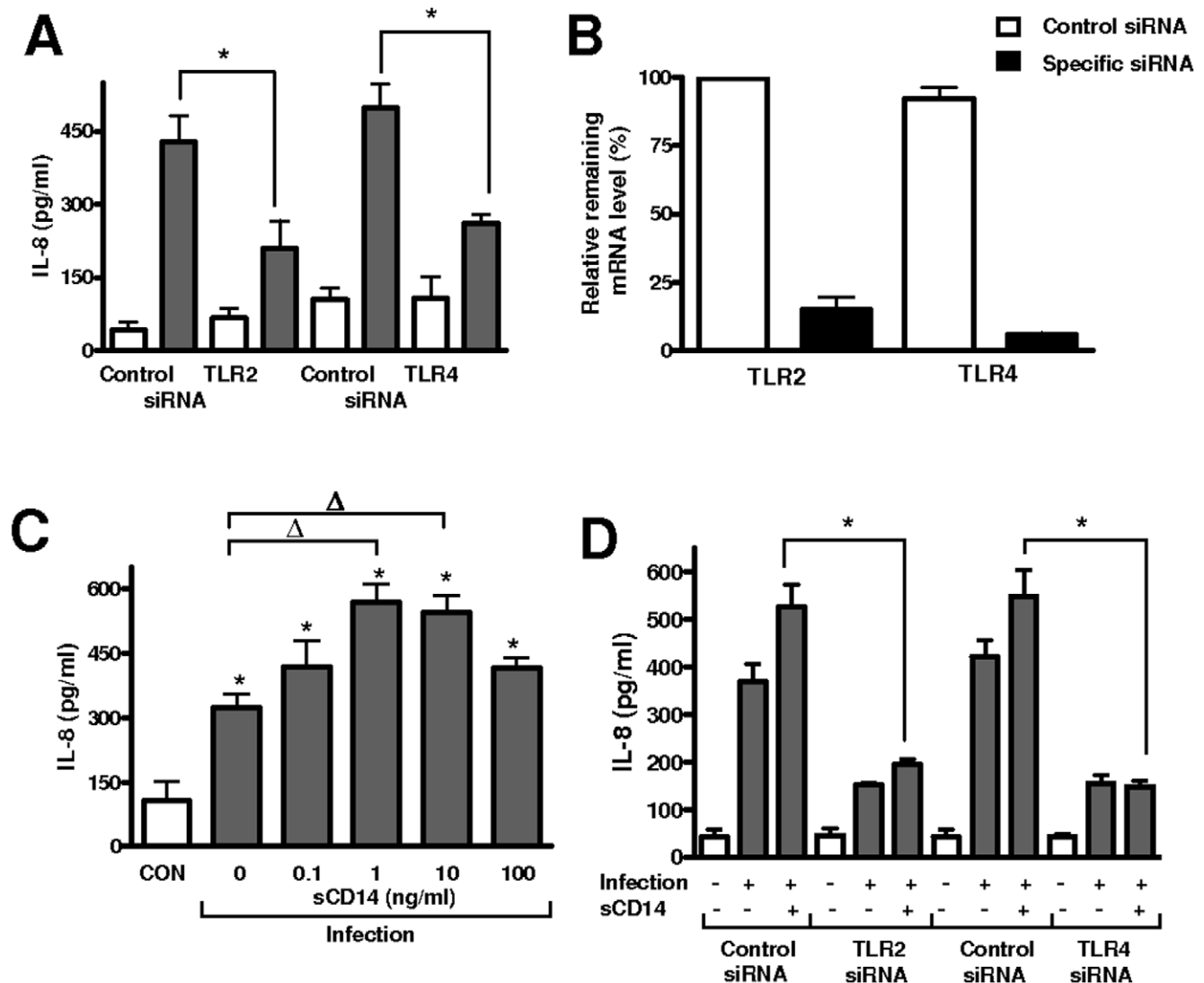


Figure 4. Role of TLR2, TLR4 and sCD14 in *Acinetobacter baumannii*-induced IL-8 expression. (A) ELISA of IL-8 secreted by A549 cells transfected with either control, TLR2, or TLR4 siRNAs, which were left untreated (white bars) or infected for 4 h with *A. baumannii* ATCC 17978 (data are means and SD; $n=3$). *, $P<0.05$ (one-way ANOVA). (B) siRNA efficiency was quantified by RT-qPCR in samples from the same experiment shown in panel A. mRNA level was normalized to GAPDH and then relative mRNA levels in cells transfected with control siRNA or specific siRNA were compared. mRNA levels in cells transfected with control siRNA were set to 100% (the data are means and SD; $n=3$). (C) ELISA of IL-8 secreted by A549 left untreated (CON, white bar) or infected with *A. baumannii* ATCC 17978 for 4 h in the absence or presence of different amounts of sCD14 ($n=3$). *, $P<0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA). Δ , $P<0.05$ (results are significantly different from the results for infected cells in the absence of sCD14). (D) ELISA of IL-8 secreted by A549 cells transfected with either control, TLR2, or TLR4 siRNAs, which were left untreated (white bars) or infected for 4 h with *A. baumannii* ATCC 17978 in the presence or absence of sCD14 (1 ng/ml) (data are means and SD; $n=3$). *, $P<0.05$ (one-way ANOVA).
doi:10.1371/journal.pone.0010033.g004

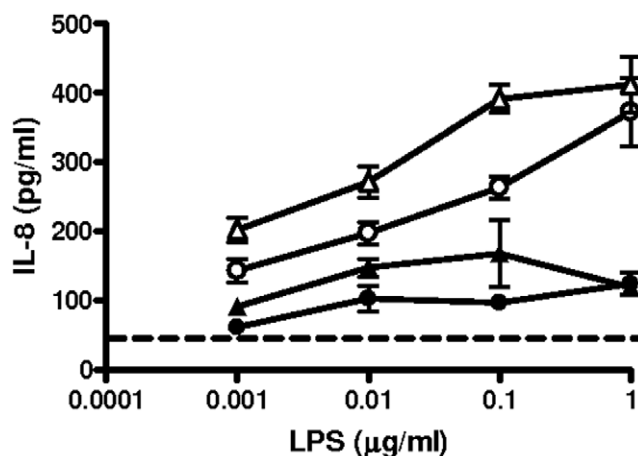


Figure 5. *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* LPSs-induced IL-8 from airway epithelial cells. A549 cells were challenged with medium alone (dashed line) or with 0.001–1 µg/ml of each LPS preparation in the absence (black symbols) or presence (white symbols) of sCD14 (1 ng/ml). Supernatant IL-8 levels were measured at 18 h. Results are presented as means and SD; (n=3). △, ▲ *A. baumannii* LPS; ○, ● *E. coli* LPS. doi:10.1371/journal.pone.0010033.g005

may represent a penta-acylated lipid A lacking one 12:0 whereas molecular species m/z 1,348 may correspond to a tetra-acyl lipid A containing two 2-amino-2-deoxyglucose residues, two phosphates, two 12:0(3-OH) and two 14:0(3-OH) (Figure 6A and B). Analysis of the negative ion mass spectrum of the intact lipid A fraction of *A. baumannii* strains 1514, 670, 1064 and 1327 (Figure S1) revealed that lipid As of the four strains contained the major ion peaks m/z 1,910 and m/z 1,728 found in lipid A fraction of strain ATCC 17978 whereas minor ion peaks m/z 1,530 and m/z 1,348 were also present in lipid A from strains 1514, 670 and 1327 but absent in strain 1064.

Altogether, these data indicate that the lipid A fraction of *A. baumannii* strains, including multidrug resistant ones, would contain two major species corresponding to a hepta-acylated lipid A with two 2-amino-2-deoxyglucose residues, two phosphates, three 12:0(3-OH), two 14:0(3-OH) and two 12:0 (m/z 1,910) or a hexa-acylated lipid A with two 2-amino-2-deoxyglucose residues, two phosphates, three 12:0(3-OH), two 14:0(3-OH) and one 12:0 (m/z 1,728).

Discussion

In this work, we demonstrate that *A. baumannii* infection of airway epithelial cells results in the secretion of IL-8 and up-regulation of BD2 expression. Mechanistically, we demonstrate that *A. baumannii*-triggered IL-8 depends on the activation of NF-κB, and MAPKs p38 and p44/42. In addition, we show that *A. baumannii* engages TLR2 and TLR4 to activate the expression of IL-8 and that sCD14 contributes to the recognition of this pathogen.

Neutrophil infiltration is a hallmark of the initial acute inflammatory response. In humans, IL-8 has a prominent role in the recruitment and activation of neutrophils [10]. Animal experiments have revealed that the predominantly neutrophilic inflammation in the airways of infected mice is essential for the eradication of *A. baumannii* from the lungs [22–24]. Furthermore, clinical studies have shown that *A. baumannii* is a common isolate in neutropenic febrile patients [46]. Therefore, our data showing that *A. baumannii*-stimulated airway epithelial cells secrete high levels of

IL-8 are consistent with the idea that an important function of airway epithelial cells is to initiate the lung influx of neutrophils. All *A. baumannii* strains tested in this study, including multidrug resistant clinical isolates, induced similar levels of IL-8 thereby suggesting that this feature could be a general theme of *A. baumannii*. It is then tempting to speculate that treatments designed to boost this cell response would help to clear *A. baumannii* infections, even those caused by multidrug resistant strains. Giving support to this idea, in a mouse model of pneumonia, administration of MIP-2, a functional mouse homologue of IL-8, significantly enhanced the clearance of *A. baumannii* from the lungs [23,24].

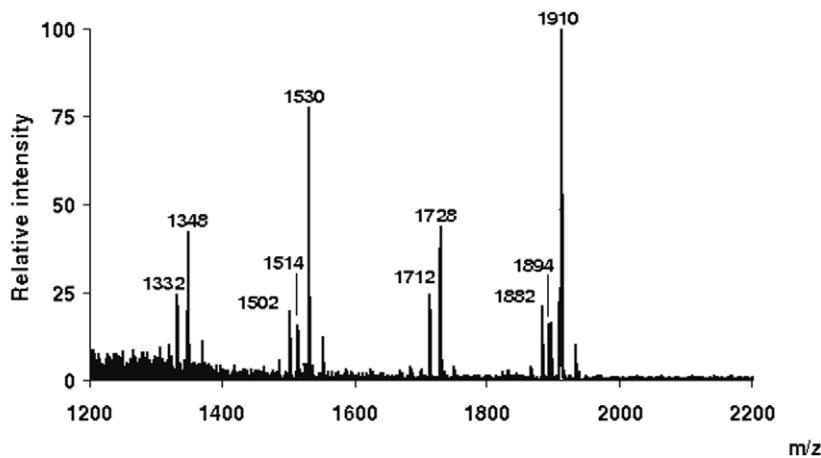
BDs are known to play an important role in lung innate immune response due to their potent activity against gram negative and positive bacteria, fungi, and viruses. However, BDs not only protect the lung against invading microbes, but they also modulate the host immune response by providing an interface between innate and adaptive immune response [47–50]. Because inflammatory cytokines and pathogens induce the expression of BD2 [14–17], it is accepted that this defensin plays an important role in host defence as inducible component of the epithelial barrier. In the present study, we have shown that *A. baumannii* strains not only up-regulated the expression of BD2 but also they were susceptible to it. Therefore, these results demonstrate the capacity of airway epithelial cells to produce mediators necessary for the clearance of *A. baumannii*.

Our results revealed that *A. baumannii* activates NF-κB and MAPKs signaling pathways in airway epithelial cells. Our findings add further evidence to the hypothesis that epithelial cells lining mucosal surfaces orchestrate a defense response upon pathogen challenge by activating NF-κB and MAPKs-dependent signaling pathways [51]. Although p38 and p44/42 MAPKs were required for *A. baumannii*-induced IL-8, the pathogen also activated JNK MAPK hence suggesting that there are other host cell responses activated in a JNK MAPK-dependent manner. Future studies will aim to identify these responses.

Accumulating evidence exist showing that engagement of TLRs triggers the activation of NF-κB and MAPKs and subsequently the production of cytokines and chemokines [52]. Therefore, we speculated that activation of airway epithelial cells by *A. baumannii* could involve TLRs-dependent signaling pathways. Our results showed that both TLR2 and TLR4 play an important role in the production of IL-8 by *A. baumannii* infected A549 cells. These data are in partial agreement with the results reported by Knapp and co-workers [22] that indicate that only TLR4-dependent signaling plays an important role in sensing of *A. baumannii* *in vivo* because TLR4-deficient mice displayed an impaired lung inflammatory response upon *A. baumannii* infection. In contrast, TLR2-deficient mice displayed an increased inflammatory response associated with accelerated elimination of the pathogen from the lung. It should be noted that *in vivo* scenario is quite complex and the final outcome of the infection is dependent on the concerted action of several cell types such as epithelial cells, alveolar macrophages, neutrophils and lymphocytes, all of them expressing TLR2, recruited and/or activated upon infection whereas here we have just tested the interplay between *A. baumannii* and airway epithelial cells. In addition, the discrepancy between our data and those obtained *in vivo* may be also attributable to differences between mice and humans related to TLR2-dependent recognition of *Acinetobacter* and the cross-talks between different signaling cascades.

To further characterize the receptors involved in the generation of *A. baumannii*-mediated responses, we evaluated the role of CD14 which may act as co-receptor for bacterial recognition in epithelial cells [36]. Our results showed that A549 cells could use sCD14 as

A



B

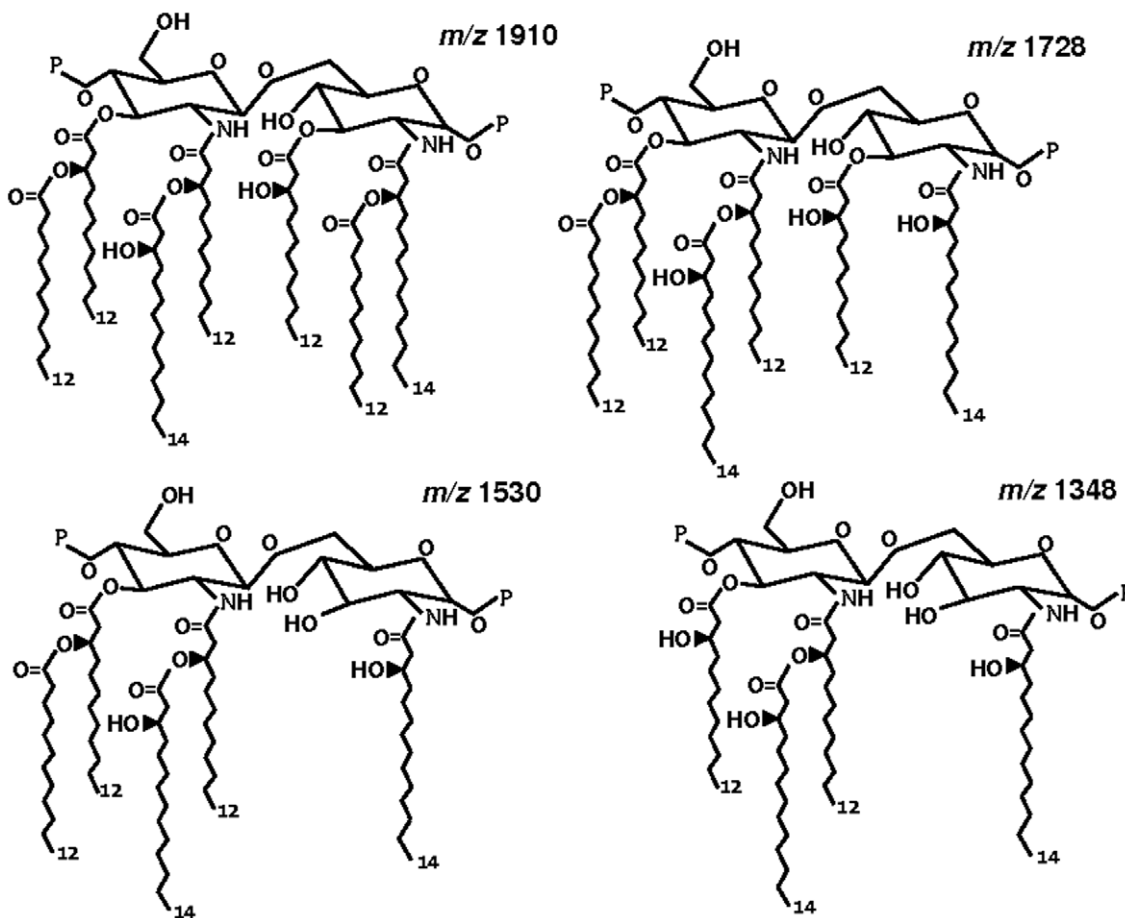


Figure 6. Analysis of *Acinetobacter baumannii* lipid A. (A) Negative ion MALDI-TOF mass spectra of lipid A isolated from *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. (B) Proposed structures of the main molecular species present in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 lipid A. doi:10.1371/journal.pone.0010033.g006

TLR co-receptor to recognize *A. baumannii*. Supporting that sCD14 is present in the airways, the molecule has been detected in bronchoalveolar fluid of healthy subjects [53] and we have demonstrated that epithelial cells may serve as one possible source

of sCD14 because airway epithelial cells primed with inflammatory cytokines release sCD14 [54].

Our data demonstrated that *A. baumannii* LPS stimulates airway epithelial cells to secrete IL-8 thereby suggesting that this LPS-

elicited IL-8 could induce a pulmonary influx of neutrophils. Supporting this, Knapp and colleagues [22] showed that intranasal administrated *A. baumannii* LPS indeed triggers the recruitment of neutrophils to the lungs. The ability of LPSs to evoke inflammatory responses and the potency of them are directly related to the structure of the molecule which in turn affects the interaction with the LPS receptor complex. Our structural analysis of the lipid A moieties of five *A. baumannii* strains by MALDI-TOF mass spectrometry revealed that *A. baumannii* lipid A is a bisphosphorylated diglucosamine to which are attached at least six saturated fatty acyl chains with lengths of 12 or 14 carbons. This structure matches with the so-called “canonical lipid A structure” which is associated with the highest level of activation of the human immune system [55]. This maybe the molecular explanation underlying the unusually severe systemic inflammatory reaction in response to *A. baumannii* infection found in some individuals [56,57].

It is worth commenting on the clinical implications of our findings. The global emergence of *A. baumannii* strains resistant to virtually all antibiotics makes it urgent to develop effective therapeutics based on new targets. Our findings together with those obtained *in vivo* [22–24] argue in favour of therapies based on stimulation of TLR-dependent pathways in airway epithelial

cells thereby leading to chemokine secretion and the subsequent recruitment of neutrophils. However, due to the high endotoxigenic potential of *A. baumannii* LPS care should be taken to induce an overwhelming and detrimental inflammatory response.

Supporting Information

Figure S1 Negative ion MALDI-TOF mass spectra of lipid A_s isolated from *Acinetobacter baumannii* strains 670, 1514, 1327 and 1064.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010033.s001 (6.53 MB TIF)

Acknowledgments

We are grateful to members of Bengoechea lab for helpful discussions. We thank Dr. Jerónimo Pachón for sending us *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J.G. is the recipient of a “Contrato de Investigador Miguel Servet” from Instituto de Salud Carlos III.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JAB. Performed the experiments: CM VR EL DM PM. Analyzed the data: CM VR JAB. Contributed reagents/materials/analysis tools: EL DM PM JG. Wrote the paper: CM JG JAB.

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538–582.
2. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C (1996) Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. *Clin Infect Dis* 23: 538–542.
3. Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS (2002) Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 3: 22.
4. Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T (2001) Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L509–L516.
5. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, et al. (1997) Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1770–1776.
6. Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, et al. (2004) Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 500–509.
7. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, et al. (1998) The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 441–448.
8. Pathmanathan S, Krishna MT, Blomberg A, Helleday R, Kelly FJ, et al. (2003) Repeated daily exposure to 2 ppm nitrogen dioxide upregulates the expression of IL-5, IL-10, IL-13, and ICAM-1 in the bronchial epithelium of healthy human airways. *Occup Environ Med* 60: 892–896.
9. Craig A, Mai J, Cai S, Jayaseelan S (2009) Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun* 77: 568–575.
10. Hoffmann E, Ulrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72: 847–855.
11. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttrop N (2006) Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia—molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res* 7: 97.
12. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, et al. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 263: 211–218.
13. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, et al. (2002) Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2129–2133.
14. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, et al. (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 714–721.
15. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276: 5707–5713.
16. McCray PB, Jr., Bentley L (1997) Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 343–349.
17. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, et al. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14961–14966.
18. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, et al. (1998) Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 943–947.
19. Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420: 1–16.
20. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819–826.
21. Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240–73, Table.
22. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, et al. (2006) Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 122–129.
23. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Chen W (2009) High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. *Microbes Infect* 11: 946–955.
24. van FH, KuoLee R, Harris G, Zhao X, Conlan JW, et al. (2007) Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun* 75: 5597–5608.
25. Regueiro V, Campos MA, Pons J, Alberti S, Bengoechea JA (2006) The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology* 152: 555–566.
26. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von MB, Schlee M, et al. (2004) NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72: 5750–5758.
27. Moranta D, Regueiro V, March C, Llobet E, Margareto J, et al. (2010) *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of β -Defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun* 78: 1135–1146.
28. Yi EC, Hackett M (2000) Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst* 125: 651–656.
29. Bengoechea JA, Díaz R, Moriyón I (1996) Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides. *Infect Immun* 64: 4891–4899.
30. Tirsoaga A, Novikov A, dib-Conquy M, Werts C, Fitting C, et al. (2007) Simple method for repurification of endotoxins for biological use. *Appl Environ Microbiol* 73: 1803–1808.
31. El HA, Tirsoaga A, Novikov A, Hussein A, Caroff M (2005) Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res* 46: 1773–1778.
32. Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132: 344–362.
33. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Jr., Grunberger D, Aggarwal BB (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9090–9095.
34. Takeda K, Akira S (2003) Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5: 143–153.
35. Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335–376.

36. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16: 379–414.
37. Regueiro V, Moranta D, Campos MA, Margareto J, Garmendia J, et al. (2008) *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun* 77: 714–724.
38. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, et al. (2002) Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand J Immunol* 56: 294–302.
39. Haziot A, Rong GW, Silver J, Goyert SM (1993) Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol* 151: 1500–1507.
40. Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijjiya N, Yamamoto S, et al. (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4: 407–414.
41. Loppnow H, Stelter F, Schonbeck U, Schluter C, Ernst M, et al. (1995) Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* 63: 1020–1026.
42. Leone S, Molinaro A, Pessione E, Mazzoli R, Giunta C, et al. (2006) Structural elucidation of the core-lipid A backbone from the lipopolysaccharide of *Acinetobacter radioresistens* S13, an organic solvent tolerant Gram-negative bacterium. *Carbohydr Res* 341: 582–590.
43. Leone S, Sturiale L, Pessione E, Mazzoli R, Giunta C, et al. (2007) Detailed characterization of the lipid A fraction from the nonpathogen *Acinetobacter radioresistens* strain S13. *J Lipid Res* 48: 1045–1051.
44. Vinogradov EV, Bock K, Petersen BO, Holst O, Brade H (1997) The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter* strain ATCC 17905. *Eur J Biochem* 243: 122–127.
45. Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635–700.
46. Karim M, Khan W, Farooqi B, Malik I (1991) Bacterial isolates in neutropenic febrile patients. *J Pak Med Assoc* 41: 35–37.
47. Scott MG, Hancock RE (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 20: 407–431.
48. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, et al. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525–528.
49. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* 58: 978–989.
50. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23: 291–296.
51. Gribar SC, Richardson WM, Sodhi CP, Hackam DJ (2008) No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med* 14: 645–659.
52. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197–216.
53. Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Steinberg KP, et al. (1997) Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 937–944.
54. Regueiro V, Campos MA, Morey P, Sauleda J, Agusti AG, et al. (2009) Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the broncho-alveolar lavage fluid of smokers. *Eur Respir J* 33: 273–281.
55. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K (2000) Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem* 267: 3032–3039.
56. Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, et al. (2001) Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 120: 1072–1077.
57. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, et al. (2006) Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* 129: 102–109.

Klebsiella pneumoniae Capsule Polysaccharide Impedes the Expression of β -Defensins by Airway Epithelial Cells[∇]

David Moranta,^{1,2} Verónica Regueiro,^{1,2} Catalina March,^{1,2} Enrique Llobet,^{1,2} Javier Margareto,³ Eider Larrate,³ Junkal Garmendia,^{1,2,4} and José A. Bengoechea^{1,2,4,5*}

Program Infection and Immunity, Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears,¹ and Area Molecular Basis of Microbial Pathogenesis, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes),² Bunyola, Unidad de Genómica, LEIA-Salud, Miñano,³ Área de Microbiología, Facultad Biología, Universitat Illes Balears, Palma Mallorca,⁴ and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid,⁵ Spain

Received 18 August 2009/Returned for modification 30 September 2009/Accepted 4 December 2009

Human β -defensins (hBDs) contribute to the protection of the respiratory tract against pathogens. It is reasonable to postulate that pathogens have developed countermeasures to resist them. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide (CPS), but not the lipopolysaccharide O antigen, mediated resistance against hBD1 and hBD2. hBD3 was the most potent hBD against *Klebsiella*. We investigated the possibility that as a strategy for survival in the lung, *K. pneumoniae* may not activate the expression of hBDs. Infection of A549 and normal human bronchial cells with 52145- Δwca_{K2} , a CPS mutant, increased the expression of hBD2 and hBD3. Neither the wild type nor the lipopolysaccharide O antigen mutant increased the expression of hBDs. *In vivo*, 52145- Δwca_{K2} induced higher levels of mBD4 and mBD14, possible mouse orthologues of hBD2 and hBD3, respectively, than the wild type. 52145- Δwca_{K2} -dependent upregulation of hBD2 occurred via NF- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) p44/42, Jun N-terminal protein kinase (JNK)-dependent pathways. The increase in hBD3 expression was dependent on the MAPK JNK. 52145- Δwca_{K2} engaged Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) to activate hBD2, whereas hBD3 expression was dependent on NOD1. *K. pneumoniae* induced the expression of CYLD and MKP-1, which act as negative regulators for 52145- Δwca_{K2} -induced expression of hBDs. Bacterial engagement of pattern recognition receptors induced CYLD and MKP-1, which may initiate the attenuation of proinflammatory pathways. The results of this study indicate that *K. pneumoniae* CPS not only protects the pathogen from the bactericidal action of defensins but also impedes their expression. These features of *K. pneumoniae* CPS may facilitate pathogen survival in the hostile environment of the lung.

The lung is a portal of entry for many pathogens, which can gain easy access to the bloodstream by crossing the alveolar-capillary membrane. Several mechanisms are devoted to protecting the lung, but the complement system and the antimicrobial peptides (APs) and proteins present on the airway surface make up the protective front (22, 39). The most abundant antibacterial agents in the airways are lysozyme and lactoferrin, which are secreted by submucosal glands, surface epithelia, and neutrophils (3, 22, 70). Other peptides found in the airway liquid are α -defensins, β -defensins (BDs), and cathelicidins (3).

Several human BDs (hBDs) have been identified, of which hBD1 (DEFB1), hBD2 (DEFB4), and hBD3 (DEFB3) are the most studied (35, 63). BDs show antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi, and viruses. hBD3 appears to be the most potent hBD, since it kills a broad range of microbes at low peptide concentrations. Moreover, in contrast to hBD1 and hBD2, hBD3 displays potent antimicrobial activity at physiological salt concentrations (46, 57). Each hBD has a unique expression profile. hBD1 is constitutively expressed by epithelial cells lining the respiratory tract (47), whereas the expression of hBD2 and hBD3 by airway epithelial

cells is induced by cytokines or by the presence of pathogens (27, 28, 47, 66). Thus, hBD2 and hBD3 play an important role in host defense as inducible components of the epithelial barrier. Indeed, hBD2 and hBD3 levels increase severalfold in the lung during pneumonia (29, 33). The importance of BDs in lung defense has been established by the use of knockout mice. Animals lacking mouse BD1 (mBD1) display a defect in the ability to clear *Haemophilus influenzae* from the lungs (49). However, BDs not only protect the lung against invading microbes but also modulate the host immune response by providing an interface between innate and adaptive immune responses (64, 76–78).

Klebsiella pneumoniae is one of the most common pathogens causing community-acquired respiratory infections, which are particularly devastating in immunocompromised patients (58, 62). Community-acquired pneumonia is a very severe illness with a rapid onset. Despite the availability of an adequate antibiotic regimen, the outcome is often fatal, with observed mortality rates around 50%. The high prevalence of multidrug-resistant isolates further complicates the treatment of these infections (69). Capsule polysaccharide (CPS) is recognized as one of the most important virulence factors of this pathogen. CPS mutants are unable to colonize pulmonary and systemic tissues (13, 41, 42). *In vitro* studies have shown that the presence of CPS inhibits the deposition of the complement component C3 onto the bacterium (5, 12, 16) and reduces adhesion and phagocytosis of the bacterium by macrophages and epithelial cells (12, 13, 18, 54). Taken together, these findings

* Corresponding author. Mailing address: Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears, Recinto Hospital Joan March, Carretera Soller Km 12, 07110 Bunyola, Spain. Phone: 34 971 011780. Fax: 34 971 011797. E-mail: bengoechea@caubet-cimera.es.

[∇] Published ahead of print on 14 December 2009.

suggest that CPS plays an important role in the interplay between *K. pneumoniae* and the innate immune system.

