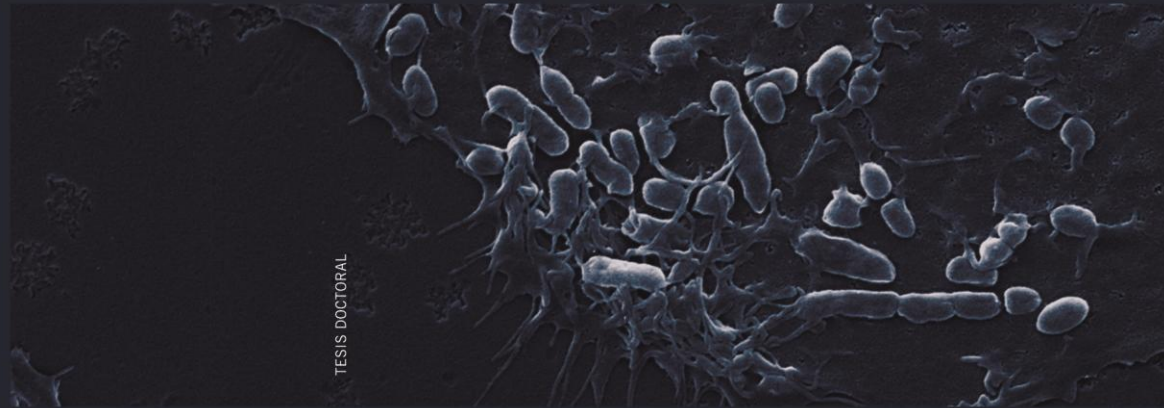


Juan Pablo Martí Lliteras

Dissecció de la infecció per *Haemophilus influenzae* no tipable: interacció con fagocitos professionals y definició de un patró molecular asociado a patogénesis

Juan Pablo Martí Lliteras

TESIS DOCTORAL  
Palma, 2012



TESIS DOCTORAL



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS  
FACULTAT DE CIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA  
Doctorat per la UIB de Ciències Experimentals i Tecnologia







UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS  
FACULTAT DE CIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA  
Doctorat per la UIB de Ciències Experimentals i  
Tecnologia

**Dissecció de la infecció por *Haemophilus influenzae* no tipable: interacció con fagocitos profesionales y definició de un patró molecular asociado a patogénesis**

---

TESIS DOCTORAL

**Juan Pablo Martí Lliteras**

Palma, 2012

Directora: Dra. Juncal Garmendia García



Memoria presentada por D. Juan Pablo Martí Lliteras para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de las Islas Baleares.

D. Juan Pablo Martí Lliteras  
*(Nombre del doctorando)*

La Dra. Juncal Garmendia García, como directora de la Tesis Doctoral titulada “Diseción de la infección por *Haemophilus influenzae* no tipable: interacción con fagocitos profesionales y definición de un patrón molecular asociado a patogénesis”, realizada en la Fundación de Investigación Sanitaria de las Islas Baleares (FISIB) por D. Juan Pablo Martí Lliteras, autoriza la presentación de la mencionada Tesis Doctoral puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Dra. Juncal Garmendia García  
*(Nombre del Director de la Tesis Doctoral)*

Dr. Sebastián Albertí Serrano  
*(Nombre del Ponente de la Tesis Doctoral)*

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias al disfrute de un contrato de Investigador de CIBERES (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias), Instituto de Salud Carlos III, asociado a los proyectos:

- FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias) con referencia PS09-00130: “Disección molecular de la colonización del epitelio respiratorio por el patógeno bacteriano *Haemophilus influenzae* no tipable”.
- Fundación Mutua Madrileña, Convocatoria de Ayudas a la Investigación 2008: “Estudio de los efectos del humo del tabaco y el tratamiento anti-inflamatorio en la interacción entre el patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipable y el macrófago alveolar”.

## AGRADECIMIENTOS

Parece ser que al fin, después de una larga espera y varios viajes, este barco llega a puerto. Es el final de una travesía que me ha proporcionado infinidad de buenos momentos, recuerdos que quedarán grabados para siempre en mi memoria. He aportado mi granito de arena al desarrollo del conocimiento científico y me llevo las alforjas llenas de experiencias. Sin duda, he recibido mucho más de lo que he dado.

Una vez leí, que por simple estadística, por razones de flujo de materia y energía, en nuestro cuerpo hay átomos que formaron parte de otras personas en el pasado y que al cabo de cinco años no quedará ningún átomo en tu cuerpo de los que hoy lo forman, por eso no sé si fui yo exactamente quién empezó esta tesis pero voy a ser yo quien la finalice para que dentro de cinco años sea otro el que la lea sin dejar de ser yo mismo en ningún momento.

En primer lugar quiero agradecer el apoyo prestado por las instituciones y entidades que con su inversión han hecho posible la realización de este trabajo, llevado a cabo gracias al disfrute de un contrato de Investigador de CIBERES (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias) del Instituto de Salud Carlos III, y a la financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) y de la Fundación Mutua Madrileña.

Quiero dar las gracias al Departamento de Microbiología de la Universitat de les Illes Balears por darme la oportunidad de conocer e iniciarme en el mundo científico. Quiero agradecer a todo el personal de la Fundación Caubet-CIMERA de las Islas Baleares su colaboración y dedicación. Al Instituto de Agrobiotecnología-CSIC-UPNA y a todas las personas que allí trabajan su colaboración y ayuda. Quiero dar las gracias a los Hospitales Universitarios Son Dureta y Bellvitge por su colaboración científica.

Quisiera agradecer a mi directora de tesis, la doctora Junkal Garmendia García que depositara su confianza en mí para el desarrollo de esta tesis doctoral. Le agradeceré siempre su dedicación, perseverancia, amistad, comprensión, ayuda y colaboración. Quiero darle las gracias por transmitirme su fascinación por la ciencia, su rigor, su focalización, su espíritu de lucha y de superación. Gracias por enseñarme los métodos y el trabajo de laboratorio. Le doy las gracias por estar siempre ahí, por ofrecerse, no escatimar nunca ni un minuto y ayudarme en todo. De ella he aprendido muchísimas cosas, de carácter científico y no científico. Muchísimas gracias por todo.

Agradecer, también, al Dr. Sebastián Albertí el que aceptara la ponencia de esta tesis doctoral.



Quiero dar las gracias al Dr. Antonio Bennasar por ser el primero en darme la oportunidad de entrar en un laboratorio de microbiología. Quiero agradecer al Dr. Jorge Lalucat y a la Dra. Elena García-Valdés que me permitieran colaborar con su equipo de investigación en el Departamento de Microbiología de la UIB. Quiero darle las gracias a Margarita Gomila, entre otras muchas cosas, por darme el último impulso para decidirme a continuar en este mundo tras largas e interminables horas de tertulia (lo siento). Quiero dar las gracias a todo el personal del laboratorio de la UIB, a la Dra. Balbina Nogales, al Dr. Rafael Bosch, a Magda, a Cristina, a Mariana, a Joseph, a Claudia, a Juana y a María Antonia Mas por su ayuda y compañerismo.

Quisiera dar las gracias a todos los compañeros de trabajo del laboratorio de CIMERA, al Dr. José Antonio Bengoechea, además de por permitirme trabajar en su laboratorio formando parte del CIBERES, por su ayuda científica en todos los problemas que han ido surgiendo y por saber transmitirnos su motivación científica a todo el grupo. Quiero agradecer a Quique su facilidad para hacer reír a la gente, su ayuda científica y no científica dentro y fuera del laboratorio, y sobre todo, quiero agradecerle su bondad y generosidad. A David quiero darle las gracias por su amistad, generosidad, carácter conciliador, compañerismo y ayuda en muchas discusiones científicas; además de por ser el cofundador de los “Xuxetes” e incluirme en sus equipos de fútbol. A Christian por su buen humor, sus detalles que solo a él se le ocurren y por su amistad, además de por su rigor científico, ganas de colaboración y no escatimar nunca ni un minuto en ayudarme en lo que fuese. A Cati Llompart por ser tan sincera, tan buenísima persona, por su predisposición a ayudar y por sus consejos. A Vero por transmitir esa fortaleza vital, por estar siempre de tan buen humor, por su simpatía y amistad. A Camino por transmitir siempre esa felicidad y alegría. A Mar por la energía y la simpatía que contagia. A Cata por ser la alcaldesa del “Barrio Alto”, por su positividad y por ser mi cómplice a la hora de contar los chistes; con ella siempre tengo éxito. A Vicky por su amistad, sus chistes, sus risas y su sinceridad, además de por su colaboración científica con el grupo “*Haemophilus*”. A Anna por sus consejos, su visión de la vida, su simpatía, alegría y felicidad. Quisiera dar las gracias también a Paloma, a Raheem, a Nuria y a todos los del “labo” de arriba por los buenos momentos que me han hecho pasar, por su ayuda y su colaboración.

Quisiera agradecer a todos los componentes del Instituto de Agrobiotecnología de Navarra el hacerme sentir como en casa. Nunca hubiera imaginado una acogida tan agradable como la que tuve.

Quisiera agradecer, también, la ayuda prestada por el equipo del Dr. Antonio Oliver en la recolección y cesión de una de las colecciones de cepas utilizadas en esta tesis y en especial a Carlos Juan, a Tomeu y a Laura por su ayuda en los métodos de análisis de campo pulsado. A Andreas y al Dr J. Sauleda quisiera agradecerles su ayuda con la recolección y procesamiento de los BALs. Al Dr. Carlos Saus su ayuda en la obtención y

procesamiento de imágenes de microscopía electrónica. A las Dras Fina Liñares y Laura Calatayud por la obtención y cesión de las colecciones de cepas de HiNT que se muestran en esta tesis. I would like to give special acknowledgement to Dr. Derek Hood for kindly providing strains HiNT375, Hi Rd (KW20), for performing LPS profiles and serum resistance assays and for helpful discussions.

Especialmente quisiera dar las gracias a los componentes del equipo *Haemophilus* que empezamos en CIMERA y seguimos después en Pamplona. Quiero agradecer a Silvia Mauro su inestimable colaboración con el procesamiento de los datos de la primera colección de aislados clínicos de HiNT. A Antonio López y a Pau Morey todas sus aportaciones científicas, que han sido muchas, pero sobre todo quisiera agradecerles sus aportaciones vitales que empezaron en Mallorca y siguieron en Pamplona debatiendo sobre temas “trascendentales” hasta altas horas de la madrugada en el “Iris”.

Quisiera darle las gracias en especial a Pau Morey por ser mi motor científico en el grupo, por ayudarme siempre en todo y transmitirme sus conocimientos, pero, sobre todo por los buenos momentos que pasamos durante esos meses que estuvimos en Pamplona.

Y, como último agradecimiento profesional, agradecer a este micro-macro mundo de la investigación científica al que he pertenecido durante los últimos años y que me ha aportado muchas satisfacciones y conocimientos. A este mundo que representa mi vocación. Este mundo del que, sin embargo, en la situación socio-económica actual, difícilmente podré volver a formar parte.

A título más personal y familiar quiero agradecer a Pablo Navarro y a Miguel Ángel Maimó las aventuras vividas durante la época de estudiantes y esas partidas de “Risk” interminables y a mis compañeros de piso en Palma, Teo, Sisi y J. Antoni por los buenos momentos vividos. A Vanessa y a Maria Angeles quiero agradecerles todas las horas que pasamos riéndonos.

A todos mis amigos de Cala Murada, Portocolom y S’Horta quisiera darles las gracias por todos los momentos felices que hemos compartido desde siempre y por los que nos quedan. A David Capó quiero agradecerle, además, su ayuda en la maquetación de la portada de la tesis.

Quiero agradecer a la familia Zinn y a la familia Kreuzburg los apoyos y ánimos recibidos, especialmente en estos últimos meses.

A toda la familia Repiso por hacerme sentir que formo parte de esa gran piña.

Quiero darle las gracias a mis suegros Pepe y Linita, a mis cuñados Xisco, Maite, Inma y Jaume, a las abuelas Conchita y María y a Toni por cuidarme tan bien, por su cariño,

comprensión, ayuda y alegría. Quiero darles las gracias entre otras muchas cosas, por todos esos buenos momentos que pasamos juntos.

Quiero darle las gracias y un beso enorme a mi sobrina Núria porque aunque ella aún no se dé cuenta, me ha ayudado muchísimo en este tramo final.

Quiero dar las gracias a mis tíos y primos por su cariño y estima.

Quiero agradecerleselo todo en esta vida a mis padres, a mi hermana y a mis abuelos por quererme tanto, por ser los faros que han guiado mi vida, por inculcarme ganas de vivir, inquietud por el conocimiento, rigor por el trabajo, afán de superación y sobre todo, por ayudarme a ser feliz y a disfrutar de la vida. Quiero agradecerles su generosidad en mi educación y su solidaridad en el trabajo. Son las mejores personas que conozco. Ellos me han enseñado a vivir.

Finalmente, quiero agradecerleselo todo a Virginia. Quiero darte las gracias por tu comprensión frente a experimentos en fin de semana, por entender ausencias interminables en días festivos y fines de semana por ir a hacer el “pase” de células, por ser tan comprensiva en los meses en los que estuve fuera y por reaccionar con una sonrisa a mi mal humor en los días en los que no salían las cosas, sinceramente, muchas gracias por tu comprensión. Gracias por hacerme feliz, apoyarme y animarme, gracias por entender mi forma de ser, gracias por quererme como me quieres y cuidarme como me cuidas. Gracias por compartir tu vida conmigo. Sin tu ayuda nada de esto habría sido posible.

A mi familia

A Virginia



# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	18
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	21
<b>ABREVIATURAS</b> .....	22
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	27
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	29
<b>1. TRACTO RESPIRATORIO HUMANO</b> .....	31
1.1. Características generales del tracto respiratorio humano.....	31
1.2. Macrófagos alveolares y características generales del proceso de fagocitosis.....	33
<b>2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TABACO EN EL TRACTO RESPIRATORIO     HUMANO</b> .....	37
2.1. Características y composición de los cigarrillos comerciales y del humo de tabaco .....	37
2.2. Efecto de la exposición al tabaco en el desarrollo de infecciones bacterianas .....	39
2.3. Enfermedades respiratorias asociadas al tabaquismo: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) .....	40
2.4. Mecanismos moleculares y celulares asociados a la progresión de la EPOC .....	42
2.5. Relación entre exposición a tabaco, desarrollo de EPOC e infecciones bacterianas .....	48
2.5.1. La hipótesis del círculo vicioso .....	48
2.5.2. Relación entre EPOC e infecciones bacterianas .....	49
2.5.3. Infección del paciente EPOC por <i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i> no tipable .....	51
<b>3. IMPACTO DE LA TERAPIA ANTI-INFLAMATORIA EN LA INFECCIÓN     RESPIRATORIA POR PATÓGENOS BACTERIANOS</b> .....	52

4. <i>Haemophilus influenzae</i> NO TIPABLE COMO PATÓGENO OPORTUNISTA DEL TRACTO RESPIRATORIO HUMANO .....	56
4.1. Características generales de <i>H. influenzae</i> .....	56
4.2. Variabilidad genética de <i>H. influenzae</i> .....	58
4.3. Aspectos moleculares de la patogénesis por <i>H. influenzae</i> no tipable .....	61
4.3.1. El lipooligosacárido (LOS) de HiNT: estructura, diversidad y papel como factor de virulencia .....	63
4.3.2. Interacción de HiNT con elementos del sistema inmune humano .....	72
4.3.2.1. Alteración de la función muco-ciliar .....	72
4.3.2.2. Inactivación de IgA .....	72
4.3.2.3. Resistencia a elementos de la inmunidad innata humoral .....	73
4.4. Características de la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio humano .....	73
4.4.1. Moléculas implicadas en la adhesión de HiNT al epitelio respiratorio .....	73
4.4.2. Dinámica de la interacción de HiNT con células del tracto respiratorio humano .....	78
4.5. Infección por HiNT e inducción de la respuesta inflamatoria .....	81
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	83
<b>CAPÍTULO 1: Disección de la infección del macrófago alveolar por <i>Haemophilus influenzae</i> no tipable</b> .....	89
1.1. INTRODUCCIÓN .....	89
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	91
1.2.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo .....	91
1.2.2. Transformación química de <i>E.coli</i> con cloruro de rubidio ....	93

1.2.3. Transformación de <i>H. influenzae</i> mediante inducción de la competencia natural (método M-IV) .....	94
1.2.4. Inmunodetección de PCho a partir de colonia .....	96
1.2.5. Cultivo celular, mantenimiento de líneas celulares e infección de células en cultivo .....	96
1.2.6. Preparación y aplicación de extracto de humo de tabaco ...	99
1.2.7. Purificación de macrófagos alveolares humanos .....	100
1.2.8. Microscopía electrónica de transmisión .....	101
1.2.9. Microscopía de inmunofluorescencia .....	101
1.2.10. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y <i>WESTERN BLOT</i> .....	103
1.2.11. Determinación de la secreción de la citoquina TNF- $\alpha$ .....	104
1.2.12. Análisis estadístico .....	104
1.3. RESULTADOS .....	105
1.3.1. Análisis de la infección del macrófago alveolar por HiNT: adhesión y fagocitosis bacteriana .....	105
1.3.2. El macrófago alveolar elimina la infección por HiNT mediante maduración fagolisosomal .....	109
1.3.3. La exposición al extracto de humo de tabaco disminuye la capacidad del macrófago alveolar para eliminar la infección por HiNT .....	113
1.3.4. La exposición a nicotina disminuye la capacidad del macrófago alveolar para adherir y fagocitar HiNT .....	118
1.3.5. El tratamiento con glucocorticoides no restablece la capacidad fagocítica del macrófago alveolar .....	121
1.3.6. Las respuestas inflamatoria y fagocítica del macrófago alveolar durante la infección por HiNT no son eventos acoplados .....	123



1.3.7. Los macrófagos alveolares de fumadores con función pulmonar normal y de pacientes EPOC tienen reducida su capacidad fagocítica .....	125
1.4. DISCUSIÓN .....	129
<b>CAPÍTULO 2.</b> Análisis de patrones moleculares y fenotípicos en aislados clínicos de <i>Haemophilus influenzae</i> no tipable .....	137
2.1. INTRODUCCIÓN .....	137
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	140
2.2.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo .....	140
2.2.2. Inmunodetección de PCho a partir de colonia .....	141
2.2.3. Gel de electroforesis en campo pulsado (PFGE) .....	141
2.2.4. Preparación del ADN bacteriano y amplificación por PCR .....	142
2.2.5. Purificación y separación electroforética de la molécula de LOS de HiNT y dot-blot .....	144
2.2.6. Cultivo celular, mantenimiento de líneas celulares e infección .....	145
2.2.7. Resistencia bacteriana a muerte mediada por suero .....	146
2.2.8. Análisis de la estructura del lípido A de HiNT .....	146
2.2.9. Análisis estadístico .....	147
2.3. RESULTADOS .....	147
2.3.1. Tipado molecular de una colección de cepas de HiNT aisladas de pacientes no relacionados .....	147
2.3.2. Distribución, prevalencia y secuencia de genes que codifican estructuras de la superficie de HiNT en una colección de cepas no isogénicas .....	148

2.3.3. Distribución fenotípica de la molécula de LOS en aislados clínicos de HiNT .....	160
2.3.4. Contribución de los patrones moleculares de HiNT a la resistencia al ataque bactericida del suero y a la adhesión al epitelio respiratorio .....	163
2.3.5. Caracterización de cepas de HiNT aisladas de pacientes adultos con enfermedades respiratorias crónicas durante episodios consecutivos de agudización .....	166
2.3.6. Distribución de genes que codifican estructuras de la superficie de HiNT en <i>sets</i> de aislados de pacientes respiratorios crónicos .....	167
2.3.7. Diversidad de secuencia génica en <i>sets</i> de aislados de HiNT de pacientes respiratorios crónicos .....	168
2.3.8. Estructura del lípido A en <i>sets</i> de aislados de HiNT de pacientes respiratorios crónicos .....	174
2.4. DISCUSIÓN .....	177
2.4.1. Distribución y diversidad génica en aislados clínicos de HiNT de origen patológico no relacionado .....	177
2.4.2. Distribución y diversidad génica en <i>sets</i> de aislados de HiNT de pacientes respiratorios crónicos. ....	179
<b>CONSIDERACIONES FINALES</b> .....	185
<b>CONCLUSIONES</b> .....	191
<b>REFERENCIAS</b> .....	195
<b>ANEXOS</b> .....	221
ANEXO I: Adhesión de HiNT a la proteína de matriz extracelular fibronectina .....	223
ANEXO II: Cepas utilizadas en este trabajo .....	225
ANEXO III: Publicaciones .....	227