Recently we have started to study whether *K. pneumoniae* expresses mechanisms of resistance against APs. We have shown that *K. pneumoniae* surface-bound CPS may act as a protective shield on the bacterial surface against APs (8), whereas released CPS traps APs, thereby blocking their bactericidal activity (45). Moreover, sublethal concentrations of APs induce an increase in the transcription of the *cps* operon, which correlates with an increase in the amount of surface-bound CPS (8). Concentrations of APs in infected tissues (for example, those found in the surface liquid lining the airway epithelium) could be rather high due to the increased production of APs after recognition of the pathogen. Therefore, although *K. pneumoniae* is endowed with mechanisms against APs, these high levels of APs may render these bacterial countermeasures ineffective.

Here we explored the possibility that as a strategy for survival in the lung, *K. pneumoniae* may not activate the expression of hBDs by airway epithelial cells. We present evidence indicating that wild-type bacteria do not induce the expression of BDs *in vitro* or *in vivo*, in contrast to a CPS mutant. We also report that a *K. pneumoniae* CPS mutant engages Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) to induce the expression of hBD2, whereas the expression of hBD3 is dependent on the activation of NOD1. Finally, we investigate whether there are negative mechanisms regulating the expression of hBDs induced by a *K. pneumoniae* CPS mutant.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, growth conditions, and reagents. *K. pneumoniae* 52145 is a clinical isolate (serotype O1:K2) that has been described previously (50). The isogenic mutants 52145- Δwca_{K2} , which does not express CPS, and 52O21, which does not express the lipopolysaccharide (LPS) O side chain, have also been described previously (13, 45). Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C.

Recombinant hBD1, hBD2, and hBD3 were purchased from PeproTech. As reported by the manufacturer, the purities of defensins were greater than 98% by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an NF- κ B inhibitor, and SB203580, a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor, were purchased from Sigma, whereas U0126, a p44/42 MAPK inhibitor, and SP600125, a Jun N-terminal protein kinase (JNK) inhibitor, were purchased from Calbiochem.

Antimicrobial peptide resistance assay. The assay described by Campos et al. (8) was carried out with minor modifications. Briefly, bacteria were grown at 37°C in 5 ml LB medium, harvested ($5,000 \times g$, 15 min, 5°C) at the exponential phase of growth, and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). A suspension containing approximately 10^5 CFU/ml was prepared in 10 mM PBS (pH 6.5), 1% tryptone soy broth (TSB; Oxoid), and 100 mM NaCl. Aliquots (5 μ l) of this suspension were mixed in Eppendorf tubes with various concentrations of hBDs. In all cases, the final volume was 30 μ l. After 3 h of incubation, the contents of the Eppendorf tubes were diluted 1:10 with PBS, and 100 μ l was immediately plated on LB agar. Colony counts were determined, and results were expressed as percentages of the colony count of bacteria that were not exposed to antibacterial agents. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of hBDs was defined as the concentration producing a 50% reduction in the colony counts from that for bacteria not exposed to the antibacterial agent.

All experiments were conducted with duplicate samples on three independent occasions.

Cell culture and infection. Monolayers of A549 human lung carcinoma cells (ATCC CCL185) derived from type II pneumocytes were grown in RPMI 1640 tissue culture medium supplemented with 1% HEPES, 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), and antibiotics (penicillin and streptomycin) in 25-cm² tissue culture flasks at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. Primary normal human bronchial epithelial (NHBE) cells (Lonza) were grown in a bronchial epithelial cell growth medium (bronchial epithelial cell basal medium

[BEBM]; Lonza) supplemented with 0.5 ng/ml human epidermal growth factor, 0.5 μ g/ml hydrocortisone, 5 μ g/ml insulin, 10 μ g/ml transferrin, 0.5 μ g/ml epinephrine, 6.5 ng/ml triiodothyronine, 50 μ g/ml gentamicin, 50 ng/ml amphotericin B, 52 μ g/ml bovine pituitary extract, and 0.1 ng/ml retinoic acid at 37°C under 5% CO₂. Tissue culture flasks (25 cm²) were coated with collagen from calf skin (Sigma).

For infections, A549 cells were seeded to 90% confluence (4×10^5 to 5×10^5 cells/well) in 24-well tissue culture plates. Cells were serum starved 16 h before infection by replacement of medium with supplemented RPMI medium lacking FCS. For NHBE cells, cells were seeded to 80% confluence (2×10^5 cells/well) in collagen-coated 24-well tissue culture plates with 1 ml of BEBM per well. Overnight-grown bacteria were subcultured and grown to exponential phase, harvested by centrifugation ($5,000 \times g$, 15 min, 5°C), and resuspended in PBS. Before infection, cells were washed three times with PBS, and infection was performed using a multiplicity of infection of 100 bacteria per cell. To synchronize infection, plates were centrifuged at $200 \times g$ for 5 min. After 2 h of infection, cells were washed three times with PBS and were then further incubated with RPMI 1640 containing 10% FCS, HEPES, and gentamicin (100 μ g/ml), to kill extracellular bacteria. Cell viability, assessed by trypan blue dye exclusion, was >95%.

RT-qPCR. Cells seeded into 60-mm-diameter tissue culture dishes were infected. After infection, cells were washed with PBS, and total RNA was purified using a NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) exactly as recommended by the manufacturer. cDNA was obtained by retrotranscription of 1.5 to 2 μ g of total RNA using a commercial RT² First Strand kit as recommended by the manufacturer (SABiosciences). The reaction included one step to eliminate traces of genomic DNA. Real-time PCR (RT-PCR) analyses were performed with a Smart Cycler real-time PCR instrument (Cepheid, Sunnyvale, CA). To amplify hBD1 (DEFB1), hBD2 (DEFB4), and hBD3 (DEFB3), 200 ng of cDNA was used as a template in a 25- μ l reaction mixture containing $1 \times$ SYBR green RT² qPCR Master Mix (SABiosciences) and a primer mixture. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and actin were amplified as controls using 50 ng of cDNA as the template. The following intron-spanning primers were used: for GAPDH, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGATC-3' (sense) and 5'-AAGATGGTGATGGGATTTC-3' (antisense); for actin, 5'-AGAAATCTGGCACCACACC-3' (sense) and 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3' (antisense); for hBD1, 5'-GCAATCCACCAGTCTTATAAATAC-3' (sense) and 5'-CAGAGAGTAAACAGCAGAAGG-3' (antisense); for CYLD, (5'-TATGGGAAGGACGATTCTGC-3' (sense) and 5'-CTGCCTTCAGTTCTTTGCC-3' (antisense); and for MKP-1, 5'-GCTGTGCAGCAAACGTCGA-3' (sense) and 5'-CGATTAGTCTCATAAGGTA-3' (antisense). To amplify hBD2 and hBD3, the RT² qPCR primer assay for DEFB4 (catalog number PPH11010A; SABiosciences) and the QuantiTect primer assay for DEFB103A (catalog number QT00217014; Qiagen) were used, respectively. To amplify mBDs, similar amounts of cDNAs were used with the following primers: for Defb1, 5'-AACA CCGTACACAGGCTTCC-3' (sense) and 5'-TCACAGATGTCCAAGTCCC A-3' (antisense); for Defb4, 5'-CTCCACTTGCAGCCTTTACC-3' (sense) and 5'-GTGCATCCCCTAGAACTGGA-3' (antisense); and for Defb14, 5'-ATCTTGTTCTTGGTGCCTGC-3' (sense) and 5'-CTTCTTTCGGCAGCATTTC C-3' (antisense). For the amplification of mouse actin, the primers used were 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' (sense) and 5'-CTGGGTCATCTTTTC ACGGT-3' (antisense), whereas for the amplification of mouse GAPDH, the primers used were 5'-CCCACTAACATCAATGGGG-3' (sense) and 5'-CCT TCCACAATGCCAAAGTT-3' (antisense). For gene detection (human or mouse), the thermocycling protocol was as follows: 95°C for 15 min for hot-start polymerase activation, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. SYBR green dye fluorescence was measured at 521 nm during the annealing phase. The threshold cycle (C_T) value reflects the cycle number at which the fluorescence generated in a reaction crosses a given threshold. The C_T value assigned to each well thus reflects the point during the reaction at which a sufficient number of amplicons have been accumulated. The relative amount of mRNA in each sample was calculated based on its C_T value in comparison with the C_T values of GAPDH and actin. The results were expressed as changes in gene expression, determined using the following formula: $2 - [(C_T \text{ of target gene} - C_T \text{ of housekeeping genes of treated cells or mice}) / (C_T \text{ of target gene} - C_T \text{ of housekeeping genes of untreated cells or mice})]$ (with C_T values in arbitrary units). The specificity of the PCR products was determined by melting curve analysis, and amplification products were resolved on a 1.5% agarose gel to confirm the correct sizes of the amplicons (human actin, 149 bp; mouse actin, 138 bp; human GAPDH, 224 bp; mouse GAPDH, 275 bp; human DEFB1, 226 bp; mouse Defb1, 246 bp; human DEFB4, 92 bp; mouse Defb4, 271 bp; human DEFB103A, 111 bp; mouse Defb14, 164 bp; human CYLD, 276 bp; human MKP-1, 431 bp). cDNAs were

obtained from three independent extractions of mRNA, and each cDNA was amplified by RT-quantitative PCR (qPCR) on two independent occasions.

Intranasal infection model. Five- to 7-week-old female C57BL/6JOLA_{Hsd} mice (Harlan) were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture containing ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Overnight bacterial cultures were centrifuged ($2,500 \times g$, 20 min, 22°C), resuspended in PBS, and adjusted to 5×10^6 CFU/ml. A 20- μ l volume of the bacterial suspension (equivalent to 10^5 CFU) was inoculated intranasally in four 5- μ l aliquots. Noninfected mice were inoculated intranasally with 20 μ l of PBS in four 5- μ l aliquots. To facilitate consistent inoculations, mice were held vertically during inoculation and were placed on a 45° incline during recovery from anesthesia. At the indicated times after infection, mice were euthanized by cervical dislocation; lungs were rapidly dissected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until the assays were performed. Mice were treated in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC) and in agreement with the Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands.

For purification of RNA from lungs, lungs were quickly weighed and homogenized with 1 ml of TRI reagent (Ambion) using an Ultra-Turrax T10 basic homogenizer (IKA) on ice. First, total RNA was purified using a standard chloroform-isopropyl alcohol protocol; then the RNA obtained was further purified using a NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) exactly as recommended by the manufacturer. RNA integrity was verified using a formaldehyde-agarose gel, quantified spectrophotometrically with a NanoDrop spectrophotometer, and stored at -80°C . mRNA expression was measured by RT-qPCR analysis as described above.

Plasmids, transfections, and luciferase assays. The transfection vectors containing the 5'-flanking regions of the human DEFB4 (hBD2) and DEFB3 (hBD3) genes have been described previously (7, 74). The pRL-TK *Renilla* luciferase control reporter vector was purchased from Promega. A549 cells seeded in 24-well plates were transiently transfected when they reached 40 to 60% confluence. They were washed three times with PBS, and transfections were carried out in 500 μ l of Opti-MEM reduced-serum medium (Invitrogen) by using the Lipofectamine 2000 transfection reagent according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). One microgram of the hBD2 reporter plasmid or 500 ng of the hBD3 reporter plasmid was cotransfected with 20 ng of the pRL-TK *Renilla* luciferase plasmid. Forty-eight hours posttransfection, cells were infected as described above.

For luciferase assays, cells were lysed with Passive Lysis buffer (Promega). Luciferase activity was assayed using the Dual Luciferase assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega). Firefly luciferase values were normalized to *Renilla* luciferase control values. Results were plotted as relative luciferase activity compared with the activity measured for nonstimulated control cells. The luciferase assay was carried out in triplicate on at least three independent occasions.

siRNA. RNA-mediated interference for downregulating MyD88, CYLD, and MKP-1 was carried out by the transfection of MyD88 small interfering RNA (siRNA) (5'-AACTGGAACAGACAACTATC-3'), CYLD siRNA (Hs_CYLD_4 HP siRNA; catalog no. SI00110096), and MKP-1 siRNA (Hs_DUSP1_5 HP siRNA; catalog no. SI03100048), respectively, which were purchased from Qiagen. The AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) was used as nonsilencing control interfering RNA. Interfering RNAs for TLR4 (catalog no. HSS110818), TLR2 (catalog no. HSS110813), and CARD4/NOD1 (catalog no. HSS115906) were purchased from Invitrogen. Stealth RNAi Negative Control Med GC was used as control interfering RNA. Unless otherwise indicated, 20 nM siRNA per well was used for transfection with the Lipofectamine 2000 transfection reagent according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). Forty-eight hours posttransfection, cells were infected as described above.

Immunoblotting. Cells were seeded on 6-well tissue culture plates at 1×10^6 per well. Cells were infected as described above, washed three times with cold PBS, scraped, and lysed with 100 μ l lysis buffer (1 \times sodium dodecyl sulfate [SDS] sample buffer, 62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [wt/vol] SDS, 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol [DTT], 0.01% [wt/vol] bromophenol blue) on ice. Samples were sonicated, boiled at 100°C for 10 min, and cooled on ice. Proteins (15 μ g) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), electrotransferred by semidry blotting to a nitrocellulose membrane, and blocked with 4% skim milk in PBS. Immunostaining for I κ B α and MKP-1 was performed with a polyclonal rabbit anti-I κ B α antibody (1:1,000) and an anti-MKP-1 antibody (1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology), respectively. Immunostaining to assess the phosphorylation of MAPKs p38, p44/42, and JNK was performed with a polyclonal rabbit anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) antibody (1:1,000), an anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) antibody (1:1,000), and an anti-phospho-

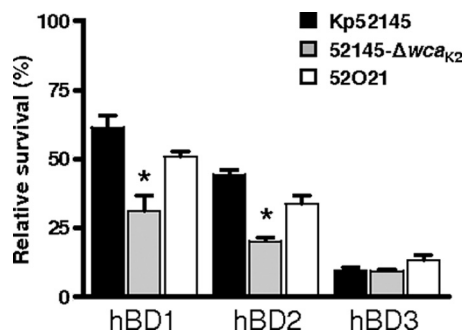


FIG. 1. Roles of CPS and the LPS O antigen in the susceptibility of *K. pneumoniae* to human β -defensins. The survival of bacteria (expressed as a percentage of the number of colonies of the same strain not exposed to agents) in the presence of 1 μ g/ml of hBD1, hBD2, or hBD3 is shown. Error bars represent standard deviations from the means for three experiments, each one run in duplicate. Asterisks indicate results that are significantly different ($P < 0.05$ by a one-tailed t test) from those for wild-type *K. pneumoniae* 52145 (Kp52145).

stress-activated protein kinase (SAPK)/JNK (Thr183/Tyr185) antibody (1:1,000), respectively, all purchased from Cell Signaling. Blots were reprobed with a polyclonal antibody against p38, p44/42, or JNK, purchased from Cell Signaling, in order to ensure that equal amounts of proteins were loaded in each lane. Immunostaining for CYLD was performed with a polyclonal rabbit anti-CYLD antibody (1:1,000) (Imgenex Corp.). Immunoreactive bands were visualized by incubation with goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (Pierce) (1:20,000) using the SuperSignal West Dura system (Pierce). To ensure that equal amounts of proteins were loaded in the lanes, blots were reprobed with mouse anti-human tubulin (Sigma) (1:3,000), and immunoreactive bands were visualized by incubation with goat anti-mouse immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (Pierce) (1:1,000). Images were recorded with a GeneGnome HR imaging system (Syngene) as JPEG files, and they were exported to a personal computer for densitometry analysis using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). Bands in each lane were selected and analyzed using the Histogram analysis tool, and mean intensities were recorded. The results were expressed as relative levels of protein [(mean intensity of protein)/(mean intensity of tubulin) \times 100].

Statistical methods. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni contrasts or the one-tailed t test or, when the requirements were not met, by the Mann-Whitney U test. A P value of <0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using Prism4 for PC (GraphPad Software).

RESULTS

Human β -defensins kill *Klebsiella pneumoniae*. Previously we have shown that *K. pneumoniae* CPS mediates resistance to different antimicrobial peptides, including hBD1 (8, 45). However, in those studies, the sensitivities of *K. pneumoniae* to hBD2 and hBD3, whose levels increase in the lung during pneumonia, were not tested (29, 33). Survival assays (Fig. 1) demonstrated that wild-type *K. pneumoniae* strain 52145 (referred to below as Kp52145) was more resistant to hBD1 and hBD2 than strain 52145- Δwca_{K2} , an isogenic CPS mutant strain. In our previous study, we found that the *K. pneumoniae* LPS O antigen also mediates resistance to certain APs (8). However, 52O21, a mutant lacking the LPS O antigen but expressing CPS, showed a level of resistance to hBD1 and hBD2 similar to that of Kp52145. Interestingly, all strains were more susceptible to hBD3 than to the other hBDs tested; furthermore, Kp52145 and 52O21 were as susceptible as 52145- Δwca_{K2} (Fig. 1). To further confirm these findings, we performed dose-response experiments that allowed us to de-

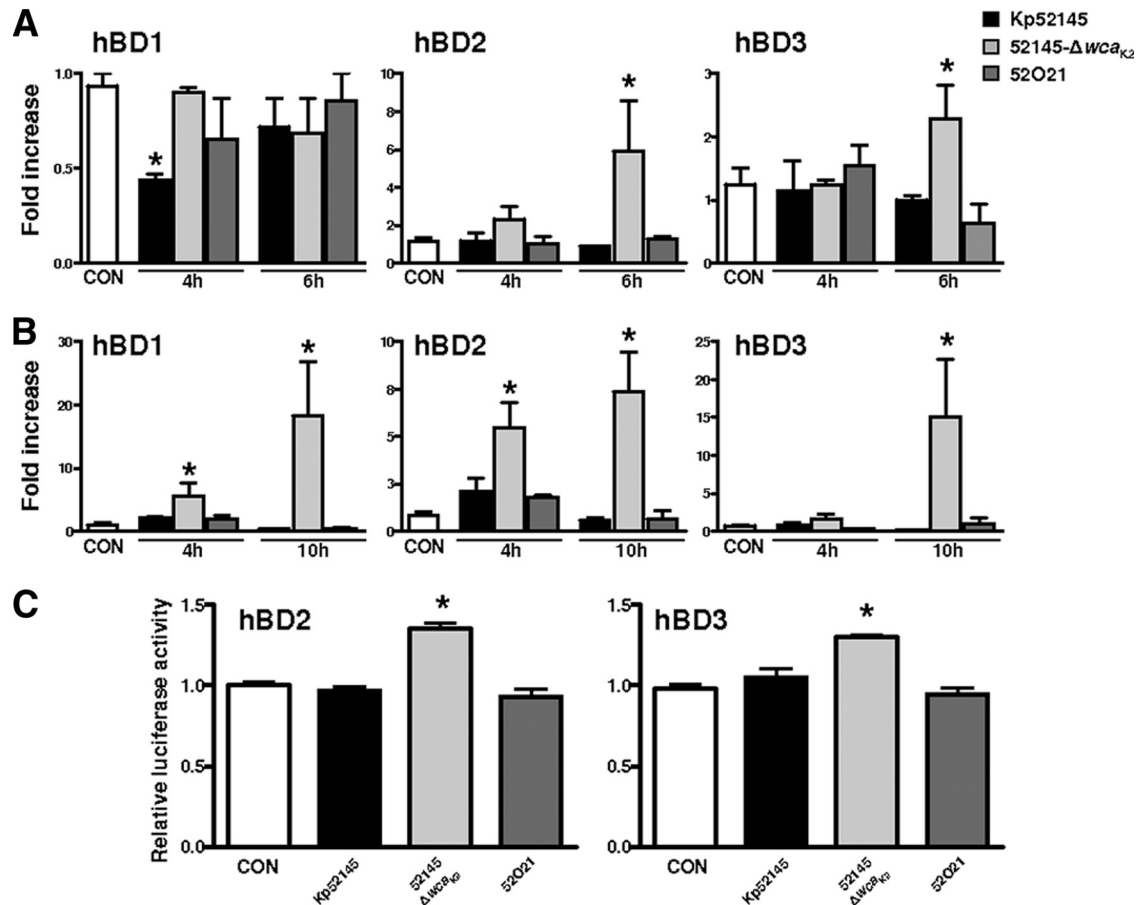


FIG. 2. The *K. pneumoniae* CPS mutant induces the expression of human β -defensins in airway epithelial cells. (A) NHBE cells were infected with either Kp52145 (filled bars), the CPS mutant 52145- Δwca_{K2} (light shaded bars), or the LPS O antigen mutant 52O21 (dark shaded bars) for different times, and levels of human β -defensin (hBD1, hBD2, and hBD3) mRNA were assessed by RT-qPCR. CON, control (noninfected cells). Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). (B) Experiments were similar to those described for panel A except that A549 cells were used instead of NHBE cells. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 4$). (C) A549 cells were transfected with the hBD2 or hBD3 luciferase reporter gene and the *Renilla* luciferase plasmid. Cells were infected with *K. pneumoniae* strains, and hBD2 or hBD3 promoter activation was measured as relative luciferase activity 6 h postinfection. CON, control (noninfected cells). Data are means \pm standard deviations ($n = 3$). Asterisks indicate results that are significantly different ($P < 0.05$ by a one-tailed t test) from those for noninfected cells.

termine the 50% inhibitory concentrations (IC_{50} s) of hBDs for these strains. The IC_{50} of hBD1 for Kp52145 was 1.51 ± 0.03 μ g/ml, similar to that for 52O12 (1.13 ± 0.05 μ g/ml [$P > 0.05$]) but significantly higher than that for 52145- Δwca_{K2} (0.42 ± 0.10 μ g/ml [$P < 0.05$]). The IC_{50} of hBD2 for 52145- Δwca_{K2} (0.31 ± 0.01 μ g/ml) was also lower than those for Kp52145 and 52O21 (1.04 ± 0.06 and 0.81 ± 0.03 μ g/ml, respectively). In contrast, the IC_{50} s of hBD3 for Kp52145, 52O21, and 52145- Δwca_{K2} were not significantly different (0.30 ± 0.04 , 0.25 ± 0.02 , and 0.26 ± 0.06 μ g/ml, respectively).

In summary, these data indicate that CPS, but not the LPS O antigen, mediates resistance to hBD1 and hBD2 and that hBD3 is the most potent hBD against *K. pneumoniae*.

The *K. pneumoniae* CPS mutant induces the expression of human β -defensins in airway epithelial cells. Airway epithelial cells do express hBDs, and data indicate that hBD1 is constitutively expressed, whereas hBD2 and hBD3 are upregulated upon infection (27, 28, 47, 66). We sought to determine whether *K. pneumoniae* increases the expression of hBD mRNA in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells.

Analysis by RT-qPCR revealed that Kp52145 did not induce the expression of hBD1, hBD2, or hBD3 but that it caused a decrease in the expression of hBD1 at the first time point analyzed (Fig. 2A). Similar results were obtained when infections were performed with strain 52O21. Therefore, we asked whether the presence of CPS on the bacterial surface may prevent the activation of cellular signaling pathways responsible for the upregulation of hBD expression. Indeed, infection of NHBE cells with 52145- Δwca_{K2} induced the expression of hBD2 in a time-dependent manner (Fig. 2A). 52145- Δwca_{K2} also increased hBD3 mRNA levels 6 h postinfection (Fig. 2A).

Similar studies in which A549 airway epithelial cells were infected were carried out (Fig. 2B). 52145- Δwca_{K2} increased mRNA levels of the three hBDs whereas neither Kp52145 nor 52O21 induced the expression of any hBDs, even at 10 h postinfection (Fig. 2B). Additionally, A549 cells were transiently transfected with a luciferase reporter construct controlled by the promoter regions of either hBD2 or hBD3. These plasmids have been used previously to monitor the expression of hBD2 and hBD3 in airway epithelial cells (7, 74). In

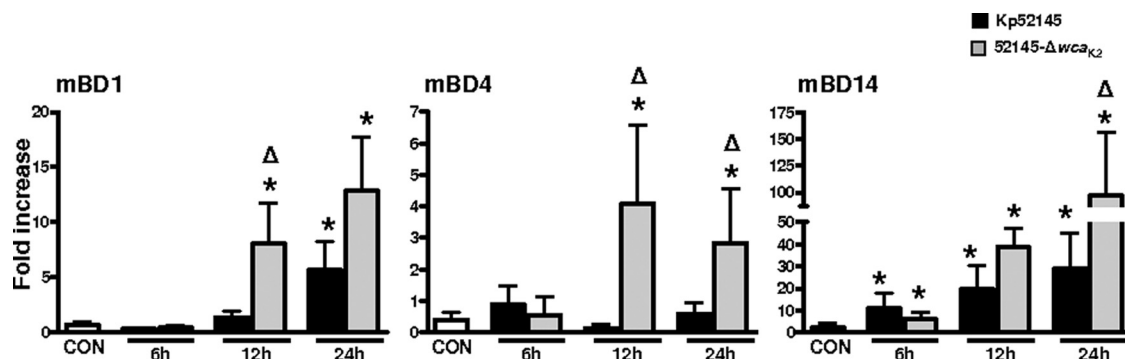


FIG. 3. β -Defensin expression in the lungs of mice after *K. pneumoniae* infection. Mice were either left uninfected (control [CON]) (open bars) ($n = 5$) or infected with wild-type *K. pneumoniae* 52145 (filled bars) ($n = 15$) or 52145- Δwca_{K2} (shaded bars) ($n = 15$). The expression of mouse β -defensin (mBD1, mBD4, and mBD14) mRNA in whole lungs at the indicated time points postinfection was assessed by RT-qPCR (5 mice per time point). Data are means \pm standard deviations. *, $P < 0.05$ for comparison with noninfected mice; Δ , $P < 0.05$ for comparison with wild-type *K. pneumoniae*-infected mice.

good agreement with the data obtained by RT-qPCR, only 52145- Δwca_{K2} induced the activation of both reporter constructs (Fig. 2C).

Collectively, our data show that a CPS mutant, but neither the wild type nor an LPS O antigen mutant, increased the expression of hBD2 and hBD3 by NHBE and A549 cells.

The *K. pneumoniae* CPS mutant induces higher levels of β -defensins *in vivo* than the wild-type strain. We investigated whether 52145- Δwca_{K2} induces higher levels of β -defensins than Kp52145 in the lungs of infected mice. Although there is no clear consensus on the existence of clear mouse orthologues of hBD2 and hBD3, reports suggest that mouse β -defensins (mBDs) mBD1, mBD4, and mBD14 are the possible mouse orthologues of hBD1 (6, 31, 36), hBD2 (35, 56), and hBD3 (61), respectively. Mice were infected intranasally and were euthanized at different time points. Whole lungs were dissected, and the expression of mBDs was measured by RT-qPCR at 6, 12, and 24 h postinfection. At 6 h postinfection, levels of mBD1 and mBD4 in the lungs of infected and noninfected mice were similar (Fig. 3). In contrast, levels of mBD14 were higher in the lungs of infected mice than in those of noninfected mice (Fig. 3). No significant differences were found between the levels of mBD14 induced by Kp52145 versus 52145- Δwca_{K2} . At 12 h postinfection, levels of mBD1 and mBD4 were higher in the lungs of mice infected with 52145- Δwca_{K2} than in those of mice infected with Kp52145 (Fig. 3). The levels of both defensins in the lungs of mice infected with Kp52145 were not significantly different from those in the lungs of noninfected mice (Fig. 3). At 12 h postinfection, levels of mBD14 were higher in the lungs of infected mice than in the lungs of noninfected mice, and no differences were found between the levels induced by the two strains (Fig. 3). At 24 h postinfection, levels of mBD4 and mBD14 were higher in the lungs of mice infected with 52145- Δwca_{K2} than in those of mice infected with Kp52145 (Fig. 3). Levels of mBD1 and mBD14 were also higher in the lungs of mice infected with Kp52145 than in the lungs of noninfected mice. Levels of mBD4 were not significantly different between noninfected mice and mice infected with Kp52145 (Fig. 3).

NF- κ B and MAPKs are involved in the upregulation of human β -defensins by the *K. pneumoniae* CPS mutant. We

sought to determine which intracellular pathways are involved in 52145- Δwca_{K2} -induced hBD2 and hBD3 expression. Based on the key role of NF- κ B in controlling the expression of genes involved in the host defense against infections, we asked whether NF- κ B could be behind the mutant-induced increased expression of hBDs. Therefore, we analyzed whether CAPE, a chemical inhibitor used to block the NF- κ B signaling pathway (53), would alter 52145- Δwca_{K2} -induced hBD expression. As shown in Fig. 4, CAPE reduced 52145- Δwca_{K2} -induced hBD2 expression (Fig. 4A), whereas the expression of hBD3 was not affected (Fig. 4B).

In addition to the NF- κ B signaling cascade, many cellular stimuli also activate MAPK pathways (17). Therefore, we asked whether MAPKs are also involved in 52145- Δwca_{K2} -induced hBD expression. To determine the contribution of MAPKs to hBD expression, infections were performed in the presence of SB203580, SP600125, or U0126, which are specific chemical inhibitors for the MAPKs p38, JNK, and p44/42, respectively. The MAPK p38 inhibitor did not affect the expression of either hBD2 or hBD3 (Fig. 4A and B). SP600125, the JNK inhibitor, significantly reduced 52145- Δwca_{K2} -induced expression of hBD2 and hBD3, whereas U0126, the p44/42 inhibitor, reduced the expression of hBD2 only (Fig. 4A and B). Control experiments revealed that the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) (the vehicle solution for all inhibitors) to 52145- Δwca_{K2} -infected cells did not affect the expression of either hBD2 or hBD3 (Fig. 4A and B).

Previously we demonstrated that a *K. pneumoniae* CPS mutant, strain 52K10, activates NF- κ B by inducing the phosphorylation of I κ B α , followed by degradation of the protein (59). To confirm that 52145- Δwca_{K2} activates NF- κ B, we analyzed the expression levels of I κ B α in cell extracts by immunoblot analysis. I κ B α degradation was apparent in extracts from cells infected with 52145- Δwca_{K2} 45 and 60 min postinfection (Fig. 4C). For the sake of comparison, the levels of I κ B α in cell extracts from Kp52145-infected cells were also analyzed (Fig. 4C). I κ B α degradation was apparent only at 30 min postinfection; at later time points, I κ B α levels were similar to those in noninfected cells (Fig. 4C).

Activation of p38, p44/42, and JNK occurs through phosphorylation of serine and threonine residues (17). Therefore,

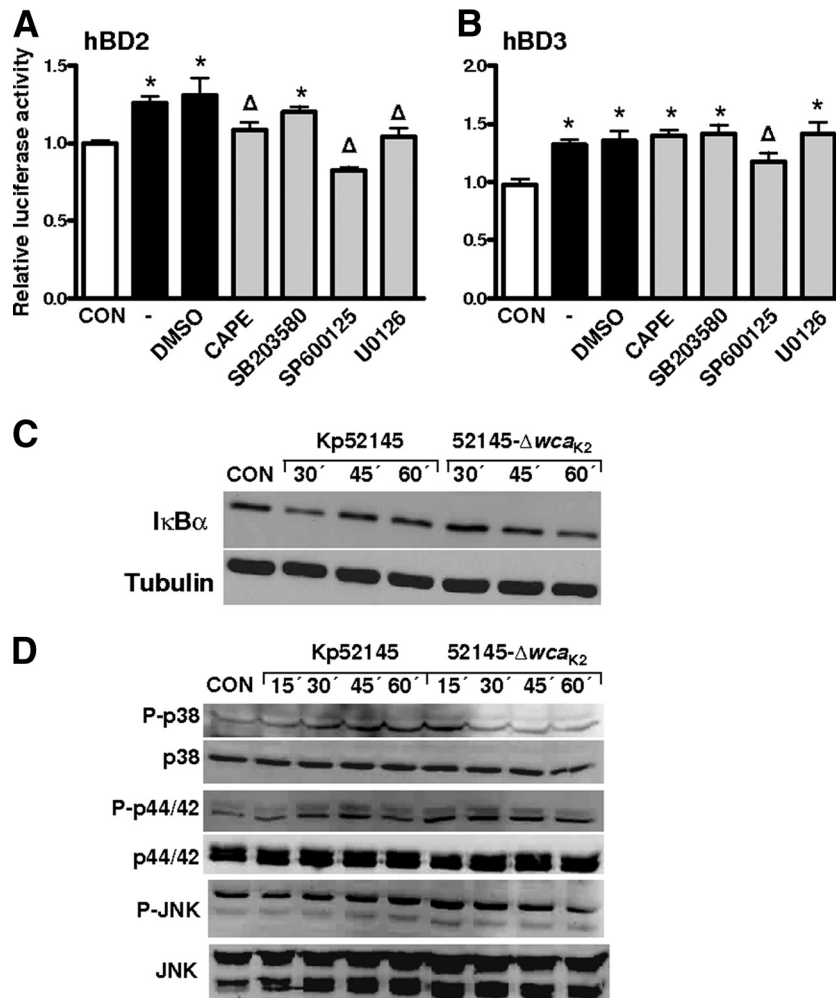


FIG. 4. NF- κ B and MAPKs are involved in the expression of hBD2 and hBD3 induced by the *K. pneumoniae* CPS mutant. (A) A549 cells were transfected with the hBD2 luciferase reporter gene and the *Renilla* luciferase plasmid. Cells were infected with 52145- Δwca_{K2} , and hBD2 promoter activation was measured as relative luciferase activity 6 h postinfection. Where indicated, cells were treated with chemical inhibitors 1 h prior to infection or with DMSO, which was the vehicle solution for all these compounds. The compounds used were CAPE (NF- κ B inhibitor) (15 μ g/ml), SB203580 (MAPK p38 inhibitor) (5 μ M), SP600125 (MAPK JNK inhibitor) (10 μ M), and U0126 extracellular signal-regulated kinase (ERK) (MAPK p44/p42 inhibitor) (2 μ M). CON, control (noninfected cells). (B) Experiments were similar to those described for panel A except that the hBD3 luciferase reporter gene was used instead of the hBD2 luciferase reporter gene and luciferase activity was measured 16 h postinfection. Values are means \pm standard deviations ($n = 3$) for panels A and B. *, $P < 0.05$ for comparison with noninfected cells; Δ , $P < 0.05$ for comparison with *K. pneumoniae* CPS mutant-infected cells treated with DMSO. (C) (Top) Immunoblot showing I κ B α levels in extracts of A549 cells infected with Kp52145 or 52145- Δwca_{K2} for different times. (Bottom) Immunoblot showing tubulin levels under the same conditions. The results are representative of three independent experiments. (D) Immunoblots showing phospho-p38 (P-p38), total p38 (p38), phospho-p44/42 (P-p44/42), total p44/42 (p44/42), phospho-JNK (P-JNK), and total JNK (JNK) levels in extracts of A549 cells infected with Kp52145 or 52145- Δwca_{K2} for different times. The results are representative of three independent experiments. CON, noninfected cells; -, infected cells without any other treatment.

we determined whether 52145- Δwca_{K2} induced the phosphorylation of p38, p44/42, and JNK. Western blot analysis showed that infection with 52145- Δwca_{K2} induced the phosphorylation of the three MAPKs (Fig. 4D). 52145- Δwca_{K2} -induced MAPK p38 phosphorylation was apparent 15 min postinfection (Fig. 4D). p44/42 and JNK phosphorylation was still detected at 60 and 45 min postinfection, respectively (Fig. 4D). Kp52145 also induced the phosphorylation of the three MAPKs. However, Kp52145-induced phosphorylation occurred at later time points than phosphorylation in cells infected with 52145- Δwca_{K2} . Thus, p38, p44/42, and JNK phosphorylation was apparent 45, 30, and 60 min postinfection, respectively (Fig. 4D).

In summary, these results suggest that NF- κ B and MAPKs p44/42 and JNK are involved in hBD2 expression induced by 52145- Δwca_{K2} , whereas activation of the MAPK JNK would be required for increased expression of hBD3.

Dissection of host cell receptors involved in the induction of human β -defensin expression upon infection by the *K. pneumoniae* CPS mutant. In most cases, the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways is dependent on the activation of the so-called pattern recognition receptors (PRRs) (4, 9). The best-characterized PRRs belong to the family of Toll-like receptors (TLRs) (2). To explore the contribution of TLRs to hBD expression induced by 52145- Δwca_{K2} infection, RNA in-

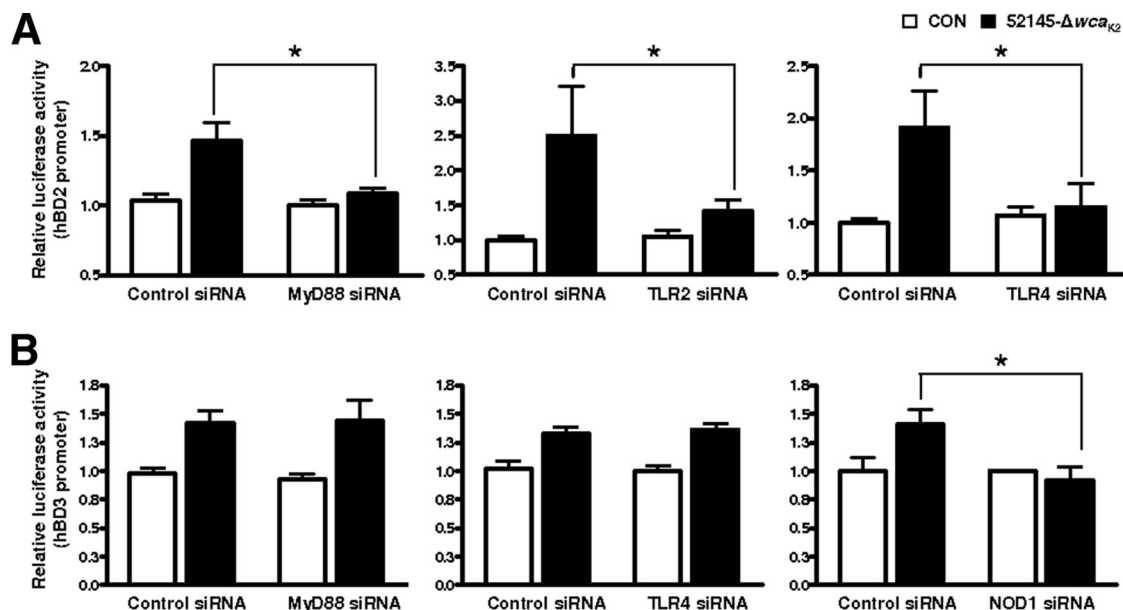


FIG. 5. Dissection of the receptors involved in the induction of human β -defensin expression upon infection by the *K. pneumoniae* CPS mutant. (A) A549 cells were cotransfected with different siRNAs, the hBD2 luciferase reporter gene, and the *Renilla* luciferase plasmid. Cells either were left uninfected (open bars) or were infected with 52145- Δwca_{K2} (filled bars), and hBD2 promoter activation was measured as relative luciferase activity 6 h postinfection. (B) A549 cells were cotransfected with different siRNAs, the hBD3 luciferase reporter gene, and the *Renilla* luciferase plasmid. Cells either were left uninfected (open bars) or were infected with 52145- Δwca_{K2} (filled bars), and hBD3 promoter activation was measured as relative luciferase activity 16 h postinfection. Data are means \pm standard deviations ($n = 3$). Asterisks indicate results that are significantly different ($P < 0.05$ by a one-tailed t test) from the results for infected cells treated with a control siRNA.

interference technology was used to knock down gene expression. Given that almost all TLRs activate intracellular pathways through TIR domain-mediated interactions with the adaptor molecule MyD88 (4), the involvement of TLRs in 52145- Δwca_{K2} -induced hBD expression can be examined by interrupting the function of the MyD88 adaptor molecule. After siRNA knockdown of MyD88, 52145- Δwca_{K2} did not induce hBD2 expression (Fig. 5A). Previously, we determined that TLR2 and TLR4 are involved in *K. pneumoniae* recognition by airway epithelial cells (59, 60). Therefore, we asked whether TLR2 and TLR4 are involved in hBD2 upregulation by 52145- Δwca_{K2} . The results shown in Fig. 5A indicate that both receptors contribute to hBD2 activation during 52145- Δwca_{K2} infection. In contrast, 52145- Δwca_{K2} infection still activated the expression of hBD3 in MyD88 knockdown cells (Fig. 5B), thus suggesting that there is no role for MyD88-dependent TLR signaling in 52145- Δwca_{K2} -induced expression of hBD3. Considering that TLR4 is also able to signal through the protein adaptor TRIF (4), we asked whether TLR4 participates in 52145- Δwca_{K2} -mediated hBD3 upregulation. However, in TLR4 knockdown cells, 52145- Δwca_{K2} induced hBD3 expression (Fig. 5B).

NOD1 belongs to the nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR) family of PRRs (9, 65), and its engagement also results in the activation of NF- κ B and MAPK signaling cascades (32). In addition, evidence indicates that NOD1 is constitutively expressed by epithelial cells (25, 30, 32, 68). We explored whether NOD1 contributes to hBD3 expression induced by 52145- Δwca_{K2} by using siRNA to knock down its expression. 52145- Δwca_{K2} infection did not

increase the expression of hBD3 in NOD1 knockdown cells (Fig. 5B).

Together, our data suggest that 52145- Δwca_{K2} -increased expression of hBD2 is mediated by the TLR4-TLR2-MyD88 pathway. In contrast, NOD1 is involved in the increased expression of hBD3 induced by the CPS mutant.

CYLD and MKP-1 act as negative regulators for *K. pneumoniae* CPS mutant-induced expression of human β -defensins. In addition to their antimicrobial activity, hBDs facilitate and amplify innate responses (for a review, see reference 21). Therefore, excess hBD production may contribute to an overwhelming inflammatory response. For this reason, tight regulation of hBD expression could be critical for balancing the beneficial and detrimental effects of hBD production. Given that our data have shown that activation of NF- κ B is positively involved in hBD2 expression, we investigated whether CYLD, a key negative regulator of NF- κ B (37, 71, 79), is involved in regulating hBD2 expression induced by 52145- Δwca_{K2} infection. The results shown in Fig. 6A revealed that 52145- Δwca_{K2} -induced hBD2 expression was higher in CYLD knockdown cells than in cells treated with a control siRNA.

We have also demonstrated that MAPKs are involved in the expression of both hBD2 and hBD3. Negative regulation of MAPK activity is exerted primarily by MAPK phosphatases (MKP), a family of phosphatases that dephosphorylate the MAPKs on their threonine and serine residues (44). MKP-1 is the archetype of the family, and several immunomodulatory agents induce the expression of MKP-1 (44, 73). We asked whether MKP-1 is involved in regulating the expression of hBD2 and hBD3 upon infection with the CPS mutant by

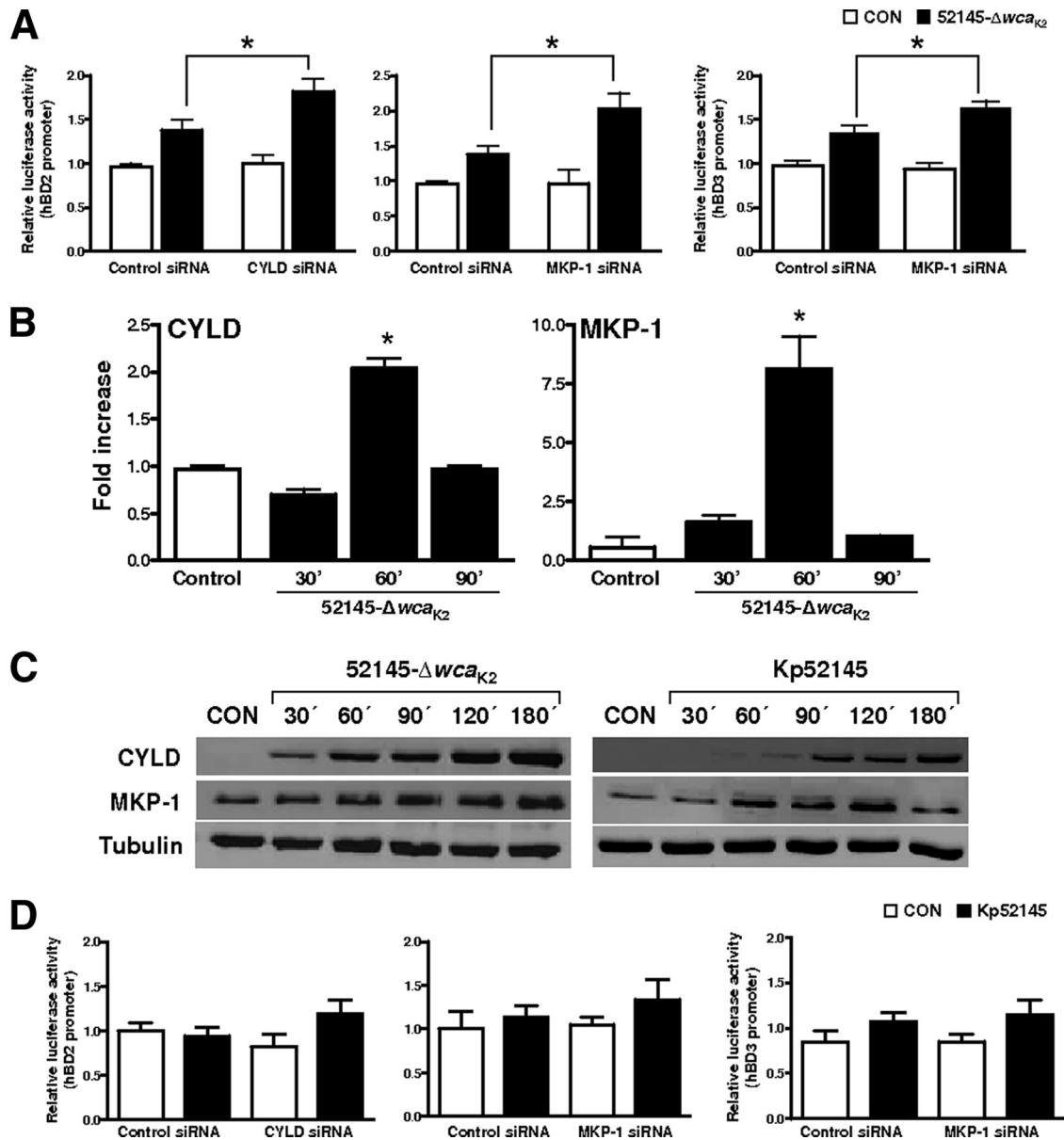


FIG. 6. CYLD and MKP-1 act as negative regulators for *K. pneumoniae* CPS mutant-induced expression of human β -defensins. (A) A549 cells were cotransfected with either a CYLD siRNA, an MKP-1 siRNA, or a control siRNA; the hBD2 or hBD3 luciferase reporter gene; and the *Renilla* luciferase plasmid. Cells either were left uninfected (control [CON]) (open bars) or were infected with 52145- Δwca_{K2} (filled bars), and hBD promoter activation was measured as relative luciferase activity. Data are means \pm standard deviations. Asterisks indicate results that are significantly different ($P < 0.05$ by a one-tailed *t* test) from the results for infected cells treated with a control siRNA. (B) CYLD and MKP-1 mRNA levels in A549-infected cells were assessed by RT-qPCR. Control, noninfected cells. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). *, $P < 0.05$ for comparison with noninfected cells. (C) Immunoblots showing CYLD, MKP-1, and tubulin levels in extracts of A549 cells infected with Kp52145 or 52145- Δwca_{K2} for different times. Results are representative of four independent experiments. (D) A549 cells were cotransfected with either a CYLD siRNA, an MKP-1 siRNA, or a control siRNA; the hBD2 or hBD3 luciferase reporter gene; and the *Renilla* luciferase plasmid. Cells either were left uninfected (open bars) or were infected with Kp52145 (solid bars), and hBD promoter activation was measured as relative luciferase activity. CON, noninfected cells.

knocking down *mkp-1* expression using siRNA. As shown in Fig. 6A, 52145- Δwca_{K2} -induced expression of hBD2 and hBD3 was higher in MKP-1 knockdown cells than in cells treated with a control siRNA.

Having established that CYLD and MKP-1 are negatively involved in hBD2 and hBD3 expression induced by 52145- Δwca_{K2} , we asked whether this strain activates the expression

of CYLD and MKP-1. Figure 6B shows that 52145- Δwca_{K2} increased the expression of *cyld* and *mkp-1* at the mRNA level. Western blot analysis revealed that 52145- Δwca_{K2} infection also increased the levels of the CYLD and MKP-1 proteins (Fig. 6C). The levels of both proteins in extracts from Kp52145-infected cells were analyzed. Of note, the wild-type strain also increased the levels of CYLD and MKP-1 (Fig. 6C).

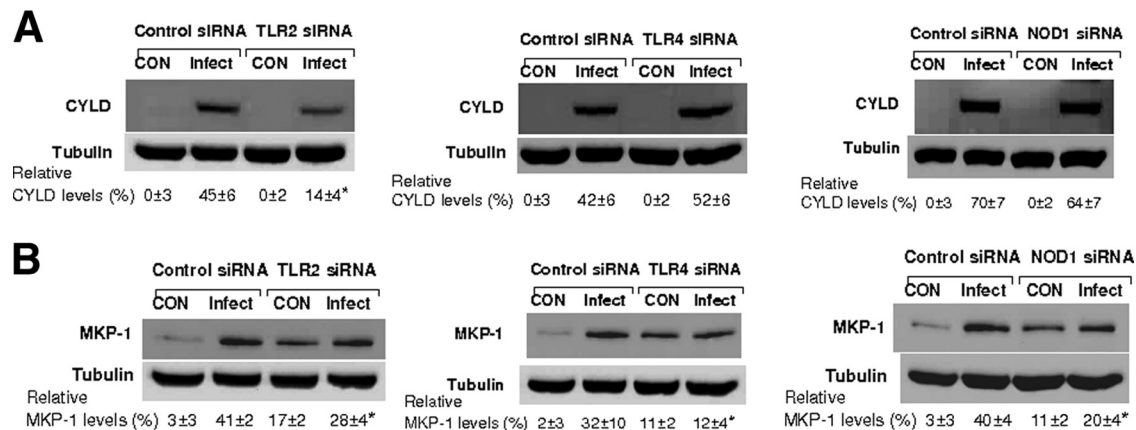


FIG. 7. Dissection of receptors involved in the induction of CYLD (A) and MKP-1 (B) during infection with the *K. pneumoniae* CPS mutant. A549 cells were transfected either with a siRNA for TLR2, TLR4, or NOD1 or with a control siRNA, and after 48 h, they were infected with 52145- Δwca_{K2} for 90 min. Immunoblots show CYLD or MKP-1 levels (top) or tubulin levels (bottom) in extracts of A549-infected cells. The results are representative of three independent experiments. The relative ratios of CYLD or MKP-1 (means \pm standard deviations) obtained after densitometric analysis of gels are given at the bottom ($n = 3$). Asterisks indicate results that are significantly different ($P < 0.05$ by a one-tailed t test) from the results for infected cells treated with a control siRNA. CON, noninfected cells.

However, Kp52145 did not induce hBD expression in either CYLD or MKP-1 knockdown cells (Fig. 6D).

Dissection of host cell receptors involved in the induction of CYLD and MKP-1 upon infection by the *K. pneumoniae* CPS mutant. We investigated the requirement for PRRs in CYLD and MKP-1 activation by 52145- Δwca_{K2} . siRNA was used to silence PRR gene expression, and Western blot analysis were carried out to determine the levels of CYLD and MKP-1 proteins. The results shown in Fig. 7A revealed that 52145- Δwca_{K2} -induced CYLD expression was lower in TLR2 knockdown cells than in infected control cells. After the silencing of TLR4, 52145- Δwca_{K2} -induced CYLD expression reached levels similar to those observed in infected cells treated with a control siRNA (Fig. 7A). Likewise 52145- Δwca_{K2} -induced CYLD expression was similar in control and NOD1 knockdown infected cells (Fig. 7A). 52145- Δwca_{K2} increased the expression of MKP-1 in TLR2 knockdown cells, although the levels were lower than those in infected cells treated with a control siRNA (Fig. 7B). In TLR4 knockdown cells, infection did not increase the expression of MKP-1. After the silencing of NOD1, infection induced MKP-1 expression, although MKP-1 levels were lower than those found in infected cells treated with a control siRNA (Fig. 7B).

In summary, our data suggest that the induction of CYLD expression by 52145- Δwca_{K2} relies on the activation of TLR2. MKP-1 expression induced by 52145- Δwca_{K2} depends mainly on the activation of TLR4, whereas TLR2 and NOD1 make a minor contribution to 52145- Δwca_{K2} induction of MKP-1 expression.

DISCUSSION

In this work we present *in vitro* evidence (by using A549 and normal human bronchial cells) showing that, in contrast to wild-type *K. pneumoniae*, a *K. pneumoniae* CPS mutant induces the expression of hBDs. Furthermore, we present *in vivo* evidence indicating that a *K. pneumoniae* CPS mutant induces higher levels of mBDs than wild-type *K. pneumoniae*. The fact

that an LPS O antigen mutant expressing wild-type levels of CPS does not induce the expression of hBDs suggests that the presence of CPS on the bacterial surface may affect the activation of cellular signaling pathways responsible for the up-regulation of BD expression. Consistent with this idea, our data demonstrate that the CPS mutant activates the expression of hBD2 via a positive I κ B α -dependent NF- κ B pathway and MAPK p44/42 and JNK pathways, whereas hBD3 expression is dependent on the activation of the MAPK JNK. Interestingly, CYLD and MKP-1 negatively regulate *K. pneumoniae* CPS mutant-induced hBD2 and hBD3 expression. Moreover, the expression of CYLD and MKP-1 was dependent on the engagement of PRRs by the *K. pneumoniae* CPS mutant. Taking these findings together, this study provides novel insights not only into the interplay between *K. pneumoniae* and airway epithelial cells but also into the molecular mechanisms underlying the regulation of hBD expression induced by a bacterial pathogen.

All studies to date have shown that hBD1 is constitutively expressed by epithelial cells, including the airway epithelium, whereas the expression of hBD2 and hBD3 is inducible by pathogens and proinflammatory cytokines (27, 28, 47, 66). The promoter region of hBD2 contains NF- κ B and AP-1 binding motifs (74). AP-1 is one of the transcription factors activated by different MAPK pathways. In good agreement, in this study we found that 52145- Δwca_{K2} -induced expression of hBD2 was mediated by NF- κ B and the MAPKs p44/42 and JNK. Interestingly, not every stimulus inducing the expression of hBD2 activates the same MAPK pathway. For example, in intestinal cells, JNK mediates hBD2 expression induced by LPS, peptidoglycan, or *Escherichia coli* Nissle 1917 (74, 75), whereas p38 and p44/42 are required for flagellin-dependent induction of hBD2 (55). p38 and JNK mediate *Fusobacterium nucleatum*-dependent hBD2 expression in human gingival epithelial cells (40), and the three MAPKs participate in *Helicobacter pylori*-induced hBD2 expression in gastric epithelial cells (72). Analysis of the promoter region of hBD3 reveals the presence of

AP-1 binding motifs but not NF- κ B binding sites (36). Most studies, including ours, support the involvement of MAPKs in hBD3 expression (7, 48, 67; also this study) and the lack of a role for NF- κ B (7, 10, 48, 67; also this study). As with hBD2, different MAPKs mediate hBD3 expression depending on the stimulus and cell type. While the MAPK p38 is responsible for *Staphylococcus aureus*-triggered hBD3 expression in keratinocytes (48), p38, p44/42, and JNK contribute to hBD3 induction by *H. pylori* in gastric cells (7). Taken together, it is tempting to speculate that depending on the stimuli and/or cell type, different MAPKs contribute to hBD2 and hBD3 expression.

Activation of host defense responses, such as the expression of BDs, depends on the engagement of PRRs (4, 20), which, in turn, activate NF- κ B and MAPK-dependent signaling cascades. The most extensively characterized PRRs belong to the family of TLRs. Several studies have shown that the expression of BDs can be activated by a plethora of purified TLR agonists (for a review, see reference 21). However, fewer studies have addressed the contribution of TLRs to BD expression induced by bacterial infections. TLR2 mediates hBD2 expression induced by *F. nucleatum* and *S. aureus*, whereas TLR2 and TLR4 are required for the induction of hBD2 by *Propionibacterium acnes* (34). Here we showed that 52145- Δwca_{K2} activated the expression of hBD2 via TLR2 and TLR4. In contrast, hBD3 expression was dependent on the activation of the intracellular receptor NOD1 (9, 65). NOD1 mediates hBD2 expression activated by *H. pylori* and *Campylobacter jejuni* (7, 80), yet, to the best of our knowledge, the current study is the first report implicating NOD1 in the expression of hBD3 induced by a pathogen.

Previous studies from our laboratory implicated TLR2 and TLR4 in the recognition of a *K. pneumoniae* CPS mutant, leading to the secretion of inflammatory mediators (59). In this work, we showed that a CPS mutant also engaged TLR2 and TLR4 to induce the expression of hBD2. Based on these data, we suggest that TLR-mediated recognition of *K. pneumoniae* is a key event for the induction of host defense responses to this pathogen. This hypothesis also implies that wild-type *K. pneumoniae* must somehow counteract TLR-mediated recognition. Our data showing that the presence of CPS on the surface of the wild-type cell prevented the induction of TLR-dependent responses (59; also this work) are consistent with this idea. Our findings implicate NOD1 in the recognition of the *K. pneumoniae* CPS mutant. Taking into account that we and others have shown that *K. pneumoniae* CPS mutants are internalized by epithelial cells (16, 59), NOD1-dependent recognition of the CPS mutant is consistent with the idea that this PRR participates in the recognition of internalized or obligately intracellular pathogens (24, 32, 38). In turn, the fact that CPS impedes the internalization of *K. pneumoniae* by cells can be taken as a strategy to avoid the activation of the NOD1-dependent host defense response. Altogether, we propose that evasion of PRR-mediated recognition may represent a feature of bacterial CPSs.