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática del tracto respiratorio humano .....	32
<b>Figura 2:</b> Maduración del fagosoma/endosoma .....	36
<b>Figura 3:</b> Mecanismos moleculares involucrados en la progresión de la EPOC..	45
<b>Figura 4:</b> Hipótesis del círculo vicioso en la progresión de la EPOC .....	49
<b>Figura 5:</b> Humo de tabaco e insensibilidad a corticoides .....	55
<b>Figura 6:</b> Regulación del contenido génico por variación de fase .....	60
<b>Figura 7:</b> Estructura de la molécula de LOS de <i>H. influenzae</i> .....	66
<b>Figura 8:</b> Estructura de la molécula de LOS de la cepa HiNT375 .....	67
<b>Figura 9:</b> Oligosacáridos del núcleo externo de la molécula de LOS de <i>H. influenzae</i> .....	70
<b>Figura 10:</b> Modelo mostrando las etapas del proceso de infección de células epiteliales por HiNT .....	79
<b>Figura 11:</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de HiNT375 a células del epitelio respiratorio humano A549 .....	80
<b>Figura 12:</b> Adhesión de HiNT a macrófagos alveolares MH-S .....	106
<b>Figura 13:</b> Microscopía electrónica de transmisión mostrando la adhesión de HiNT398 a la superficie del macrófago alveolar MH-S .....	106
<b>Figura 14:</b> Cuantificación de la adhesión de las cepas HiNT375, HiNT375 $\Delta$ <i>lgtF</i> , HiNT375 $\Delta$ <i>lic1BC</i> , HiNT375 $\Delta$ <i>lpsA</i> , HiNT375 $\Delta$ <i>siaB</i> , HiNT375 $\Delta$ <i>lic2A</i> , HiNT375 $\Delta$ <i>lgtF</i> $\Delta$ <i>lpsA</i> y HiNT375 $\Delta$ <i>opsX</i> a macrófagos alveolares MH-S .....	107
<b>Figura 15:</b> Cuantificación de la fagocitosis por el macrófago alveolar MH-S de un repertorio de cepas mutantes en genes implicados en la síntesis de LOS .....	108
<b>Figura 16:</b> Mecanismos moleculares implicados en la fagocitosis de la cepa HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S .....	109
<b>Figura 17:</b> Progresión de la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT .....	110

<b>Figura 18:</b> Maduración y tránsito fagolisosomal durante la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT398 .....	112
<b>Figura 19:</b> Efecto de la exposición a EHT en la infección de macrófagos alveolares MH-S por HiNT .....	114
<b>Figura 20:</b> Fagocitosis de bolas de látex por el macrófago alveolar MH-S pre-expuesto a EHT 10% durante 3 h .....	115
<b>Figura 21:</b> Detección de la fosforilación de Akt (P-Akt) mediante <i>Western blot</i> .....	116
<b>Figura 22:</b> Maduración y tránsito fagolisosomal durante la infección por HiNT398 del macrófago alveolar MH-S pre-expuesto a EHT 10% .....	117
<b>Figura 23:</b> Efecto de la exposición a EHT en la eliminación de HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S .....	118
<b>Figura 24:</b> Efecto de la nicotina en la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT .....	120
<b>Figura 25:</b> Efecto de la pre-exposición a distintas concentraciones de nicotina sódica en la fagocitosis de HiNT375 por el macrófago alveolar MH-S .....	120
<b>Figura 26:</b> Efecto de la exposición a EHT, nicotina y dexametasona en la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT .....	122
<b>Figura 27:</b> Respuesta inflamatoria del macrófago alveolar MH-S durante la infección con HiNT .....	124
<b>Figura 28:</b> Respuesta inflamatoria del macrófago alveolar MH-S durante la infección con un repertorio de cepas mutantes de HiNT375 .....	125
<b>Figura 29:</b> Fagocitosis de HiNT398 por macrófagos alveolares humanos obtenidos a partir de BALs .....	127
<b>Figura 30.</b> Localización de HiNT en el interior de fagocitos profesionales murinos <i>in vivo</i> .....	130
<b>Figura 31:</b> Gel de electroforesis en campo pulsado (PFGE) mostrando patrones de restricción de ADN cromosomal de distintas cepas de HiNT .....	148
<b>Figura 32:</b> Localización de los cebadores y tamaños de los amplicones obtenidos por PCR al amplificar los genes analizados .....	150

<b>Figura 33:</b> Gel de agarosa 1% mostrando productos de PCR representativos de los distintos tamaños obtenidos al amplificar el gen <i>lic2A</i> .....	152
<b>Figura 34:</b> Predicción de la estructura de la proteína P5 de HiNT obtenida con el programa PRED-TMBB .....	154
<b>Figura 35:</b> Detección de la expresión de PCho mediante colony blot en tres cepas de HiNT .....	161
<b>Figura 36:</b> Perfiles electroforéticos del LOS bacteriano aislado de 19 cepas clínicas de HiNT .....	162
<b>Figura 37:</b> Adhesión de 19 cepas clínicas de HiNT a células de epitelio respiratorio humano A549 .....	164
<b>Figura 38:</b> Estructuras del lípido A de los distintos aislados de HiNT analizados .....	175
<b>Figura 39:</b> Estructura del lípido A de HiNT322 .....	175
<b>Figura 40:</b> Valores de adhesión de las cepas HiNT375, HiNT375 $\Delta$ <i>hap</i> , HiNT398, HiNT2019 y Hi Rd KW20 a fibronectina .....	224

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Caracterización bioquímica de <i>H. influenzae</i> .....	57
<b>Tabla 2:</b> Patogénesis por <i>H. influenzae</i> Tipo b y por HiNT .....	61
<b>Tabla 3:</b> Genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de LOS de HiNT .....	64
<b>Tabla 4:</b> Adhesinas de <i>H. influenzae</i> .....	75
<b>Tabla 5:</b> Cebadores utilizados para la generación de cepas mutantes .....	93
<b>Tabla 6:</b> Preparación del medio M-IV .....	95
<b>Tabla 7:</b> Información clínica de los pacientes incluidos en este estudio .....	100
<b>Tabla 8:</b> Anticuerpos primarios usados en este trabajo .....	102
<b>Tabla 9:</b> Cebadores utilizados en este estudio .....	144
<b>Tabla 10:</b> Origen clínico de las cepas utilizadas en este estudio que constituyen la colección 1 .....	149
<b>Tabla 11:</b> Distribución de los genes que codifican adhesinas y enzimas implicados en la síntesis del LOS en una colección de 111 aislados clínicos de HiNT no isogénicos .....	151
<b>Tabla 12:</b> Características de los aislados de HiNT de la colección 1 seleccionados para su posterior caracterización .....	155
<b>Tabla 13:</b> Distribución del número de repeticiones 5'-CAAT-3' en el gen <i>lic2A</i> en 20 cepas clínicas de HiNT .....	156
<b>Tabla 14:</b> Secuencia de las regiones extracelulares variables 1 a 5 de la proteína P5 en 18 aislados clínicos de HiNT .....	157
<b>Tabla 15:</b> Secuencias de OapA en la región variable identificada (a partir del aminoácido 195) en 19 aislados clínicos de HiNT de la colección 1 .....	159
<b>Tabla 16:</b> Secuencias de OapA en la región variable identificada (a partir del aminoácido 195) en cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios crónicos en visitas independientes, colección 2 .....	159
<b>Tabla 17:</b> Distribución de los niveles de ChoP en la colección 1 de aislados clínicos de HiNT no isogénicos .....	161
<b>Tabla 18:</b> Resistencia de 18 aislados clínicos no isogénicos de HiNT al ataque bactericida del suero humano normal .....	165
<b>Tabla 19:</b> Origen clínico, historial, perfil PFGE y patrón génico de las 54 cepas de HiNT utilizadas en este estudio .....	169
<b>Tabla 20:</b> Tamaño de la deleción en la proteína OapA en la región variable identificada en asilados de HiNT representativos de la colección 2 .....	171
<b>Tabla 21:</b> Número de repeticiones del tetranucleótido 5'-CAAT-3' en los genes <i>lic2A</i> y <i>lic1A</i> de las cepas clínicas de la colección 2 seleccionadas y predicción de traducción .....	173
<b>Tabla 22:</b> Estructuras de lípido A identificadas .....	176
<b>Tabla 23:</b> Cepas de <i>Haemophilus influenzae</i> utilizadas en este trabajo .....	225

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Agua d.o.i.</b>	Agua desionizada y purificada por ósmosis inversa
<b>Akt</b>	Serina/treonina proteína quinasa, también conocida como proteína quinasa B (PKB).
<b>Ap</b>	Ampicilina
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BAL</b>	Lavado broncoalveolar (del inglés <i>bronchoalveolar lavage</i> )
<b>BC</b>	Bronquitis crónica
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón (del inglés <i>Brain Heart Infusion</i> )
<b>β-NAD</b>	β-nicotinamida adenin dinucleótido
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>CAP</b>	Neumonía adquirida en comunidad (del Inglés <i>community acquired pneumonia</i> )
<b>CEACAM</b>	del inglés <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
<b>CFTR</b>	Proteína transmembrana asociada a fibrosis quística (del inglés <i>cystic fibrosis transmembrane protein</i> )
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>CMP</b>	Citidin monofosfato
<b>CRP</b>	Proteína C-reactiva (del inglés <i>C-reactive protein</i> )
<b>Crp</b>	del inglés <i>cAMP receptor protein</i>
<b>CTAB</b>	Hexadecil trimetil bromuro de amonio
<b>CXC</b>	Quimoquinas CXC (las dos cisteínas del extremo N-terminal están separadas por un aminoácido X)
<b>CXCR</b>	Receptor de quimoquinas CXC
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTP</b>	Dinucleótido trifosfato
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica como absorbancia a λ=600 nm
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetracético
<b>EEA1</b>	del inglés <i>early endosome antigen 1</i>
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EHT</b>	Extracto de humo de tabaco
<b>ELISA</b>	del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>Erm</b>	Eritromicina
<b>FQ</b>	Fibrosis quística
<b>GFP</b>	del inglés <i>green fluorescent protein</i>

<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GalNAc</b>	N-acetilgalactosamina
<b>Glc</b>	Glucosa
<b>GlcN</b>	Glucosamina
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
<b>GR</b>	receptor de glucocorticoides
<b>GRO-<math>\alpha</math></b>	del inglés <i>growth related oncogene alpha</i>
<b>GSH</b>	Glutation
<b>h</b>	Horas
<b>HAT</b>	Histona acetil-transferasa (del inglés <i>histone acetyltransferase</i> )
<b>hBD-2</b>	$\beta$ -defensina 2 humana (del inglés <i>human <math>\beta</math>-defensin 2</i> )
<b>HDAC</b>	Deacetilasa de histonas (del inglés <i>histone deacetylase</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanolsulfónico
<b>Hep</b>	Heptosa
<b>HiNT</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipable
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>IP-10</b>	Proteína 10 inducida por interferón $\gamma$ (del inglés <i>interferon gamma-induced protein 10</i> )
<b>I-TAC</b>	Quimioatrayente de células T inducible por interferón (del inglés <i>interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i> )
<b>JNK</b>	del inglés <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
<b>kb</b>	Kilobase
<b>Kdo</b>	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>Lamp</b>	del inglés <i>lysosomal associated marker protein</i>
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>LBP</b>	del inglés <i>lipopolysaccharide binding protein</i>
<b>LOS</b>	Lipooligosacárido
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LTA<sub>4</sub>H</b>	Hidrolasa de leucotrieno A <sub>4</sub>
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>M6PR</b>	del inglés <i>mannose 6-phosphate receptor</i>
<b>MA</b>	macrófago alveolar
<b>MAP</b>	del inglés <i>mitogen-associated protein</i>
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
<b>MBP</b>	del inglés <i>mannose binding protein</i>
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>min</b>	Minutos



<b>MMP</b>	Metaloproteasa de Matriz
<b>MUC</b>	Mucina
<b>NAD</b>	nicotinamida adenin dinucleótido
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>Neu5Ac</b>	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico o ácido siálico
<b>NFκB</b>	Factor nucleante kappa B
<b>NLR</b>	del inglés <i>Nod like receptors</i>
<b>OAc</b>	Grupo O-acetilo
<b>P</b>	Grupo fosfato
<b>PAF</b>	Factor activador de plaquetas (del inglés <i>platelet activating factor</i> )
<b>PAF-R</b>	Receptor de PAF
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógeno (del inglés <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfato salino
<b>PBSB</b>	PBS con albúmina bovina sérica 1% (p/v)
<b>PCho</b>	Fosforilcolina
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEtn</b>	Fosfoetanolamina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PFGE</b>	Electroforesis en campo pulsado (del inglés <i>pulsed field gel electrophoresis</i> )
<b>PGE</b>	Prostaglandina E
<b>PGP</b>	Tripéptido Prolina-Glicina-Prolina
<b>PI3K</b>	del inglés <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A (del inglés <i>protein kinase A</i> )
<b>PKCζ</b>	Proteína quinasa C Z
<b>PRR</b>	del inglés <i>pattern recognition receptors</i>
<b>RelA/p65</b>	Factor de transcripción RelA/p65
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>RRX</b>	Rodamina-RedX
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>s</b>	Segundos
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>sBHI</b>	Infusión de cerebro y corazón suplementada
<b>sCD14</b>	CD14 soluble
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SHN</b>	Suero humano normal
<b>SLPI</b>	del inglés <i>Secretory Leukoprotease Inhibitor</i>
<b>SSR</b>	repeticiones de secuencia simple (del inglés <i>simple sequence repeats</i> )

<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TACE</b>	Enzima conversor de TNF- $\alpha$ (del inglés <i>TNF-<math>\alpha</math> converting enzyme</i> )
<b>TE</b>	Tampón Tris-EDTA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>transformant growing factor beta</i> )
<b>TLR</b>	del inglés <i>Toll like receptor</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	del inglés <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>u.f.c.</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>USS</b>	Señal específica de captura (del inglés <i>uptake specific signal</i> )
<b>vATPasa</b>	ATPasa vacuolar



## RESUMEN

*Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT) es un patógeno oportunista que causa infecciones respiratorias agudas e infecciones crónicas en pacientes respiratorios crónicos que sufren enfermedades asociadas al tabaquismo. En esta Tesis Doctoral, hemos diseccionado la interacción de HiNT con el macrófago alveolar, principal fagocito residente del tracto respiratorio humano. Hemos analizado (i) la progresión de la infección de macrófagos en cultivo y *ex vivo*; (ii) la implicación del lipooligosacárido bacteriano en dicha infección; (iii) la modulación de la infección por exposición a humo de tabaco y a terapia corticoide. El macrófago alveolar elimina la infección por HiNT mediante procesamiento fagolisosomal. La exposición celular a humo de tabaco disminuye su capacidad fagocítica, al bloquear parcialmente la cascada de señalización dependiente de la quinasa PI3K. El corticoide no revierte el defecto causado por el humo de tabaco. En segundo lugar, hemos analizado la diversidad genética y fenotípica de dos colecciones de aislados clínicos de HiNT. Hemos determinado la distribución y conservación de secuencia de nueve genes que codifican moléculas localizadas en la superficie bacteriana. Hemos establecido un patrón génico prevalente, parcialmente asociado a la resistencia del patógeno a la muerte mediada por complemento y a su adhesión al epitelio respiratorio humano.

## ABSTRACT

Nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is an opportunistic pathogen that causes acute infections and chronic infections in patients suffering chronic respiratory diseases associated to tobacco smoking. We characterized NTHi infection of alveolar macrophages, the main resident professional phagocyte in the human respiratory tract. We studied (i) the progression of the infection by using both *in vitro* and *ex vivo* approaches; (ii) the involvement of bacterial lipooligosaccharide in macrophage infection; (iii) the effect of host cell exposure to cigarette smoke and corticoids on bacterial infection. Alveolar macrophages clear NTHi infection by phagolysosomal maturation. Host cell exposure to cigarette smoke impairs bacterial phagocytosis. Mechanistically, this impairment may be due to a partial inhibition of PI3K signaling by cigarette smoke, which is not reverted by cell treatment with corticoids. Moreover, we analyzed NTHi genetic and phenotypic diversity in two collections of clinical isolates, by assessing the distribution and sequence conservation of nine genes encoding bacterial surface molecules. We determined the existence of a prevalent gene pattern, which could be associated to bacterial resistance to complement mediated killing and to NTHi adhesion to the human respiratory epithelium.



# INTRODUCCIÓN



## 1. TRACTO RESPIRATORIO HUMANO

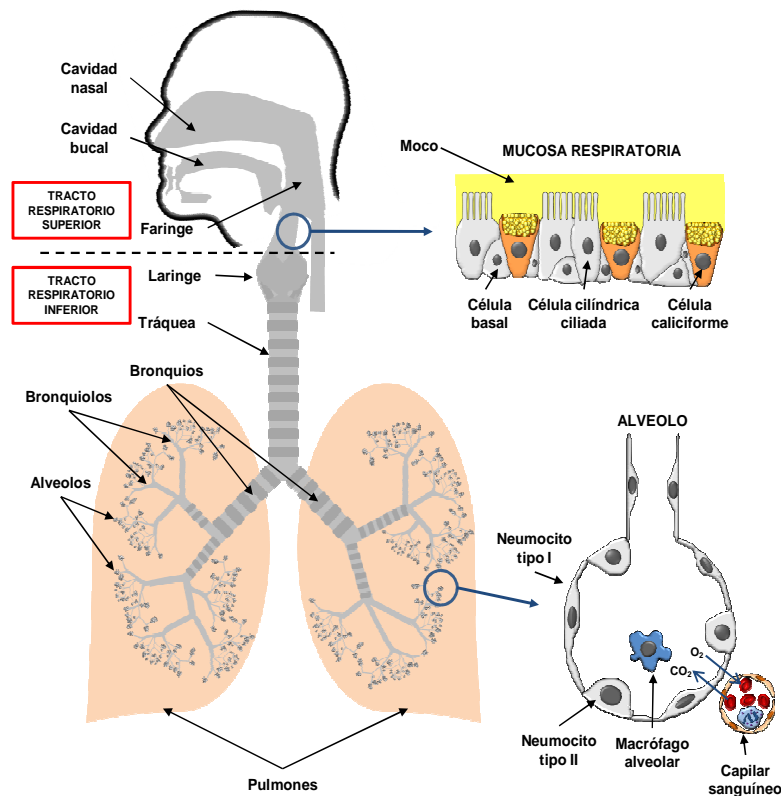
### 1.1. Características generales del tracto respiratorio humano

Las vías respiratorias altas del tracto respiratorio humano están colonizadas desde el nacimiento por microorganismos que constituyen la microbiota respiratoria característica de cada individuo. Los microorganismos colonizadores que constituyen la microbiota respiratoria humana son comensales y/o patógenos oportunistas (García-Rodríguez *et al.*, 2002). Existen ejemplos de co-evolución microorganismo-hospedador de distintos patógenos oportunistas humanos como son *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis* (Voges *et al.*, 2010). La utilización de técnicas convencionales de microbiología basadas en el aislamiento e identificación de microorganismos sugiere que las vías respiratorias bajas de individuos con función pulmonar normal son un ambiente carente de microorganismos, fundamentalmente estéril (Garmendia *et al.*, 2012). Por el contrario, la utilización de técnicas de secuenciación masiva en muestras respiratorias ha determinado la presencia de microorganismos a lo largo de todo el árbol respiratorio de individuos con función pulmonar normal, si bien las vías respiratorias bajas de individuos con función pulmonar normal presentan un menor número de microorganismos que las de pacientes respiratorios crónicos (Erb-Downward *et al.*, 2011). Estas evidencias señalan la importancia de los estudios de ecología microbiana, dinámica de poblaciones e interacción hospedador-microorganismo en el tracto respiratorio humano, así como la importancia de combinar metodologías complementarias en el estudio de la fisiología y función pulmonar.

El sistema inmunitario humano juega un papel esencial en el correcto funcionamiento del sistema respiratorio. Limitar la presencia de microorganismos en las vías respiratorias bajas es clave, ya que el intercambio gaseoso entre el medio externo y los capilares sanguíneos se produce en el pulmón, y tanto el epitelio alveolar como las paredes vasculares son extremadamente delgadas. La **Fig. 1** muestra la organización anatómica y celular del tracto respiratorio humano. Existen barreras físicas, anatómicas y mecánicas (vello nasal, tos y batido muco-ciliar) que constituyen la primera línea de defensa en el control de la llegada de microorganismos a las vías respiratorias bajas. El batido muco-ciliar genera una barrera de hidratación alrededor del tejido pulmonar que, mediante la combinación de mucus y cilios, atrapa y elimina partículas que entran desde el exterior y microorganismos potencialmente invasores (Taylor *et al.*, 2010). El epitelio alveolar está formado por neumocitos tipo I y



neumocitos tipo II. Los neumocitos tipo I ejercen una función anatómica; cubren el 95% de la superficie de los alveolos, generando una barrera fina entre el espacio alveolar y los vasos sanguíneos. Los neumocitos tipo II cubren el 5% de la superficie alveolar, pero son más abundantes en número que los neumocitos tipo I (Fereol *et al.* 2008).



**Figura 1. Representación esquemática del tracto respiratorio humano.** Detalles de la mucosa respiratoria a nivel de la faringe (arriba, derecha) y de un alveolo (abajo, derecha).