An increasing body of evidence indicates that hBDs facilitate and amplify innate responses (for a review, see reference 21). Therefore, high levels of hBDs would prompt the host to develop an overwhelming inflammatory response, leading to complications (23). Supporting this, hBDs are upregulated in several inflammatory diseases (1, 11, 15, 19), highlighting the

notion that the expression of hBD-encoding genes should be tightly controlled. To the best of our knowledge, the current study is the first one describing negative mechanisms controlling the expression of hBDs induced by bacteria. Having established the involvement of NF- κ B and MAPK signaling pathways in 52145- Δwca_{K2} -induced upregulation of hBDs, we explored the possibility that inhibitors of these pathways might be involved in negative regulation of hBD expression. We identified CYLD as a negative regulator of the expression of hBD2, whereas MKP-1 negatively controls hBD2 and hBD3 expression. CYLD has been identified as a negative regulator of NF- κ B activation by deubiquitinating proteins of the TRAF family (14, 71). On the other hand, cells control the activation of MAPK-dependent signaling by MAPK phosphatases; MKP-1 is the archetype of this family (44, 73). Our data demonstrated that 52145- Δwca_{K2} induced the expression of CYLD and MKP-1 in a PRR-dependent manner. These results are consistent with the concept that to prevent uncontrolled innate responses, a number of signaling mechanisms are evoked, including the transcriptional induction of negative regulatory proteins (26, 43). Interestingly, wild-type *K. pneumoniae* also induced the expression of the negative regulators CYLD and MKP-1. A tantalizing hypothesis could be that *K. pneumoniae* could modulate the activation of inflammatory responses by, on the one hand, preventing TLR-dependent responses (59; also this work) and, on the other hand, targeting cellular functions controlling the expression of CYLD and MKP-1. Future studies will explore this hypothesis.

It is known that *K. pneumoniae* strains expressing small amounts of CPS are less virulent than strains expressing larger amounts of CPS (51, 52) and, furthermore, that CPS mutants are avirulent in a mouse model of pneumonia (13, 41, 42). A previous study from our laboratory showed that a CPS mutant is more susceptible to hBD1 than wild-type *K. pneumoniae* (8), and here we have shown that this is also true for hBD2. Moreover, in this work we showed that the CPS mutant induced the expression of hBD2 and hBD3. Thus, the avirulent strain not only activated host defense mechanisms but also was susceptible to them. Of particular interest in our study is the fact that hBD3 also killed wild-type *K. pneumoniae*. Therefore, our findings demonstrating that wild-type *K. pneumoniae* did not elicit the expression of hBDs *in vitro* and elicited significantly lower levels of mBDs *in vivo* than the CPS mutant could be considered as a *Klebsiella* strategy for survival in the lung. Interestingly, results from our laboratory indicate that this strategy could be complemented by the expression of bacterial countermeasures against BDs, including an increase in CPS production and an alteration of LPS charge (8, 45; E. Llobet and J. A. Bengoechea, unpublished results). Collectively, these findings are consistent with a scenario in which *K. pneumoniae* facilitates the pathogenesis of pneumonia by, on the one hand, preventing the expression of BDs and, on the other hand, activating countermeasures against them.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to members of the Bengoechea lab for helpful discussions and to Christian Frank for critical reading of the manuscript. We thank Ole Sorensen and Jürgen Harder for sending us hBD3 and hBD2 luciferase reporter plasmids.

This work has been funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI05/2311 and PI06/1629) and ERA-NET Pathogenomics

(GEN2006-27776-C2-2-E/PAT and SAF2008-04353-E) to J.A.B. Ci-beRes is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

- Aarbiou, J., K. F. Rabe, and P. S. Hiemstra. 2002. Role of defensins in inflammatory lung disease. *Ann. Med.* **34**:96–101.
- Aderem, A., and R. J. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**:782–787.
- Agerberth, B., J. Grunewald, E. Castanos-Velez, B. Olsson, H. Jornvall, H. Wigzell, A. Eklund, and G. H. Gudmundsson. 1999. Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**:283–290.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783–801.
- Alvarez, D., S. Merino, J. M. Tomas, V. J. Benedi, and S. Alberti. 2000. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* **68**:953–955.
- Bals, R., M. J. Goldman, and J. M. Wilson. 1998. Mouse β -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect. Immun.* **66**:1225–1232.
- Boughan, P. K., R. H. Argent, M. Body-Malapel, J. H. Park, K. E. Ewings, A. G. Bowie, S. J. Ong, S. J. Cook, O. E. Sorensen, B. A. Manzo, N. Inohara, N. J. Klein, G. Nunez, J. C. Atherton, and M. Bajaj-Elliott. 2006. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of β -defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J. Biol. Chem.* **281**:11637–11648.
- Campos, M. A., M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. Llompert, S. Alberti, and J. A. Bengoechea. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72**:7107–7114.
- Chamaillard, M., S. E. Girardin, J. Viala, and D. J. Philpott. 2003. Nods, Naip, and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell. Microbiol.* **5**:581–592.
- Chung, W. O., and B. A. Dale. 2004. Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infect. Immun.* **72**:352–358.
- Claeys, S., T. de Belder, G. Holtappels, P. Gevaert, B. Verhasselt, P. Van Cauwenberge, and C. Bachert. 2003. Human β -defensins and toll-like receptors in the upper airway. *Allergy* **58**:748–753.
- Cortés, G., D. Alvarez, C. Saus, and S. Alberti. 2002. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect. Immun.* **70**:1075–1080.
- Cortés, G., N. Borrell, B. de Astorza, C. Gomez, J. Sauleda, and S. Alberti. 2002. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect. Immun.* **70**:2583–2590.
- Courtois, G. 2008. Tumor suppressor CYLD: negative regulation of NF- κ B signaling and more. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:1123–1132.
- Cunliffe, R. N., M. Kamal, F. R. Rose, P. D. James, and Y. R. Mahida. 2002. Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *J. Clin. Pathol.* **55**:298–304.
- de Astorza, B., G. Cortes, C. Crespi, C. Saus, J. M. Rojo, and S. Alberti. 2004. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**:1767–1774.
- Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:55–72.
- Favre-Bonte, S., B. Joly, and C. Forestier. 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:554–561.
- Fellermann, K., J. Wehkamp, K. R. Herrlinger, and E. F. Stange. 2003. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**:627–634.
- Franchi, L., J. H. Park, M. H. Shaw, N. Marina-Garcia, G. Chen, Y. G. Kim, and G. Nunez. 2008. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell. Microbiol.* **10**:1–8.
- Froy, O. 2005. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell. Microbiol.* **7**:1387–1397.
- Ganz, T. 2002. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J. Clin. Invest.* **109**:693–697.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:710–720.
- Girardin, S. E., P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott. 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens—common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* **10**:193–199.
- Girardin, S. E., R. Tournebise, M. Mavris, A. L. Page, X. Li, G. R. Stark, J. Bertin, P. S. DiStefano, M. Yaniv, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* **2**:736–742.
- Han, J., and R. J. Ulevitch. 2005. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat. Immunol.* **6**:1198–1205.
- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2001. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**:5707–5713.
- Harder, J., U. Meyer-Hoffert, L. M. Teran, L. Schwichtenberg, J. Bartels, S. Maune, and J. M. Schroder. 2000. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**:714–721.
- Hiratsuka, T., M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, and S. Matsukura. 1998. Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**:943–947.
- Hisamatsu, T., M. Suzuki, and D. K. Podolsky. 2003. Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**:32962–32968.
- Huttner, K. M., C. A. Kozak, and C. L. Bevins. 1997. The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human β -defensin 1. *FEBS Lett.* **413**:45–49.
- Inohara, N., and G. Nunez. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:371–382.
- Ishimoto, H., H. Mukae, Y. Date, T. Shimbara, M. S. Mondal, J. Ashitani, T. Hiratsuka, S. Kubo, S. Kohno, and M. Nakazato. 2006. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur. Respir. J.* **27**:253–260.
- Ji, S., J. E. Shin, Y. S. Kim, J. E. Oh, B. M. Min, and Y. Choi. 2009. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human β -defensins by *Fusobacterium nucleatum* in gingival epithelial cells. *Infect. Immun.* **77**:1044–1052.
- Jia, H. P., B. C. Schutte, A. Schudy, R. Linzmeier, J. M. Guthmiller, G. K. Johnson, B. F. Tack, J. P. Mitros, A. Rosenthal, T. Ganz, and P. B. McCray, Jr. 2001. Discovery of new human β -defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**:211–218.
- Jia, H. P., S. A. Wolk, B. C. Schutte, S. K. Lee, A. Vivado, B. F. Tack, C. L. Bevins, and P. B. McCray, Jr. 2000. A novel murine β -defensin expressed in tongue, esophagus, and trachea. *J. Biol. Chem.* **275**:33314–33320.
- Jono, H., J. H. Lim, L. F. Chen, H. Xu, E. Trompouki, Z. K. Pan, G. Mosialos, and J. D. Li. 2004. NF- κ B is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF- κ B: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *J. Biol. Chem.* **279**:36171–36174.
- Kim, J. G., S. J. Lee, and M. F. Kagnoff. 2004. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect. Immun.* **72**:1487–1495.
- Knowles, M. R., and R. C. Boucher. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**:571–577.
- Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, and B. A. Dale. 2002. Regulation of human β -defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF- κ B transcription factor family. *J. Immunol.* **168**:316–324.
- Lawlor, M. S., S. A. Handley, and V. L. Miller. 2006. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infect. Immun.* **74**:5402–5407.
- Lawlor, M. S., J. Hsu, P. D. Rick, and V. L. Miller. 2005. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol. Microbiol.* **58**:1054–1073.
- Liew, F. Y., D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O'Neill. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:446–458.
- Liu, Y., E. G. Shepherd, and L. D. Nelin. 2007. MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:202–212.
- Llobet, E., J. M. Tomas, and J. A. Bengoechea. 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**:3877–3886.
- Maisetta, G., G. Batoni, S. Esin, W. Florio, D. Bottai, F. Favilli, and M. Campa. 2006. In vitro bactericidal activity of human β -defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:806–809.
- McCray, P. B., Jr., and L. Bentley. 1997. Human airway epithelia express a β -defensin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**:343–349.
- Menzies, B. E., and A. Kenoyer. 2006. Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human β -defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect. Immun.* **74**:6847–6854.
- Moser, C., D. J. Weiner, E. Lysenko, R. Bals, J. N. Weiser, and J. M. Wilson. 2002. β -Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect. Immun.* **70**:3068–3072.
- Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel, and P. J. Sansonetti. 1989. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**:546–552.
- Nassif, X., N. Honore, T. Vasselon, S. T. Cole, and P. J. Sansonetti. 1989. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **3**:1349–1359.
- Nassif, X., and P. J. Sansonetti. 1986. Correlation of the virulence of *Kleb-*

- siella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect. Immun.* **54**:603–608.
53. Natarajan, K., S. Singh, T. R. Burke, Jr., D. Grunberger, and B. B. Aggarwal. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:9090–9095.
 54. Oelschlaeger, T. A., and B. D. Tall. 1997. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect. Immun.* **65**:2950–2958.
 55. Ogushi, K., A. Wada, T. Niidome, N. Mori, K. Oishi, T. Nagatake, A. Takahashi, H. Asakura, S. Makino, H. Hojo, Y. Nakahara, M. Ohsaki, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, J. Moss, and T. Hirayama. 2001. *Salmonella enteritidis* FlhC (flagella filament protein) induces human β -defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **276**:30521–30526.
 56. Patil, A. A., Y. Cai, Y. Sang, F. Blecha, and G. Zhang. 2005. Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol. Genomics* **23**:5–17.
 57. Pazgier, M., D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, and J. Lubkowski. 2006. Human β -defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:1294–1313.
 58. Podschun, R., and U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589–603.
 59. Regueiro, V., M. A. Campos, J. Pons, S. Alberti, and J. A. Bengoechea. 2006. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology* **152**:555–566.
 60. Regueiro, V., D. Moranta, M. A. Campos, J. Margareto, J. Garmendia, and J. A. Bengoechea. 2009. *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **77**:714–724.
 61. Röhrl, J., D. Yang, J. J. Oppenheim, and T. Hehlhans. 2008. Identification and biological characterization of mouse β -defensin 14, the orthologue of human β -defensin 3. *J. Biol. Chem.* **283**:5414–5419.
 62. Sahly, H., and R. Podschun. 1997. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**:393–399.
 63. Schutte, B. C., J. P. Mitros, J. A. Bartlett, J. D. Walters, H. P. Jia, M. J. Welsh, T. L. Casavant, and P. B. McCray, Jr. 2002. Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:2129–2133.
 64. Scott, M. G., and R. E. Hancock. 2000. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**:407–431.
 65. Shaw, M. H., T. Reimer, Y. G. Kim, and G. Nunez. 2008. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr. Opin. Immunol.* **20**:377–382.
 66. Singh, P. K., H. P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B. A. Conway, E. P. Greenberg, E. V. Valore, M. J. Welsh, T. Ganz, B. F. Tack, and P. B. McCray, Jr. 1998. Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:14961–14966.
 67. Steubesand, N., K. Kiehne, G. Brunke, R. Pahl, K. Reiss, K. H. Herzig, S. Schubert, S. Schreiber, U. R. Folsch, P. Rosenstiel, and A. Arlt. 2009. The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF- κ B and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of *Candida* esophagitis. *BMC Immunol.* **10**:36.
 68. Strober, W., P. J. Murray, A. Kitani, and T. Watanabe. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:9–20.
 69. Timko, J. 2004. Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella* spp. strains. *J. Infect. Chemother.* **10**:212–215.
 70. Travis, S. M., B. A. Conway, J. Zabner, J. J. Smith, N. N. Anderson, P. K. Singh, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh. 1999. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**:872–879.
 71. Trompouki, E., E. Hatzivassiliou, T. Tschritzis, H. Farmer, A. Ashworth, and G. Mosialos. 2003. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature* **424**:793–796.
 72. Wada, A., K. Ogushi, T. Kimura, H. Hojo, N. Mori, S. Suzuki, A. Kumatori, M. Se, Y. Nakahara, M. Nakamura, J. Moss, and T. Hirayama. 2001. *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human β -defensin 2 gene requires NF- κ B. *Cell. Microbiol.* **3**:115–123.
 73. Wang, X., and Y. Liu. 2007. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell. Signal.* **19**:1372–1382.
 74. Wehkamp, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schroder, and E. F. Stange. 2004. NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* **72**:5750–5758.
 75. Wehkamp, K., L. Schwichtenberg, J. M. Schroder, and J. Harder. 2006. *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1 β -mediated induction of human β -defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF- κ B and AP-1. *J. Invest. Dermatol.* **126**:121–127.
 76. Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**:291–296.
 77. Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**:525–528.
 78. Yang, D., O. Chertov, and J. J. Oppenheim. 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:978–989.
 79. Yoshida, H., H. Jono, H. Kai, and J. D. Li. 2005. The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 and TRAF7. *J. Biol. Chem.* **280**:41111–41121.
 80. Zilbauer, M., N. Dorrell, P. K. Boughan, A. Harris, B. W. Wren, N. J. Klein, and M. Bajaj-Elliott. 2005. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human β -defensins 2 and 3. *Infect. Immun.* **73**:7281–7289.

Klebsiella pneumoniae subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner

Verónica Regueiro,^{1,2†} David Moranta,^{1,2†}
Christian G. Frank,^{1,2†} Eider Larrarte,³
Javier Margareto,³ Catalina March,^{1,2}
Junkal Garmendia^{1,2,4} and José A. Bengoechea^{1,2,5*}

¹Program Infection and Immunity, Fundació Caubet-CIMERA Illes Balears, Bunyola, Spain.

²Program Host–Pathogen interactions, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain.

³Unidad de Genómica, LEIA-Salud, Miñano, Spain.

⁴Instituto de Agrobiotecnología, UPNA-CSIC, Mutilva Baja, Spain.

⁵Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain.

Summary

Klebsiella pneumoniae is an important cause of community-acquired and nosocomial pneumonia. Subversion of inflammation is essential for pathogen survival during infection. Evidence indicates that *K. pneumoniae* infections are characterized by lacking an early inflammatory response although the molecular bases are currently unknown. Here we unveil a novel strategy employed by a pathogen to counteract the activation of inflammatory responses. *K. pneumoniae* attenuates pro-inflammatory mediators-induced IL-8 secretion. *Klebsiella* antagonizes the activation of NF- κ B via the deubiquitinase CYLD and blocks the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) via the MAPK phosphatase MKP-1. Our studies demonstrate that *K. pneumoniae* has evolved the capacity to manipulate host systems dedicated to control the immune balance. To exert this anti-inflammatory effect, *Klebsiella* engages NOD1. In NOD1 knock-down cells, *Klebsiella* neither induces the expression of CYLD and MKP-1 nor blocks the activation of NF- κ B and MAPKs. *Klebsiella* inhibits Rac1 activation; and inhibition

of Rac1 activity triggers a NOD1-mediated CYLD and MKP-1 expression which in turn attenuates IL-1 β -induced IL-8 secretion. A capsule (CPS) mutant does not attenuate the inflammatory response. However, purified CPS neither reduces IL-1 β -induced IL-8 secretion nor induces the expression of CYLD and MKP-1 thereby indicating that CPS is necessary but not sufficient to attenuate inflammation.

Introduction

Activation of innate immune responses, particularly inflammation, is a key event in the host defence against pathogens. Innate responses rely on the activation of signalling pathways resulting in the production of antimicrobial molecules, the expression of co-stimulatory molecules and the release of cytokines and chemokines (Mogensen, 2009). These signalling pathways converge on a limited set of transcriptional activators including NF- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Medzhitov, 2007; Kumar *et al.*, 2009a; Mogensen, 2009). To launch these responses, the host recognizes conserved molecules uniquely expressed by pathogens, the so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), through a set of germ line-encoded receptors referred to as pattern-recognition receptors (PRRs) (Medzhitov, 2007; Kumar *et al.*, 2009a). The best-characterized PRRs belong to the Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide binding and oligomerization domain-like receptors (NLRs) families (Chamaillard *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009b). Among TLRs, most of the studies focus on TLR4, mainly involved in the detection of lipopolysaccharide (LPS), and on TLR2 which responds to a variety of Gram-positive PAMPs (Medzhitov, 2007; Kumar *et al.*, 2009a; Mogensen, 2009). Among NLRs, NOD1 receives increasing attention. NOD1 is located intracellularly and recognizes a peptidoglycan (PGN) motif, γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid from Gram-negative bacteria (Chamaillard *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2005).

Subversion of the fast-acting inflammatory response is considered important for pathogen survival during the early stages of infection. Such subversion allows pathogens to avoid immediate elimination by the host defence and

Received 20 July, 2010; revised 3 September, 2010; accepted 6 September, 2010. *For correspondence. E-mail bengoechea@caubet-cimera.es; Tel. (+34) 971 011780; Fax (+34) 971 011797.
†These authors have contributed equally to this work.

increases the chances of establishing a critical population size. However, little is known about the mechanisms employed by most of the pathogens to subvert the activation of inflammatory responses. At present, the best-characterized strategies are the modification of PAMPs to avoid detection by PRRs and the disruption of those intracellular signalling pathways implicated in host defence (Finlay and McFadden, 2006; Roy and Mocarski, 2007).

Klebsiella pneumoniae is the most common Gram-negative bacterium causing community-acquired pneumonia and up to 5% of community-acquired urinary tract infections (Sahly and Podschun, 1997). Community-acquired pneumonia is a very severe illness with a rapid onset, and despite the availability of an adequate antibiotic regimen the outcome is often fatal with observed mortality rates of 50%. Importantly, many clinical strains of *K. pneumoniae* are highly resistant to antibiotics, indicating the relative ineffectiveness of current therapy (Timko, 2004). Research over the last 20 years has demonstrated that activation of an inflammatory response is essential to clear *Klebsiella* infections (Greenberger *et al.*, 1996; Standiford *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001). Furthermore, increasing the response by providing inflammatory mediators decreases morbidity and mortality (Tsai *et al.*, 1998; Standiford *et al.*, 1999). In turn, any exogenous interference with the induction of this response leads to a more severe disease (Laichalk *et al.*, 1996). Strikingly, evidence indicates that *K. pneumoniae* infections are characterized by lacking an early production of cytokines although the molecular bases of these observations are currently unknown (Lawlor *et al.*, 2006).

We have previously tackled the interplay between *K. pneumoniae* and airway epithelial cells by studying the cellular responses activated upon *K. pneumoniae* infection. Epithelial cells play a critical role in the regulation of airway inflammation and immunity, hence acting as the

first line of host defence against infections. Our data indicated that wild-type *K. pneumoniae* does not activate a defence response in airway epithelial cells (Regueiro *et al.*, 2006; Moranta *et al.*, 2010). In contrast, infection with a *K. pneumoniae* capsule polysaccharide (CPS) mutant induces the expression of antimicrobial molecules and of IL-8 in a process dependent on the nuclear translocation of NF- κ B through TLR2 and TLR4 pathways (Regueiro *et al.*, 2006; Moranta *et al.*, 2010).

In the present study we explored whether wild-type *K. pneumoniae* modulates the activation of inflammatory responses by targeting cellular functions. Here we show that *K. pneumoniae* attenuates IL-8 secretion elicited by pro-inflammatory mediators in human airway epithelial cells. Mechanistically, this anti-inflammatory effect involves inhibition of the NF- κ B and MAPKs pathways via upregulation of CYLD and the MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in a NOD1-dependent manner.

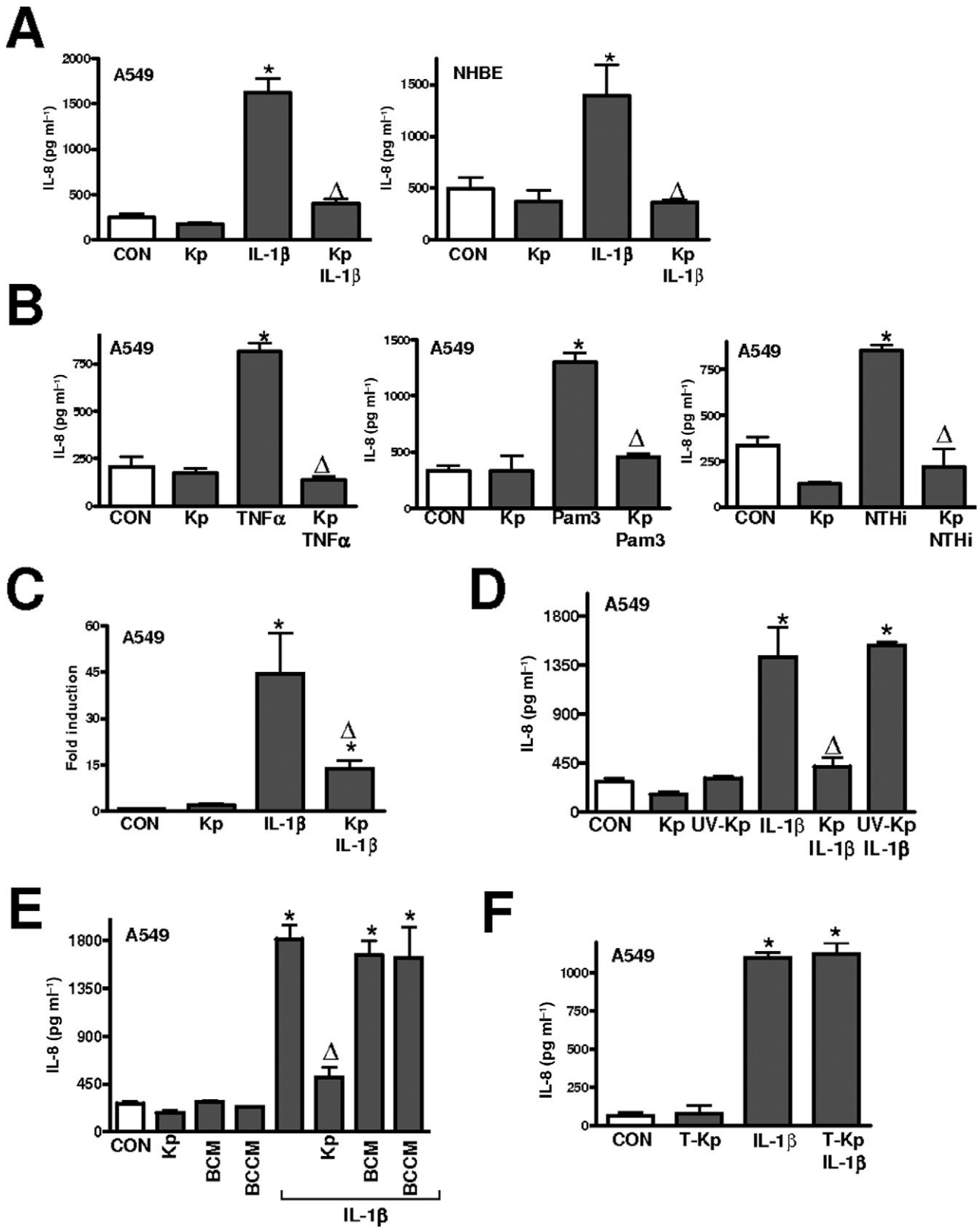
Results

K. pneumoniae attenuates pro-inflammatory stimuli-induced IL-8 expression

IL-8 is a multifunctional protein involved in host defence with a prominent role in the recruitment and activation of neutrophils (Hoffmann *et al.*, 2002). Several stimuli including PAMPs and pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α induce the secretion of IL-8 by epithelial cells (Hoffmann *et al.*, 2002). We sought to determine whether wild-type *K. pneumoniae* strain 52145 (hereafter Kp52145) modulates the IL-1 β -induced secretion of IL-8 by the human alveolar epithelial cell line A549 and by normal human bronchial epithelial cells (NHBE). As shown in Fig. 1A, Kp52145 reduced IL-1 β -induced IL-8

Fig. 1. *Klebsiella pneumoniae* attenuates pro-inflammatory stimuli-induced IL-8 expression.

- A. ELISA of IL-8 released by A549 or NHBE cells left untreated (CON) or infected for 1 h with Kp52145 (Kp) and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h ($n = 5$).
- B. ELISA of IL-8 released by A549 cells left non-treated (CON) or infected for 1 h and then stimulated for 2 h with TNF α (50 ng ml⁻¹); or Pam3CSK4 (Pam; 100 pg ml⁻¹) or stimulated for 4 h with non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi; multiplicity of infection 100 bacteria per cell) ($n = 4$).
- C. *il-8* mRNA levels, assessed by RT-qPCR, in A549 cells left untreated (CON) or infected for 2.5 h and then stimulated with IL-1 β (1 ng ml⁻¹) for 30 min ($n = 3$).
- D. ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON) or infected for 1 h with Kp52145 (Kp) or UV-killed Kp52145 (UV-Kp) and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h ($n = 3$). To generate UV-killed bacteria, a mock infection was carried out, i.e. same infection conditions as before, but in a tissue culture well without cells. After 3 h, the bacterial suspension was UV irradiated [1 joule for 3 min in a BIO-LINK BLX cross-linker (Vilber Lourmat)] and used to infect cells.
- E. ELISA of IL-8 in the supernatants of A549 cells. Cells were left untreated (CON) or infected for 1 h and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h ($n = 3$). To obtain bacteria conditioned medium (BCM) a mock infection was carried out and after 3 h, the bacterial suspension was filtered sterilized (0.22 μ m; nylon membrane) and used to treat cells. Bacteria-cell conditioned medium (BCCM) was obtained from previously infected cells for 3 h.
- F. ELISA of IL-8 released by A549 cells left untreated (CON) or infected for 1 h with Kp52145 (Kp) and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h. Bacteria and cell monolayer were separated by a Transwell insert. IL-1 β was added to the upper chamber.
- Data (A–F) are means and s.e.m. * $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA). $\Delta P < 0.05$ (results are significantly different from the results for cells treated with the pro-inflammatory stimuli alone; one-way ANOVA).



secretion by A549 cells (Fig. 1A, left panel) and NHBE (Fig. 1A, right panel). Next, we explored whether Kp52145 attenuates secretion of IL-8 induced by pro-inflammatory stimuli not signalling via IL-1R. Kp52145 also attenuated TNF α , Pam3CSK4 and non-typable *Haemophilus influenzae*-induced IL-8 secretion by A549 cells (Fig. 1B). To determine whether the observed effects involved changes in *il-8* transcription, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was carried out, and data showed that Kp52145 reduced IL-1 β -induced *il-8* mRNA levels (Fig. 1C). Analysis by flow cytometry revealed that infected A549 cells expressed amounts of surface molecules and receptors similar to non-infected cells (Fig. S1).

The anti-inflammatory effect triggered by Kp52145 could be abrogated by UV-killing bacteria (Fig. 1D) and was not exerted by either bacteria conditioned medium (BCM) or by bacteria–cell conditioned medium (BCCM) (Fig. 1E). Furthermore, removal of bacteria by washing, followed by 1 h gentamicin treatment, rendered cells responsive to IL-1 β (50 ng ml⁻¹) challenge [1140 \pm 90 pg ml⁻¹ IL-8 secreted by non-infected cells versus 990 \pm 75 pg ml⁻¹ IL-8 secreted by control cells; $P > 0.05$; one-way analysis of variance (ANOVA)]. We verified that Kp52145 itself did not inactivate IL-1 β . To this end, IL-1 β (50 ng ml⁻¹) was incubated with Kp52145 (10⁷ cfu ml⁻¹) for 3 h in tissue culture medium. Bacteria were pelleted (12 000 g, 5 min) and the supernatant used as a source of IL-1 β . This bacteria-incubated IL-1 β performed in an identical way to non-pre-incubated IL-1 β hence inducing secretion of IL-8 (1300 \pm 80 and 1100 \pm 100 pg ml⁻¹ IL-8 respectively; $P > 0.05$ one-way ANOVA). Collectively, these data suggest that Kp52145 anti-inflammatory effect is mediated by bacteria–cell contact. To further explore this effect, Kp52145 and A549 cells were separated by a Transwell insert (0.4 μ m pore size, polycarbonate membrane) and IL-1 β (50 ng ml⁻¹) was added to the upper compartment containing bacteria. As shown in Fig. 1F, the Kp52145 anti-inflammatory effect was abrogated.

Taken together, these findings demonstrate that Kp52145 attenuates the induction of IL-8 elicited by pro-inflammatory stimuli in a process requiring alive bacteria and bacteria–cell contact.

K. pneumoniae affects NF- κ B activation by upregulating the expression of CYLD

We next aimed to identify the cellular functions targeted by Kp52145 to exert the observed anti-inflammatory effect. Given that it is known that NF- κ B activation is associated with IL-8 expression (Hoffmann *et al.*, 2002), we analysed the effect of Kp52145 on the NF- κ B activation pathway, by studying the activation of a reporter construct controlled by synthetic NF- κ B response elements.

Klebsiella inhibited the IL-1 β and TNF α -dependent activation of the reporter construct (Fig. 2A). Immunolocalization of the NF- κ B p65 subunit in A549 cells revealed that Kp52145 prevented IL-1 β - and TNF α -induced nuclear translocation of the p65 subunit (Fig. 2B). In the canonical NF- κ B activation pathway, nuclear translocation of NF- κ B is preceded by phosphorylation and subsequent degradation of I κ B α (Hayden and Ghosh, 2008). We analysed the levels of I κ B α in cell extracts by immunoblot. Infection of A549 cells with Kp52145 before IL-1 β challenge resulted in I κ B α stabilization in contrast to its nearly complete degradation induced by IL-1 β (Fig. 2C). In summary, these data indicate that Kp52145 inhibits cytokine-dependent activation of NF- κ B by altering I κ B α degradation.

Having established that Kp52145 blocks the activation of the NF- κ B pathway we sought to identify the underlying molecular mechanisms. Ubiquitination is a key event in the regulation of NF- κ B signalling (Sun, 2008; Skaug *et al.*, 2009). In fact, ubiquitination of proteins belonging to the TNF receptor-associated factor family (TRAF) is essential for signal transduction leading to phosphorylation of I κ B α (Sun, 2008; Skaug *et al.*, 2009). Given that ubiquitination of TRAF6 is a necessary event for IL-1 β -dependent activation of NF- κ B (Hacker and Karin, 2006), we asked whether Kp52145 affects IL-1 β -induced ubiquitination of TRAF6. Figure 3A shows that IL-1 β -induced ubiquitination of TRAF6 was reduced in cells infected with Kp52145.

Recent evidence indicates that deubiquitinating enzymes regulate the activation of innate immune responses (Sun, 2008). CYLD, originally identified as a tumour suppressor, is a deubiquitinating enzyme that targets members of the TRAF family and acts as a negative regulator of NF- κ B activation (Trompouki *et al.*, 2003). We explored whether Kp52145 downregulates the NF- κ B pathway by inducing the expression of CYLD. RT-qPCR analysis showed that Kp52145 induced the expression of *cyld* in both A549 and NHBE cells (Fig. 3B). Western blot analysis demonstrated that Kp52145 increased the expression of CYLD in both cell types (Fig. 3C). Next, we investigated whether CYLD could play a role in Kp52145-triggered block of NF- κ B activation by using small interfering RNA (siRNA) targeting CYLD. In CYLD knock-down cells, Kp52145 did not inhibit IL-1 β -dependent activation of the NF- κ B reporter construct (Fig. 3D). Finally, we asked whether Kp52145 inhibits the ubiquitination of TRAF6 via CYLD. As shown in Fig. 3E, Kp52145 did not affect IL-1 β -induced ubiquitination of TRAF6 in CYLD knock-down cells.

Collectively, our data demonstrate that Kp52145 blocks the activation of NF- κ B signalling pathway by upregulating the expression of CYLD.

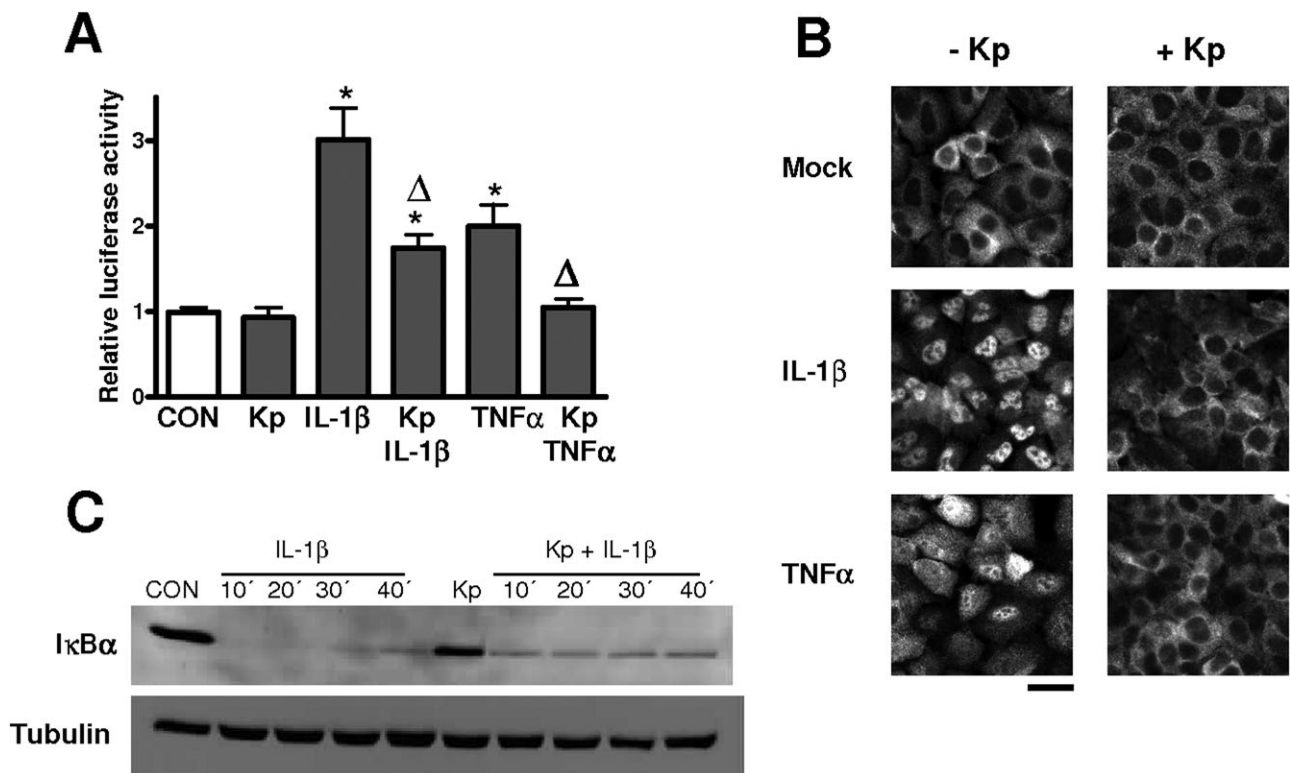


Fig. 2. *Klebsiella pneumoniae* affects NF- κ B activation.

A. Activation of a NF- κ B luciferase reporter plasmid in A549 cells left non-treated (CON) or infected for 1 h and then stimulated for 4 h with IL-1 β (20 ng ml⁻¹) or TNF α (50 ng ml⁻¹). Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to cells untreated (data are means and s.e.m.; $n = 3$).

B. Immunofluorescence microscopy of A549 cells left untreated or stimulated with IL-1 β (10 ng ml⁻¹) or TNF α (100 ng ml⁻¹) for 20 min. When indicated (right column) cells were infected for 3 h before adding the stimuli. Cells were labelled with antibody anti-p65 NF- κ B subunit. Original magnification, $\times 400$. Scale bar 20 μ m.

C. Immunoblot analysis of I κ B α levels in lysates of A549 cells left untreated (CON), stimulated with IL-1 β (1 ng ml⁻¹) for the indicated times, infected for 3 h (Kp), or infected for 3 h and then stimulated with IL-1 β as before. Data are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA). $\Delta P < 0.05$ (results are significantly different from the results for cells treated with the respective pro-inflammatory stimuli alone; one-way ANOVA).

K. pneumoniae affects MAPKs phosphorylation via activation of MKP-1, a MAPK phosphatase

Pro-inflammatory stimuli also activate MAPKs which are considered important regulators of gene expression including *il-8* (Hoffmann *et al.*, 2002). The activation of the three MAPKs p38, JNK and p44/42 occurs through phosphorylation of serine and threonine residues. IL-1 β is known to be a potent inducer of MAPKs' phosphorylation (O'Neill, 2000). We asked whether Kp52145 affects IL-1 β -induced phosphorylation of p38, p44/42 and JNK. Western blot analysis showed that infection with Kp52145 reduced IL-1 β -induced phosphorylation of the three MAPKs in both A549 and NHBE cells (Fig. 4A and B respectively).

These findings led us to explore whether Kp52145 upregulates the expression of inhibitors of MAPKs' phosphorylation. Evidence indicates that MAPK phosphatases are pivotal in the regulation of immune responses by deactivating MAPKs (Liu *et al.*, 2007). Several studies highlight the importance of the phosphatase MKP-1 in the

attenuation of MAPKs activities (Liu *et al.*, 2007). Therefore, we hypothesized that Kp52145-triggered reduced phosphorylation of MAPKs could be mediated by MKP-1. Consistent with this, we observed that Kp52145 increased the expression of *mkp-1* and MKP-1 levels in both A549 and NHBE cells (Fig. 4C and D). To study the role of MKP-1 in Kp52145-mediated reduced phosphorylation of MAPKs, *mkp-1* was knocked down using siRNA. In MKP-1 knock-down cells; Kp52145 did not affect IL-1 β -induced phosphorylation of MAPKs (Fig. 4E).

In summary, our findings indicate that Kp52145 inhibits IL-1 β -dependent activation of MAPKs by upregulating the expression of MKP-1, which in turn leads to dephosphorylation of p38, p44/42 and JNK MAPKs.

K. pneumoniae attenuates IL-1 β -induced IL-8 secretion by upregulating the expression of CYLD and MKP-1

Having established that Kp52145 blocks the activation of NF- κ B and MAPKs pathways by upregulating the

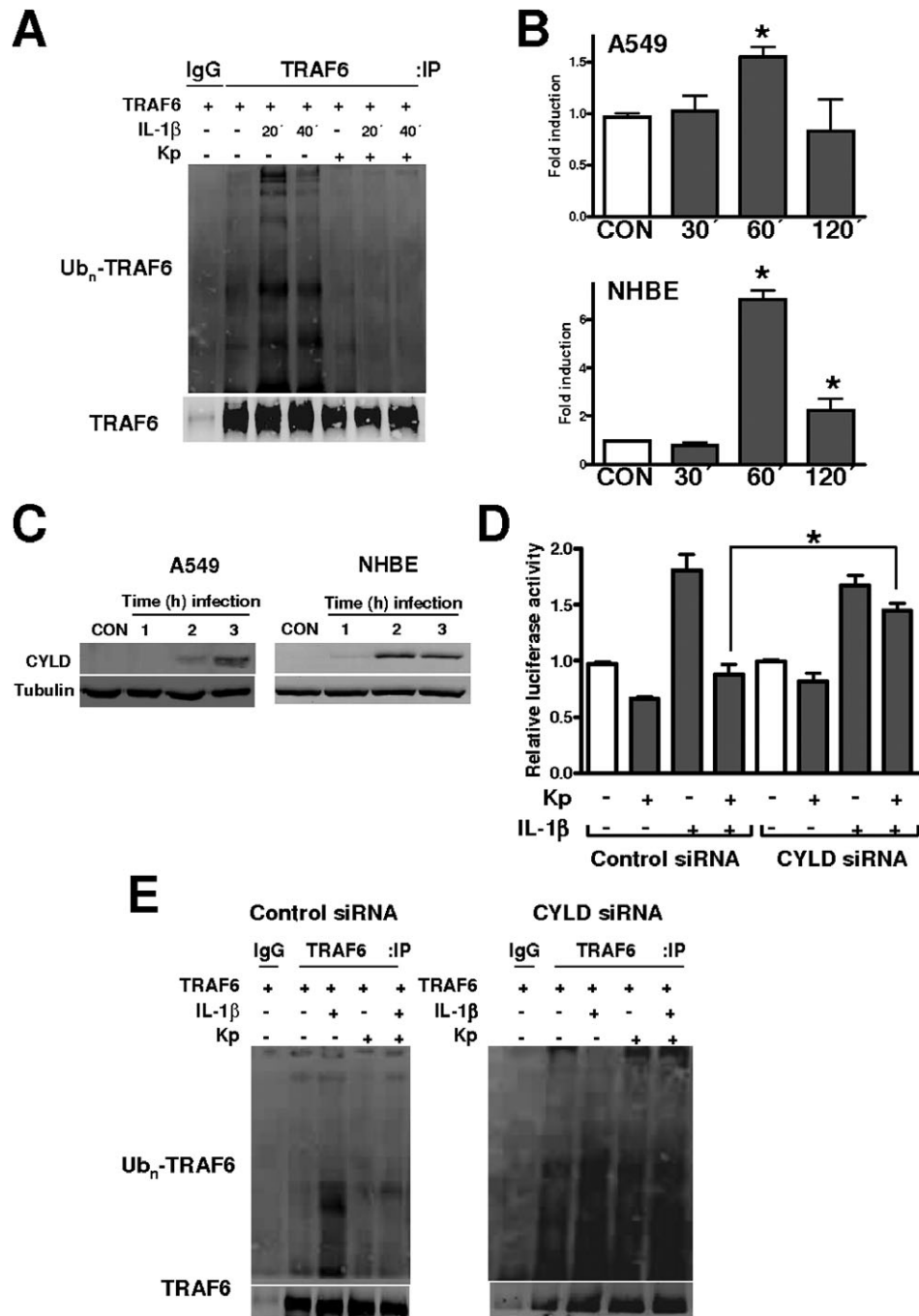


Fig. 3. *Klebsiella pneumoniae* affects NF- κ B activation via CYLD.

A. Immunoblot analysis of ubiquitinated TRAF6 and TRAF6 in lysates of A549 cells left untreated, stimulated with IL-1 β (20 ng ml⁻¹) for the indicated times, infected for 3 h, or infected for 3 h and then stimulated with IL-1 β , assessed after immunoprecipitation of TRAF6. Data are representative of four independent experiments.

B. *cyld* mRNA levels, assessed by RT-qPCR, in A549 or NHBE cells left untreated (CON) or infected for the indicated times (data are means and s.e.m.; $n = 3$). * $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA).

C. Immunoblot analysis of CYLD levels in A549 or NHBE cells left uninfected (CON) or infected for the indicated times. Data are representative of three independent experiments.

D. Activation of a NF- κ B luciferase reporter plasmid in A549 cells transfected with either control or CYLD siRNA, which were left untreated or infected for 1 h and then stimulated for 4 h with IL-1 β (20 ng ml⁻¹). Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to the untreated cells (data are means and s.e.m.; $n = 3$). * $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

E. Immunoblot analysis of ubiquitinated TRAF6 and TRAF6 in lysates of A549 cells transfected with either control or CYLD siRNA, which were left untreated, stimulated with IL-1 β (20 ng ml⁻¹) for 30 min, infected for 3 h, or infected for 3 h and then stimulated with IL-1 β , assessed after immunoprecipitation of TRAF6. Data are representative of five independent experiments.

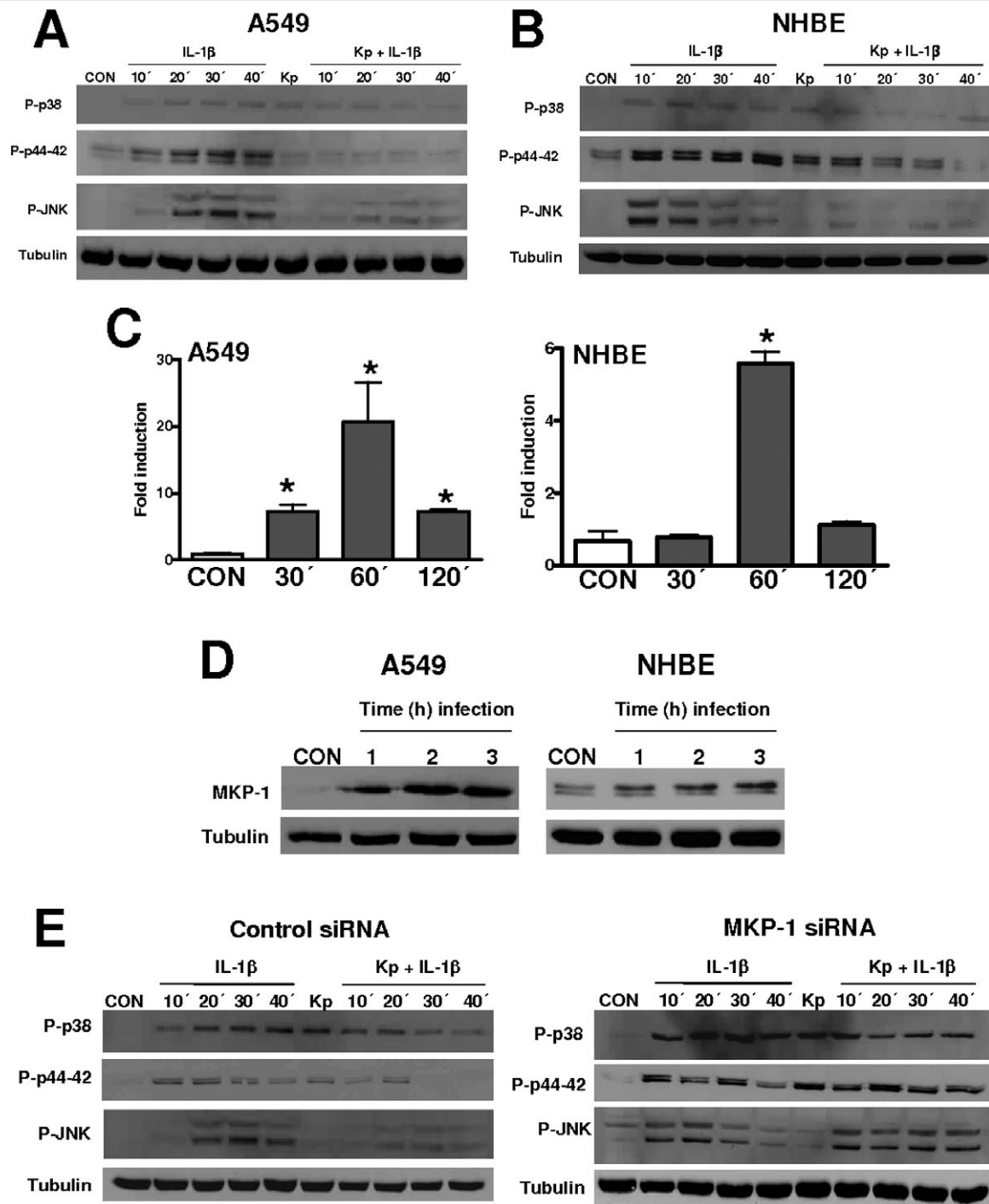


Fig. 4. *Klebsiella pneumoniae* affects MAPKs' phosphorylation via activation of MKP-1.

A and B. Immunoblot analysis of phospho p38 (P-p38), phospho p44-42 (P-p44-42), phospho JNK (P-JNK) and tubulin levels in lysates of A549 or NHBE cells left untreated (CON), stimulated with IL-1 β (1 ng ml⁻¹) for the indicated times, infected for 3 h (Kp), or infected for 3 h and then stimulated with IL-1 β as before. Data are representative of three independent experiments.

C. *mkp-1* mRNA levels, assessed by RT-qPCR, in A549 or NHBE cells left untreated (CON) or infected for the indicated times (data are means and s.e.m.; $n = 3$). * $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA).

D. Immunoblot analysis of MKP-1 levels in A549 or NHBE cells left uninfected (CON) or infected for the indicated times. Data are representative of three independent experiments.

E. Immunoblot analysis of phospho MAPKs and tubulin levels in lysates of A549 cells transfected with either control or MKP-1 siRNA, which were left untreated (CON), stimulated with IL-1 β (1 ng ml⁻¹) for the indicated times, infected for 3 h (Kp), or infected for 3 h and then stimulated with IL-1 β as before. Data are representative of three independent experiments.

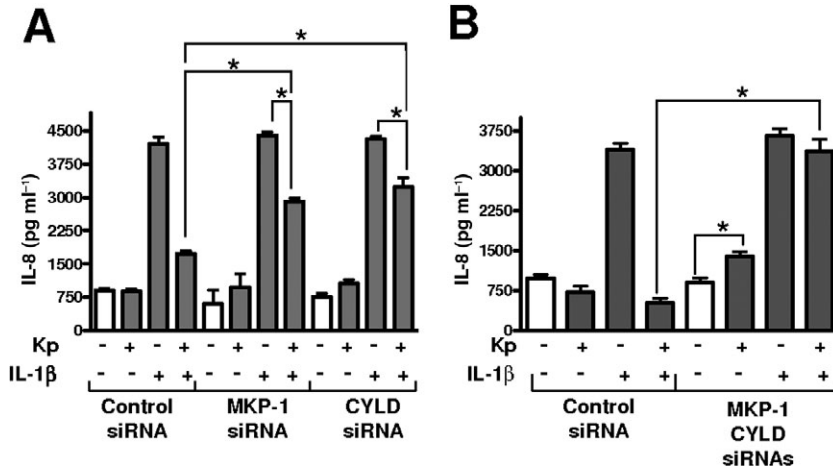


Fig. 5. *Klebsiella pneumoniae* attenuates IL-1 β -induced IL-8 secretion via CYLD and MKP-1.

A. ELISA of IL-8 secreted by A549 cells transfected with either control, MKP-1 or CYLD siRNAs, which were left untreated (CON) or infected for 1 h with Kp52145 (Kp) and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h.

B. As before but cells were transfected with either control (final concentration 40 nM) or both MKP-1 and CYLD (they were co-transfected each one at a concentration of 20 nM) siRNAs.

Data (A and B) are means and s.e.m. ($n = 3$). * $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

expression of CYLD and MKP-1, we sought to determine the involvement of both proteins in Kp52145-induced anti-inflammatory effect. In MKP-1 knock-down cells by siRNA, Kp52145 attenuated partially IL-1 β -dependent induction of IL-8 (Fig. 5). Similarly, knock-down of CYLD by siRNA also reduced Kp52145-triggered attenuation of IL-1 β -induced IL-8 secretion (Fig. 5). In cells knock-down for both CYLD and MKP-1, Kp52145 did not reduce IL-1 β -induced IL-8 levels (Fig. 5).

K. pneumoniae induces CYLD and MKP-1 in vivo

We asked next whether Kp52145 induces the expression of CYLD and MKP-1 in the lungs of infected mice. To this end, mice were infected intranasally and mRNA expression of *cyld* and *mkp-1* was measured by RT-qPCR at 6, 12 and 24 h post infection. Results displayed in Fig. 6 show that both genes were upregulated in the lungs of infected mice. Furthermore, the expression of both genes

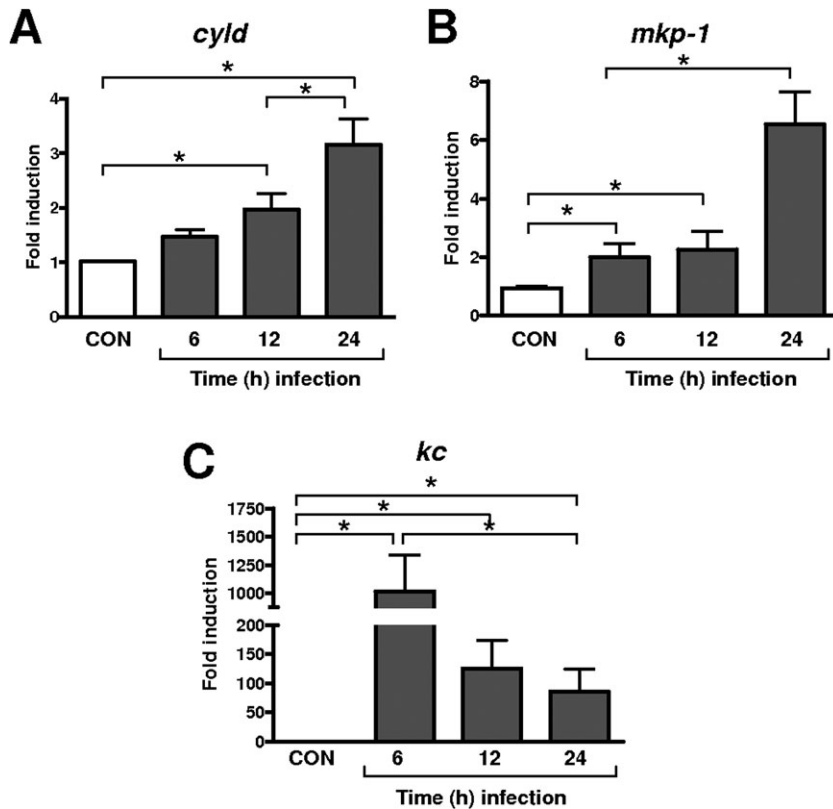


Fig. 6. *cyld* and *mkp-1* expressions in mice lungs after *K. pneumoniae* infection. Mice were non-infected (white bars, $n = 5$), or infected with wild-type *K. pneumoniae* 52145. (A) *cyld*, (B) *mkp-1* and (C) *kc* mRNAs expressions in whole lungs at indicated time points post infection were assessed by RT-qPCR (five mice per time point). Data are means and s.e.m.; * $P < 0.05$ for the indicated comparisons (one-way ANOVA).

increased over time, being significantly higher at 24 h than at 6 h post infection (Fig. 6A and B). We also measured the expression of the CXC chemokine KC in the lungs of infected mice. It has been shown that high KC lung levels result in increased *K. pneumoniae* clearance and improved survival (Tsai *et al.*, 1998). Analysis by RT-qPCR revealed that Kp52145 induced the expression of *kc* in the lungs of infected mice; however, the levels of *kc* at 24 h post infection were 10-fold lower than at 6 h post infection (Fig. 6C). Of note, the reduction of *kc* expression correlated with the increased expression of *cylD* and *mkp-1*.

K. pneumoniae-induced anti-inflammatory effect relies on the activation of NOD1

We investigated the potential contribution of TLRs-dependent pathways to Kp52145-induced anti-inflammation. Almost all TLRs activate cellular signalling pathways through TIR domain-mediated interactions with the adaptor molecule MyD88 (Kenny and O'Neill, 2008). Therefore, the involvement of TLRs in Kp52145-induced anti-inflammatory effect can be examined by reducing the expression of the MyD88 adaptor molecule using siRNA. TNF α was used as a pro-inflammatory stimulus because MyD88 is essential for IL-1 β -dependent induction of IL-8 expression (O'Neill, 2000). After siRNA knock-down of MyD88, Kp52145 was still able to attenuate TNF α -induced IL-8 expression (Fig. 7A). These data suggested that there is no role for MyD88-dependent TLR signalling in Kp52145 anti-inflammatory effect. However, considering that TLR4 is also able to signal through the protein adaptor TRIF (Kenny and O'Neill, 2008), we asked whether TLR4 participates in Kp52145-elicited anti-inflammation. Kp52145 still inhibited TNF α -induced IL-8 expression in TLR4 knock-down cells by siRNA (Fig. 7A).

Another PRR constitutively expressed by airway epithelial cells is NOD1 (Girardin *et al.*, 2001; Hisamatsu *et al.*, 2003; Inohara and Nunez, 2003; Strober *et al.*, 2006). To determine whether NOD1 is involved in Kp52145-induced anti-inflammatory effect, siRNA was used to knock-down its expression. Kp52145 did not reduce IL-1 β -dependent IL-8 expression in NOD1 knock-down cells (Fig. 7B). Similar results were obtained using two different siRNA (Fig. 7B). Kp52145 increased IL-8 expression in NOD1 knock-down cells in contrast to cells transfected with control siRNA (Fig. 7B). Furthermore, Kp52145 did not inhibit IL-1 β -induced phosphorylation of MAPKs in cells in which *nod1* was knocked-down by using siRNA (Fig. 7C). In addition, Kp52145 did not block IL-1 β -dependent activation of the NF- κ B reporter construct in NOD1 knock-down cells (Fig. 7D). The efficiency of siRNA-mediated downregulation of target gene mRNA levels was confirmed by RT-qPCR (Fig. S2).

Having established the involvement of CYLD-, MKP-1- and NOD1-dependent signalling on Kp52145-triggered anti-inflammatory effect, we questioned whether Kp52145 upregulates the expression of CYLD and MKP-1 through NOD1. Kp52145 did not increase the expression of both CYLD and MKP-1 in NOD1 knock-down cells in contrast to cells transfected with control siRNA (Fig. 7E).

Altogether, these data show that Kp52145-triggered anti-inflammatory effect relies on NOD1-dependent expression of both CYLD and MKP-1.