Los neumocitos tipo II desempeñan un conjunto de funciones esenciales en la función pulmonar: (i) mantenimiento de la tensión pulmonar, secreción y reabsorción del surfactante pulmonar; (ii) transporte de agua y sodio; metabolismo de compuestos xenobióticos; (iii) regeneración pulmonar; (iv) reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) por receptores de reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) y transducción de señales asociada; (v) secreción de péptidos antimicrobianos; (vi) secreción de citoquinas y quimoquinas, mediadores pro-inflamatorios que orquestan respuestas inflamatorias del hospedador; (vii) formación de una barrera que evita el paso de microorganismos patógenos al torrente sanguíneo (Castranova *et al.*, 1998; Chaudhuri *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2006; Rubovitch *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2000).

Los macrófagos alveolares son fagocitos profesionales residentes en el pulmón. Estas células desempeñan un papel esencial en la eliminación de microorganismos patógenos mediante la fagocitosis y procesamiento fagolisosomal de los mismos. Además, los macrófagos alveolares secretan mediadores inflamatorios que dirigen, cuando es necesario, el reclutamiento de neutrófilos desde el torrente sanguíneo hacia el espacio alveolar (Naito *et al.*, 2008).

Los neutrófilos juegan un papel fundamental en la eliminación de infecciones bacterianas (Nathan *et al.*, 2006). Los neutrófilos son células circulantes localizadas en su mayor parte en el torrente sanguíneo, y son el primer elemento celular innato reclutado a un lugar de inflamación aguda (Metchnikoff *et al.*, 1968) en respuesta a estímulos quimiotácticos como son las citoquinas inflamatorias secretadas por epitelio y macrófagos (Zemans *et al.*, 2009). Los neutrófilos son células fagocíticas de vida corta, que no se dividen. Presentan un núcleo multilobulado y numerosos gránulos citosólicos que contienen enzimas líticas y moléculas antimicrobianas (Roitt *et al.*, 2006). El contenido de los gránulos es secretado en el foco de infección, desempeñando función bactericida.

Las células del aparato respiratorio producen y secretan al espacio alveolar un repertorio de moléculas solubles con un papel esencial en la eliminación de microorganismos y en el control de la carga bacteriana de las vías respiratorias bajas. Estas moléculas, localizadas en el fluido acuoso de las vías respiratorias, incluyen el sistema del complemento, péptidos antimicrobianos, lisozima, lactoferrina, inhibidor de la secreción de leucoproteasa (SLPI) y las proteínas del surfactante pulmonar SP-A y SP-D (Bals *et al.*, 2004). El equilibrio inmunitario que garantiza la función alveolar puede verse alterado por la exposición continuada a partículas nocivas y gases presentes en el medio ambiente. Así, la exposición prolongada a humo de tabaco es una agresión que causa un impacto en la microbiota respiratoria, con consecuencias perjudiciales en la calidad de vida del individuo que se expone a dicho agente.

## **1.2. Macrófagos alveolares y características generales del proceso de fagocitosis**

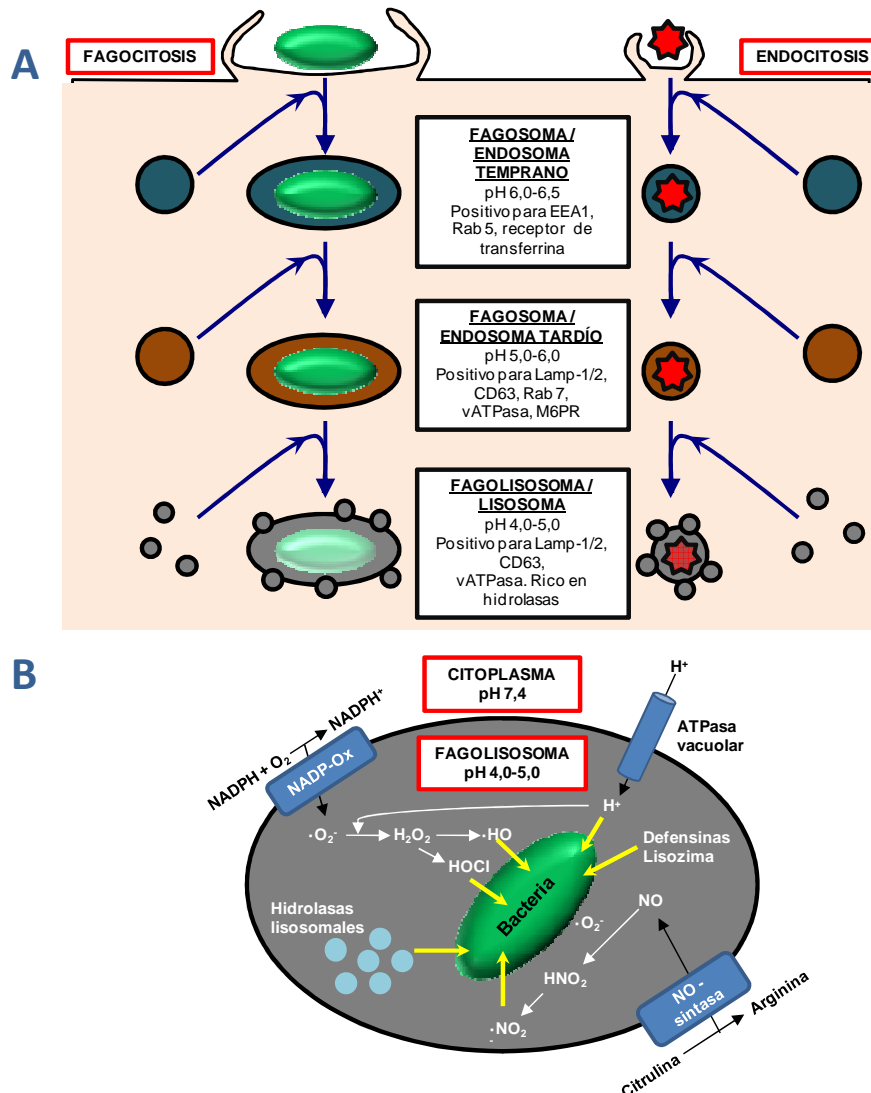
Fagocitosis (del griego *phagein*, 'comer' y *kytos*, 'célula') es un tipo de endocitosis por el cual algunas células rodean con su membrana citoplasmática partículas que pueden ser antígenos, células apoptóticas, restos celulares y microorganismos, y las ingieren. Existe un repertorio de tipos celulares que llevan a cabo procesos de fagocitosis. La eficiencia fagocítica varía en función del tipo celular. Así, los términos "fagocitos no

profesionales”, “fagocitos paraprofesionales” y “fagocitos profesionales” hacen referencia a una competencia fagocítica baja, media y alta, respectivamente (Rabinovitch *et al.*, 1995). Las células procedentes del linaje monocito/macrófago (macrófagos, células dendríticas) y los neutrófilos son los principales fagocitos profesionales en mamíferos. Los fagocitos profesionales son centinelas del sistema inmune que identifican y eliminan células senescentes, apoptóticas o defectivas, además de partículas y microorganismos extraños o potencialmente patógenos (Vieira *et al.*, 2002). El macrófago es un fagocito profesional derivado del promonocito de la médula ósea que, tras su diferenciación en monocito sanguíneo, se instala en los tejidos como macrófago maduro residente, donde constituye el sistema fagocítico mononuclear. A diferencia del neutrófilo circulante, el macrófago permanece reclutado localmente en los diferentes órganos. Así, el macrófago alveolar está confinado en el pulmón, encargado de patrullar los alveolos pulmonares (Roitt *et al.*, 2006).

La fagocitosis es un proceso que actúa a modo de cremallera, mediado por un receptor y dirigido por la polimerización/despolimerización del citoesqueleto de actina del fagocito (Griffin *et al.*, 1975). La fagocitosis llevada a cabo por macrófagos se inicia con el reconocimiento de la partícula a fagocitar por un receptor celular. Los receptores reconocen PAMPs, que son patrones moleculares expresados en la superficie de los patógenos, conservados y compartidos por un gran grupo de agentes infecciosos, y que se distinguen con claridad de los patrones propios del hospedador. Una vez los PAMPs son reconocidos, los receptores se unen directa o indirectamente (por medio de opsoninas) a la partícula a fagocitar. En mamíferos, las rutas de señalización implicadas en procesos fagocíticos mejor caracterizadas son las mediadas por los receptores FcγR y CR3, siendo ambos opsono-receptores que reconocen partículas recubiertas por las opsoninas IgG y C3bi, respectivamente (Groves *et al.*, 2008). Los mecanismos implicados en procesos fagocíticos de patógenos no opsonizados son menos conocidos. De forma general, los receptores que reconocen PAMPs se conocen como PRRs. Ejemplos de PRRs son: (i) los receptores de membrana tipo Toll (TLR, del inglés *toll like receptors*); (ii) las lectinas tipo C (dependientes de calcio), (iii) los receptores de manosa (RM), un subtipo de receptores de lectinas presentes en macrófagos y células dendríticas; (iv) los receptores depuradores (*scavenger receptors*); (v) los receptores citoplasmáticos dependientes de Nod (NLR, del inglés *nucleotide-binding domain leucine-rich-repeat-containing receptors*) (Flannagan *et al.*, 2009; Roitt *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2002). El reconocimiento de un PAMP por un PRR alerta a la célula de la existencia de partículas extrañas e inicia el proceso fagocítico. Así, el reconocimiento de PAMPs por los TLRs desencadena un conjunto de eventos de señalización que activan el factor de transcripción NF-κB, el cual se trasloca al núcleo y,

junto a los factores de transcripción reguladores de interferón (IFN), participa en la inducción de la fagocitosis y en la liberación de mediadores inflamatorios (Roitt *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2002). Ejemplos de mediadores inflamatorios son las citoquinas inflamatorias interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12 y el factor necrotizante tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estos factores inflamatorios solubles activan otras células a través de su unión a receptores específicos, amplificando la respuesta inmunitaria en el foco de infección.

Tras la unión de la partícula a fagocitar a su receptor en la superficie del macrófago, se produce una polimerización local transitoria del citoesqueleto de actina del fagocito. La reorganización local del citoesqueleto celular genera un sistema contráctil que extiende pseudópodos alrededor de la partícula a fagocitar a modo de cremallera, formando una copa fagocítica, hasta incluirla por completo en una vacuola llamada fagosoma (Vieira *et al.*, 2002; Flannagan *et al.*, 2009; Roitt *et al.*, 2006). El fagosoma sufre eventos de fisión y fusión con vesículas intracelulares que modifican la composición de su membrana. Los eventos de fusión de membranas durante la maduración fagocítica están dirigidos por GTPasas de la familia Rab. La sucesión de estos eventos en el interior del macrófago se denomina ruta fagolisosomal y tiene función antimicrobiana (Vieira *et al.*, 2002; Flannagan *et al.*, 2009). Durante el proceso de maduración del fagosoma (estadio inicial) a lisosoma (estadio final), el pH de su interior se acidifica hasta pH=5. Además, la fusión secuencial con vesículas subcelulares proporciona enzimas que generan un ambiente oxidante y moléculas antimicrobianas y proteolíticas (Vieira *et al.*, 2002; Flannagan *et al.*, 2009) (**Fig. 2**). La acidificación del lumen fagolisosomal se produce debido a la acción de la ATPasa vacuolar (vATPasa), que transloca protones al interior del fagolisosoma. Las enzimas nicotamin adenin dinucleótido sintasa (NADPH), que produce radicales superóxido, y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que produce óxido nítrico, generan potencial oxidante. En los últimos estadios del proceso de maduración, el fagosoma se fusiona con el lisosoma, dotándolo de hidrolasas (proteasas, DNasas, lipasas) que digieren el material fagocitado. Entre las proteasas lisosomales se encuentran varios tipos de catepsinas cisteína proteasas (catepsina C, B, H, L, K), y aspartato y zinc proteasas.



**Figura 2. Maduración del fagosoma/endosoma.** (A) Representación esquemática de las rutas fagocítica (izquierda) y endocítica (derecha). Los fagosomas/endosomas 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. EEA1, del inglés *Early Endosome Antigen 1*; M6PR, del inglés *mannose 6-phosphate receptor*; vATPasa, ATPasa vacuolar; Lamp, del inglés *Lysosomal associated marker protein*. (B) Maquinaria de degradación en el fagolisosoma. La bacteria atrapada en el compartimento fagolisosomal es atacada por especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, péptidos antimicrobianos, lisozima e hidrolasas, todo ello en un ambiente ácido.

Existe un conjunto de moléculas de la célula hospedadora que están implicadas en los estadios iniciales de la fagocitosis. Las balsas lipídicas de la membrana plasmática (*lipid rafts*), constituidas por esfingolípidos, colesterol y proteínas, son importantes en el inicio de la interacción bacteria-célula, si bien no se conoce su papel preciso en el proceso de infección bacteriana, ni si su papel es distinto en función del microorganismo (Lafont *et al.*, 2004). Por ejemplo, en macrófagos alveolares, el proceso de fagocitosis de *Pseudomonas aeruginosa* se inhibe bloqueando la síntesis de

colesterol (Kowalski *et al.*, 2004; Kannan *et al.*, 2006; Soong *et al.*, 2004; Zaas *et al.*, 2005). Las tirosina-quinasa de la familia *Src* juegan un papel importante en los primeros estadios de la fagocitosis, contribuyendo a los cambios en el grado de polimerización del citoesqueleto necesarios para la formación de la copa fagocítica e internalización de las partículas adheridas (Furumoto *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 1998). Los fosfoinosítidos de membrana también juegan un papel crucial en el proceso fagocítico. La fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K, de inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*) cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bi-fosfato (PI4,5P<sub>2</sub>) en fosfatidilinositol 3,4,5-tri-fosfato (PI3,4,5P<sub>3</sub>). PI3K es responsable del reclutamiento de la membrana en el lugar de formación de la copa fagocítica por medio de eventos de fusión de vesículas, asiste al cierre de la copa fagocítica para la formación del fagosoma (Marshall *et al.*, 2001), y es responsable de la reorganización de los filamentos de actina en la protrusión de la copa fagocítica. PI3K activa la proteína Akt o proteína quinasa B (PKB) (Kannan *et al.*, 2008), una serina/treonina quinasa que regula el metabolismo, supervivencia y proliferación celular. Estudios sobre el papel de Akt en fagocitosis, infecciones bacterianas intracelulares, tolerancia a lipopolisacárido (LPS) bacteriano, producción de citoquinas inflamatorias y migración celular durante la respuesta inmunitaria mediada por macrófagos, sugieren que esta proteína juega un papel esencial en la activación funcional de los macrófagos (Lee *et al.*, 2011).

En esta Tesis Doctoral, se han analizado las características de la infección del macrófago alveolar por el patógeno bacteriano *Haemophilus influenzae* no tipable.

## **2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TABACO EN EL TRACTO RESPIRATORIO HUMANO**

### **2.1. Características y composición de los cigarrillos comerciales y del humo de tabaco**

Un cigarrillo consiste en una mezcla de tabaco enrollado en papel, con una composición química específica. La mayoría de los cigarrillos tienen filtro y ventilación en el extremo. Ventilación en el extremo significa que la corriente de humo es diluida con una cantidad definida de aire durante la aspiración. La mezcla del tabaco, el papel del cigarrillo, el tipo y eficiencia del filtro, la intensidad de la aspiración, y el grado de

ventilación en el extremo del cigarrillo, determinan la composición química del humo de tabaco de cada cigarrillo. Cuando se consume un cigarrillo, se inhala una mezcla compleja de compuestos químicos que se dirigen al tracto respiratorio del fumador. Desde el momento del encendido del cigarrillo hasta la inspiración del humo se producen varios fenómenos físico-químicos encadenados y solapados que incluyen quemado, pirólisis, pirosíntesis, destilación, sublimación y condensación de las partículas del tabaco (Borgerding *et al.*, 2005). El humo de tabaco generado tras los procesos enumerados previamente es complejo, dinámico y reactivo, debido a sus propiedades físicas y químicas. Existen otras mezclas complejas similares al humo de tabaco como las producidas por la polución existente en el aire y las emisiones producidas por los motores diesel. El humo de tabaco es un aerosol que contiene microgotas en estado sólido/líquido que forman la fase particulada (alquitrán), contenida a su vez en una fase gaseosa. La corriente central de humo es el humo que sale del final del cigarrillo hacia el interior de la boca después de cada inspiración, y la corriente lateral de humo es el humo que sale del cigarrillo hacia el exterior desde el extremo distal del cigarrillo entre inspiraciones. Las corrientes central y lateral de humo tienen composiciones distintas. El humo de la corriente lateral sumado al humo exhalado (que ha sido filtrado por el aparato respiratorio), difunde hacia la atmósfera y se convierte en el humo de tabaco ambiental. Se han identificado aproximadamente 4.700 moléculas diferentes en el humo de tabaco, incluyendo gases neutros, agua, óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno, amidas, aminas, lactonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, N-nitrosaminas volátiles, carbohidratos, nitrilos, hidrocarburos, éteres, compuestos nitrogenados, metales, y radicales libres de vida corta y de vida larga. Las cantidades de estos compuestos en un cigarrillo oscilan entre mg (agua, monóxido de carbono, dióxido de carbono, nicotina) y pg (aminas heterocíclicas y metales pesados) (Borgerding *et al.*, 2005). La materia particulada inhalada al fumar un cigarrillo se deposita en el tracto respiratorio, depositándose las partículas de mayor tamaño en el tracto respiratorio superior y las más pequeñas en el tracto respiratorio inferior y en los espacios alveolares. La incapacidad para eliminar la materia particulada provoca la retención de partículas en los tejidos pulmonares, resultando en una inflamación crónica que juega un papel importante en la progresión irreversible de las enfermedades pulmonares crónicas asociadas al tabaquismo (Ling *et al.*, 2009).

Además de compuestos químicos, se ha documentado la presencia de microorganismos en los cigarrillos. Todos los tabacos comerciales se someten a un proceso de curado que facilita el crecimiento rápido de varios tipos de bacterias y hongos, lo que provoca una acumulación de toxinas microbianas. Se han encontrado bacterias mesofílicas en hojas de tabaco, tanto frescas como curadas. El

almacenamiento de cigarrillos en lugares con niveles altos de humedad resulta en un aumento de poblaciones fúngicas en el tabaco. Determinados hongos producen ergosterol (componente de su pared celular), lo que determina un aumento en la concentración de ergosterol en el humo del tabaco (Larsson *et al.*, 2008).

El estudio del metagenoma bacteriano presente en cigarrillos de varias marcas comerciales distintas ha revelado la existencia de al menos quince tipos de bacterias en los mismos, siendo varias de ellas potenciales patógenos (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Proteus* y *Staphylococcus*). Al fumar, se destruye el tabaco que forma parte de la columna del cigarrillo y, en principio, se eliminan los microorganismos que forman parte de éste durante el proceso de combustión. Sin embargo, las trazas de tabaco que se encuentran en la superficie del filtro escapan de la pirólisis y entran en la corriente principal de humo, lo que genera riesgo de infección por los patógenos presentes en el cigarrillo (Pauly *et al.*, 2010; Sapkota *et al.*, 2010). Se desconoce cuál es el riesgo de contraer una infección causada por los microorganismos que puedan ser inhalados con el humo de la corriente principal de un cigarrillo.

## 2.2. Efecto de la exposición al tabaco en el desarrollo de infecciones bacterianas

Existe una asociación entre la exposición continuada a humo de tabaco y cambios en la composición de la microbiota nasofaríngea. En fumadores, esta microbiota está formada por numerosos patógenos oportunistas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *M. catarrhalis* y *Streptococcus pyogenes*), a diferencia de la microbiota de individuos no fumadores, que contiene mayormente *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, *Peptostreptococcus spp* y *Prevotella spp* (Brook *et al.*, 2005). El cese del hábito tabáquico se correlaciona con una reversión hacia la microbiota predominante en no fumadores. Estas observaciones indican que el humo de tabaco favorece la colonización de la nasofaringe por microorganismos patógenos oportunistas y facilita el desarrollo de infecciones sintomáticas (Brook *et al.*, 2005).

La exposición a humo de tabaco eleva también la probabilidad de sufrir periodontitis (Bagaitkar *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2005; Zambon *et al.*, 1996; van der Weijden *et al.*, 2001), y favorece la colonización del espacio sublingual por los patógenos oportunistas causantes de periodontitis *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Fusobacterium nucleatum*



(Zambon *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 2001; Shchipkova *et al.*, 2010; van Winkelhoff *et al.*, 2001). El cese del hábito tabáquico está correlacionado con una disminución de la prevalencia de patógenos periodontales (Haffajee *et al.*, 2001; Delima *et al.*, 2010). Asimismo, el humo de tabaco aumenta la adhesión bacteriana a células epiteliales y promueve cambios en la virulencia bacteriana modificando la expresión génica (Bagaitkar *et al.*, 2010; Bagaitkar *et al.*, 2009; El Ahmer *et al.*, 1999). Así, al exponer *P. gingivalis* a humo de tabaco, se observa un incremento de la expresión de la proteína bacteriana formadora de fimbrias FimA, lo que favorece la formación de *biofilms* y la adhesión de este patógeno al epitelio respiratorio (Bagaitkar *et al.*, 2010).