Rac1 inhibition triggers NOD1-mediated CYLD and MKP-1 expression

Considering that NOD1 recognizes PGN (Chamaillard *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2005), one could speculate that *K. pneumoniae* PGN mediates the anti-inflammatory effect. Yet, *K. pneumoniae* PGN does not differ from PGNs expressed by other *Enterobacteriaceae* (Botta and Buffa, 1981) known to activate inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. On the other hand, evidence suggests that actin cytoskeletal reorganization may contribute to the activation of members of the NLR family (Legrand-Poels *et al.*, 2007; Eitel *et al.*, 2008; Kufer *et al.*, 2008). Furthermore, inhibition of the Rho family GTPase Rac1 is associated to activation of NOD2, a close homologue of NOD1 (Eitel *et al.*, 2008). Therefore, we hypothesized that *K. pneumoniae* may negatively modulate Rac1 activity to contribute to NOD1-mediated induction of CYLD and MKP-1.

To pursue this notion, we explored whether *K. pneumoniae* inhibits Rac1 activation by analysing the amount of activated protein bound to the GST-PAK Rac1 interaction binding site. Pull-down assays of activated Rac1 revealed that the levels of Rac1-GTP were lower in Kp52145 infected cells than in control cells (Fig. 8A). Moreover, Kp52145 also inhibited PMA-dependent Rac1 activation (Fig. 8A). To further sustain the notion that *K. pneumoniae* inhibits Rac1 activation, we questioned whether Kp52145 affects *Yersinia enterocolitica* invasion of epithelial cells. It is firmly established that *Y. enterocolitica* invasion is dependent on Rac1 activation (Wong and Isberg, 2005). Indeed, a 99% reduction in *Y. enterocolitica* invasion was observed in Kp52145 infected cells (Fig. S3). Control experiments showed that *Y. enterocolitica* adhesion was not significantly different between control cells or *Klebsiella* infected cells (Fig. S3).

Rac1 inhibition perturbs membrane recruitment of NOD2, a close homologue of NOD1 (Eitel *et al.*, 2008). To test whether this is also the case for NOD1, HEK293T cells were transiently transfected with a plasmid containing HA-tag NOD1 and the subcellular location of NOD1 was assessed by Western blot. NSC23766 inhibits the generation of Rac1-GTP (Gao *et al.*, 2004). This inhibitor

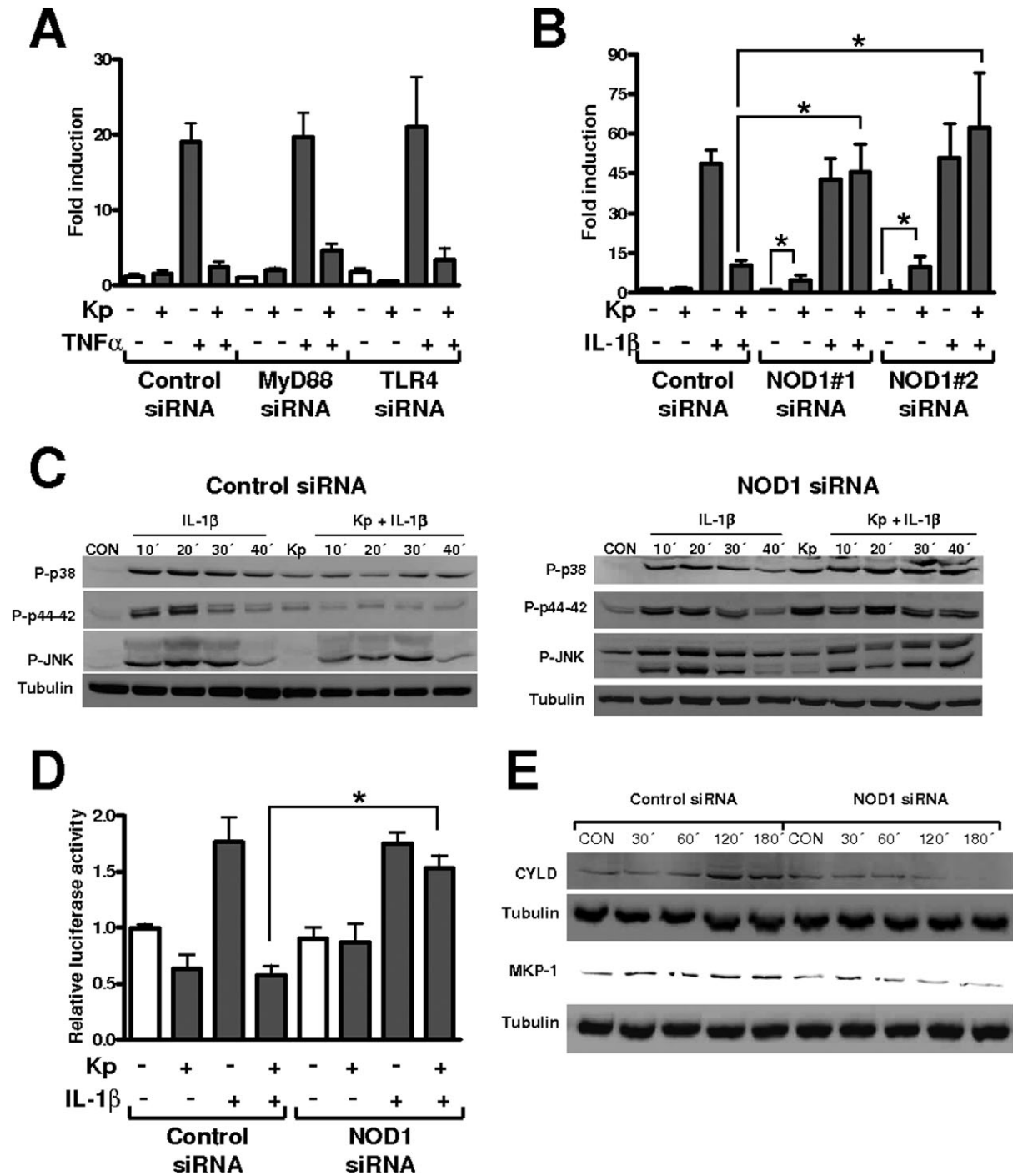


Fig. 7. *Klebsiella pneumoniae*-induced anti-inflammatory effect relies on the activation of NOD1.

A and B. *il-8* mRNA levels, assessed by RT-qPCR, in A549 cells transfected with control, MyD88, TLR4 or NOD1 (two different ones) siRNAs which were left untreated, stimulated with cytokines (IL-1 β , 1 ng ml $^{-1}$; TNF α , 20 ng ml $^{-1}$) for 30 min or infected for 2.5 h and then stimulated with the indicated cytokines ($n = 3$) (data are means and s.e.m.).

C. Immunoblot analysis of phospho MAPKs and tubulin levels in lysates of A549 cells transfected with either control or NOD1 siRNA (NOD1#1), which were left untreated (CON), stimulated with IL-1 β (1 ng ml $^{-1}$) for the indicated times, infected for 3 h (Kp), or infected for 3 h and then stimulated with IL-1 β . Data are representative of three independent experiments.

D. Activation of a NF- κ B luciferase reporter plasmid in A549 cells transfected with either control or NOD1 siRNA (NOD1#1), which were left untreated or infected for 1 h and then stimulated for 4 h with IL-1 β (20 ng ml $^{-1}$). Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to the cells untreated (data are means and s.e.m.; $n = 3$).

E. Immunoblot analysis of CYLD, MKP-1 and tubulin levels in A549 cells transfected with either control or NOD1 siRNA (NOD1#1), which were left uninfected (CON) or infected for the indicated times. Data are representative of three independent experiments.

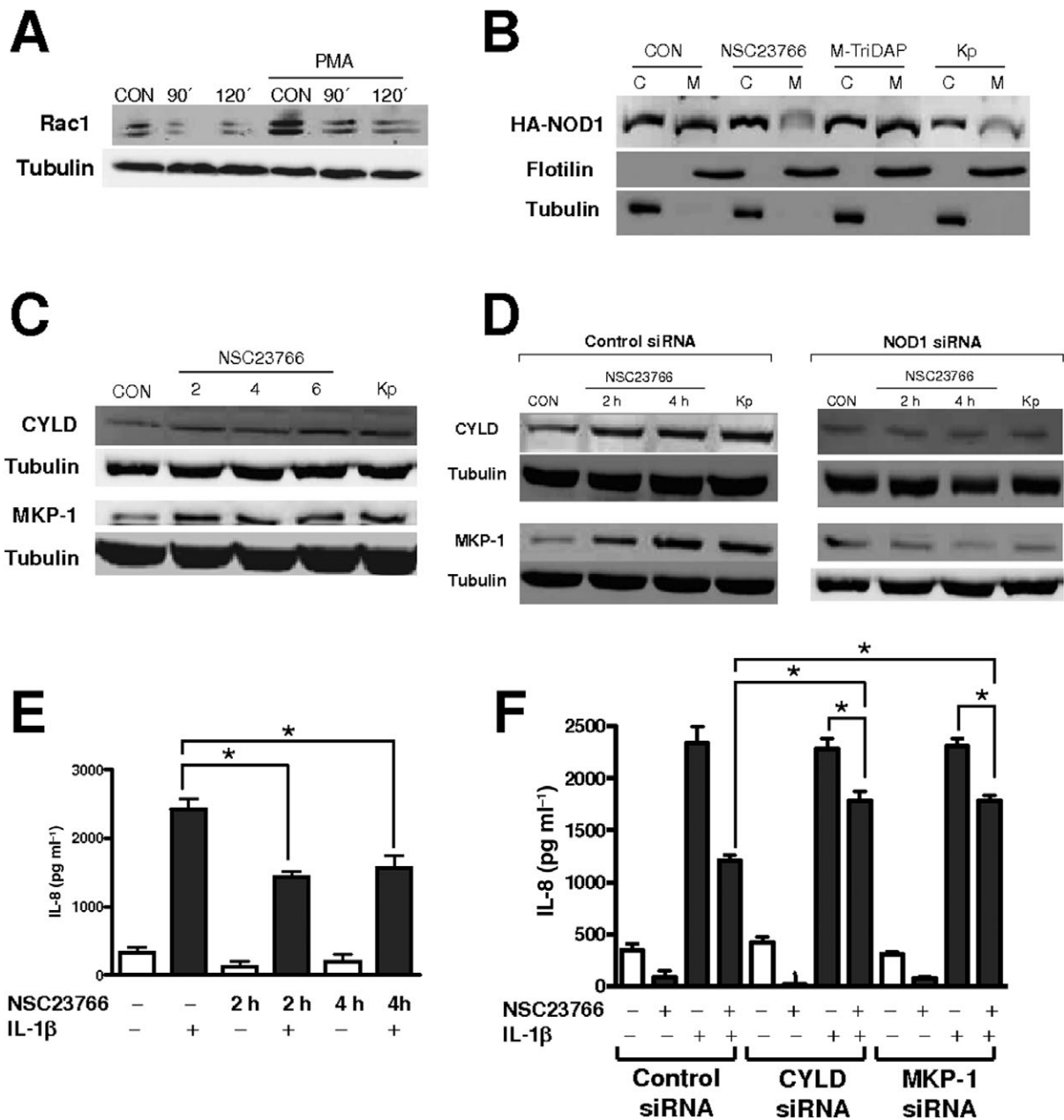


Fig. 8. Rac1 inhibition triggers NOD1-mediated CYLD and MKP-1 expressions.

A. Rac1 activation, detected by the amount bound to the GST-PAK Rac1 interaction binding site, was determined in A549 cells left uninfected (CON), infected for 90 or 120 min, stimulated with PMA (100 nM) for 40 min, or infected for 90 or 120 min and then stimulated with PMA. Tubulin Western blot was used as a loading control before the pull-down ($n = 3$).

B. Western blot analysis of cytosol (C) and membrane (M) fractions from HEK293T cells transfected with HA-NOD1 plasmid which were left untreated (CON), treated with Rac1 inhibitor NSC23766 (4 h, 200 μ M final concentration), NOD1 agonist M-Tri-DAP (40 min, 10 μ g ml⁻¹) or infected with Kp52145 (Kp) for 3 h. NOD1 was revealed using anti-HA antibody (HA-NOD1); flotillinE 2 and tubulin are used as markers of the fractions.

C. Immunoblot analysis of CYLD, MKP-1 and tubulin levels in A549 cells which were left uninfected (CON), treated with Rac1 inhibitor NSC23766 (200 μ M) for the indicated hours or infected for 3 h (Kp). Data are representative of three independent experiments.

D. Immunoblot analysis of CYLD, MKP-1 and tubulin levels in A549 cells transfected with either control or NOD1 siRNA (NOD1#1), which were left uninfected (CON), treated with Rac1 inhibitor NSC23766 (200 μ M) for the indicated hours or infected with Kp52145 for 3 h (Kp). Data are representative of three independent experiments.

E. ELISA of IL-8 secreted by A549 cells which were left untreated (CON) or treated with Rac1 inhibitor NSC23766 (200 μ M) for the indicated hours and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h (data are means and s.e.m.; $n = 3$). * $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

F. ELISA of IL-8 secreted by A549 cells transfected with either control, MKP-1 or CYLD siRNAs, which were left untreated (CON) or treated with Rac1 inhibitor NSC23766 (200 μ M) for 2 h and then stimulated with IL-1 β (50 ng ml⁻¹) for 2 h (data are means and s.e.m.; $n = 3$).

* $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

does not affect the activity of endogenous Cdc42 or RhoA (Gao *et al.*, 2004). NSC23766 decreased membrane association of NOD1 compared with untreated cells (Fig. 8B). Consistent with Rac1 inhibition by Kp52145, infection also decreased NOD1 membrane association. M-Tri-DAP, a NOD1 agonist, did not affect membrane association of NOD1 (Fig. 8B).

We next examined whether Rac1 inhibition could be sufficient to induce the expression of CYLD and MKP-1. Western blot analysis showed that NSC23766 induced the expression of CYLD and MKP-1 in A549 cells (Fig. 8C). Furthermore, NSC23766-induced CYLD and MKP-1 expression is dependent on NOD1 because this inhibitor did not increase the expression of CYLD and MKP-1 in NOD1 knock-down cells (Fig. 8D). These findings prompted us to evaluate whether Rac1 inhibition reduces IL-1 β -dependent induction of IL-8 secretion. Indeed, NSC23766 attenuated IL-1 β -induced IL-8 levels (Fig. 8E). Moreover, knock-down of MKP-1 or CYLD by siRNA reduced NSC23766-triggered attenuation of IL-1 β -induced IL-8 (Fig. 8F).

In summary, our findings suggest that Kp52145-triggered anti-inflammatory effect is dependent on Rac1 inhibition which in turn induces NOD1-mediated CYLD and MKP-1 expression.

K. pneumoniae capsule polysaccharide is necessary but not sufficient to attenuate pro-inflammatory stimuli-induced IL-8 expression

K. pneumoniae CPS is recognized as an important virulence factor. We have previously shown that 52K10, an isogenic capsule polysaccharide mutant from Kp52145 (Cortes *et al.*, 2002), activates an inflammatory programme in airway epithelial cells (Regueiro *et al.*, 2006). To explore whether CPS could account for Kp52145 anti-inflammatory effect we determined the effect of 52K10 on IL-1 β -induced *il-8* expression by A549 cells. Data obtained by RT-qPCR showed that 52K10 did not significantly reduce IL-1 β -induced *il-8* mRNA levels (Fig. 9A). Furthermore, 52K10 did not significantly attenuate IL-1 β -induced IL-8 secretion by A549 cells (Fig. 9B). These results might indicate that CPS could mediate the observed Kp52145 anti-inflammatory effect. However, purified CPS (up to 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$) did not reduce IL-1 β -induced IL-8 secretion (Fig. 9C). Furthermore, purified CPS did not induce the expression of either CYLD or MKP-1 (Fig. 9D) and it did not activate NF- κ B-dependent reporter activity in NOD1-expressing HEK293T cells (Fig. 9E). Addition of Fugene HD, a transfection reagent, together with CPS did not lead to the activation of NF- κ B-dependent reporter activity (data not shown).

Taken together it can be concluded that CPS is necessary but not sufficient for Kp52145 anti-inflammatory effect.

Discussion

In the present study, we provide evidence that *K. pneumoniae* dampens the activation of inflammatory responses by targeting NF- κ B and MAPKs pathways, via upregulation of CYLD and MKP-1. Our data show that, in order to exert this anti-inflammatory effect, Kp52145 engages a NOD1-dependent pathway by inhibiting Rac1 activation. Collectively, these findings unveil a previously unknown strategy employed by a human pathogen to counteract host defence mechanisms.

Inflammation is a key element of the infected host response against pathogens (Barton, 2008). In turn, pathogens try to counteract this fast-acting response to survive during the early stages of infection. One of the best-characterized strategies is the avoidance of detection by PRRs (Finlay and McFadden, 2006; Roy and Mocarski, 2007). For example, pathogens modify their LPS lipid As to evade detection by TLR4 (Miller *et al.*, 2005). Another strategy is the disruption of cellular communications by targeting NF- κ B and MAPKs signalling pathways (Finlay and McFadden, 2006; Roy and Mocarski, 2007), which in most cases is achieved by injecting protein effectors via a type III secretion system.

The evidence provided in this study describes a novel strategy utilized by bacteria to subvert the activation of inflammatory responses. *K. pneumoniae* upregulates the expression of two proteins, CYLD and MKP-1, which cells normally activate to return to homeostasis after an inflammatory response (Liu *et al.*, 2007; Sun, 2008). Our data support the notion that *Klebsiella* increases the transcription of both genes; however, it cannot be ruled out that post-transcriptional mechanisms could be operating as well. *In vitro* and *in vivo* studies suggest that CYLD and MKP-1 may protect the host from an overwhelming inflammatory response by terminating the activation of NF- κ B- and MAPKs-dependent signalling pathways respectively (Chi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007; 2008; Liu *et al.*, 2007). Then, *K. pneumoniae*-induced expression of CYLD and MKP-1 could be explained as part of a normal cell response to avoid a *Klebsiella*-dependent overactive inflammatory response. However, this explanation seems unlikely given the fact that wild-type *K. pneumoniae* does not induce the secretion of inflammatory mediators by airway cells (this work and Regueiro *et al.*, 2006). Therefore, based on the presented data, we propose that *K. pneumoniae* hijacks two host systems used by the cells to return to homeostasis in order to actively block the activation of inflammatory responses. We put forward the notion that manipulation of systems

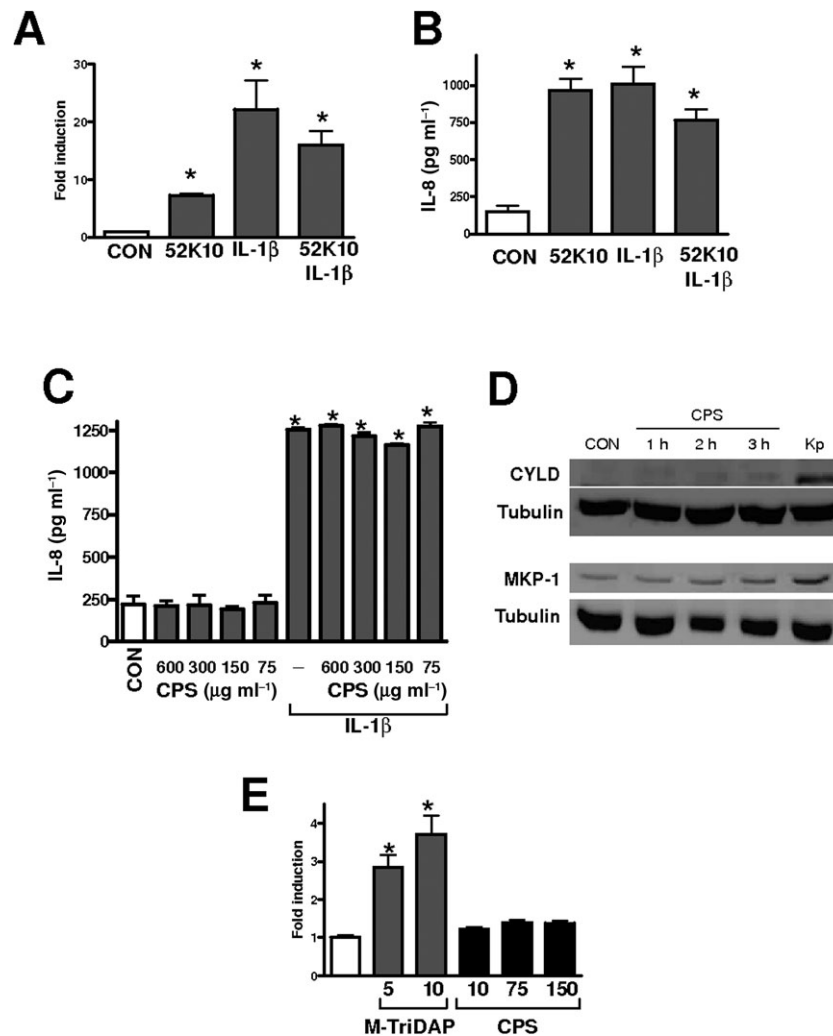


Fig. 9. *Klebsiella pneumoniae* capsule mutant does not attenuate IL-1 β -induced IL-8 expression.

A. *il-8* mRNA levels, assessed by RT-qPCR, in A549 cells left untreated (CON) or infected for 2.5 h and then stimulated with IL-1 β (1 ng ml⁻¹) for 30 min ($n = 3$).

B. ELISA of IL-8 released by A549 cells left non-treated (CON) or infected with strain 52K10 for 1 h and then stimulated for 2 h with IL-1 β (50 ng ml⁻¹).

C. ELISA of IL-8 released by A549 cells left non-treated (CON) or treated with different amounts of purified Kp52145 capsule for 1 h and then stimulated for 2 h with IL-1 β (50 ng ml⁻¹). Data are means and s.e.m. ($n = 3$). * $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA).

D. Immunoblot analysis of CYLD, MKP-1 and tubulin levels in A549 cells which were left uninfected (CON), treated with purified Kp52145 capsule (CPS, 300 μ g ml⁻¹) for the indicated hours or infected for 3 h (Kp). Data are representative of three independent experiments.

E. Activation of a NF- κ B luciferase reporter plasmid in HEK293T cells transfected with HA-NOD1 plasmid, which were left untreated (white bar), or treated with M-Tri-DAP (grey bars; 5 or 10 μ g ml⁻¹) for 3 h or treated with different amounts of purified Kp52145 capsule (black bars; from 10 to 150 μ g ml⁻¹) for 3 h. Activity is normalized by correction of *Renilla* expression and is presented relative to untreated cells (data are means and s.e.m.; $n = 3$). * $P < 0.05$ (results are significantly different from the results for untreated cells; one-way ANOVA).

dedicated to control the host immune balance represents an example of a novel theme employed by pathogens to subvert cell innate immunity.

Another important finding of our study is that *K. pneumoniae* engages a PRR to exert its anti-inflammatory effect. This strategy is unusual and only one example has been reported. *Yersinia* species secrete a protein, LcrV, which signals in a CD14-TLR2-dependent manner to induce IL-10 secretion and hence immunosuppression

(Sing *et al.*, 2002). To the best of our knowledge *K. pneumoniae* is the first pathogen hijacking NOD1 to block the activation of inflammatory responses. Moreover, available evidence implicates only TLRs in the expression of CYLD and MKP-1 (Yoshida *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2006), being this the first study showing a role for a NLR receptor in the expression of both proteins.

Evidence indicates that extracellular bacteria, like *K. pneumoniae*, may engage NOD1 by delivering PGN to the

cytoplasm using either type IV or type III secretion systems (Viala *et al.*, 2004; Travassos *et al.*, 2005). However, the fact that *K. pneumoniae* PGN does not differ from other PGNs activating inflammatory responses and that *in silico* analysis of the available *K. pneumoniae* genomes does not support that this pathogen encodes type III or IV secretion systems makes unlikely that *K. pneumoniae* engagement of NOD1 would be PGN-dependent. As an alternative possibility, we examined the role of Rac1 in *K. pneumoniae* induced NOD1 signalling. This was based on three considerations: (i) several pathogens manipulate the activation state of Rac1, (ii) Rac1 has been implicated in different inflammatory pathways, and (iii) Rac1 mediates actin cytoskeletal reorganization which in turn modulates the activation of NOD2 and NOD1 (Legrand-Poels *et al.*, 2007; Eitel *et al.*, 2008; Kufer *et al.*, 2008). By pull-down assays detecting the activated form of Rac1 and by functional assays based on testing the effect of *K. pneumoniae* infection on the Rac1-dependent *Y. enterocolitica* invasion, we show that Kp52145 inhibits the activation of Rac1. To connect Rac1 inhibition and the NOD1-dependent anti-inflammatory phenotype, we took advantage of the well-characterized Rac1 chemical inhibitor NSC23766 and explored whether the inhibitor may recapitulate the features of *Klebsiella*-triggered anti-inflammation. Indeed, NSC23766 attenuated IL-1 β -induced IL-8 levels via upregulation of CYLD and MKP-1 in a NOD1-dependent manner. On the whole, our findings are consistent with a model in which *K. pneumoniae*, by negatively modulating Rac1, engages NOD1 to activate the expression of CYLD and MKP-1.

We further confirmed previous findings showing the membrane association of NOD1 (Kufer *et al.*, 2008). Moreover, and similar to NOD2 (Eitel *et al.*, 2008), Rac1 inhibition decreases membrane location of NOD1 (this work). In agreement with Kp52145 inhibition of Rac1 activation, Kp52145 infection was also associated with a decreased membrane association of NOD1. These findings do not necessarily contradict recent reports showing that membrane recruitment of NOD1 is crucial for NOD-mediated signalling as shown for *Shigella flexneri* (Kufer *et al.*, 2008). It should be noted that, in contrast to wild-type *K. pneumoniae*, *Shigella* activates Rac1 and invades tissue culture cells (Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). On the other hand, Rac1 inhibition induces NOD1- and NOD2-mediated signalling (Eitel *et al.*, 2008 and this work) and for NOD2 it has been postulated that release of the protein from cytoskeletal structures may allow more efficient signalling due to a reduction of NOD2 interaction with its negative regulator Erbin (Kufer *et al.*, 2006; Eitel *et al.*, 2008). Therefore, a tantalizing hypothesis could be that membrane location is not essential for NOD1 activation but only crucial for recognition of invading bacteria. Additional work is needed to further clarify

the impact of NOD1's membrane recruitment on its activation level and the type of responses under different situations of Rac1 activation induced by different bacterial infections.

Having deciphered intracellular signalling mechanisms responsible for the anti-inflammatory phenotype we were keen to identify the bacterial system(s) involved. We first focused on the possible involvement of CPS because we and others have shown that *K. pneumoniae* CPS mutants activate an inflammatory program in contrast to wild-type strains (Lawlor *et al.*, 2006; Regueiro *et al.*, 2006; Moranta *et al.*, 2010). Here we have shown that strain 52K10 did not attenuate IL-1 β -induced IL-8 secretion by A549 cells. However, purified CPS did not reduce IL-1 β -induced IL-8 secretion, it did not induce the expression of CYLD and MKP-1 and it did not activate NOD1 using a standard activation assay. Taken together, these results argue against a direct role of CPS in the anti-inflammatory phenotype. In turn, recently we have shown that presence of the CPS on the bacterial surface interferes with TLR signalling (Regueiro *et al.*, 2006; Moranta *et al.*, 2010). Interestingly, this seems to be a feature of bacterial CPSs because *Salmonella typhi* and *Neisseria meningitidis* CPSs also inhibit TLR-dependent signalling (Kocabas *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2008). Therefore, we propose that the reduced inflammatory response characteristic of *K. pneumoniae* infections is the sum of the CPS-mediated inhibition of TLR signalling and the NOD1-dependent anti-inflammatory effect described in this study. This model implies that TLR-dependent inflammatory signal overcome the NOD1-dependent anti-inflammatory signal. Supporting this, IL-8 secretion induced by 52K10 is TLR-dependent (Regueiro *et al.*, 2006). Future studies will aim to identify *K. pneumoniae* factor(s) required to attenuate inflammatory responses in a NOD1-dependent manner.

It should be pointed out that the findings reported in this study do not contradict two studies from our group (Regueiro *et al.*, 2008; Moranta *et al.*, 2010). In a first study, we showed that LPS-induced IL-8 secretion is increased in A549 cells infected for 5 h with Kp52145 compared with non-infected cells (Regueiro *et al.*, 2008). Note that in the experimental set-up, bacteria were washed off because otherwise cells would not respond to LPS (Regueiro *et al.*, 2008; V. Regueiro and J.A. Bengoechea; unpubl. data). This is in agreement with the findings reported here demonstrating, on one hand, that Kp52145 blocking effect was dependent on bacteria-cell contact and, on the other hand, that removal of bacteria by washing followed by gentamicin treatment rendered cells responsive to IL-1 β . In a second study, we showed that strain 52145- Δwca_{k2} , a *cps* mutant derived from Kp52145, does induce the expression of CYLD and MKP-1 which in turn acted as negative regulators for 52145- Δwca_{k2} -induced

expression of human β -defensins (Moranta *et al.*, 2010). Interestingly, 52145- Δwca_{k2} engaged TLR-dependent pathways to activate the expression of human β -defensins, CYLD and MKP-1 (Moranta *et al.*, 2010). As discussed before, these results are consistent with the concept that activation of an inflammatory programme also triggers the induction of negative regulatory proteins to return to homeostasis. The fact that Kp52145 did induce the expression of CYLD and MKP-1 led us to postulate that wild-type bacteria could target cellular functions controlling the expression of CYLD and MKP-1 to block host defence responses (Moranta *et al.*, 2010). Findings reported here give experimental support to this notion.