El humo de tabaco causa cambios en la composición de la microbiota senonasal, provocando la formación de *biofilms* robustos y reversibles que se relacionan con la persistencia bacteriana en la cavidad nasal (Goldstein-Daruech *et al.*, 2011). La exposición a humo de tabaco se relaciona también con un aumento en la periodicidad y severidad de infecciones agudas causadas por patógenos bacterianos (Bagaitkar *et al.*, 2008; Aronson *et al.*, 1982). El humo de “segunda mano” al que se exponen los fumadores pasivos causa un elevado número de enfermedades en niños. El hábito tabáquico parental aumenta la carga de *S. pneumoniae* en niños, en particular de los serotipos no incluidos en la vacuna heptavalente (Greenberg *et al.*, 2006). El hábito tabáquico parental también aumenta el riesgo de meningitis causada por meningococo (Greenberg *et al.*, 2006; Iles *et al.*, 2001), otitis media (García-Rodríguez *et al.*, 2002) e infecciones del tracto respiratorio inferior en niños menores de dos años (Jones *et al.*, 2011).

El tabaquismo es también un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad del legionario o legionelosis (Marston *et al.*, 1994) y de la tuberculosis (Bates *et al.*, 2007). En enfermos de tuberculosis, el humo de tabaco genera pérdida de peso e incrementa la mortalidad. Esto sucede debido a la disminución de la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> frente a *Mycobacterium tuberculosis*, un factor crucial para la activación del macrófago dependiente de IFN- $\gamma$  y la posterior eliminación de *M. tuberculosis* intracelular (Feng *et al.*, 2011).

### **2.3. Enfermedades respiratorias asociadas al tabaquismo: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)**

El consumo de tabaco causa más del 90% de los casos de cáncer de pulmón y es un factor de riesgo importante en el desarrollo de angina de pecho e infarto de miocardio (Garmendia *et al.*, 2012). El consumo de tabaco es también un factor de

riesgo en el desarrollo de infecciones sistémicas e infecciones respiratorias en adultos y en niños, incluyendo el resfriado común, la gripe, la tuberculosis y la neumonía (Arcavi *et al.*, 2004). En este trabajo, destacamos de forma particular que el consumo de tabaco es el factor de riesgo principal en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC se caracteriza por la obstrucción irreversible y progresiva de los espacios de intercambio gaseoso que lleva asociada la pérdida/destrucción del tejido pulmonar (enfisema) y la remodelación del tejido pulmonar (fibrosis). Enfisema y fibrosis contribuyen a la pérdida progresiva de la función pulmonar, a la reducción de la calidad de vida del paciente y al aumento de la mortalidad (Taylor *et al.*, 2010; MacNee *et al.*, 2005). Las partículas y los gases nocivos presentes en el humo de tabaco provocan cambios en el sistema inmune del fumador que generan una inflamación pulmonar elevada y crónica. Esta condición inflamatoria crónica provoca a su vez otros cambios patológicos como son la bronquitis obstructiva crónica con fibrosis y consiguiente obstrucción de las vías aéreas menores, la generación de enfisema con destrucción del parénquima pulmonar, y la pérdida de elasticidad pulmonar (Barnes *et al.*, 2004; Cosío *et al.*, 2009). El humo de tabaco favorece también el desarrollo de infecciones pulmonares provocadas por bacterias y virus. Estos microorganismos, tanto individualmente como a través de co-infecciones, provocan un porcentaje alto (entorno al 65%) de las agudizaciones periódicas que sufren los enfermos EPOC. Estas agudizaciones frecuentes se denominan exacerbaciones (Celli *et al.*, 2007). Una exacerbación es un incremento agudo de los síntomas de la EPOC que requiere intervención médica. Las exacerbaciones son el principal factor de morbilidad y mortalidad de los pacientes EPOC. Asimismo, las agudizaciones periódicas sufridas por los enfermos EPOC generan un gasto elevado para los sistemas sanitarios nacionales, dado que conllevan la aplicación de tratamientos concretos y en ocasiones la hospitalización (Barnes *et al.*, 2007; Barnes *et al.*, 2009; Hansel *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la EPOC se realiza mediante espirometría, una prueba que mide la capacidad funcional pulmonar. El volumen espiratorio forzado ( $VEF_1$ , del inglés *FEV\_1 Forced Expiratory Volume*) es una medida obtenida por espirometría que equivale al volumen de aire exhalado del pulmón de manera forzada durante un segundo después de haber tomado aire al máximo. El resultado de  $FEV_1$  se expresa en porcentaje, y su valor en sujetos sanos equivale a un 75% de su capacidad vital pulmonar (FVC, del inglés *Forced Vital Capacity*). Los pacientes EPOC presentan un  $FEV_1$  post-broncodilatador  $< 80\%$  (excepto en el estadio GOLD 1) y una relación  $FEV_1/FVC < 0.7$ . La *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* ha categorizado los grados de la EPOC en: GOLD 1, leve ( $FEV_1/FVC < 0.7$ ;  $FEV_1 > 80\%$  predicho, con o sin síntomas crónicos); GOLD 2, moderada ( $FEV_1/FVC < 0.7$ ;  $50\% < FEV_1 < 80\%$  predicho, con o sin

síntomas crónicos como tos, expectoración, disnea); GOLD 3, severa ( $FEV_1/FVC < 0.7$ ;  $30\% < FEV_1 < 50\%$  predicho, con o sin síntomas crónicos); GOLD 4, muy severa ( $FEV_1/FVC < 0.7$ ;  $FEV_1 < 30\%$  predicho o  $FEV_1 < 50\%$  predicho más insuficiencia respiratoria crónica ( $PaO_2 < 60$  mm Hg).

En conjunto, los rasgos fisiopatológicos más relevantes asociados a la EPOC son la inflamación crónica, el enfisema, la fibrosis y las exacerbaciones frecuentes. Dado que las exacerbaciones son con frecuencia de origen microbiano, la identificación y caracterización de los microorganismos responsables de las mismas es esencial para el desarrollo de terapias adecuadas.

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con el patógeno respiratorio bacteriano *Haemophilus influenzae* no tipable, colonizador de las vías respiratorias bajas en pacientes EPOC y causa frecuente de las exacerbaciones sufridas por este tipo de pacientes.

## 2.4. Mecanismos moleculares y celulares asociados a la progresión de la EPOC

La EPOC es una enfermedad inflamatoria compleja en la que están involucrados varios tipos celulares y un elevado número de mediadores solubles (**Fig. 3**) (Barnes *et al.*, 2004; Barnes *et al.*, 2009). La progresión de la EPOC se asocia con la acumulación de exudados inflamatorios en el lumen pulmonar y la infiltración pulmonar de células del sistema inmune innato y adaptativo (Hogg *et al.*, 2004). El humo de tabaco es una agresión que, al entrar en el tracto respiratorio, causa efectos deletéreos sobre el sistema muco-ciliar; así, disminuye la frecuencia del batido ciliar, reduce el epitelio ciliado y aumenta el número de células globulares, provocando hipertrofia de la glándula submucosa y metaplasia de las células escamosas (Mehta *et al.*, 2008). El humo de tabaco daña las uniones entre las células epiteliales debido a la inhibición de la expresión de ocludina, ZO1 y claudina-1, lo que provoca una disminución de la resistencia transepitelial y un aumento de la permeabilidad epitelial en las vías respiratorias (Mauders *et al.*, 2007; Olivera *et al.*, 2007).

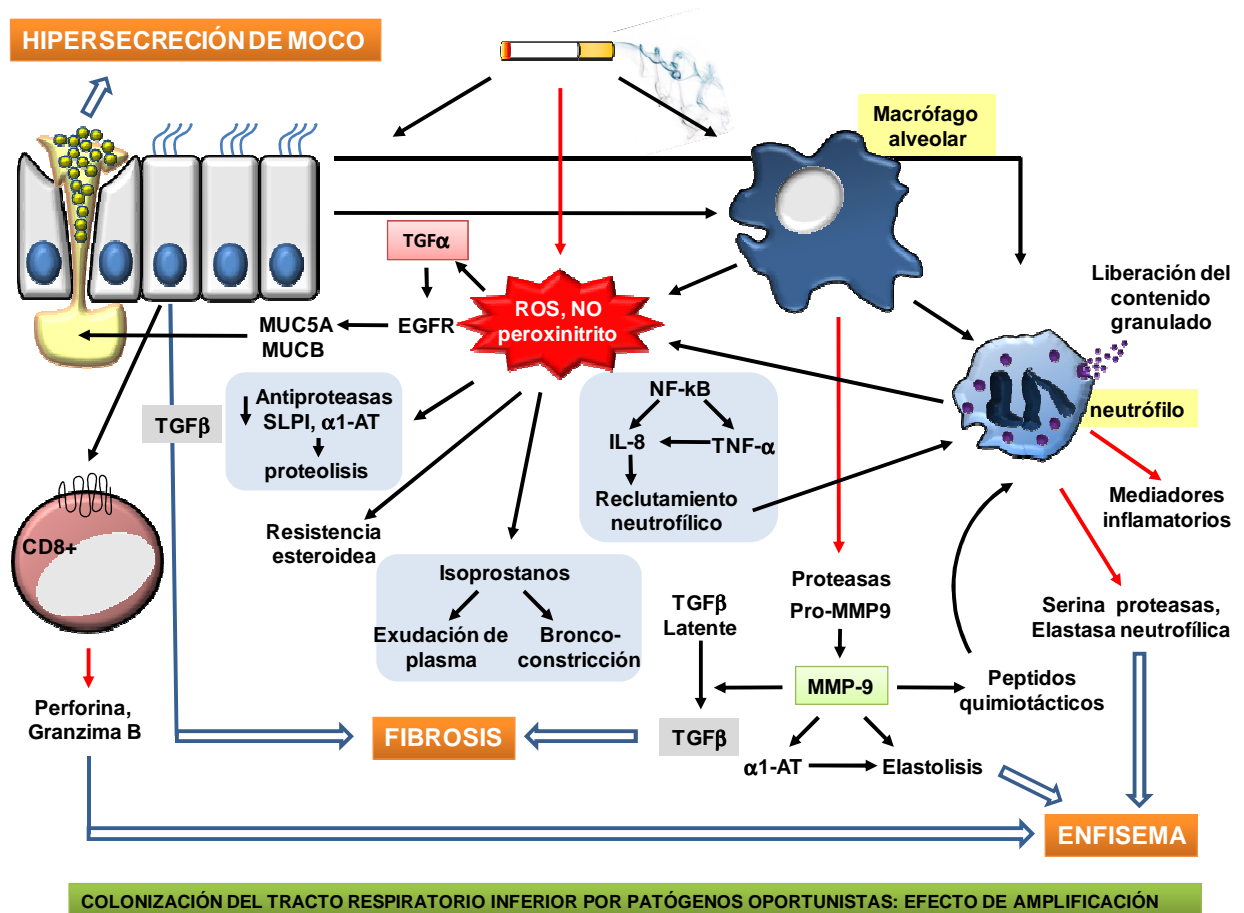
Por otra parte, el humo de tabaco activa la respuesta inflamatoria del epitelio respiratorio, lo que determina la producción y secreción de un repertorio de mediadores inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, IL-8, leucotrieno B<sub>4</sub>-LTB<sub>4</sub>) responsables de la activación y/o el reclutamiento de macrófagos alveolares y neutrófilos. En enfermos EPOC, se observa un aumento significativo del número total

de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T en el parénquima pulmonar y en las vías aéreas centrales y periféricas (Cosío *et al.*, 2009; Sopori *et al.*, 2002). Las células epiteliales de las vías aéreas de menor diámetro también secretan TGF- $\beta$ , que es un inductor de la fibrosis local (Barnes *et al.*, 2004). Las quimoquinas IP-10, Mig e I-TAC, producidas por las células del epitelio respiratorio y por los macrófagos alveolares, activan el receptor CXCR3 de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los cuales secretan perforinas y granzimas (Barnes *et al.*, 2004; Cosío *et al.*, 2009; Saetta *et al.*, 2002; Chrysofakis *et al.*, 2004). Perforinas y granzimas actúan como inductores de apoptosis sobre neumocitos tipo I, provocando enfisema pulmonar y liberación de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  amplifica la liberación de las quimoquinas iniciales. Los macrófagos alveolares, activados por el humo de tabaco y por el propio epitelio respiratorio, secretan un amplio repertorio de mediadores inflamatorios, varios de los cuales (IL-8, GRO- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, MCP-1) actúan como quimio-atrayentes de neutrófilos. Los macrófagos alveolares liberan también enzimas elastolíticas (que destruyen la elastina), metaloproteasas de matriz (MMPs del inglés matrix metaloproteases) y las cisteína proteasas catepsinas K, L y S. Estos enzimas elastolíticos activan el inductor de fibrosis TGF- $\beta$ . La MMP-9 causa también elastolisis mediante la inactivación de la anti-proteasa  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT), contribuyendo a provocar enfisema pulmonar al amplificar los efectos de la elastasa secretada por los neutrófilos (Barnes *et al.*, 2004). Finalmente, la exposición a humo de tabaco resulta en una disminución de la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares y en un incremento del estrés oxidativo (Fig. 3).

El análisis del impacto del humo de tabaco sobre la capacidad fagocítica del macrófago alveolar humano ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Esta parte del trabajo se presenta en el **Capítulo 1** de la sección de **Resultados**.

Las señales quimiotácticas asociadas a la EPOC que participan en el reclutamiento de neutrófilos son, entre otras, LTB<sub>4</sub>, IL-8 y quimoquinas CXC. Estos mediadores son producidos por los macrófagos alveolares y por las células epiteliales, y los neutrófilos por sí mismos son una fuente de IL-8. El humo de tabaco estimula la producción de granulocitos por los neutrófilos y la secreción del contenido de los mismos al medio. Los neutrófilos expuestos a humo de tabaco presentan un aumento del burso respiratorio y secretan serina proteasas (elastasa, catepsina G, proteinasa 3, MMP-8 y MMP-9) que contribuyen al enfisema pulmonar. El tripéptido prolina-glicina-prolina (PGP) y su forma acetilada (N- $\alpha$ -PGP) es un quimioatrayente específico de neutrófilos. El PGP se genera mediante reacciones enzimáticas catalizadas por MMP-8 y MMP-9 a partir de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno. El PGP estimula la quimiotaxis de los neutrófilos a través del receptor CXCR2. Los neutrófilos y las células epiteliales producen hidrolasa de leucotrieno A4 (LTA<sub>4</sub>H), una enzima que tiene una

función doble. Por una parte,  $LTA_4H$  genera  $LTB_4$ , mediador inflamatorio y quimioatrayente de neutrófilos. Por otra parte,  $LTA_4H$  presenta actividad aminopeptidasa e inactiva PGP, lo que favorece que la inflamación neutrofílica se resuelva una vez desaparece el patógeno causante de una infección respiratoria aguda. Sin embargo, el humo de tabaco inhibe la actividad aminopeptidasa de  $LTA_4H$  y estabiliza el PGP mediante acetilación, lo que potencia la migración de los neutrófilos al pulmón, provocando en último término una inflamación persistente (Snelgrove *et al.*, 2010). La exposición a humo de tabaco resulta también en una supresión de la actividad de la caspasa-3 neutrofílica, lo que provoca una disminución de la actividad fagocítica de los neutrófilos que son reclutados al pulmón en respuesta a la exposición continuada al humo de tabaco (Stringer *et al.*, 2007).



**Figura 3. Mecanismos moleculares implicados en la progresión de la EPOC.** Se muestran tres alteraciones características de la progresión de la EPOC: fibrosis, enfisema e hipersecreción de moco (paneles en naranja). Se indica la colonización/infección crónica de las vías respiratorias bajas por patógenos oportunistas, característica de la progresión de la EPOC (panel verde). La persistencia microbiana contribuye a la amplificación y progresión irreversible de la EPOC. Se muestran los tipos celulares respiratorios más relevantes implicados en el desarrollo de la EPOC: células epiteliales respiratorias, macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. El humo de tabaco activa las células epiteliales, que producen y secretan inductores de fibrosis local (TGF-β) y mediadores inflamatorios que activan y/o reclutan macrófagos alveolares y neutrófilos. Las quimoquinas producidas por células epiteliales y macrófagos alveolares activan los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que liberan perforinas y granzimas, implicadas en el desarrollo de enfisema. Los macrófagos alveolares secretan quimioatrayentes de neutrófilos y proteasas. La metaloproteasa de matriz MMP-9 activa el inductor de fibrosis TGF-β causando fibrosis, o causando inactivación de la anti-proteasa antitripsina-1, que facilita el desarrollo de enfisema. Los neutrófilos secretan proteasas, mediadores inflamatorios y el contenido de sus gránulos. Por otra parte, las vías aéreas del paciente EPOC presentan un elevado estrés oxidativo. El humo de tabaco *per se* contiene altos niveles de ROS, y los neutrófilos y macrófagos alveolares incrementan su burso respiratorio en respuesta a la presencia de humo de tabaco. En conjunto, los altos niveles de ROS y de especies reactivas de nitrógeno conllevan múltiples consecuencias: (i) disminución de los niveles anti-proteasas; (ii) activación de NF-κB y reclutamiento neutrofílico; (iii) resistencia a esteroides; (iv) aumento de la producción de isoprostanos; (v) hipersecreción de moco.

El estrés oxidativo es un desequilibrio que ocurre cuando existe un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) que no puede ser compensado por los mecanismos de defensa antioxidantes del hospedador. Los mecanismos antioxidantes son enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), y no enzimáticos (glutatión, ascorbato, ureato). El estrés oxidativo tiene múltiples efectos nocivos (daño en el ADN, proteínas y lípidos, distorsión de la señalización celular) y juega un papel crucial en la fisiopatología de la EPOC. El humo de tabaco presenta un alto contenido en radicales libres, se estima que la fase gaseosa del humo de un cigarrillo contiene  $10^{15}$  especies reactivas. Por otra parte, los macrófagos alveolares y los neutrófilos producen radicales libres en respuesta a la exposición a humo de tabaco. En conjunto, el exceso de ROS y el estrés oxidativo generado provocan efectos inflamatorios y daños en el hospedador que se resumen a continuación:

- (i) aumento de la actividad de proteasas y descenso de los niveles de las anti-proteasas  $\alpha$ 1-AT y SLPI. Las ROS inactivan las anti-proteasas; los neutrófilos y los macrófagos alveolares liberan enzimas proteolíticas que contribuyen a la destrucción de las anti-proteasas. En conjunto, se produce un desequilibrio del balance proteasa:anti-proteasa, favoreciendo un aumento de la actividad proteolítica, lo que provoca una degradación del tejido conectivo y de la elastina pulmonar, generando enfisema (Garmendia *et al.*, 2012).
- (ii) amplificación de la respuesta inflamatoria debido a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B dependiente de ROS, resultando en un aumento de la secreción de IL-8 y TNF- $\alpha$  por el epitelio respiratorio y los macrófagos alveolares, y posterior reclutamiento de neutrófilos (Garmendia *et al.*, 2012).
- (iii) resistencia a esteroides (los mecanismos moleculares subyacentes se detallan en el **apartado 3** de la sección Introducción) (Barnes *et al.*, 2004).
- (iv) aumento de la producción de isoprostanos. El estrés oxidativo provoca la oxidación del ácido araquidónico y la formación de un conjunto de mediadores prostanoides denominados isoprostanos que provocan broncoconstricción y exudación de plasma (Barnes *et al.*, 2004).
- (v) hipersecreción de moco. Las ROS activan la enzima TACE (enzima conversor de TNF- $\alpha$ ), producida por las células epiteliales de las vías aéreas e implicada

en la liberación del TGF- $\beta$ , lo que resulta en la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, que media la hipersecreción de moco a través de la sobreexpresión de los genes *muc5AC* y *mucB*, y de la diferenciación de las células secretoras de moco. De forma independiente, las ROS activan la quinasa JNK, que a su vez activa la expresión de *muc5AC* (Barnes *et al.*, 2004).

El humo de tabaco provoca un efecto deletéreo sobre la inmunidad adaptativa del hospedador, reduciendo los niveles séricos de inmunoglobulinas (Ferson *et al.*, 1979; González-Quintela *et al.*, 2008). En pacientes EPOC, se ha observado un aumento en el número total de linfocitos T en el parénquima pulmonar y en las vías respiratorias periféricas y centrales (Barnes *et al.*, 2004; Saetta *et al.*, 1999) y de células dendríticas maduras. Las células dendríticas de fumadores muestran un aumento en la expresión de CD80 y CD86 (Bratke *et al.*, 2008). Las células T, una vez activadas, acceden al parénquima pulmonar por medio de receptores de quimoquinas específicas de tejido (Cosío *et al.*, 2009). Las células T CD8<sup>+</sup> presentes en las vías aéreas periféricas de pacientes EPOC muestran un aumento en la expresión del receptor CXCR3 para las quimoquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Las células del epitelio bronquial, células de la musculatura lisa respiratoria y los macrófagos alveolares expresan los ligandos de CXCR3, lo que a su vez contribuye a la acumulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Barnes *et al.*, 2004; Saetta *et al.*, 2002). Las células T CD8<sup>+</sup> liberan perforinas y granzimas A y B, que provocan la muerte de las células epiteliales en los alveolos pulmonares (Cosío *et al.*, 2009; Chrysofakis *et al.*, 2004). De esta forma, la abundancia de células T CD8<sup>+</sup> en el pulmón de pacientes EPOC está correlacionada con el grado de obstrucción de las vías aéreas y con el desarrollo de enfisema.

Por otra parte, en las vías respiratorias y en el parénquima pulmonar de pacientes EPOC se encuentra un número elevado de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que expresan el factor activador de transcripción STAT-4, IFN- $\gamma$  y citoquinas de células T *helper* tipo 1. Estas moléculas quimioatrayentes promueven la migración transendotelial de las células inflamatorias hacia las vías aéreas, contribuyendo a la progresión de la EPOC (Cosío *et al.*, 2009). Sin embargo, existen evidencias que indican que el humo de tabaco suprime la respuesta inmune mediada por células T *helper* frente a infecciones por bacterias Gram negativas, al interferir en la señalización mediada por MyD88/IL-1, lo que provoca a su vez una reducción de la expresión de TLR4 inducida por LPS. Esta evidencia contribuye a explicar que los enfermos EPOC son altamente susceptibles a las infecciones bacterianas (Knobloch *et al.*, 2011).

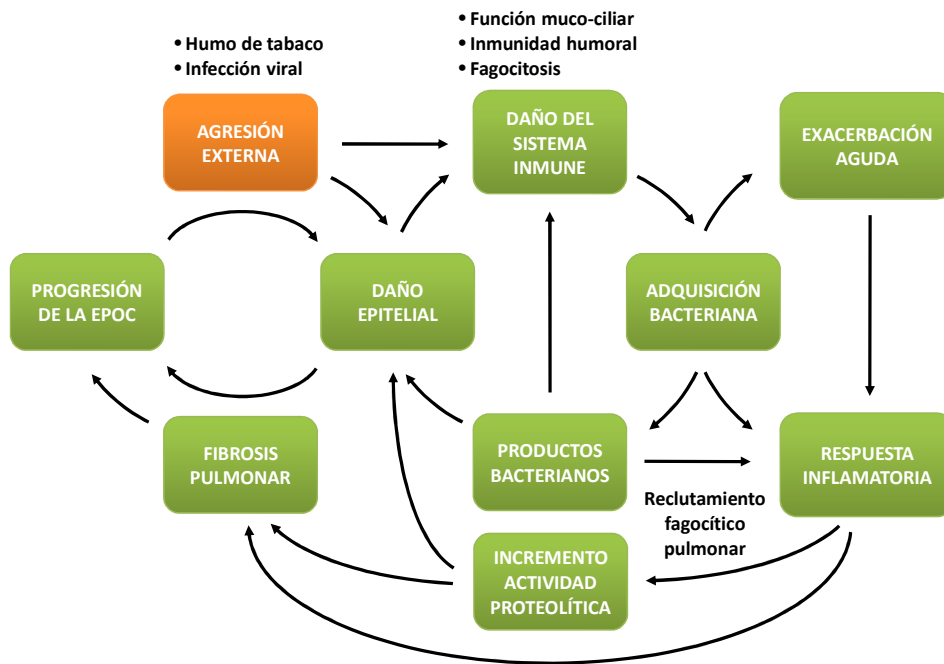


## 2.5. Relación entre exposición a tabaco, desarrollo de EPOC e infecciones bacterianas

### 2.5.1. La hipótesis del círculo vicioso

Junto a las modificaciones pato-fisiológicas descritas previamente, la exposición a humo de tabaco tiene como consecuencia adicional la colonización persistente/infección crónica de las vías respiratorias bajas por patógenos oportunistas. Esta infección crónica contribuye a la progresión de la EPOC al amplificar los procesos inflamatorios descritos en el **apartado 5 de la sección Introducción**). La “hipótesis del círculo vicioso” explica cómo la colonización bacteriana crónica de las vías respiratorias bajas en enfermos EPOC perpetúa dicha inflamación y contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad (**Fig. 4**) (Sethi *et al.*, 2000; Sethi *et al.*, 2009). El punto central de esta hipótesis es que, una vez el patógeno alcanza las vías respiratorias bajas de individuos con el sistema muco-ciliar dañado por la exposición a humo de tabaco, persiste y contribuye de forma activa e indefinida a amplificar el efecto deletéreo del humo de tabaco sobre el sistema respiratorio (Sethi *et al.*, 2000; Sethi *et al.*, 2009).

El humo de tabaco y la progresión de la EPOC dañan la inmunidad de la mucosa respiratoria. El humo de tabaco produce hipersecreción mucosa, daña las propiedades elásticas del epitelio pulmonar, los neutrófilos producen proteasas que degradan IgA, disminuyen los niveles de SP-A y SP-D, y disminuye la capacidad fagocítica de los fagocitos profesionales (Barnes *et al.*, 2004). Estas alteraciones favorecen la llegada de microorganismos a las vías respiratorias bajas de forma continua e indefinida, facilitando la colonización bacteriana de este nicho y la amplificación de la respuesta inflamatoria debido al reconocimiento constante de PAMPs presentes en dichos microorganismos. Del mismo modo, los productos bacterianos (material secretado o material liberado al medio) contribuyen a la respuesta inflamatoria y consiguiente activación y/o reclutamiento de fagocitos profesionales, que amplifican el daño epitelial ya producido por la exposición a humo de tabaco. La amplificación del daño pulmonar favorece a su vez el acceso ininterrumpido de nuevos patógenos al pulmón. Por tanto, la infección crónica contribuye al deterioro del aparato respiratorio, al mal funcionamiento de la inmunidad del individuo y al acceso de microorganismos al tracto respiratorio inferior en un bucle sin fin denominado “círculo vicioso”. Este “círculo vicioso” amplifica indefinidamente la infección crónica y contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad respiratoria (Sethi *et al.*, 2009).



**Figura 4. Hipótesis del círculo vicioso en la progresión de la EPOC.** La exposición a humo de tabaco es una agresión que altera el funcionamiento de la inmunidad respiratoria, favoreciendo la colonización del tracto respiratorio inferior por microorganismos patógenos. Esta colonización es el punto de partida de una secuencia cíclica de eventos que se repite de forma indefinida, y que contribuye a producir niveles de inflamación crónica elevados, daño tisular, fibrosis, e infección bacteriana persistente del tracto respiratorio inferior. La repetición cíclica de estos procesos contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad respiratoria crónica.

Junto al deterioro progresivo de la función pulmonar, los pacientes EPOC sufren episodios periódicos de exacerbación. La exacerbación recurrente (paciente exacerbador frecuente) precipita el deterioro de las condiciones de vida del enfermo, aumenta la tasa de mortalidad y los costes para los sistemas nacionales de salud. Un porcentaje elevado de las exacerbaciones de enfermos EPOC son de origen microbiano. Los microorganismos más frecuentemente aislados del tracto respiratorio inferior de enfermos EPOC son *Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT), *M. catharralis*, *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

### 2.5.2. Relación entre EPOC e infecciones bacterianas

La neumonía adquirida en la comunidad (CAP, del inglés *community acquired pneumoniae*) es una causa importante de hospitalización y muerte. *S. pneumoniae* es el patógeno más comúnmente aislado de pacientes que sufren CAP (Kadioglu *et al.*, 2008). El hábito tabáquico es un factor de riesgo importante en el desarrollo de

neumonía pneumocócica en enfermos EPOC (Almirall *et al.*, 1999; Almirall *et al.*, 1999), y en el desarrollo de enfermedad invasiva por *S. pneumoniae* (Nuorti *et al.*, 2000). La exposición a humo de tabaco exacerba la discapacidad del sistema muco-ciliar para eliminar *S. pneumoniae* (Vander Top *et al.*, 2005), y previene su fagocitosis mediada por complemento por parte de los macrófagos alveolares, disminuyendo la eliminación de este patógeno bacteriano del pulmón (Phipps *et al.*, 2010).

*H. influenzae* está dotado de elementos que facilitan su evasión del sistema inmune y su co-existencia con otras bacterias de la misma especie o de especies distintas como *Staphylococcus aureus* y *S. pneumoniae* (Margolis *et al.*, 2010). La presencia simultánea de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* en el tracto respiratorio superior provoca una inflamación sinérgica que resulta en el reclutamiento neutrofílico a la mucosa respiratoria (Ratner *et al.*, 2005). El reclutamiento de neutrófilos provoca la muerte selectiva de *S. pneumoniae* opsonizado. El peptidoglicano de *H. influenzae* actúa como estímulo que induce la eliminación de *S. pneumoniae* por neutrófilos y el sistema del complemento en un proceso dependiente de Nod-1 (Lysenko *et al.*, 2007; Lysenko *et al.*, 2005). Por otra parte, la co-colonización con *H. influenzae* favorece la selección de los serotipos capsulados de *S. pneumoniae* resistentes a opsono-fagocitosis, que pueden ser más virulentas y provocar infección invasiva (Lysenko *et al.*, 2010). Asimismo, la utilización de un modelo de otitis media *in vivo* sugiere que HiNT proporciona a *S. pneumoniae* protección pasiva frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos a través de dos mecanismos, la producción de  $\beta$ -lactamasas y la formación de *biofilms* robustos de ambas comunidades bacterianas (Kristin *et al.*, 2011).

*M. catarrhalis* es responsable del 10% de las exacerbaciones sufridas por pacientes EPOC y coloniza las vías respiratorias bajas de pacientes EPOC en fase estable. El análisis de parámetros inflamatorios en muestras de esputo de enfermos EPOC indica un incremento de los niveles de IL-8, TNF- $\alpha$  y elastasa neutrofílica tras la infección por *M. catarrhalis* (Phipps *et al.*, 2010). Existen células Th1 específicas para *M. catarrhalis* en lavados broncoalveolares (BALs, del inglés *bronchoalveolar lavage*) de enfermos EPOC infectados por *M. catarrhalis* (Amedei A *et al.*, 2009). El humo de tabaco disminuye la expresión del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina 2 humana (hBD2) inducida por *M. catarrhalis*, lo que favorece el incremento de la carga bacteriana bronquial en individuos fumadores (Zhang *et al.*, 2011).

*P. aeruginosa* es aislado con frecuencia en muestras de pacientes que sufren neumonía (Williams *et al.*, 2010). La exposición a humo de tabaco aumenta la inflamación del hospedador y disminuye la tasa de eliminación de *P. aeruginosa* (Drannik *et al.*, 2004). El humo de tabaco disminuye la expresión del gen CFTR (CFTR,

del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), lo que contribuye al aumento de la susceptibilidad a *P. aeruginosa* (Cantin *et al.*, 2006). Estudios epidemiológicos apuntan que los pulmones de enfermos EPOC están infectados con frecuencia de forma crónica con un único clon de *P. aeruginosa*, sin evidencias de transmisión entre pacientes. Durante la infección crónica de pacientes EPOC, los clones de *P. aeruginosa* presentan un incremento de la frecuencia de mutación, de la resistencia antibiótica y una reducción de la producción de proteasas, co-existiendo diferentes morfotipos, con patrones de infección y evolución que se asemejan a los observados en pacientes de fibrosis quística (Martínez-Solano *et al.*, 2008).

*Mycoplasma pneumoniae* es un patógeno común en enfermos EPOC (Varma-Basil *et al.*, 2009). La exposición a humo de tabaco provoca niveles elevados de glutatión (GSH) y glutatión reductasa (GR) en el pulmón para mantener el potencial redox. La infección por *M. pneumoniae* interfiere sobre esta respuesta adaptativa del pulmón causando estrés oxidativo, lo que puede favorecer la progresión de la EPOC (Kariya *et al.*, 2008).

### 2.5.3. Infección del paciente EPOC por *Haemophilus influenzae* no tipable

*Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT) es un patógeno oportunista que coloniza de forma asintomática el tracto respiratorio superior de individuos sanos e infecta de forma persistente el tracto respiratorio inferior de pacientes respiratorios crónicos. HiNT es el microorganismo más frecuentemente aislado en las vías respiratorias bajas de pacientes EPOC y es responsable de un porcentaje significativo de las exacerbaciones de naturaleza microbiana sufridas por este tipo de paciente (Sethi *et al.*, 2002; Sethi *et al.*, 2008). Se aporta información detallada acerca de la microbiología, genética, patogénesis y bases moleculares de la infección por HiNT en el **apartado 4** de la sección Introducción.

La colonización bronquial en enfermos EPOC ha sido analizada en varios estudios (Marin *et al.*, 2010; Erb-Downward *et al.*, 2011). El análisis de poblaciones bacterianas en muestras de esputo expectorado o broncoscopias del tracto respiratorio inferior de pacientes EPOC muestra colonización simultánea por múltiples cepas de HiNT con diferentes susceptibilidades antibióticas (Murphy *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado la colonización persistente de pacientes EPOC con cepas de HiNT isogénicas en visitas clínicas consecutivas (Murphy *et al.*, 2004). Si bien estas cepas colonizadoras provocan una respuesta inflamatoria en el hospedador, esta respuesta no es efectiva en la eliminación del patógeno, dado que la colonización es crónica y no es erradicada

(Murphy *et al.*, 2004).

Las cepas de HiNT aisladas en las exacerbaciones de EPOC son con frecuencia cepas de nueva adquisición, diferentes a las cepas que colonizan al paciente de forma persistente (Sethi *et al.*, 2002). Las cepas de HiNT de “nueva entrada” inducen mayor inflamación de las vías aéreas y se adhieren mejor al epitelio respiratorio que las cepas colonizadoras (Bresser *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 2005; Look *et al.*, 2006). Además, cepas de HiNT aisladas del tracto respiratorio inferior, relacionadas con exacerbaciones de EPOC, muestran una resistencia al efecto bactericida del sistema de complemento presente en el suero humano mayor que cepas aisladas de portadores sanos. Esta observación ha sido asociada al aumento de expresión de los genes *vacJ* e *yrb* en cepas aisladas de pacientes EPOC, lo que contribuye a minimizar el reconocimiento de la bacteria por los anticuerpos anti-oligosacárido bacteriano presentes en el suero (Nakamura *et al.*, 2011). Estas evidencias sugieren la adaptación de HiNT a ambientes en los que se desarrollan procesos inflamatorios con un contenido alto de componentes del sistema de complemento.

Los pacientes EPOC producen anticuerpos frente a epítomos específicos expuestos en la superficie de cada cepa de HiNT de nueva adquisición tras una exacerbación. Esta respuesta adaptativa genera una respuesta inmunológica específica que protege contra exacerbaciones recurrentes causadas por cepas homólogas, no contra exacerbaciones causadas por cepas heterólogas antigénicamente distintas. La respuesta inmunológica cepa-específica favorece por tanto las exacerbaciones provocadas por cepas de nueva adquisición (Sethi *et al.*, 2004).

### **3. IMPACTO DE LA TERAPIA ANTI-INFLAMATORIA EN LA INFECCIÓN RESPIRATORIA POR PATÓGENOS BACTERIANOS**

Los tratamientos administrados a pacientes EPOC son generalmente paliativos, e incluyen terapia con oxígeno, broncodilatadores, agentes mucolíticos y antibióticos. La inflamación es uno de los principales problemas de esta enfermedad, por lo que el control de la inflamación, tanto crónica como aguda asociada a exacerbación, es prioritario en el tratamiento de la EPOC. El uso de agentes anti-inflamatorios en enfermos de EPOC es habitual, siendo el tratamiento con corticosteroides una práctica ampliamente extendida (Barnes *et al.*, 2006; Barnes *et al.*, 2005).

En enfermos EPOC, la inflamación pulmonar se asocia con fibrosis, pérdida irreversible

de los espacios aéreos pequeños, destrucción del parénquima pulmonar y enfisema. Estos cambios resultan en el bloqueo y cierre de las vías aéreas menores, lo que genera episodios de disnea e incapacidad para el ejercicio físico. Este patrón inflamatorio se puede observar también en fumadores con función pulmonar normal, pero la intensidad de la inflamación aumenta significativamente en enfermos EPOC. La inflamación crónica se asocia con el aumento de la expresión de genes inflamatorios, muchos de ellos regulados positivamente por NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B es a su vez activado por el humo de tabaco en las células del pulmón de enfermos EPOC, en particular en los macrófagos alveolares (**Fig. 5**) (Yao *et al.*, 2010; Barnes *et al.*, 2006). Además, la expresión génica se activa por acetilación del núcleo de las histonas, proceso llevado a cabo por co-activadores con actividad histona acetiltransferasa (HAT). La acetilación de histonas abre la estructura de la cromatina permitiendo la entrada de los factores de transcripción, la unión de la ARN polimerasa al ADN, y el inicio de la transcripción. En enfermos EPOC, se observa un aumento de la acetilación de histonas asociadas a las regiones promotoras de genes inflamatorios activados por NF- $\kappa$ B, y el nivel de acetilación aumenta con la severidad de la enfermedad. Por tanto, el humo de tabaco contribuye a la expresión de genes inflamatorios tanto a través de la activación de NF- $\kappa$ B como a través de la acetilación de histonas. Por otra parte, la exposición a humo de tabaco activa y trasloca PKC $\zeta$  al núcleo celular donde tiene un papel doble. Por una parte, fosforila la subunidad RelA/p65 de NF- $\kappa$ B en la serina 311, incrementando la transactivación de NF- $\kappa$ B; por otra parte, funciona como un regulador, facilitando el ensamblaje de RelA/p65 con su co-activador, lo que aumenta la acetilación de RelA/p65 y de las histonas asociadas a la región promotora de los genes inflamatorios (Yao *et al.*, 2010). El aumento de la acetilación y expresión de genes inflamatorios no es debido directamente a un aumento de la actividad HAT, sino a una reducción de la expresión de histona deacetilasas selectivas (HDAC, HDAC-2 en particular), enzimas que revierten la acetilación de las histonas. La reducción de los niveles de HDAC se asocia al estrés oxidativo causado por el tabaquismo y la EPOC. El estrés oxidativo favorece la formación de peroxinitrito, que nitrifica residuos tirosina en HDAC-2, provocando su ubiquitinación y degradación proteosómica. Este conjunto de eventos resulta en niveles bajos de HDAC-2 en los pulmones de pacientes con EPOC severa (Barnes *et al.*, 2006).

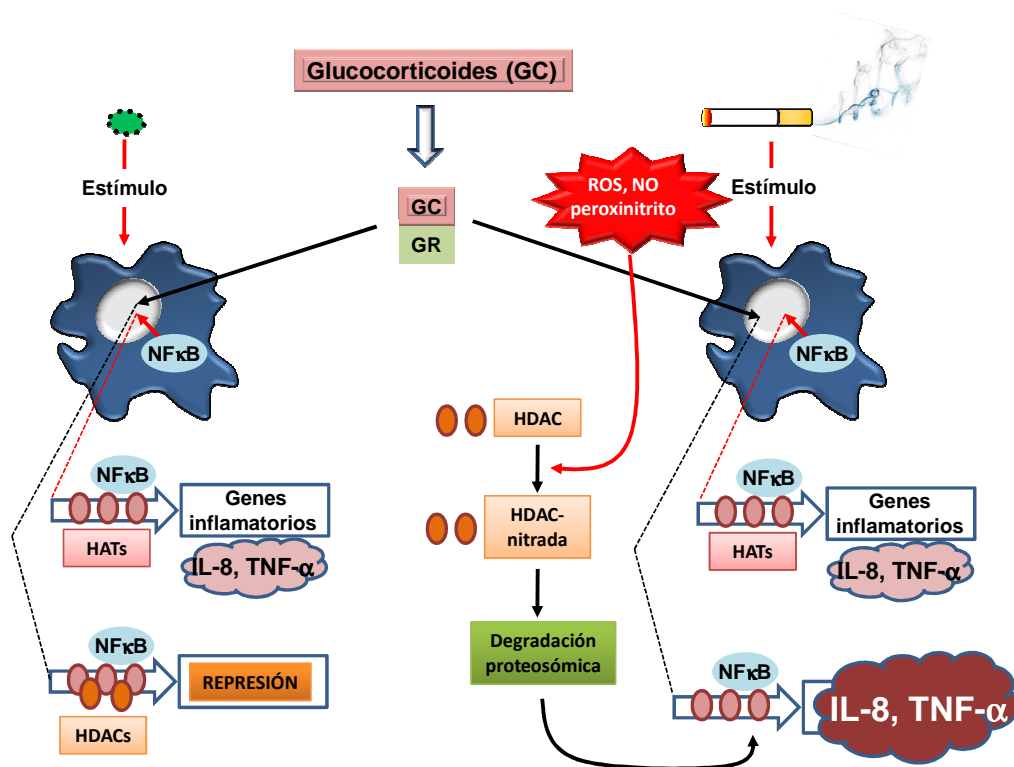
La reducción de los niveles de HDAC-2 tiene una connotación terapéutica importante, que es la disminución de la respuesta a los corticosteroides. Los corticosteroides se unen a los receptores de corticoesteroides (GR, del inglés *glucocorticoid receptors*) y los activan, lo que provoca el reclutamiento de HDAC-2 a genes inflamatorios activados, y la reversión de la acetilación de las histonas asociadas a estos genes, con lo que disminuye su transcripción, determinando una reducción de la respuesta

inflamatoria del hospedador. En conjunto, el efecto deletéreo del estrés oxidativo provocado por el tabaco sobre las HDAC amplifica la transcripción de genes inflamatorios al favorecer su acetilación y provocar una insensibilización a los corticoides. De hecho, las evidencias clínicas indican que los corticosteroides confieren un beneficio clínico reducido en pacientes EPOC, no contribuyen a reducir significativamente la progresión de la enfermedad, y la administración de corticoides inhalados a enfermos EPOC aumenta el riesgo de hospitalización por neumonía (Barnes *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2010).