Finally, it is worthwhile commenting on the clinical implications of our findings. A wealth of evidence clearly indicates the importance of the inflammatory response in clearing *K. pneumoniae* infections (Greenberger *et al.*, 1996; Standiford *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001). Conversely, these data suggest that *K. pneumoniae* limits the induction of these defence responses. Our *in vivo* data give experimental support to this hypothesis. We found a reduction in the levels of the pro-inflammatory cytokine *kc* in the lungs of infected mice associated with an increased expression of *cyld* and *mkp-1*. Therefore, we reason that in the onset of pneumonia *K. pneumoniae* does induce the expression of CYLD and MKP-1 to dampen host defence inflammatory responses. It is tempting to postulate that treatments designed to interfere with this *Klebsiella*-induced response could be the basis of new therapeutic strategies to treat *K. pneumoniae* pneumonias. It is important to note that glucocorticoids, widely used anti-inflammatory drugs to treat respiratory diseases including pneumonia, induce the expression of MKP-1, which is one of the molecular mechanisms underlying their anti-inflammatory effect (O'Neill, 2008). Therefore in the context of *K. pneumoniae* infections, setting of pneumonia would be facilitated by the treatment with glucocorticoids because, on one hand, they activate the expression of the same mechanism hijacked by *Klebsiella* and, on the other hand, they reduce the inflammatory response necessary to clear the infection. In agreement with this notion, a number of clinical studies already point out that glucocorticoid therapy is associated with a higher risk of pneumonia (Drummond *et al.*, 2008), thereby casting doubts on the use of these drugs to treat pneumonias, particularly those caused by *Klebsiella*.

Experimental procedures

Bacterial strains, growth conditions and reagents

Klebsiella pneumoniae 52145 is a clinical isolate (serotype O1:K2) previously described (Nassif *et al.*, 1989). *K. pneumoniae* 52K10 is an isogenic capsule mutant from strain 52145 (Cortes *et al.*, 2002). *Y. enterocolitica* strain 8081-c R-M⁺ (serotype O:8)

is a restriction minus mutant derived from 8081-c which lacks the pYV virulence plasmid (Zhang and Skurnik, 1994). Bacteria were grown in Luria–Bertani medium at 37°C (*Klebsiella* strains) or at 21°C (*Yersinia*). Recombinant human IL-1 β and TNF α were purchased from Peprotech; NSC23766 was purchased from Calbiochem; Pam3CSK4 and M-TriDAP were purchased from InvivoGen.

Cell culture and infection

Monolayers of A549 (ATCC CCL185) and NHBE (Lonza) cells were grown as previously described (Regueiro *et al.*, 2006). HEK293T (ATCC CRL-11268) cells were grown in DMEM tissue culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin, streptomycin and amphotericin B) in 25 cm² tissue culture flasks at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For infections, A549 cells were seeded to 90% confluence (2×10^5 cells well⁻¹) in 24-well tissue culture plates. Cells were serum starved 16 h before infection. For NHBE cells, cells were seeded to 80% confluence (8×10^4 cells well⁻¹) in collagen coated 24-well tissue culture plates using 1 ml of Bronchial Epithelial cell Growth Medium (Lonza) per well. Bacteria were prepared as described (Regueiro *et al.*, 2006; 2008) and infections were performed using a multiplicity of infection of 150 bacteria per cell, unless otherwise indicated. To synchronize infection, plates were centrifuged at 200 *g* during 5 min. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion and it was > 95% even after 4 h of infection.

IL-8 stimulation assay

IL-8 in the supernatants from stimulated cells was determined by ELISA using a commercial kit (Endogen) with a sensitivity < 2 pg ml⁻¹.

RT-qPCR

Cells seeded into 60 mm tissue culture dishes were infected as described above. After infection, cells were washed with PBS and total RNA was purified using a Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) as recommended by the manufacturer. cDNA was obtained by retrotranscription of 2 μ g of total RNA using a commercial RT² First Strand kit as recommended by the manufacturer (Superarray Bioscience Corporation). The reaction included one step to eliminate traces of genomic DNA. Real-time PCR (RT-PCR) analyses were performed with a Smart Cycler real-time PCR instrument (Cepheid, Sunnyvale, CA). To amplify human *il-8*, *cyld* and *mkp-1* 200 ng of cDNA was used as template in a 25 μ l reaction mixture containing 1 \times SYBR green RT² qPCR Master Mix (Superarray Bioscience Corporation) and primer mix. Human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and actin were amplified as controls using 100 ng of cDNA as template. The following intron-spanning primers were used: [GAPDH] sense (5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3') and antisense (5'-GAAGATGGTGTGGGATTC-3'); [Actin] sense (5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3') and antisense (5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAA-3'); [CYLD] sense (5'-TATGGGAAGGACGATTCTGC-3') and antisense (5'-CTGCCTTCAGTTTCTTTGCC-3'); [MKP-1] sense (5'-GCTGTGCAGCAAACAGTCTGA-3') and antisense (5'-CGATTAGTCCTCATAAGGTA-3'). To amplify

il-8 the Hs_IL8-1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen; catalogue number QT00000322) were used. To amplify mouse *kc*, *cyld* and *mkp-1* 400 ng of cDNA was used whereas 200 ng of cDNA was used to amplify mouse actin and mouse *gadh*. The following primers were used: [mouse actin] sense (5'-TGT TACCAACTGGGACGACA-3') and antisense (5'-CTGGGTCA TCTTTTCACGGT-3'); [mouse GAPDH] sense (5'-CCCACT AACATCAAATGGGG-3') and antisense (5'-CCTTCCACAATG CCAAAGTT-3'); [KC] sense (5'-GACAGACTGCTCTGATGGCA-3') and antisense (5'-TGCACTTCTTTTCGCACAAC-3'); [mouse CYLD] (5'-CCTGGCTTTTCTTTGACAGC-3') and antisense (5'-AAGAGTGCAGGTCCTCCAGA-3'); [mouse MKP-1] sense (5'-GTTTGAGGCAGTTTCTTCGC-3') and antisense (5'-CTTTGT CTGTCAGTGCCGAA-3'). The thermocycling protocol was as follows: 95°C for 15 min for hot-start polymerase activation, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s. SYBR green dye fluorescence was measured at 521 nm during the annealing phase. Relative quantities of mRNAs were obtained using the comparative threshold cycle ($\Delta\Delta C_T$) method by normalizing to GAPDH and actin.

Intranasal infection model

Five- to seven-week-old female C57BL/6JOLA Hsd mice (Harlan) were infected intranasally as described (Lawlor *et al.*, 2006). Suspensions of 10^5 cfu (20 μ l) were inoculated; non-infected mice were inoculated with 20 μ l of PBS. At indicated times after infection, mice were sacrificed by cervical dislocation and lungs were dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The animals were treated in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC) and in agreement with the Bioethical Committee of the University of Balearic Islands.

For purification of RNA, lungs were homogenized on ice with 1 ml of TRI reagent (Ambion) using an Ultra-Turrax T10 basic (IKA). Total RNA was purified first using a standard chloroform/isopropyl alcohol protocol, and the obtained RNA was further purified using a Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel).

Plasmids, transfections and luciferase assays

PathDetect[®] NF- κ B *cis*-Reporting plasmid and pRL-TK *Renilla* luciferase control reporter vector were purchased from Stratagene and Promega respectively. A549 cells seeded in 24-well plates were transiently transfected when they reached 40–60% confluence. Transfections were carried out in 500 μ l of Opti-MEM Reduced-Serum Medium (Invitrogen) using Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent (Invitrogen). Two hundred and fifty nanograms of the NF- κ B reporter plasmid were co-transfected with 20 ng of pRL-TK *Renilla* Luciferase plasmid. Forty-eight hours post transfection cells were infected as described. Cell extracts were prepared using Passive Lysis Buffer (Promega) and luciferase activities were measured with the Dual Luciferase Assay kit (Promega). Firefly luciferase values were normalized to *Renilla* control values. Results were plotted as relative luciferase activity compared with activity measured in non-stimulated control cells.

Small interfering RNA (siRNA)

RNA-mediated interference for downregulating MyD88, CYLD, MKP-1 was carried out by transfection of MyD88 siRNA (5'-AACTGGAACAGACAACTATC-3'), CYLD siRNA (Hs_CYLD_4 HP siRNA; catalogue number SI00110096), MKP-1 siRNA (Hs_DUSP1-5 HP siRNA; catalogue number SI03100048) which were purchased from Qiagen. The AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) was used as non-silencing control interference RNA. Interference RNA for TLR4 (catalogue number HSS110818) and CARD4/NOD1 [catalogue number HSS115906 (NOD1#1); and number HSS115908 (NOD1#2)] were purchased from Invitrogen. Stealth[™] RNAi Negative Control Medium GC (Invitrogen) was used as control interference RNA. Approximately 36 nM of siRNA per well was used for transfection using Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent following manufacturer's recommendations (Invitrogen). Cells were infected at 48 h post transfection as previously described.

Immunoprecipitation

A549 cells grown in six-well plates were transfected with 1 μ g of pcDNA3-hTRAF6 (donated by M. Kracht). After infection, cells were lysed in RIPA buffer (sc-24498 Santa Cruz Biotechnology). Five hundred micrograms of cell lysates were pre-cleared with protein A/G PLUS agarose beads (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology) for 30 min at 4°C. After centrifugation (1000 *g*, 30 s, 4°C), supernatant was incubated with 2 μ g of anti-TRAF6 antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 2 h at 4°C. Protein A/G PLUS agarose beads were added and then incubated overnight at 4°C. Immunoprecipitates were washed four times with RIPA buffer and suspended in 2 \times electrophoresis sample buffer (Santa Cruz Biotechnology).

Western blot analysis

Proteins were separated by 10% SDS-PAGE, semi-dry electrotransferred onto a nitrocellulose membrane, and blocked with 4% skimmed milk in PBS. The following rabbit antibodies were used: anti-TRAF6 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-MKP-1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti- κ B α (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-p38 (1:1000; Cell Signaling), anti-phospho-p44/42 (1:1000; Cell Signaling), anti-phospho-SAPK/JNK (1:1000, Cell Signaling), anti-CYLD (1:1000) (Imgenex Corp.), anti-flotillin-2/ESA (1:5000) (BD Biosciences). Ubiquitin was detected using monoclonal antibody P4D1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and HA tag was detected using anti-HA antibody Y-11 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactive bands were visualized by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (1:20 000, Pierce) or goat anti-mouse immunoglobulins (1:1000, Pierce) using the Super-Signal West-dura system (Pierce). To ensure that equal amounts of proteins were loaded, blots were reprobbed with mouse anti-human tubulin (1:3000, Sigma).

Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded on 13 mm circular coverslips in 24-well tissue culture plates. After infection, cells were washed three times with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS pH 7.4 for

15 min at room temperature. p65 NF- κ B subunit was stained with anti-p65 antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Cy2-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Jackson Immunological) was diluted 1:200. Staining was carried out as previously described (Marti-Llitas *et al.*, 2009). Immunofluorescence was analysed with a Leica CTR6000 fluorescence microscope.

Rac1 activation assay

Rac1 activation was determined with the Rac1 Activation assay kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Briefly, A549 cells were grown to $\sim 10^6$ cells per sample (80% confluence) in 25 cm² tissue culture flasks. After treatments, cells were washed twice with ice-cold Tris-Buffered Saline (TBS) and resuspended in the assay buffer provided by the kit. Protein concentration was determined using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Two hundred micrograms of lysates were mixed with PAK-1 PBD agarose slurry (10 μ g) and incubated for 1 h at 4°C with gentle rocking. Beads were collected by centrifugation (14 000 *g*; 5 s), washed three times with the assay buffer provided by the kit, and resuspended in SDS sample buffer. Activated Rac1 in the cell lysates was visualized by Western blot using mouse anti-Rac1 (clone 23A8, provided by the kit) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (1:1000, Pierce). Proteins were detected using the Super-Signal West-dura system (Pierce). To confirm that equal amounts of protein from each sample were pulled down, tubulin levels of the lysates were also analysed by immunoblotting.

Yersinia adhesion and invasion assays

Yersinia enterocolitica strain was grown aerobically for 4 h at 21°C, pelleted and resuspended to an OD₆₀₀ of 1.0 in PBS. Bacteria suspensions were added to subconfluent A549 cells grown in 24-well plates (multiplicity of infection of $\sim 150:1$) which, when indicated, were pre-infected for 3 h with Kp52145 as described. To determine *Yersinia* adhesion, cells were infected during 30 min, monolayers were washed five times with PBS and then lysed with PBS-0.5% saponin. Bacteria were plated in CIN agar plates, a selective medium for *Yersinia*. To determine *Yersinia* invasion, cells were infected during 30 min, monolayers were washed twice with PBS and incubated during 60 min in medium containing gentamicin (100 μ g ml⁻¹) to kill extracellular bacteria. Gentamicin treatment was long enough to kill all extracellular bacteria. After this period, cells were washed three times with PBS, lysed with PBS-0.5% saponin and bacteria plated on CIN agar plates. Experiments were carried out in triplicate on three independent occasions. Invasion was calculated as per cent invasion = $100 \times (\text{No. of bacteria recovered after gentamicin treatment} / \text{No. of bacteria initially added})$ whereas adhesion was calculated as per cent adhesion = $100 \times (\text{No. of bacteria recovered after washes} / \text{No. of bacteria initially added})$.

NOD1 NF- κ B activation assay

HEK293T, seeded in 24-well plates, were transfected overnight with pCI-Nod1 (0.3 ng; kindly donated by T. Kufer), PathDetect® NF- κ B *cis*-Reporting plasmid (75 ng), pRL-TK *Renilla* luciferase (7.5 ng) and 120 ng of pcDNA3 (120 ng) to balance the transfected DNA concentration in a final volume of 500 μ l using 1 μ l

of Lipofectamine 2000 following manufacturer's instructions. Twenty-four hours post transfection, cells were washed once with PBS and M-Tri-DAP, or CPS were added for 3 h before performing luciferase measurements.

Cell fractionation (membrane/cytosol) experiments

HEK293T cells, seeded on six-well plates, were transfected with 50 ng of pCI-NOD1 plasmid and 450 ng of pcDNA3 to balance the transfected DNA concentration in a final volume of 2500 μ l using 4 μ l of Lipofectamine 2000 following manufacturer's instructions. Twenty-four hours later, cells were washed once with PBS and treated with Rac1 inhibitor NSC23766, M-Tri-DAP or infected for 3 h. Medium was removed and 300 μ l of lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 M NaCl, 10 mM Hepes pH 5.6, 2 mM EDTA, 4 mM Na₂VO₄ and 40 mM NaF) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche) was added. Lysates were harvested and passed 10 times through a 21-gauge needle. The cytosolic fraction was obtained by centrifugation at 10 000 *g* for 30 min at 4°C. The pellet was resuspended in 200 μ l of lysis buffer containing 1% SDS and was sonicated twice. After 5 min centrifugation, the resulting supernatant containing membrane proteins was collected. The protein concentration was determined using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Ten micrograms of proteins were separated on 4–12% SDS-PAGE, semi-dry electrotransferred onto a PVDF membrane, and blocked with 4% skim milk in PBS. Membranes were stained using anti-HA antibody and blots were reprobed first with mouse anti-flotillin-2/ESA and second with mouse anti-human tubulin.

Statistical methods

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA with Bonferroni contrasts or the Mann–Whitney *U*-test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

We are indebted to Michael Kracht and Thomas Kufer for sending us TRAF6 and NOD1 constructs respectively. We are grateful to members of the Bengoechea lab for helpful discussions. J.G. has been the recipient of a 'Contrato de Investigador Miguel Servet' from Instituto de Salud Carlos III. This work has been funded by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI06/1629), ERA-NET Pathogenomics (GEN2006-27776-C2-2-E/PAT and SAF2008-04353-E) and Biomedicine Program (SAF2009-07885) from Ministerio de Ciencia e Innovación to J.A.B. CIBERES is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.

References

- Barton, G.M. (2008) A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* **118**: 413–420.
- Botta, G.A., and Buffa, D. (1981) Murein synthesis and β -lactam antibiotic susceptibility during rod-to-sphere transition in a *pbpA*(Ts) mutant of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **19**: 891–900.

- Chamaillard, M., Girardin, S.E., Viala, J., and Philpott, D.J. (2003) Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* **5**: 581–592.
- Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., et al. (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2274–2279.
- Cortes, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gomez, C., Sauleda, J., and Alberti, S. (2002) Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun* **70**: 2583–2590.
- Drummond, M.B., Dasenbrook, E.C., Pitz, M.W., Murphy, D.J., and Fan, E. (2008) Inhaled corticosteroids in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **300**: 2407–2416.
- Eitel, J., Krull, M., Hocke, A.C., N'Guessan, P.D., Zahlten, J., Schmeck, B., et al. (2008) Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *J Immunol* **181**: 2664–2671.
- Finlay, B.B., and McFadden, G. (2006) Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* **124**: 767–782.
- Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7618–7623.
- Girardin, S.E., Tournebise, R., Mavris, M., Page, A.L., Li, X., Stark, G.R., et al. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**: 736–742.
- Greenberger, M.J., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Bramson, J., Gauldie, J., et al. (1996) IL-12 gene therapy protects mice in lethal *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol* **157**: 3006–3012.
- Hacker, H., and Karin, M. (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**: re13.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**: 344–362.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., and Podolsky, D.K. (2003) Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **278**: 32962–32968.
- Hoffmann, E., Trich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* **72**: 847–855.
- Inohara, N., and Nunez, G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**: 371–382.
- Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C., and Nunez, G. (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* **74**: 355–383.
- Kenny, E.F., and O'Neill, L.A. (2008) Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* **43**: 342–349.
- Kocabas, C., Katsenelson, N., Kanswal, S., Kennedy, M.N., Cui, X., Blake, M.S., et al. (2007) *Neisseria meningitidis* type C capsular polysaccharide inhibits lipooligosaccharide-induced cell activation by binding to CD14. *Cell Microbiol* **9**: 1297–1310.
- Kufer, T.A., Kremmer, E., Banks, D.J., and Philpott, D.J. (2006) Role for erbin in bacterial activation of Nod2. *Infect Immun* **74**: 3115–3124.
- Kufer, T.A., Kremmer, E., Adam, A.C., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2008) The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol* **10**: 477–486.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009a) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* **420**: 1–16.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009b) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* **388**: 621–625.
- Laichalk, L.L., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Danforth, J.M., Baillie, M.B., and Standiford, T.J. (1996) Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **64**: 5211–5218.
- Lawlor, M.S., Handley, S.A., and Miller, V.L. (2006) Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infect Immun* **74**: 5402–5407.
- Legrand-Poels, S., Kustermans, G., Bex, F., Kremmer, E., Kufer, T.A., and Piette, J. (2007) Modulation of Nod2-dependent NF- κ B signaling by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **120**: 1299–1310.
- Lim, J.H., Jono, H., Koga, T., Woo, C.H., Ishinaga, H., Bourne, P., et al. (2007) Tumor Suppressor CYLD acts as a negative regulator for non-typeable *Haemophilus influenzae*-induced inflammation in the middle ear and lung of mice. *PLoS ONE* **2**: e1032.
- Lim, J.H., Ha, U.H., Woo, C.H., Xu, H., and Li, J.D. (2008) CYLD is a crucial negative regulator of innate immune response in *Escherichia coli* pneumonia. *Cell Microbiol* **10**: 2247–2256.
- Liu, Y., Shepherd, E.G., and Nelin, L.D. (2007) MAPK phosphatases-regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* **7**: 202–212.
- Marti-Llitas, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D.W., Saus, C., Sauleda, J., et al. (2009) Non-typable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* **77**: 4232–4242.
- Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**: 819–826.
- Miller, S.I., Ernst, R.K., and Bader, M.W. (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* **3**: 36–46.
- Mogensen, T.H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **22**: 240–273, Table.
- Moranta, D., Regueiro, V., March, C., Llobet, E., Margareto, J., Larrate, E., et al. (2010) *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of β -defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun* **78**: 1135–1146.
- Nassif, X., Fournier, J.M., Arondel, J., and Sansonetti, P.J. (1989) Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun* **57**: 546–552.
- O'Neill, L.A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2000**: RE1.

- O'Neill, L.A. (2008) When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* **29**: 12–20.
- Regueiro, V., Campos, M.A., Pons, J., Alberti, S., and Bengoechea, J.A. (2006) The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology* **152**: 555–566.
- Regueiro, V., Moranta, D., Campos, M.A., Margareto, J., Garmendia, J., and Bengoechea, J.A. (2008) *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun* **77**: 714–724.
- Roy, C.R., and Mocarski, E.S. (2007) Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol* **8**: 1179–1187.
- Sahly, H., and Podschun, R. (1997) Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**: 393–399.
- Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C.J., *et al.* (2002) *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* **196**: 1017–1024.
- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J. (2009) The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* **78**: 769–796.
- Standiford, T.J., Wilkowski, J.M., Sisson, T.H., Hattori, N., Mehrad, B., Bucknell, K.A., *et al.* (1999) Intrapulmonary tumor necrosis factor gene therapy increases bacterial clearance and survival in murine gram-negative pneumonia. *Hum Gene Ther* **10**: 899–909.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006) Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **6**: 9–20.
- Sun, S.C. (2008) Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol* **8**: 501–511.
- Timko, J. (2004) Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella* spp. strains. *J Infect Chemother* **10**: 212–215.
- Tran Van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A., and Sansonetti, P.J. (1999) IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* **18**: 3249–3262.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Girardin, S.E., Boneca, I.G., Lemos, R., Bozza, M.T., *et al.* (2005) Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **280**: 36714–36718.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature* **424**: 793–796.
- Tsai, W.C., Strieter, R.M., Wilkowski, J.M., Bucknell, K.A., Burdick, M.D., Lira, S.A., *et al.* (1998) Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J Immunol* **161**: 2435–2440.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., *et al.* (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**: 1166–1174.
- Wilson, R.P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S.E., Tukel, C., and Baumler, A.J. (2008) The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol* **10**: 876–890.
- Wong, K.W., and Isberg, R.R. (2005) Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasion-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol* **8**: 4–9.
- Ye, P., Garvey, P.B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W.R., *et al.* (2001) Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**: 335–340.
- Yoshida, H., Jono, H., Kai, H., and Li, J.D. (2005) The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J Biol Chem* **280**: 41111–41121.
- Zhang, L., and Skurnik, M. (1994) Isolation of an R⁻ M⁺ mutant of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 and its application in construction of rough mutants utilizing mini-Tn5 derivatives and lipopolysaccharide-specific phage. *J Bacteriol* **176**: 1756–1760.
- Zhao, Q., Wang, X., Nelin, L.D., Yao, Y., Matta, R., Manson, M.E., *et al.* (2006) MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxin shock. *J Exp Med* **203**: 131–140.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. *Klebsiella pneumoniae* infection does not affect the levels of surface molecules in A549 cells. Flow cytometry analysis of TLR2, TLR4, TNFR1, TNFR2, CD54 and HLA-I expression by A549 cells left uninfected (white bars) or infected with Kp52145 for 3 h (grey bars). Cells were detached by incubation with trypsin-EDTA and washed with 0.1% sodium-azide in PBS. Non-permeabilized cells were incubated with PE-conjugated antibodies (10 μ g ml⁻¹) or IgG2a, κ isotype labelled antibodies for 15 min at room temperature (22–25°C) for 15 min. Analysis were performed using a CultiKek Epics XL flow cytometer. At least 9000 cells were acquired in every experiment. The levels of proteins were expressed as relative mean fluorescence intensity (rMFI) measured in arbitrary units and the non-specific binding was corrected by subtraction of MFI values corresponding to isotype-matched antibodies. Data are means and s.e.m. ($n = 3$).

Fig. S2. siRNA knock-down efficiency. siRNA efficiency in A549 cells was quantified by RT-qPCR in samples from the same experiments shown in Fig. 7A and B. mRNA level was normalized to GAPDH and actin and then relative mRNA levels in cells transfected with control siRNA or specific siRNAs were compared. mRNA levels in control siRNA-transfected cells were set to 100%. Data are means and s.e.m. of RT-qPCR duplicates.

Fig. S3. *Klebsiella pneumoniae* reduces *Yersinia enterocolitica* invasion of A549 cells. Invasion and adhesion assays were performed without centrifugation. Values for invasion and adhesion were calculated as described in *Experimental procedures*. Data are means and s.e.m. ($n = 3$).

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Efficacy of cecropin A-melittin peptides on a sepsis model of infection by pan-resistant *Acinetobacter baumannii*

R. López-Rojas · F. Docobo-Pérez · M. E. Pachón-Ibáñez · B. G. de la Torre · M. Fernández-Reyes · C. March · J. A. Bengoechea · D. Andreu · L. Rivas · J. Pachón

Received: 15 December 2010 / Accepted: 19 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Pan-resistant *Acinetobacter baumannii* have prompted the search for therapeutic alternatives. We evaluate the efficacy of four cecropin A-melittin hybrid peptides (CA-M) in vivo. Toxicity was determined in mouse erythrocytes and in mice (lethal dose parameters were LD₀, LD₅₀, LD₁₀₀). Protective dose 50 (PD₅₀) was determined by inoculating groups of ten mice with the minimal lethal dose of *A. baumannii* (BMLD) and treating with doses of each CA-M from 0.5 mg/kg to LD₀. The activity of CA-Ms against *A. baumannii* was assessed in a peritoneal sepsis model. Mice were sacrificed at 0 and 1, 3, 5, and 7-h post-treatment. Spleen

and peritoneal fluid bacterial concentrations were measured. CA(1–8)M(1–18) was the less haemolytic on mouse erythrocytes. LD₀ (mg/kg) was 32 for CA(1–8)M(1–18), CA(1–7)M(2–9), and Oct-CA(1–7)M(2–9), and 16 for CA(1–7)M(5–9). PD₅₀ was not achieved with non-toxic doses (\leq LD₀). In the sepsis model, all CA-Ms were bacteriostatic in spleen, and decreased bacterial concentration ($p < 0.05$) in peritoneal fluid, at 1-h post-treatment; at later times, bacterial regrowth was observed in peritoneal fluid. CA-Ms showed local short-term efficacy in the peritoneal sepsis model caused by pan-resistant *Acinetobacter baumannii*.

R. López-Rojas · F. Docobo-Pérez · M. E. Pachón-Ibáñez · J. Pachón

Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/Universidad de Sevilla/CSIC Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

B. G. de la Torre · D. Andreu
Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain

M. Fernández-Reyes · L. Rivas
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain

C. March · J. A. Bengoechea
Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears and Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes), 07110 Bunyola, Spain

R. López-Rojas (✉)
Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain
e-mail: rlopezrojas@hotmail.com

Introduction

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative coccobacillus that causes an increasing number of mainly nosocomial infections, with pneumonias, bacteremias, urinary tract infections, surgical site infections, and meningitis as the most frequent ones [1]. This pathogen has relevant clinical implications as it survives on almost every surface and develops resistance to all available antibiotics [2]. Thus, several outbreaks associated with a high morbidity and mortality have been caused by multi-drug resistant or even pan-resistant *A. baumannii* strains [3, 4], with a dramatic reduction in the available antimicrobial armamentarium, including the last gold-standard imipenem [5, 6], and colistin [7]. Therefore, an urgent need exists for new agents to treat MDR *A. baumannii* nosocomial infections.

Eukaryotic antimicrobial peptides (EAPs) are important components of the innate immune response of higher organisms against invasive pathogens [8]. Despite their diverse size and structures, nearly all EAPs have a strong cationic character and fold into amphipathic structures, two features that are critical for bacterial killing. This is achieved

by disruption of the pathogen membranes, by stoichiometric interaction of the EAP with the anionic phospholipids on the extracellular leaflet of the cell membrane of prokaryotes and lower—though not higher—eukaryotes [9–12]. As a result, EAPs show broad spectrum activity, fast killing rates, and scarce induction of resistance. Other advantages are their anti-endotoxic properties [13–15] and potential synergism with classical antibiotics. On the downside are their rather short life in biological fluids, poor tissue penetration, and high production costs [9, 10]. Being gene-encoded, EAPs show simple, if any posttranslational modifications, which makes optimization of their microbicidal activity easily achievable by genetic or chemical manipulation of the primary structure [16, 17]. In this regard, the cecropin A-melittin (CA-M) hybrid peptides are paradigmatic. CA-M peptides are formed by juxtaposing the cationic N-amino terminus of cecropin A (CA) to the hydrophobic N-terminus of melittin (M) [18, 19]. The result is a significant reduction of the toxicity with respect to M, and a substantial improvement of the antibiotic activity on Gram-positive bacteria, fungi and protozoa relative to CA [19–22].

In a previous work we demonstrated the *in vitro* antibiotic efficacy of four CA-M hybrids against four pan-resistant *A. baumannii* strains by membrane permeabilization, regardless of the resistance pattern of the strain [23, 24]. The present study aims to determine the *in vivo* potential of CA-M peptides as chemotherapeutic alternative on *A. baumannii*, evaluated on an experimental model of peritoneal sepsis.

Material and methods

Bacterial strains

The clinical pan-resistant *A. baumannii* strain 208628 (Ab208628), resistant to cefotaxime, ceftazidime, imipenem, amoxicillin, amikacin, piperacillin/tazobactam, doxycycline and colistin, was chosen from a previous work by its high colistin MIC (64 µg/mL) [23]. The isolate was stored at –70°C until required.