El tracto respiratorio de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas que reciben terapia anti-inflamatoria está frecuentemente colonizado por patógenos oportunistas. Por ello, el efecto de los corticoides en la dinámica de interacción patógeno-hospedador debe ser considerado, porque el bloqueo exógeno/terapéutico de la respuesta inflamatoria que el hospedador orchestra para combatir una infección puede resultar en último término perjudicial para el propio hospedador. Si bien el tratamiento de células en cultivo con glucocorticoides (dexametasona) reduce la inflamación en infecciones por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *Aspergillus fumigatus*, varios estudios independientes han descrito efectos adversos de la terapia esteroidea en el curso de infecciones. Así, el tratamiento con dexametasona disminuye la eliminación de la infección por *P. aeruginosa* mediante la supresión de la expresión de iNOS y la producción de peroxinitrito (Bellanger *et al.*, 2009; Mogensen *et al.*, 2008; Skornik *et al.*, 1974; Satoh *et al.*, 2001).

La dexametasona atenúa la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B inducida por HiNT, y al mismo tiempo aumenta la expresión de TLR2 inducida por HiNT mediante la regulación positiva de la fosfatasa MKP-1, que defosforila e inactiva la quinasa MAP p38. El tratamiento con glucocorticoides también bloquea la expresión de *muc5A* inducida por HiNT, a través de la inhibición de MAPK p38 dependiente de MKP-1 (Imasato *et al.*, 2002; Komatsu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2003; Shuto *et al.*, 2002).

En este trabajo, se ha analizado el impacto de la terapia corticoide en la capacidad del macrófago alveolar para fagocitar el patógeno oportunista HiNT.



**Figura 5. Humo de tabaco e insensibilidad a corticoides.** La exposición a humo de tabaco provoca una disminución de los niveles de histona deacetilasa (HDAC), lo que causa amplificación de la respuesta inflamatoria (derecha) e insensibilidad al efecto anti-inflamatorio de los corticoides (izquierda). El humo de tabaco activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (derecha). La expresión génica se activa por medio de la acetilación nuclear de histonas mediada por el enzima histona acetiltransferasa (HAT). En macrófagos alveolares de pacientes EPOC, los niveles de acetilación de histonas en promotores de genes inflamatorios cuya expresión es activada por NF- $\kappa$ B aumenta. El aumento del nivel de acetilación está relacionado con la reducción de HDAC provocada por el humo de tabaco. En condiciones normales, HDAC revierte la acetilación y apaga la transcripción génica, contribuyendo a mantener bajos los niveles de expresión de genes inflamatorios. Sin embargo, HDAC se inactiva debido al estrés oxidativo característico de la exposición a humo de tabaco. El estrés oxidativo promueve la formación de peroxinitrito, que nitrosila HDAC, promoviendo su degradación, lo que en último término resulta en una disminución de los niveles de HDAC y, en consecuencia, en una amplificación de la respuesta inflamatoria. Además, la reducción de HDAC inducida por el estrés oxidativo causado por el humo de tabaco provoca una disminución de la respuesta a corticoides. Los glucocorticoides (GC) se unen al receptor de glucocorticoides (GR) y reclutan HDAC, que contribuye a revertir la acetilación de genes inflamatorios. Por tanto, la transcripción de estos genes y la consiguiente inflamación se reducen (izquierda). La disminución de los niveles de HDAC debido a la exposición a humo de tabaco limita su reclutamiento y por tanto, disminuye la reducción de inflamación provocada por la exposición a GC. En conjunto, la exposición a humo de tabaco estimula la inflamación y limita la actividad de los GCs, amplificando en último término la respuesta inflamatoria.



## 4. *Haemophilus influenzae* NO TIPABLE COMO PATÓGENO OPORTUNISTA DEL TRACTO RESPIRATORIO HUMANO

### 4.1. Características generales de *H. influenzae*

*Haemophilus*: del griego *haima* (sangre); del griego *philos* (amante). *Haemophilus*: amante de la sangre. *Influenzae*: del italiano *influenza*: gripe.

*H. influenzae* fue descrito por primera vez en 1892 tras ser aislado en individuos enfermos durante una pandemia de gripe (Kilian *et al.*, 2005). *H. influenzae* pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae*, género *Haemophilus*. Es un cocobacilo (0,3-0,5  $\mu\text{m}$   $\times$  0,5-3,0  $\mu\text{m}$ ) pleomórfico, Gram negativo y anaeróbico facultativo. Como todos los miembros del género, *H. influenzae* requiere factores de crecimiento presentes en la sangre, en concreto una fuente de grupos hemo (factor X) y nicotinamida adenina dinucleótido, NAD (factor V). La definición del género *Haemophilus* a través del requerimiento de estos factores de crecimiento contrasta con la filogenia en base a criterios de similitud genética. Estudios basados en hibridaciones ADN-ADN y en la similitud de los genes *infB* y el gen que codifica ARNr 16S sugieren que el género *Haemophilus sensu stricto* debería estar formado por las especies *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus* y *H. pittmaniae*. Sin embargo, especies como *H. parahaemolyticus*, *H. parasuis* o *H. felis* son más cercanas genéticamente a otros géneros de la familia *Pasteurellaceae* (Korczak *et al.*, 2008).

La caracterización bioquímica de *H. influenzae* se resume en la **Tabla 1**. Las cepas de *H. influenzae* se clasifican en siete biovares en base a tres características bioquímicas: producción de indol, actividad ureasa y actividad ornitina decarboxilasa.

**Tabla 1:** Caracterización bioquímica de *H. influenzae*.

Producción de gas a partir de D-Glucosa	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	*	*	*	
Catalasa	+																				
Oxidasa	+																				
Hemolisis	-																				
Reducción de nitratos	+																				
Reducción de nitritos	-																				
$\alpha$ -Galactosidasa	-																				
$\beta$ -Galactosidasa	-																				
$\alpha$ -Glucosidasa	-																				
$\beta$ -Glucosidasa	-																				
$\alpha$ -Manosidasa	-																				
$\beta$ -Xilosidasa	-																				
$\alpha$ -Fucosidasa	-																				
Fosfatasa alcalina	+																				
Requerimiento factor V	+																				
Requerimiento factor X	+																				
Arginina dihidrolasa	-																				
Producción de indol	*																				
Ureasa	*																				
Ornitina decarboxilasa	*																				
Producción de ácido a partir de																					
D-Glucosa	+																				
D-Fructosa	-																				
Sacarosa	-																				
Lactosa	-																				
D-xilosa	+																				
D-ribosa	+																				
D-manosa	-																				
D-manitol	-																				
D-sorbitol	-																				
L-Arabinosa	-																				
L-Ramnosa	-																				
D-Galactosa	+																				
Sorbosa	-																				
Inulin	-																				
Maltosa	+																				
Glicerol	-																				
Inositol	-																				
Xilitol	-																				
Dulcitol	-																				

* Biovares de <i>H. influenzae</i>							
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Indol	+	+	-	-	+	-	+
Ureasa	+	+	+	+	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	+	-	-	+	+	+	-

Adaptado de Kilian (2005)

*H. influenzae* crece a 37°C en los medios Agar-chocolate e Infusión de Cerebro y Corazón (Brain Heart Infusion, BHI) suplementado con hemina y  $\beta$ -NAD. (sBHI) en condiciones aeróbicas con una elevada tensión de CO<sub>2</sub>. El crecimiento en placas de Agar-chocolate genera colonias lisas, bajas, convexas, grisáceas y translúcidas. Tras 24 h de incubación, las colonias de cepas no capsuladas presentan un diámetro de 0,5 a 1,0 mm. Las colonias de cepas capsuladas presentan un diámetro de 1-3 mm y un aspecto mucoide (Kilian *et al.*, 2005; Poje *et al.*, 2003). Se han identificado seis serotipos capsulares (a-f) (Pittman *et al.*, 1931). Las cepas no capsuladas se denominan *H. influenzae* no tipables (HiNT) e incluyen la mayoría de cepas de *H. influenzae*. La mayor parte de las cepas no capsuladas pertenecen a los biovares II y III, mientras que la mayoría de las cepas con cápsula de serotipo b pertenecen al biovar I (Kilian *et al.*, 2005). Las cepas capsuladas presentan poca diversidad genética y se organizan en dos divisiones filogenéticas homogéneas. La estructura de la población de HiNT es diversa y heterogénea. Mediante el análisis del locus *capB*, implicado en la síntesis de cápsula, se observó que una minoría de cepas no tipables contiene este locus, sugiriendo un ancestro capsulado. Sin embargo, la mayoría de cepas no tipables no tienen ancestros capsulados como progenitores (Kilian *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 1999).

*H. influenzae* forma parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior humano, en la oro- y nasofaringe. Se transmite por inhalación a través de aerosoles o contacto directo con las secreciones respiratorias. *H. influenzae* es aislado en un 40-80% de los individuos sanos, con mayor frecuencia en niños que en adultos. Un

individuo está colonizado simultáneamente por cepas distintas de *H. influenzae* que cambian a lo largo de su vida. La proporción de cepas capsuladas en la microbiota normal es baja (2-7% de todas las cepas de *H. influenzae*). Los factores que determinan la tasa de colonización son, entre otros, la edad, la época del año, la dieta, la posición al dormir y la situación socio-económica. En niños, la asistencia a una guardería y el número de hermanos condicionan la tasa de renovación de cepas. En adultos, la presencia de niños en el hogar, el tabaquismo y la obesidad condicionan los niveles de colonización por HiNT (García-Rodríguez *et al.*, 2002). En determinadas circunstancias, *H. influenzae* es un patógeno oportunista, agente causal de un conjunto de infecciones agudas respiratorias y no respiratorias, y de infecciones crónicas del tracto respiratorio inferior (Kilian *et al.*, 2005; Mukundan *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 1999) (**Tabla 2, apartado 4.3** de la sección de Introducción).

### 4.2. Variabilidad genética de *H. influenzae*

El tamaño del genoma de *H. influenzae* es aproximadamente 1,8 Mb. La cepa *H. influenzae* Rd KW20 (variante de una cepa capsulada serotipo d, carente de cápsula, no patógena) es el primer organismo vivo cuyo genoma completo fue secuenciado y en el que se anotaron 1.743 genes (Fleischmann *et al.*, 1995). Desde entonces, se han realizado análisis de diversidad genética de *H. influenzae* mediante electroforesis por campo pulsado, ribotipado o tipado de secuencias multilocus. Estos análisis indican la existencia de una gran diversidad genética entre cepas, mayor en cepas no tipables (Gilsdorf *et al.*, 2004). Actualmente, se ha secuenciado el genoma completo de 13 cepas de *H. influenzae* (12 no tipables y *H. influenzae* Rd KW20) y se ha observado que sólo el 50% de los genes están presentes en todas ellas (Hogg *et al.*, 2007). La diversidad genética observada entre aislados de *H. influenzae* se debe a un conjunto de razones:

(i) *H. influenzae* es una bacteria competente natural. Tiene capacidad de captar ADN lineal del medio extracelular que puede recombinar e integrarse en su genoma. La competencia natural de *H. influenzae* se induce en ausencia de fuentes de carbono y energía, lo que provoca un aumento de los niveles de AMPc citosólico. El AMPc actúa como cofactor de la proteína Crp (del inglés *cAMP receptor protein*). Crp activa la transcripción del gen que codifica la proteína activadora de competencia Sxy. Crp y Sxy activan conjuntamente la expresión de genes implicados en la captura de ADN, entre los que se encuentran los componentes del pili tipo IV, responsable de la unión a ADN y su posterior traslocación al periplasma (Maughan *et al.*, 2009). *H. influenzae* no capta ADN exógeno de forma indiscriminada. El sistema tiene una elevada afinidad por

fragmentos de ADN que contienen una señal específica de captura o USS (del inglés *uptake specific signal*). En *H. influenzae*, esta señal es la secuencia 5'-AAGTGCGGT-3' (Maughan *et al.*, 2009). Además, *H. influenzae* posee sistemas de restricción-modificación de tipo III para la eliminación del ADN exógeno no deseado (Fox *et al.*, 2007).

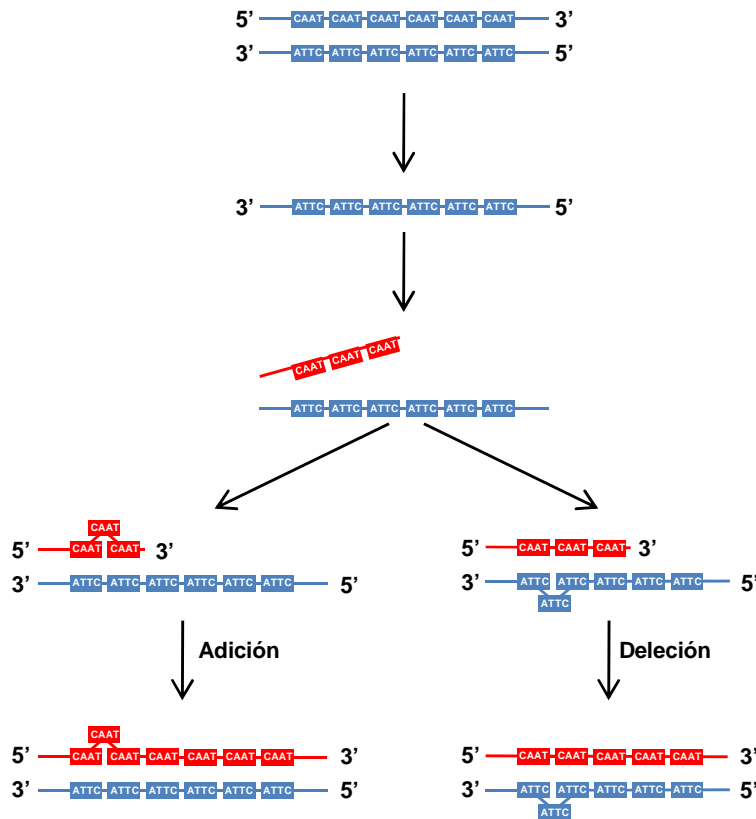
(ii) *H. influenzae* incorpora ADN exógeno mediante transferencia horizontal de material genético. La población colonizadora de *H. influenzae* en la nasofaringe y en el tracto respiratorio inferior es policlonal (Mukundan *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 1999) y existen fenómenos de transferencia genética horizontal *in situ* (Hiltke *et al.*, 2003).

(iii) *H. influenzae* presenta una frecuencia elevada de polimorfismos genéticos causados por mutaciones puntuales no sinónimas, inserciones, deleciones y duplicaciones génicas. Los polimorfismos se observan en genes que codifican proteínas localizadas en la superficie bacteriana, lo que contribuye a aumentar la variabilidad antigénica de este microorganismo (Duum *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1992; Munson *et al.*, 1993; Weiser *et al.*, 1995).

(iv) La expresión de algunos genes de *H. influenzae* está regulada mediante variación de fase. La secuenciación del genoma de *H. influenzae* Rd KW20 reveló una alta frecuencia de repeticiones de secuencias cortas de ADN (Fleischmann *et al.*, 1995; Hood *et al.*, 1996). Estas secuencias cortas oscilan entre 1 y 9 nucleótidos y se denominan repeticiones de secuencia simple o SSRs (del inglés *simple sequence repeats*). Las SSRs se encuentran en regiones promotoras o en pautas de lectura abierta. La SSR de un gen está conservada en secuencia y posición relativa. Sin embargo, el número de repeticiones de cada SSR de un determinado gen varía en función de la cepa.

La introducción de cambios en el número de repeticiones de una SSR conlleva cambios en el marco traduccional de lectura (si la SSR está en la pauta abierta de lectura del gen) o cambios en el promotor, que determinarán variaciones en los niveles de expresión del gen correspondiente. Estos cambios son generados por errores de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN que provocan un desapareamiento de hebras (**Fig. 6**) (Moxon *et al.*, 2006; Power *et al.*, 2009). La variación de fase es un mecanismo estocástico, reversible y de alta frecuencia que facilita la supervivencia bacteriana frente a las fluctuaciones del ambiente y es una estrategia utilizada por muchas bacterias adaptadas a un hospedador (Moxon *et al.*, 2006). En *H. influenzae*, un conjunto de genes con secuencias SSR está implicado en virulencia. Se ha descrito regulación por variación de fase en genes implicados en adquisición de hierro, síntesis

del LPS y en genes que codifican proteínas de membrana externa que actúan como adhesinas. Asimismo, la metiltransferasa *modA1* del sistema de restricción-modificación de tipo III está sometida a este tipo de regulación. Dado que ModA controla la expresión de un repertorio de genes, este repertorio se llama regulón de fase variable o *phasevarion* (del inglés *phase variable regulon*) (Srikhanta *et al.*, 2005; Srikhanta *et al.*, 2010).



**Figura 6. Regulación del contenido génico por variación de fase.** El desapareamiento de la doble hebra en la replicación del ADN resulta en la adición (izquierda) o delección (derecha) de repeticiones de secuencia simple (SSR). Cada hebra de ADN está representada por una línea y las secuencias SSR, en este caso tetranucleótidos, están representadas por rectángulos. Una hebra parcialmente replicada (rojo) puede separarse de la hebra molde (azul) durante la replicación. Durante el re-anillamiento puede darse un desapareamiento de las SSR que resulta en un cambio en el número de repeticiones en la nueva hebra. Los cambios no corregidos se mantienen en la siguiente ronda de replicación del ADN y se incorporan a la nueva progenie.

(v) Se han descrito cepas de *H. influenzae* hipermutadoras asociadas a la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística (Watson *et al.*, 2004). Estas cepas presentan defectos en el sistema de reparación de desapareamiento guiado por metilación o MMR (del inglés, *methyl-directed mismatch repair*) debido a mutaciones en el gen *mutS*.

La variabilidad genética entre aislados de HiNT es un hecho contrastado ampliamente en la literatura. La existencia de rasgos genéticos o fenotípicos que resulten prevalentes entre aislados clínicos, y que puedan ser ventajosos para la adaptación al hospedador o la patogenicidad de este microorganismo ha sido objeto de estudio durante esta Tesis Doctoral.

### 4.3. Aspectos moleculares de la patogénesis por *H. influenzae* no tipable

*H. influenzae* forma parte de la microbiota normal de las vías respiratorias altas como colonizador asintomático y es un patógeno oportunista. En determinadas situaciones, *H. influenzae*, es responsable de un conjunto de infecciones respiratorias y no respiratorias agudas y/o crónicas, resumidas en la **Tabla 2** (Kilian *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 1999).

**Tabla 2:** Patogénesis por *H. influenzae* tipo b y por HiNT.

		<i>H. influenzae</i> tipo b	HiNT
Rango de edad		Niños	Niños y adultos
% individuos colonizados		2-4 %	40-80 %
Septicemia		Habitual	Inusual
Infecciones sintomáticas	Infecciones agudas del tracto respiratorio superior	Meningitis Epiglotitis	Otitis media Sinusitis
	Infecciones agudas del tracto respiratorio inferior	Neumonía	Bronquitis Neumonía
	Otras infecciones agudas	Artritis Pericarditis Celulitis	Conjuntivitis
	Infecciones crónicas	No	Colonización del tracto respiratorio inferior en pacientes con enfermedades respiratorias subyacentes como EPOC, BC o FQ.

EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; BC, bronquitis crónica; FQ, fibrosis quística

*H. influenzae* tipo b ha sido históricamente una causa importante de meningitis bacteriana infantil, además de causar epiglotitis, artritis, celulitis y neumonías agudas (Kilian *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 1999). El suministro de una vacuna conjugada basada en la cápsula de *H. influenzae* tipo b a partir de 1990 ha disminuido las infecciones invasivas provocadas por este patógeno (Peltola *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2011) hasta su práctica erradicación. Si bien algunas cepas capsuladas no tipo b causan neumonía (Kilian *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2011), HiNT es el patógeno de esta especie que tiene un mayor impacto clínico en la actualidad.

HiNT es la causa más común de otitis media crónica con efusión en niños y el segundo agente causante de otitis media aguda (Rao *et al.*, 1999). Asimismo, HiNT es uno de los principales agentes etiológicos de neumonía adquirida en la comunidad en niños y ancianos, bronquitis aguda, sinusitis o conjuntivitis. Por otra parte, HiNT causa infecciones crónicas del tracto respiratorio inferior en individuos que sufren enfermedades respiratorias crónicas subyacentes como EPOC y bronquitis crónica. En EPOC, la infección crónica por HiNT contribuye a la progresión de la enfermedad y causa aproximadamente el 40% de las exacerbaciones periódicas (Sethi *et al.*, 2008; Agrawal *et al.*, 2011).

*H. influenzae* presenta una dualidad colonizador-patógeno que está relacionada con desequilibrios en la dinámica de colonización (Foxwell *et al.*, 1998). Estos desequilibrios se deben a alteraciones en la inmunidad del hospedador que condicionan cambios en las características del nicho ocupado por el microorganismo. Así, la exposición continua a humo de tabaco provoca hiperplasia de las células caliciformes, hipersecreción de moco y disfunción muco-ciliar (Rao *et al.*, 1999). Por otro lado, la infección por el virus respiratorio sincitial disminuye la expresión de hBD2 en el tracto respiratorio superior. La menor expresión de hBD-2 está relacionada con un aumento en la tasa de colonización del tracto respiratorio superior por HiNT, lo que aumenta la probabilidad de sufrir otitis media (McGillivray *et al.*, 2009). Estos cambios en el hospedador, sumados a la capacidad adaptativa de HiNT, permiten al microorganismo alcanzar nuevos nichos y establecerse en ellos. La capacidad adaptativa de HiNT se basa en la disposición de múltiples estrategias de colonización, en el desarrollo de mecanismos de respuesta frente a la inmunidad del hospedador y en el aprovechamiento de las fluctuaciones del nicho que ocupa (Foxwell *et al.*, 1998).

### 4.3.1. El lipooligosacárido (LOS) de HiNT: estructura, diversidad y papel como factor de virulencia

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por membrana interna, espacio periplasmático y membrana externa. La membrana externa está constituida en su mayor parte por una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos en su cara interna y moléculas de lipopolisacárido (LPS) en su cara externa (Kita *et al.*, 1973).

El LPS bacteriano está formado por glicolípidos. Cada molécula de LPS está compuesta por lípido A, núcleo oligosacarídico y cadena O. El lípido A sirve de anclaje de la molécula de LPS a la membrana externa y es su componente lipídico más importante. El núcleo polisacarídico está unido al lípido A y se divide en núcleo interno y núcleo externo. El núcleo interno está formado por ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo) y heptosas. Los residuos Kdo están unidos al lípido A y presentan cargas negativas en el grupo carboxi. Las heptosas, que constituyen el sitio de unión al núcleo externo, están modificadas a menudo con grupos fosfato. El núcleo externo está compuesto por oligosacáridos de hexosas que sirven como anclaje para la cadena O, que es la región del LPS más expuesta al exterior. La cadena O es un polisacárido variable en longitud y tipo de azúcar, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica. La molécula de LPS de *H. influenzae* carece de cadena O como tal, por lo que se denomina lipooligosacárido (LOS).

Los genes implicados en la biosíntesis del LOS están descritos en la **Tabla 3**.



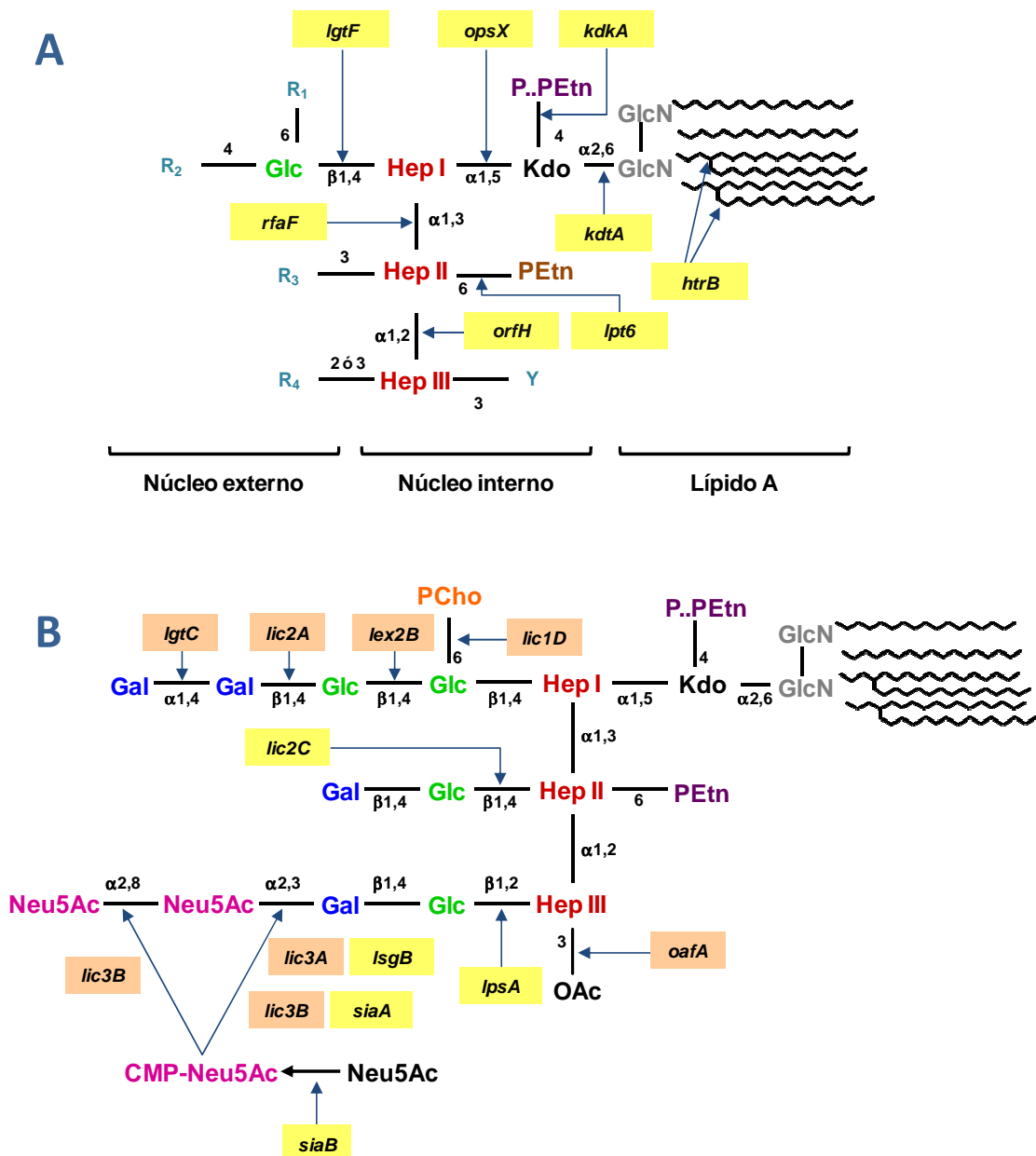
**Tabla 3:** Genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de LOS de HiNT.

Gen	Enzima	SSR en pauta abierta de lectura (5'-3')
<i>htrB</i>	tetradecanoil transferasa	
<i>kdtA</i>	Kdo transferasa	
<i>kdkA</i>	Kdo quinasa	
<i>opsX</i>	heptosiltransferasa I	
<i>rfaF</i>	heptosiltransferasa II	
<i>orfH</i>	heptosiltransferasa III	
<i>lpt6</i>	fosfoetanolamina transferasa	
<i>galU</i>	UDP-glucosa sintasa	
<i>lgtF</i>	glucosiltransferasa (UDP glucosa)	
<i>lic2C</i>	glucosiltransferasa	
<i>lpsA</i>	glicosiltransferasa	
<i>oafA</i>	acetilasa	GCAA
<i>lgtC</i>	galactosiltransferasa	GACA
<i>lic2A</i>	galactosiltransferasa	CAAT
<i>lex2AB</i>	glicosiltransferasa	GCAA
<i>lic1A</i>	colina quinasa	CAAT
<i>lic1B</i>	transportador de colina	
<i>lic1C</i>	PCho pirofosforilasa	
<i>lic1D</i>	PCho transferasa	
<i>lic3A</i>	sialiltransferasa	CAAT
<i>lic3B</i>	Sialiltransferasa	CAAT
<i>lsgB</i>	sialiltransferasa	
<i>siaA</i>	sialiltransferasa	
<i>siaB</i>	CMP-Neu5Ac sintetasa	
<i>lic2B</i>	glicosiltransferasa	
<i>losB1/losB2</i>	heptosiltransferasa (DD; DL)	
<i>losA</i>	glucosiltransferasa	CGAGCATA

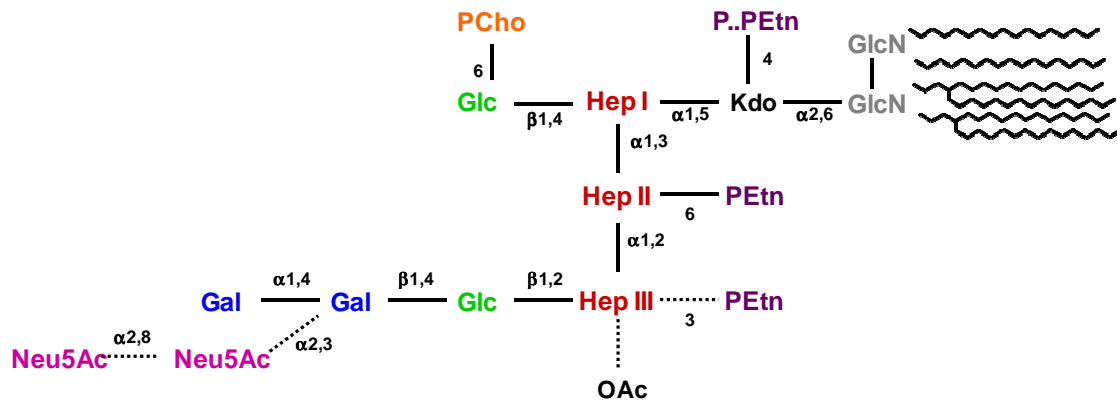
Una representación esquemática de la estructura de la molécula de LOS de *H. influenzae* se muestra en la **Fig. 7**. El lípido A de la molécula de LOS de *H. influenzae* contiene una diglucosamina a la que se unen los ácidos grasos. El análisis del lípido A en distintas cepas de *H. influenzae* revela heterogeneidad en longitud, número y posición de los ácidos grasos, si bien el patrón de acilación más frecuente es la hexaacilación (Mikhail *et al.*, 2005). El gen *htrB* codifica una tetradecanoil transferasa que añade un ácido graso de 14 carbonos al lípido A (Lee *et al.*, 1995). El núcleo interno del LOS consta de una molécula fosforilada de Kdo unida a una triheptosa. Los genes implicados en la síntesis del núcleo interno son *kdtA*, que codifica una Kdo transferasa que incorpora una molécula de Kdo al lípido A, y *kdkA*, responsable de la fosforilación del Kdo (**Fig. 7**) (White *et al.*, 1997). La heptosiltransferasa que une la

molécula de Kdo con la triheptosa mediante enlace con la heptosa I está codificada por *opsX* (Gronow *et al.*, 2005). La transferencia de las heptosas II y III está catalizada por las proteínas codificadas por *rfaF* y *orfH*, respectivamente (Hood *et al.*, 1996). A partir de cada una de las heptosas se ensamblan distintas cadenas de oligosacáridos que constituyen el núcleo externo del LOS. *lgtF* es responsable de iniciar la extensión de oligosacáridos a partir de la heptosa I, añadiendo una glucosa (Hood *et al.*, 2004). El núcleo interno, con una glucosa en la heptosa I, constituye la porción de LOS conservada en todas las cepas de *H. influenzae* analizadas (Schweda *et al.*, 2007). El núcleo externo está formado a partir de los oligosacáridos que conforman las extensiones de la triheptosa (**Fig. 7**) (Schweda *et al.*, 2007). Las enzimas encargadas de añadir las ramificaciones a las heptosas II y III son codificadas por *lic2C* y *lpsA*, respectivamente. *lgtF* y *lpsA* están presentes en todas las cepas de *H. influenzae* analizadas; *lic2C* está presente en aproximadamente el 50% de las cepas que habían sido estudiadas al comienzo de este trabajo (Hood *et al.*, 2004). *LgtF* y *Lic2C* añaden una glucosa a la posición O-4 de la heptosa correspondiente. *LpsA* puede transferir una glucosa o una galactosa en las posiciones O-2 o O-3 de la heptosa III. La adición de un azúcar u otro y la posición del mismo dependen de la variante alélica de *lpsA* presente en cada cepa. De hecho, cada cepa produce una de las cuatro combinaciones posibles respecto al enlace de la primera hexosa a la heptosa III (Deadman *et al.*, 2006). *oafA*, cuya expresión está regulada por variación de fase, es responsable de la incorporación de grupos O-acetilo a la heptosa III (Fox *et al.*, 2005). *lpt6* está implicado en la adición de PEtn a la heptosa II (Schweda *et al.*, 2007).

La **Fig. 8** muestra una representación del LOS de la cepa HiNT375 (Hood *et al.*, 1999). HiNT375 ha sido empleada como cepa de referencia en parte del trabajo realizado durante esta tesis doctoral.



**Figura 7: Estructura de la molécula de LOS de *H. influenzae*.** (A) Estructura conservada en la molécula de LOS de *H. influenzae* entre cepas. El gen que codifica la proteína responsable de cada enlace está indicado con un recuadro amarillo. R1-R4 son las ramificaciones a nivel de núcleo externo. Y es la sustitución de la HepIII con OAc o con PEtn. (B) Esquema de la estructura de una molécula modelo de LOS en *H. influenzae*. El gen que codifica la proteína responsable de cada enlace está indicado con un recuadro amarillo o naranja. Los genes indicados con un recuadro naranja presentan regulación de su expresión por variación de fase. Kdo, ketodeoxioctonato; Hep, heptosa; Gal, galactosa; Glu, glucosa; GlcN, glucosamina; PCho, fosforilcolina; PEtn, fosfoetanolamina; Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico; OAc, grupo O-acetilo; P, grupo fosfato.



**Figura 8. Estructura de la molécula de LOS de la cepa HiNT375.** Los enlaces representados con una línea punteada corresponden a glicofomas alternativas. En la ramificación a partir de la Heptosa III, la glicofoma mayoritaria presenta una digalactosa terminal. La forma minoritaria (enlaces punteados), presenta ácido siálico en su terminación (Hood *et al.*, 1999).

El locus *lic2*, constituido por los genes *lic2A*, *ksgA*, *lic2C*, *lic2B1* e *infA*, es el encargado de la extensión de la cadena oligosacáridica a partir de la heptosa II (HepII) (Hood *et al.*, 2004). El gen *lic2B* codifica una glucosiltransferasa encargada de la unión de una glucosa/galactosa a la primera glucosa de la Hep II, cuya adición es a su vez catalizada por Lic2C (Twelkmeyer *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011). Por otra parte, existen cepas de HiNT que presentan en el núcleo externo del LOS oligosacáridos que contienen una heptosa denominada heptosa IV. *losAB* (*losA1/losB1* o *losA2/losB2*) codifican una glucosiltransferasa y una heptosiltransferasa, respectivamente (Hood *et al.*, 2010). La expresión de *losA* está regulada por variación de fase (Erwin *et al.*, 2006). Los genes *losAB* se encuentran flanqueados por *infA* y *ksgA*, en la misma región donde, alternativamente se localiza *lic2BC*. Por tanto, la región genómica flanqueada por *infA* y *ksgA* en *H. influenzae* es variable entre cepas: puede estar vacía, contener únicamente *lic2C*, contener *lic2BC* o contener *losAB* (Erwin *et al.*, 2005).

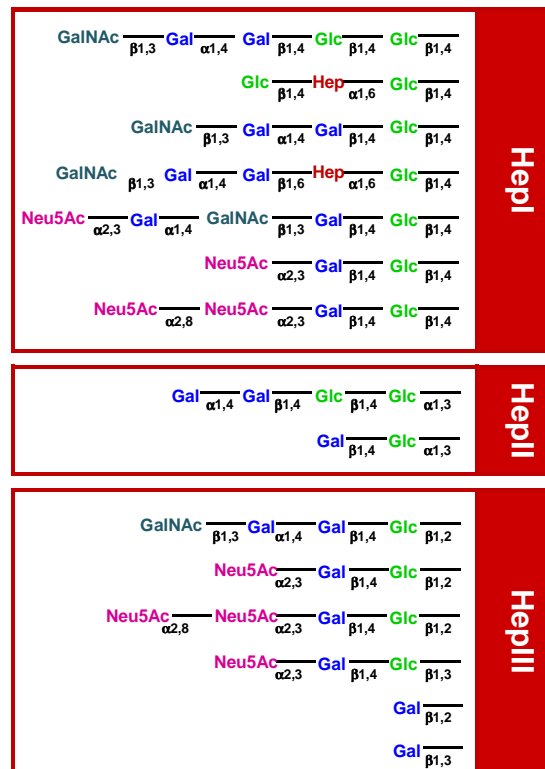
El operón *lic1ABCD* es responsable de la síntesis y transferencia de fosforilcolina (PCho) a la molécula de LOS de *H. influenzae*. *lic1A* codifica una quinasa de colina, *lic1B* un transportador de colina, *lic1C* una pirofosforilasa que activa PCho para su incorporación a la molécula de LOS y *lic1D* codifica una transferasa de PCho (Weiser *et al.*, 1997). La expresión del operón está regulada por variación de fase. El extremo 5' de la región codificante de *lic1A* presenta un número variable de repeticiones de la secuencia SSR 5'-CAAT-3' (Power *et al.*, 2009; Weiser *et al.*, 1997). PCho se localiza en la molécula de LOS de la mayor parte de cepas analizadas unida a la primera glucosa

de la HepI, en la posición R<sub>1</sub> (**Fig. 7 y Fig. 8**), si bien se ha descrito la asociación de PCho a residuos de las extensiones HepII y HepIII. La especificidad de *lic1D* respecto al aceptor de PCho está relacionada con polimorfismos en este gen (Lysenko *et al.*, 2000a; Schweda *et al.*, 2007). *lic1D* puede estar duplicado en el genoma, resultando en la adición simultánea de dos moléculas de PCho en localizaciones distintas de la molécula de LOS (Fox *et al.*, 2008). *lic2A* y *lgtC* son responsables de la adición de digalactosa a una glucosa de la molécula de LOS (Hood *et al.*, 1996; Weiser *et al.*, 1998). El resultado es la formación de una globotriosa, epítipo que mimetiza el antígeno humano P<sup>k</sup> (Harvey *et al.*, 2001). Ambos genes presentan regulación por variación de fase (Power *et al.*, 2009; Weiser *et al.*, 1998). Si la molécula de digalactosa se une a la primera glucosa de la ramificación HepI, la unión de la galactosa proximal es llevada a cabo por Lex2B, en lugar de por LgtC. *lex2B*, regulado por variación de fase, es por tanto responsable de la transferencia de la segunda hexosa en la ramificación HepI. La adición de una glucosa o una galactosa depende de la variante alélica del gen *lex2B* presente en cada cepa (Deadman *et al.*, 2009). Por otra parte, *H. influenzae* expresa ácido siálico en su superficie en forma de Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico. Neu5Ac es un azúcar de nueve carbonos que el microorganismo capta del medio externo. SiaPQM es el transportador de Neu5Ac (Allen *et al.*, 2005; Severi *et al.*, 2005). En el citoplasma bacteriano, la molécula de Neu5Ac entra en una ruta catabólica o es procesada para su incorporación al LOS (Severi *et al.*, 2007). Para ello, es necesaria la activación de Neu5Ac con CMP, proceso catalizado por la CMP-Neu5Ac sintetasa SiaB (Hood *et al.*, 1999). La transferencia de CMP-Neu5Ac a una galactosa de la molécula de LOS es catalizada por las sialiltransferasas LsgB, SiaA, Lic3A o Lic3B (Fox *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2002). La presencia en el genoma de *H. influenzae* de los genes que codifican estas enzimas es variable en función de la cepa. *lic3B* transfiere Neu5Ac a una galactosa o a otra molécula de Neu5Ac, generando ácido disíalico. *lic3A* y *lic3B* están regulados por variación de fase (Fox *et al.*, 2006).

La molécula de LOS de *H. influenzae* presenta variabilidad entre cepas distintas y dentro de una misma cepa. Las moléculas de LOS de *H. influenzae* contienen glucosa, galactosa, ácido siálico, el aminoazúcar N-acetilgalactosamina y las sustituciones de naturaleza no glucídica PCho, grupos acetilo y PEtn (Schweda *et al.*, 2007). La variabilidad del LOS entre cepas depende de (i) diferencias en el contenido génico, a nivel de presencia o ausencia de genes implicados en la biosíntesis de la molécula; (ii) variabilidad alélica de los genes implicados en dicha biosíntesis. La heterogeneidad del LOS dentro de una misma cepa se debe a la longitud variable de las cadenas de oligosacáridos unidas al núcleo interno. Este hecho puede ser debido a: (i) una biosíntesis incompleta durante la adición de azúcares (Hood *et al.*, 2001); (ii) la competencia entre distintas transferasas por un mismo aceptor durante la biosíntesis,

lo que puede generar glicofomas distintas en una cepa (Hood *et al.*, 1999; Schweda *et al.*, 2007); (iii) la variación de fase de genes implicados en la biosíntesis. La regulación por variación de fase de varios genes implicados en la síntesis de LOS es un fenómeno combinatorio que genera múltiples posibilidades en el patrón de la molécula. Además, el apagado de algunas transferasas implica la pérdida de la glicofoma aceptora para otras transferasas, que no podrán incorporar ninguna sustitución a pesar de expresarse correctamente. Las extensiones de oligosacáridos del núcleo externo de las cepas de *H. influenzae* analizadas se resumen en la **Fig. 9** (Schweda *et al.*, 2007).