Antimicrobial peptides

Peptides (Table 1) were synthesized by solid phase methods using Fmoc chemistry as described [21]. They were purified by reverse phase HPLC (>98%), characterized by MALDI–TOF mass spectrometry and quantified by tryptophan absorbance [21].

Animals

For the sepsis animal model, immunocompetent C57BL/6 female mice [25] (16–20 g), obtained from the animal

facility of Seville University were used. Animals had pathogen-free sanitary status and assessed genetic authenticity. For haemolytic activity assays, BALB/c mice (22–28 g, from the animal facility at Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain) were chosen due to their high blood volume (10.75 mL/100 g) [26]. Animals were housed in regulation cages with food and water *ad libitum*. Surviving mice were sacrificed after 7 days with a 5% (wt/vol) overdose of thiopental. Clearance from the Ethics and Clinical Research Committee of the Virgen del Rocío University Hospitals and Centro de Investigaciones Biológicas were obtained.

Haemolytic activity

Haemolysis was chosen as a parameter for peptide cytotoxicity on mice cells. Erythrocytes from blood withdrawn by cardiac puncture were washed twice in Hank's medium (140 mM NaCl, 4.0 mM Na₂HPO₄, 1.0 mM KCl, 4.8 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, pH 7.2) to eliminate serum and free haemoglobin. The resulting erythrocytes were resuspended in the same medium at 4 × 10⁷ cells/mL; 50 µL aliquots were transferred into Eppendorf tubes. An equal volume of the peptide in Hank's was added. After incubation (4 h, 37°C), the suspension was centrifuged (Hettich, Mikro 200, 3 min, 3000 × g). An aliquot (90 µL) of the supernatant, containing the released haemoglobin, was carefully withdrawn, transferred into a 96-microwell plate, and measured in a BioRad 680 plate reader at 550 nm. Full haemolysis (100%) was achieved by lysis with Triton X-100 (0.1%, final concentration) [27]. Experiments were repeated at least twice using samples by triplicate.

In vivo toxicity

The Reed and Munch method [28] was applied. Groups of six C57BL/6 mice were intraperitoneally (i.p.) inoculated with a single 250 µL dose of peptide, starting at 0.5 mg/kg and serially duplicated until 100% mortality was reached. Maximum tolerated dose (LD₀), lethal dose 50 (LD₅₀), and lethal dose 100 (LD₁₀₀), were defined as those causing 0%, 50%, and 100% mortality, respectively. Other signs of toxicity (piloerection, handicapped motility) were additionally monitored.

Determination of bacterial minimal lethal dose (BMLD) and bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀)

To assess BMLD (minimal inoculum causing a 100% mortality) and BLD₅₀, groups of ten C57BL/6 mice were inoculated i.p. with 250 µL of a ten-fold serially diluted inoculum, starting at 10⁸ CFU/mL [28], obtained from a

Table 1 In vivo toxicity of cecropin A-melittin hybrid peptides in C57BL/6 mice

Peptide	Sequence	MW	LD ₀ ^a	LD ₅₀ ^a	LD ₁₀₀ ^a
CA(1–8)M(1–18)	KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS-NH ₂	2793.78	32.0	64.0	128.0
CA(1–7)M(2–9)	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	1770.19	32.0	45.2	64.0
Oct-CA(1–7)M(2–9)	¹ N ^α -octyl -KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	1898.50	32.0	45.2	64.0
CA(1–7)M(5–9)	KWKLFKKVVKVL-NH ₂	1544.07	16.0	39.4	128.0

LD₀ maximum tolerated dose, LD₅₀ lethal dose 50, LD₁₀₀ lethal dose 100

^a Expressed as mg/kg

24-h Ab208628 culture in Mueller-Hinton II broth, cation adjusted (MHBCA; Becton Dickinson, Cockeysville, MD) at 37°C. Dilutions were done with saline solution plus 5% (wt/vol) porcine gastric mucin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The animals were observed for 7 days and their cumulative survival rates recorded.

As a control group, ten mice were inoculated with 250 µL of porcine mucin as above, to discard an intrinsic toxic effect of mucin.

Determination of protective dose

The protective dose for 50% of the population (PD₅₀) was determined for each peptide [28]. Groups of ten mice were infected i.p. with a BMLD inoculum. Four hours later, animals were treated i.p. with two-fold increasing doses of each peptide (0.5 mg/kg to LD₀), in physiological serum (0.5 mL final volume), and observed for 7 days to measure cumulative survival rates.

Influence of serum on activity of CA(1–8)M(1–18)

Two complementary experiments were carried out: (1) CA(1–8)M(1–18) at 25 µg/mL (80% haemolysis) was mixed with serum at different concentrations (0–20% vol/vol) and incubated (15 min, 37°C) prior to its addition to the erythrocyte suspension. Afterwards, the haemolysis was assayed as above. (2) Variation of haemolysis with CA(1–8)M(1–18) concentration (0–200 µg/mL), was checked at a fixed 10% serum concentration. CA(1–8)M(1–18) was then incubated with 10% autologous mouse serum (15 min, 37°C), prior to its addition to erythrocyte suspension, and haemolysis assayed by the standard procedure.

The inhibition by serum of the bactericidal activity of CA(1–8)M(1–18) and its all-D enantiomer was tested at a concentration equal to their MIC calculated in the absence of serum (4 µg/mL). To this end, peptide was incubated with serum (0–20% vol/vol) for 15 min at 37°C before its addition to bacterial suspension (initial inoculum 5 × 10⁵ CFU/mL, final volume 100 µL). The bacteria were allowed to grow 24 h at 37°C and read at 600 nm. The intrinsic

effect of different amounts of serum on bacterial growth was corrected, inhibition percentages being referred to their respective growth rate.

Experimental peritoneal sepsis in mice

Groups of 25 female C57BL/6 mice were i.p. inoculated with BMLD. After 4 hours, animals were i.p. injected with a single dose of each peptide (16 mg/kg) diluted in physiological serum (0.5 mL final volume). This dose corresponds to the LD₀ for CA(1–7)M(5–9) and the dose previous to LD₀ for the other peptides. A group of 25 infected but untreated mice was used as a control (control A).

Groups of five mice were sacrificed at 4, 5, 7, 9, and 11 h after bacterial inoculation (0, 1, 3, 5 and 7 h post-treatment). The CFUs in peritoneal fluid were determined by i.p. injection of 2 mL sterile saline serum and, after mild abdominal massage, 1 mL of peritoneal fluid was aspirated with a sterile pipette tip. One hundred µL aliquots of serial ten-fold dilutions were plated on Columbia sheep blood agar and incubated at 37°C. CFUs were counted after 24 h and expressed as median (P₂₅, P₇₅) of log₁₀ CFU/mL. Spleens were aseptically removed and homogenized (2 min) in 2 mL of sterile saline solution (Stomacher 8, Tekmar Co., Cincinnati, OH). After ten-fold dilution of the homogenate, 100 µL aliquots were plated on Columbia sheep blood agar and CFUs determined as above and expressed as median (P₂₅, P₇₅) of the log₁₀ CFU/g of tissue.

Results

Haemolytic activity

The results of the haemolytic activity of the CA-M hybrid peptides on mouse erythrocytes are shown in Fig. 1. Haemolysis rises steeply with peptide concentration, reaching >60% at 5 µg/mL, except for CA(1–8)M(1–18) with a less pronounced increase. Interestingly, despite the increase in overall hydrophobicity caused by

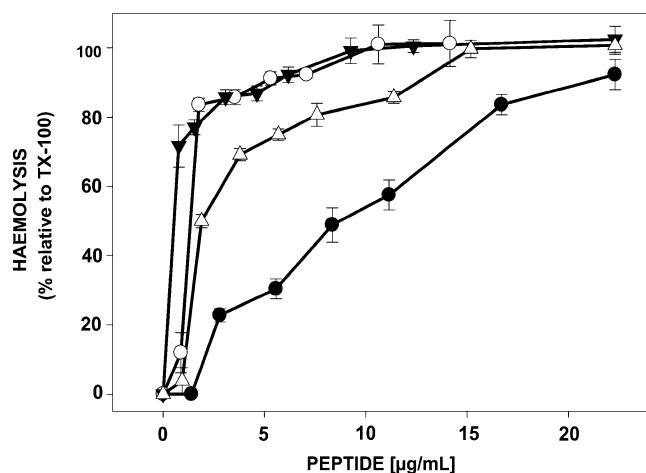


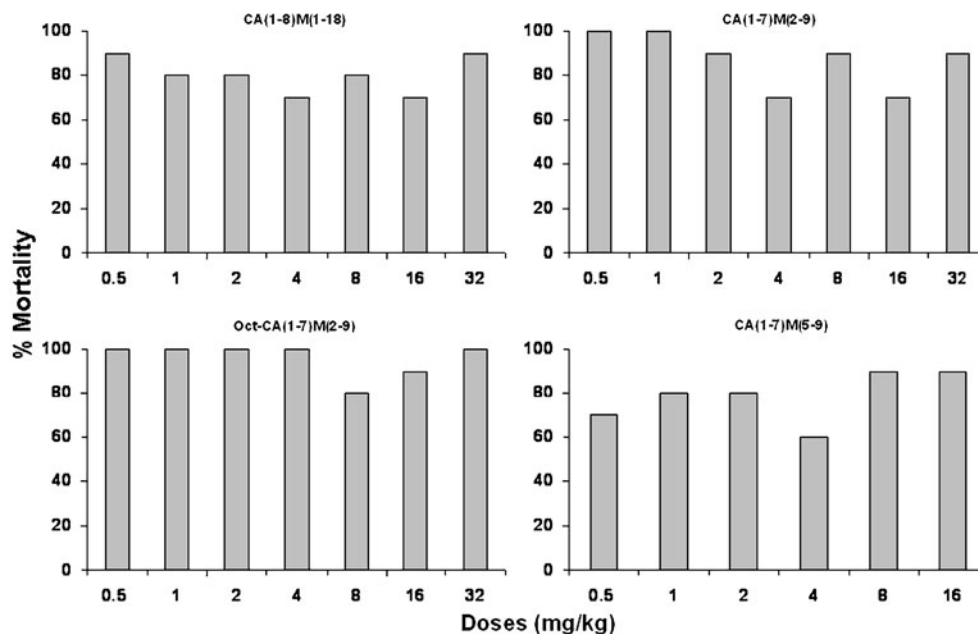
Fig. 1 Haemolytic activity of CA-M peptides on BALB/c mouse erythrocytes. Peptides were incubated with BALB/c mouse erythrocytes (4 h, 37°C) and the haemoglobin released measured. Full permeabilization (100%) was considered as that achieved with 0.1% Triton X-100. Closed circle CA(1–8)M(1–18), empty circle CA(1–7)M(2–9), empty triangle up Oct-CA(1–7)M(2–9), filled triangle down CA(1–7)M(5–9)

octanoylation of CA(1–7)M(2–9), the haemolysis of Oct-CA(1–7)M(2–9) is moderately lower than its non acylated parental peptide.

In vivo toxicity

Lethal parameters LD₀, LD₅₀, and LD₁₀₀ of each peptide are summarized in Table 1. LD₀ ranged between 16 and 32 mg/kg, and LD₁₀₀ between 64 and 128 mg/kg. As adverse effects, transitory movement disorders and muscle spasms were observed with dose-dependent duration, from 4 mg/kg except for CA(1–8)M(1–18), which starts at 8 mg/kg.

Fig. 2 Protective dose 50 (PD₅₀) results. Groups of ten mice were inoculated with Ab208628 BMLD. Four hours later, animals were treated with increasing in log₂ doses of each peptide (from 0.5 mg/kg to LD₀)



Determination of bacterial minimal lethal dose (BMLD) and bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀)

The BMLD of Ab208628 was 2.5×10^6 CFU. This value was used for the rest of animal assays. BLD₅₀ was 5×10^5 CFU. A 2.5×10^4 CFU inoculum did not cause mortality.

Protective dose determination

Four hours after the i.p. inoculation with the BMLD of Ab208628, peptides ranging from 0.5 mg/kg up to the respective LD₀ (Table 1) were administered to the animals. PD₅₀ was not achieved at non-toxic doses of any peptide. Results are shown in Fig. 2.

Influence of serum on activity of CA(1–8)M(1–18)

The haemolytic activity of CA(1–8)M(1–18) at 25 µg/mL was severely reduced with increasing serum concentration (Fig. 3a). Additionally, the haemolysis extent for CA(1–8)M(1–18) at 10% serum was considerably lower than in absence of serum (Fig. 3b).

The bactericidal activity of CA(1–8)M(1–18) and its all-D enantiomer, assayed at their MICs on Ab208628, was inhibited by preincubation with serum in a concentration-dependent manner. It is worth noting that the percentage of inhibition for the all-D enantiomer, impervious to proteolytic activity, was consistently lower than the all-L peptide (Fig. 3c).

Experimental peritoneal sepsis in mice

The bacterial concentration in the peritoneal fluid was consistently reduced ($p < 0.05$, Mann-Whitney *U* test) by

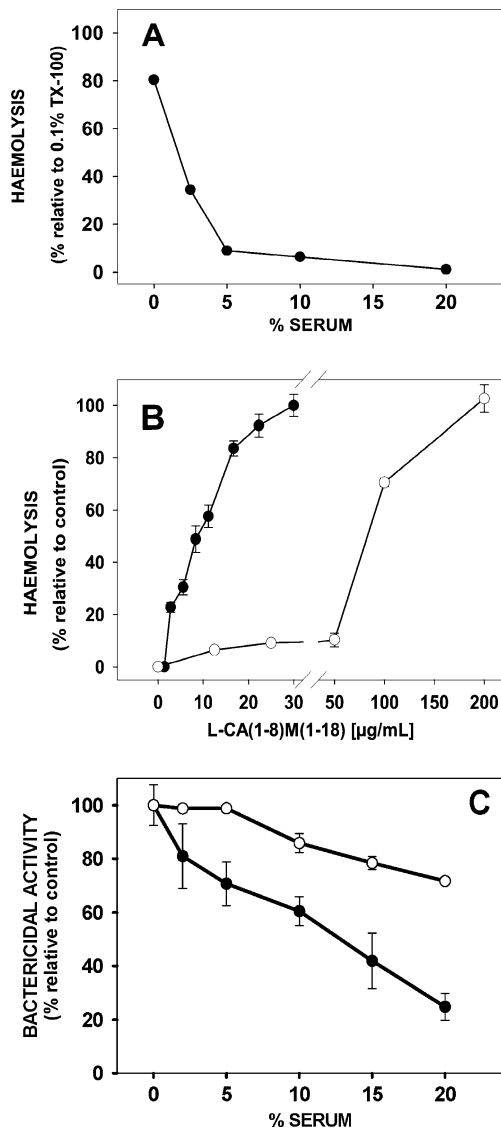


Fig. 3 Influence of mouse serum on the biological activities of CA(1–8)M(1–18). **a** Inhibition of haemolysis caused by L-CA(1–8)M(1–18) by serum at a constant peptide concentration of 25 µg/mL. **b** Variation of the haemolytic activity of L-CA(1–8)M(1–18) in presence (*open circle*) or absence (*closed circle*) of 10% heat inactivated autologous serum. **c** Serum inhibition of microbicidal activity of L-CA(1–8)M(1–18) (*closed circle*), and its all-D-enantiomer (*empty circle*), at a constant peptide concentration equivalent to their MIC in absence of serum (4 µg/mL)

CA-M peptides with respect to 4-h values in the control group. Nevertheless, a later bacterial re-growth ensued for all CA-M hybrids (Fig. 4). In the spleen, the increase of approximately 1 log of spleen CFUs observed at later times in untreated mice was abolished by all the peptides. Furthermore, a slight reduction in original CFUs was observed for Oct-CA(1–7)M(2–9). This decrease is delayed with respect to that for peritoneum with a maximal reduction at 7-h post infection (3 h after peptide inoculation) (Fig. 4).

Discussion

The lack of optimal alternatives for treatment of MDR *A. baumannii* infections has prompted the search of new therapeutic options, especially for nosocomial infections [2, 29]. EAPs may present a feasible alternative against the ever-raising multiresistance of microorganisms [30, 31]. A number of EAPs have been tested in vitro on *Acinetobacter* with in vitro MICS in the µg/mL range, even in the presence of large serum percentages [32]. CA-M hybrids and their parent peptides, CA, and M, exhibit good activity against *A. baumannii* [33, 34], including colistin- and pan-resistant strains [23, 24].

In this work, after CA-M peptide administration, all peptides caused an early drop of the bacterial load in the peritoneal cavity, CA(1–8)M(1–18) being the most effective. Of all peptides, only Oct-CA(1–7)M(2–9) caused a transitory decrease in CFUs in the spleen, whereas the other three remaining peptides, including the non-acylated parent peptide CA(1–7)M(2–9), only halted the bacterial load increase to about 1 log order, relative to untreated animals. Thus, the singularity of Oct-CA(1–7)M(2–9) appears to derive from its additional acyl chain. Other EAPs with similar replacements are resistant to degradation, either by shielding of the cleavage site, or by promoting conformations less accessible to peptidases [35].

In this work we sought to assay CA-M peptides under stringent conditions, similar to those at the onset of clinical treatment; the inoculum size consisted of a lethal dose of bacteria, and peptide administration was delayed for 4 h after inoculation, thus forcing peptide activity on an ongoing, well-established and disseminated infection. Other EAPs halt infection in animals, but administered with short delays (1–2 h, even simultaneously) after inoculation [14, 22, 32, 36]. Proteolytic degradation or sequestration by serum are two major hurdles for in vivo EAP application. For CA-M peptides, trypsin or serum led to inactivation of microbicidal activity, as shown by comparison between the two enantiomers of CA(1–8)M(1–18). Thus, substantial degradation and inactivation of CA-M peptides appears to occur after their injection, accounting for the inability to attain a PD₅₀ in the murine sepsis model.

We have also chosen to work on CA-M peptides composed exclusively of proteinogenic amino acids, to reduce the cost of chemical synthesis and to allow eventual production by recombinant methods [37]. The inclusion of D- or β-amino acids, or the replacement of peptide bonds by peptidomimetics, is a powerful strategy to increase EAP proteolytic resistance [38]. Thus, protection of mice against *A. baumannii* infection was not achieved by all-L K₆L₉, whereas one of its diastereomer analog, with five D-residues, was effective [32]. In our study, even the peptide with the highest toxicity, CA(1–7)M(2–5) (LD₀ 16 mg/kg)

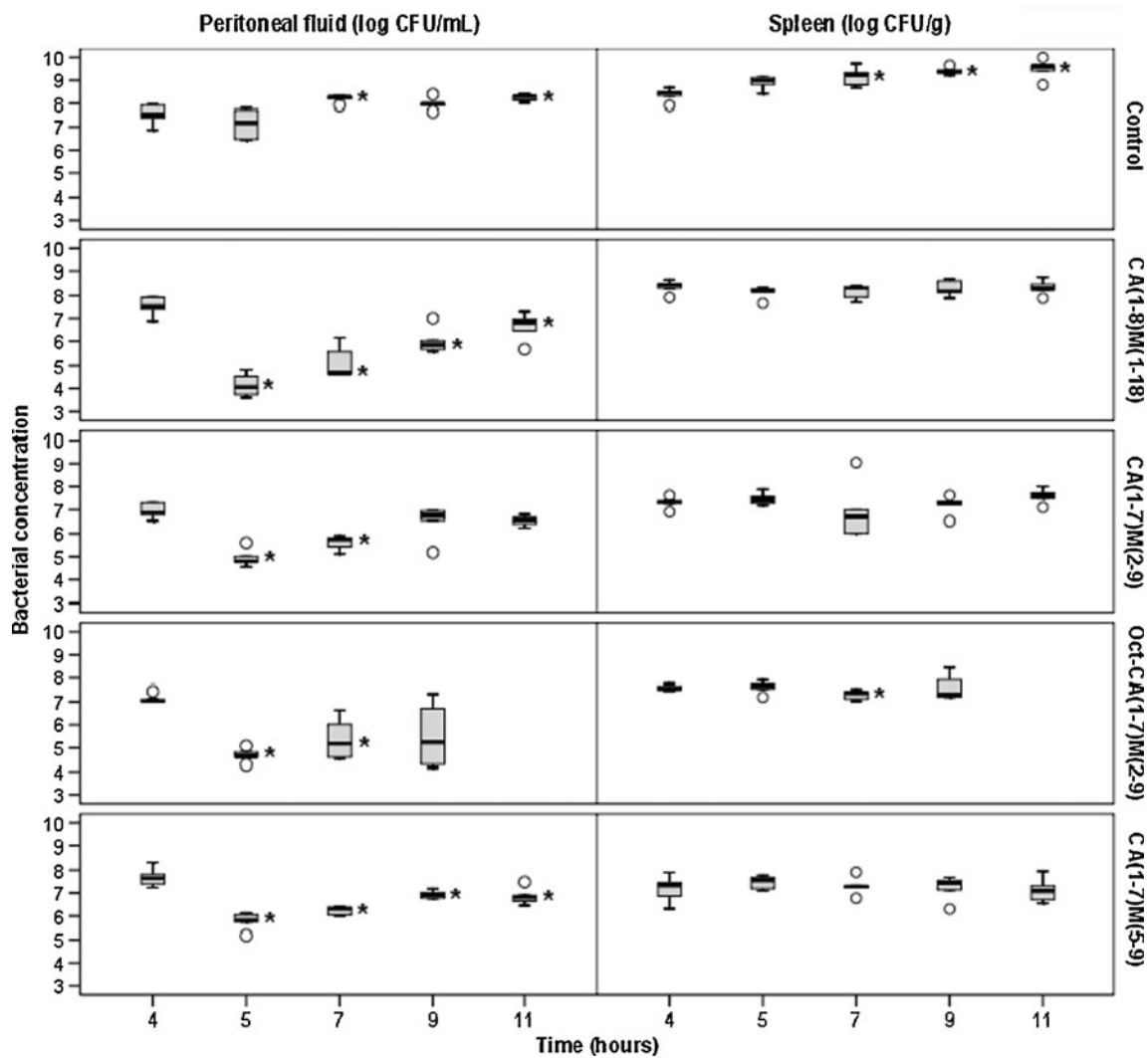


Fig. 4 Experimental peritoneal sepsis in mice. After i.p. inoculation of Ab208628 ($t=0$) at its BMLD, peptide (16 mg/kg) was injected 4 h later. Samples removed from either peritoneum or spleen for CFU

determination as described in [Material and Methods](#). For Oct-CA(1-7)M(2-9) data at 11 h were omitted as mice died earlier. * $p < 0.05$ respect to 4 h, Mann-Whitney U test

compares favorably the with K_6L_9 diastereomer (80% exitus at 9 mg/kg) [32].

While, taken together, our results allow moderate optimism on the use of CA-M hybrids to fight sepsis caused by *A. baumannii*, it is clear that additional fine-tuning of the prototypes is required. Thus, it seems worthwhile to concentrate efforts on developing analogs more resistant to in vivo inactivation, either by strategic replacement of vulnerable residues or by inclusion of D-residues, as shown by the comparison between the enantiomers of CA(1-8)M(1-18), in tune with data from K_6L_9 diastereomers [32]. A further concern is dosage; our assumption that a single shot of peptide would achieve full pathogen elimination was indeed naïve; rather, an increased and, if possible, steady level of peptide delivery at the higher sub-toxic dose at least for several hours appears to

be desirable. While this obviously increases the peptide requirements, they can be nonetheless diminished by the choice of shortened, proteolysis-resistant analogs. Another alternative for reducing peptide requirements could be synergy with conventional antibiotics. For CA-M hybrids, synergy was reported on other Eubacteria such as *Escherichia coli* [39] or *P. aeruginosa* [40]; more specifically, for *A. baumannii*, in vitro synergy between CA(1-7)M(2-9) and β -lactams including imipenem was reported [33].

In summary, the findings of the present work, used as a proof-of-principle, allow for a moderately optimistic view on the efficacy of EAPs in this regard. The CA-M peptides of this work, bactericidal against pan-resistant *A. baumannii* [23], show a local efficacy in the *A. baumannii* peritoneal sepsis model, but are only bacteriostatic on the spleen. Thus, several drawbacks must be overcome before EAPs become

useful antimicrobials, such as to improve the feasibility of their systemic administration, in contrast with the hitherto demotion of EAPs to topical or mucosal administration.

Acknowledgement This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant PET2006-0139 to D.A. and L.R.), and by the Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigaciones Sanitarias-FEDER, grants PI061125 and PI040827 to L.R., PI040885 to D.A., PI041854 to J.A.B. and PI040624 to J.P.) Additional funding from the regional governments of Madrid (S-BIO-0260/2006 to L.R.) and Catalonia (SGR2005-00494 to D.A.) is acknowledged. L.R. belongs to the COMBACT Network (BIO260) (Comunidad Autónoma de Madrid). J.P. belongs to the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III-FEDER. CIBERES is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.

References

- Rodríguez-Bano J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martínez-Martínez L, Bou G, Pachón J (2004) Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:819–824
- Vila J, Pachón J (2008) Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother* 9:587–599
- Fournier PE, Richet H (2006) The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 42:692–699
- Villegas MV, Hartstein AI (2003) *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24:284–295
- Poirel L, Nordmann P (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12:826–836
- Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M (2008) Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 14:161–167
- Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F, Garnacho-Montero J, Cisneros JM, Ortiz C, Pachón J, Aznar J (2009) Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:257–263
- Ganz T (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* 327:539–549
- Giuliani A, Nicoletto SF (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* 2:33
- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19:491–511
- Khandelia H, Ipsen JH, Mouritsen OG (2008) The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1778:1528–1536
- Matsuzaki K (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1788:1687–1692
- Rivas L, Andreu D (2003) Cecropin-melittin hybrid peptides as versatile templates in the development of membrane active antibiotics agents. In: Menestrina G, Dalla Serra M (eds) *Pore-forming peptides and protein toxins*. Harwood Academic Publishers, Reading, Berkshire, United Kingdom, pp 215–259
- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, D'Amato G, Del Prete MS, Orlando F, Kamysz W, Lukasiak J, Saba V, Scalise G (2003) Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin induced mortality in bile duct ligated rats. *Gut* 52:874–878
- Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Orlando F, Mocchegiani F, Pacci AM, Scalise G, Saba V (2001) Therapeutic efficacy of the polymyxin-like peptide ranalexin in an experimental model of endotoxemia. *J Surg Res* 100:183–188
- Giuliani A, Pirri G, Bozzi A, Di Giulio A, Aschi M, Rinaldi AC (2008) Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci* 65:2450–2460
- Zelezetsky I, Tossi A (2006) Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim Biophys Acta* 1758(9):1436–1449
- Andreu D, Ubach J, Boman A, Wahlin B, Wade D, Merrifield RB, Boman HG (1992) Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett* 296(2):190–194
- Boman HC, Boman IA, Andreu D, Li ZQ, Merrifield RB, Schlenstedt G, Zimmermann R (1989) Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. *J Biol Chem* 264(10):5852–5860
- Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B (1998) Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 11(3):218–227
- Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L (2001) N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1–7)M(2–9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 45(9):2441–2449
- Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, Yan H, Hancock RE (1999) Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 43(7):1542–1548
- Rodríguez-Hernández MJ, Saugar J, Docobo-Pérez F, de la Torre BG, Pachón-Ibanez ME, García-Curiel A, Fernández-Cuenca F, Andreu D, Rivas L, Pachón J (2006) Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 58(1):95–100
- Saugar JM, Rodríguez-Hernández MJ, de la Torre BG, Pachón-Ibanez ME, Fernández-Reyes M, Andreu D, Pachón J, Rivas L (2006) Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1251–1256
- C57BL/6 Datasheet. Harland. http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/inbred_mice/c57bl6j_inbred_mice.hl. Accessed 13 December 2010.
- BALBc Datasheet. Harland. http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/inbred_mice/balbc.hl. Accessed 13 December 2010.
- Solanas C, de la Torre BG, Fernández-Reyes M, Santiveri CM, Jiménez MA, Rivas L, Jiménez AI, Andreu D, Cativiela C (2009) Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *J Med Chem* 52(3):664–674
- O'Reilly T, Cleeland R, Squires EL (1996) Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, MD, USA, pp 604–765
- Pachón J, Vila J (2009) Treatment of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Investig Drugs* 10(2):150–156
- Pereira HA (2006) Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Curr Pharm Biotechnol* 7(4):229–234
- Zhang L, Falla TJ (2006) Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert Opin Pharmacother* 7(6):653–663
- Braunstein A, Papo N, Shai Y (2004) In vitro activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 48(8):3127–3129

33. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, Lukasiak J, Scalise G (2003) Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1–7)M(2–9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 24(9):1315–1318
34. Saugar JM, Alarcon T, Lopez-Hernandez S, Lopez-Brea M, Andreu D, Rivas L (2002) Activities of polymyxin B and cecropin A-, melittin peptide CA(1–8)M(1–18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(3):875–878
35. Avrahami D, Shai Y (2003) Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D, L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry* 42(50):14946–14956
36. Gough M, Hancock RE, Kelly NM (1996) Antidotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun* 64(12):4922–4927
37. Zhang L, Falla T, Wu M, Fidai S, Burian J, Kay W, Hancock RE (1998) Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 247(3):674–680
38. Seebach D, Beck AK, Bierbaum DJ (2004) The world of beta- and gamma-peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. *Chem Biodivers* 1(8):1111–1239
39. Zhang L, Benz R, Hancock RE (1999) Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry* 38(25):8102–8111
40. Piers KL, Brown MH, Hancock RE (1994) Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob Agents Chemother* 38(10):2311–2316