Varias modificaciones de la molécula de LOS de HiNT están relacionadas con distintos aspectos de la virulencia del patógeno. Así, la adición de grupos O-acetilo a la molécula de LOS de HiNT y la expresión de *losA* juegan un papel importante en la resistencia del patógeno al ataque bactericida del suero (Fox *et al.*, 2005; Erwin *et al.*, 2006). La hexaacilación del lípido A confiere resistencia a los péptidos antimicrobianos (Starner *et al.*, 2002) y media la persistencia del patógeno durante la infección (DeMaria *et al.*, 1997; Swords *et al.*, 2002). El gen *lic2B* facilita la evasión del ataque bactericida del complemento por HiNT en un modelo de bacteremia murina. La expresión de *lic2B* está regulada por el sistema de dos componentes ArcAB, el cual responde a las condiciones redox del medio, activándose en condiciones de baja presión de oxígeno. En estas condiciones, ArcA activa la expresión de *lic2B*, favoreciendo la resistencia de *H. influenzae* al suero (Wong *et al.*, 2011).



**Figura 9: Oligosacáridos del núcleo externo de la molécula de LOS de *H. influenzae*.** Representación de las ramificaciones más frecuentes identificadas a partir de las Hepl, HepII y HepIII. Se pueden observar también versiones truncadas de las ramificaciones mostradas en esta figura. Hep, heptosa; Gal, galactosa; Glu, glucosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; PCho, fosforilcolina; Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico. Figura adaptada de Schweda *et al.*, 2007.

El papel de PCho en la virulencia de HiNT es multifactorial: (i) PCho facilita la formación de agregados bacterianos sobre superficies abióticas y sobre el oído medio, observado en un modelo *in vivo* de otitis media en chinchilla (Hong *et al.*, 2007a; Hong *et al.*, 2007b), favoreciendo la persistencia de HiNT durante la infección; (ii) PCho mimetiza estructuralmente la molécula eucariota factor activador de plaquetas (PAF, del inglés *platelet activating factor*) y se une al receptor de PAF (PAF-R) presente en la superficie celular, lo que facilita la adhesión e internalización bacteriana en células epiteliales bronquiales (Gould *et al.*, 2002; Swords *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2001); (iii) PCho media la resistencia de HiNT al ataque bactericida de los péptidos antimicrobianos (Lysenko *et al.*, 2000b); (iv) si bien juega un papel importante en estadios iniciales de la infección por HiNT, PCho activa la vía clásica del complemento a través de su unión a la proteína de fase aguda CRP (Weiser *et al.*, 1998). Esta unión puede ser revertida por la presencia de surfactante pulmonar, favoreciendo la adhesión de HiNT (Gould *et al.*, 2002). La regulación por variación de fase del operón *lic1ABCD* permite al patógeno el

control de los niveles de expresión superficial de PCho para evadir la activación de la vía clásica del complemento tras las etapas iniciales de la infección (Pang *et al.*, 2008b; Weiser *et al.*, 1998; Weiser *et al.*, 1998). La unión a CRP ocurre cuando la molécula de PCho se encuentra en la ramificación HepIII de la molécula de LOS, pero no en la posición O-6 de la primera glucosa de la ramificación HepI (Lysenko *et al.*, 2000a). Una observación que aparentemente contrasta con la implicación de PCho en la activación del complemento a través de CRP es el hecho de que PCho permite la evasión del ataque bactericida del suero mediado por anticuerpos al prevenir la unión/limitar el acceso de los mismos a la superficie bacteriana (Clark *et al.*, 2012).

La sustitución de una glucosa con digalactosa lleva a la formación de una globotriosa (Gal-Gal-Glc), que mimetiza el antígeno P<sup>k</sup> presente en la superficie de eritrocitos y de varios tipos de células epiteliales humanas (de Vries *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2001). La presencia de digalactosa en el LOS de HiNT juega un papel en: (i) resistencia del patógeno a la muerte mediada por activación de la vía clásica del complemento (Weiser *et al.*, 1998). Esta molécula disminuye la deposición de C4b sobre la superficie bacteriana (Erwin *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2007); (ii) la virulencia del patógeno. La expresión de dos residuos de digalactosa aumenta la virulencia de HiNT (Griffin *et al.*, 2005).

La presencia de ácido siálico en la molécula de LOS de HiNT confiere resistencia al ataque bactericida del suero humano, impidiendo la deposición de C3 y C4 (Figueira *et al.*, 2007; Hood *et al.*, 1999). La resistencia a suero está relacionada con la persistencia y la virulencia de la infección por HiNT (Bouchet *et al.*, 2003). El ácido siálico presente en la superficie bacteriana favorece la formación de agregados bacterianos extracelulares, facilitando la persistencia y aumentando la virulencia de la infección por HiNT (Jurcisek *et al.*, 2005; Swords *et al.*, 2004). Los glicoconjugados con ácido siálico son componentes predominantes de la superficie de las células humanas, por lo que su presencia en la superficie bacteriana contribuye a evitar el reconocimiento del patógeno por la inmunidad del hospedador (Harvey *et al.*, 2001). Este fenómeno de mimetismo molecular puede a su vez enmascarar otros epítomos de la bacteria que podrían ser reconocidos por el sistema inmune, favoreciendo así la evasión del mismo (Vimr *et al.*, 2002).

Junto con la molécula de LOS, HiNT dispone de un conjunto de mecanismos de virulencia que se describen a continuación.



### 4.3.2. Interacción de HiNT con elementos del sistema inmune humano

#### 4.3.2.1. Alteración de la función muco-ciliar

HiNT ha desarrollado un conjunto de estrategias para contrarrestar el batido muco-ciliar de la mucosa respiratoria: (i) adhesión preferente a células no ciliadas; (ii) formación de agregados bacterianos o microcolonias en la capa de moco; (iii) provocar la pérdida de cilios en células ciliadas y alteración del batido ciliar (Rao *et al.*, 1999). El lípido A de la molécula de LOS de HiNT provoca la pérdida de cilios (Johnson *et al.*, 1986). Por otra parte, la disminución de la frecuencia de batido ciliar está relacionada con una disminución de los niveles intracelulares de AMPc en las células epiteliales en presencia de HiNT (Kanthakumar *et al.*, 1996).

#### 4.3.2.2. Inactivación de IgA

IgA es la inmunoglobulina predominante en las mucosas. Este anticuerpo promueve la aglutinación y fagocitosis bacteriana, inhibe la adhesión bacteriana al epitelio, inactiva toxinas bacterianas y activa la vía clásica del complemento (Roitt *et al.*, 2006). HiNT secreta una proteasa de IgA1 que proteoliza esta inmunoglobulina a nivel de la región bisagra, inactivándola (Kilian *et al.*, 1979; Rao *et al.*, 1999). La IgA1 proteasa es una proteína autotransportadora codificada por el gen *iga*, presente en el 97% de las cepas de *H. influenzae* analizadas (Rao *et al.*, 1999). Algunas cepas de HiNT poseen y expresan un segundo gen con actividad IgA1 proteasa, *igaB*. La prevalencia de *igaB* es mayor en aislados clínicos pulmonares y de oído medio que en aislados de la microbiota normal de la nasofaringe humana (Fernaays *et al.*, 2006b; Fernaays *et al.*, 2006a). Existe un grupo de cepas de HiNT clonalmente relacionadas entre sí que presentan las dos IgA1 proteasas. La presencia simultánea de las dos proteasas se ha relacionado con la adaptación del patógeno para infectar de forma crónica el tracto respiratorio inferior de enfermos EPOC (Murphy *et al.*, 2011).

### 4.3.2.3. Resistencia a elementos de la inmunidad innata humoral

HiNT posee varios mecanismos de resistencia al ataque bactericida de los péptidos antimicrobianos (PAs): (i) la acilación del lípido A; (ii) la presencia de PCho en la molécula de LOS; (iii) el operón *sapABCDFZ*. Este operón codifica un transportador de membrana que confiere resistencia a PAs mediante la unión de SapA a los péptidos bactericidas en el espacio periplásmico. Una vez unidos a SapA, estos péptidos atraviesan la membrana bacteriana a través del complejo Sap y son degradados en el citosol bacteriano por peptidasas citoplasmáticas (Mason *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2005; Shelton *et al.*, 2011). Además, SapA se une al grupo hemo y es esencial para la utilización de este grupo por la bacteria en condiciones de escasez de hierro. Los PAs compiten y desplazan al grupo hemo en su unión a SapA, priorizando la resistencia a PAs sobre la captación de hierro (Mason *et al.*, 2011).

Por otra parte, *H. influenzae* posee varios mecanismos de resistencia frente a la muerte mediada por el sistema de complemento: (i) retraso de la actividad convertasa de C3 de la vía clásica (Williams *et al.*, 2001); (ii) retraso de la deposición de C3b sobre la superficie bacteriana (Williams *et al.*, 2001); (iii) unión al inhibidor de la vía clásica del complemento C4BP (del inglés *C4-binding protein*) (Hallstrom *et al.*, 2007); (iv) unión a vitronectina a través de la proteína de membrana externa PE; la vitronectina inhibe la formación del complejo de ataque a membrana en la superficie bacteriana (Hallstrom *et al.*, 2009); (v) control de la expresión de los genes *vacJ* e *yrb* (Nakamura *et al.*, 2011); (vi) inhibición de la deposición de C4b por acción de LgtC (Ho *et al.*, 2007); (vii) interferencia en la activación de la vía alternativa del complemento por unión al inhibidor Factor H (Hallstrom *et al.*, 2008). Asimismo, las moléculas de digalactosa, ácido siálico y galactosa presente en la ramificación de la Hep II median la resistencia de este microorganismo al ataque bactericida del complemento.

## 4.4. Características de la interacción del HiNT con el epitelio respiratorio humano

### 4.4.1. Moléculas implicadas en la adhesión de HiNT al epitelio respiratorio

HiNT se adhiere al epitelio respiratorio y a la matriz extracelular en un proceso mediado por múltiples estructuras superficiales de la bacteria denominadas adhesinas

y del hospedador (**Tabla 4**). De forma general, las adhesinas de HiNT presentan variabilidad en base a: (i) su presencia o ausencia; (ii) polimorfismos que incluyen mutaciones puntuales, inserciones o deleciones; (iii) regulación de su expresión por variación de fase (**resumido en Tabla 4**). Las adhesinas de HiNT median la adhesión del patógeno a células, a la mucina (uno de los componentes principales del moco que cubre el epitelio respiratorio) y a la matriz extracelular. Si bien la adhesión a mucina no supone un beneficio para la colonización ya que ésta es expulsada del tracto respiratorio mediante el batido muco-ciliar, esta adhesión contribuye al desarrollo de infecciones sintomáticas en individuos que presentan daño o alteraciones en la función muco-ciliar (Rao *et al.*, 1999; St Geme III *et al.*, 2002).

A continuación, se describen las características más destacadas de las adhesinas de *H. influenzae* conocidas. P2 es una porina altamente inmunogénica abundante en la membrana externa de HiNT. P2 se adhiere a la mucina y a laminina (Reddy *et al.*, 1996;). P5 es una proteína abundante en la membrana externa de HiNT que presenta homología con la proteína OmpA de *Escherichia coli* (Munson *et al.*, 1993). P5 se une a la mucina (Miyamoto *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996) y a la superficie de las células epiteliales a través del receptor CEACAM-1 (del inglés Carcinoembrionic antigen-related cell adhesion molecule-1) (Bookwalter *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2001; Virji *et al.*, 2000) y de la molécula ICAM-1 (del inglés Intracellular adhesion molecule-1) (Avadhanula *et al.*, 2006). La proteína OapA media la adhesión a células epiteliales a través de un receptor no identificado (Prasadarao *et al.*, 1999; Weiser *et al.*, 1995). La proteína E (PE) es una proteína de la membrana externa de HiNT altamente conservada, que media adhesión al epitelio respiratorio y a la proteína de la matriz extracelular vitronectina, reconociendo su dominio C-terminal y modulando la formación del complejo de ataque a la membrana del sistema de complemento (Hallstrom *et al.*, 2009; Ronander *et al.*, 2009; Ronander *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011). PE también se une a la proteína de matriz extracelular laminina (Hallström *et al.*, 2011) y al plasminógeno ayudando así, a la evasión bacteriana de los elementos de la inmunidad innata del hospedador (Barthel *et al.*, 2012). En individuos fumadores, se observan niveles de laminina mayores que en individuos no fumadores (Amin *et al.*, 2003), lo que puede contribuir a favorecer la adhesión de HiNT.

**Tabla 4:** Adhesinas de *H. influenzae*.

Adhesina	Gen	Función	Fuente variabilidad		
			Presencia variable del gen	Polimorfismos	SSR
P2	<i>ompP2</i>	Adhesión a mucina y laminina	no	sí	no
P5	<i>ompP5</i>	Adhesión a mucina, CEACAM-1 e ICAM-1	no	sí	no
OapA	<i>oapA</i>	Adhesión a células epiteliales	no	sí	no
Proteína E	<i>pe</i>	Adhesión a vitronectina, laminina y células epiteliales	no	no	no
Hap	<i>hap</i>	Adhesión a células epiteliales, fibronectina, laminina y colágeno. Formación de microcolonias.	no	ND	no
Hia	<i>hia</i>	Adhesión a células epiteliales	sí	ND	no
HMW1	<i>hmw1ABC</i>	Adhesión a una glicoproteína sialilada de células epiteliales no identificada	sí	sí	En la región promotora
HMW2	<i>hmw2ABC</i>	Adhesión a células epiteliales	sí	sí	En la región promotora
Fímbria	<i>hifABCDE</i>	Adhesión a mucina y tejidos nasofaríngeo y nasal	sí	ND	En la región promotora
Pili tipo IV	<i>pilABCD</i>	Adhesión a células epiteliales, formación de <i>biofilms</i> , captación de ADN	ND	ND	no
PCho	<i>lic1ABCD</i>	Adhesión a PAF-R	no	sí	En <i>lic1A</i>

ND: no determinado

*H. influenzae* posee dos proteínas autotransportadoras que actúan como adhesinas: Hap e Hia. Hap forma parte de un grupo de proteínas extracelulares conocidas como autotransportadores que se asocian a sí mismos (del inglés *self-associating autotransporters*, SAATs). Hap consta de una secuencia señal, un dominio barril  $\beta$  (Hap $\beta$ ) y un dominio pasajero (Hap $\varsigma$ ). Hap media la adhesión de HiNT a la superficie de células epiteliales y a las proteínas de la matriz extracelular fibronectina, laminina y colágeno IV (Fink *et al.*, 2002; Hendrixson *et al.*, 1998). Asimismo, Hap promueve la formación de agregados bacterianos o microcolonias en la superficie celular (Hendrixson *et al.*, 1998; St Geme III *et al.*, 2002). Esta capacidad adhesiva está relacionada con el dominio Hap $\varsigma$ . La definición de la estructura cristalina de Hap $\varsigma$  muestra que este dominio es responsable de la oligomerización intercelular, entre

subunidades de proteínas presentes en la superficie de bacterias distintas, lo que favorece la agregación inter-bacteria (Meng *et al.*, 2011). La inactivación de algunos genes involucrados en la biosíntesis del LOS interfieren en la localización de Hap en la membrana externa (Spahich *et al.*, 2012). Hia media la adhesión a células epiteliales a través de su dominio Hia<sub>5</sub> (Barenkamp *et al.*, 1996; Laarmann *et al.*, 2002).

HMW1 y HMW2 son dos glicoproteínas de alto peso molecular que actúan como adhesinas de HiNT (St Geme III *et al.*, 1993; St Geme III *et al.*, 2009). HMW1 interacciona con una glicoproteína sialilada de la superficie eucariota de identidad desconocida (St Geme III *et al.*, 1994).

HiNT presenta en su superficie un pili hemaglutinante o fimbria, codificado por el operón *hifABCDE* (Gilsdorf *et al.*, 1997). Las fimbrias de *H. influenzae* son estructuras helicoidales con un diámetro de 5 nm y una longitud de 450 nm (St Geme III *et al.*, 1996). Presentan disposición peritrica y promueven la unión del patógeno a la mucina (Kubiet *et al.*, 2000) y a los tejidos nasofaríngeo y nasal (St Geme III *et al.*, 2002). HiNT también expresa en su superficie un pili tipo IV, codificado por los operones *pilABCD* y *comABCDEF* (Bakaletz *et al.*, 2005). El pili tipo IV es un polímero filamentoso de 5-8 nm de diámetro formado por subunidades de pilina dispuestas de forma helicoidal. Esta estructura está implicada en la adhesión bacteriana a células del epitelio respiratorio, formación de agregados bacterianos, colonización del tracto respiratorio superior (Jurcisek *et al.*, 2007; Pelicic *et al.*, 2008), captura de ADN exógeno (Dougherty *et al.*, 1999; Macfadyen *et al.*, 2000) y motilidad por movimiento asociado a superficies (en inglés *twitching*) (Bakaletz *et al.*, 2005). La expresión de los operones *pilABCD* y *comABCDEF* es esencial para la funcionalidad del pili tipo IV, ya que mutantes en cada uno de los 10 genes que forman los dos operones muestran defectos en la adhesión de la bacteria a células primarias del epitelio bronquial, una disminución en su capacidad para formar *biofilms*, y una disminución en la tasa de eventos de transformación natural (Carruthers *et al.*, 2012).

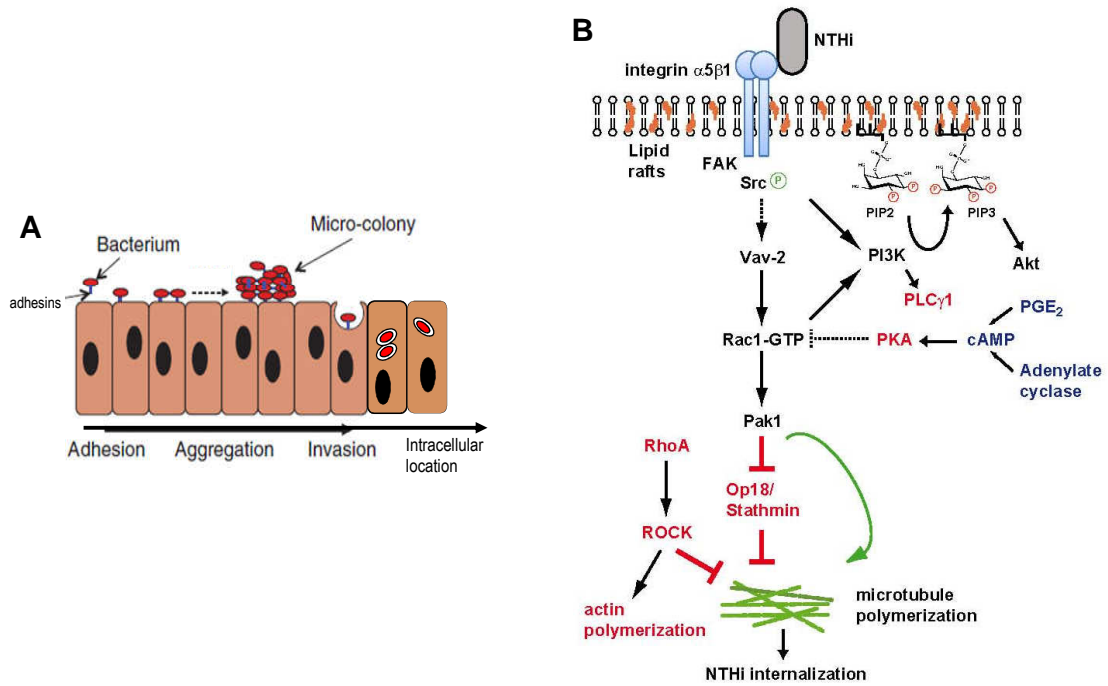
Como se ha descrito anteriormente en el **apartado 4.2** de la sección Introducción, *H. influenzae* presenta una elevada tasa de variabilidad antigénica debido a cambios en su contenido y expresión génica. Como resultado, el hospedador se enfrenta a una población bacteriana cambiante, lo que dificulta su eliminación mediante el reconocimiento específico de antígenos conservados de la superficie bacteriana por el sistema inmune adaptativo (Deitsch *et al.*, 2009). Además de la variabilidad antigénica a nivel de la molécula de LOS descrita en los **apartados 4.2** y **4.3.1** de la sección Introducción, las adhesinas de HiNT son variables. En concreto, P2, HMW1A, HMW2A, OapA y P5 presentan variabilidad de secuencia entre cepas. Estudios de variabilidad

entre distintas cepas colonizadoras de enfermos EPOC muestran una elevada heterogeneidad en la secuencia de *ompP2*. Estas secuencias heterogéneas codifican regiones de la proteína expuestas al exterior. Esto sugiere que la presencia de polimorfismos en P2 puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador. La población bacteriana puede cambiar la región de P2 expuesta, forzando al hospedador a desarrollar nuevas respuestas inmunológicas en cada exacerbación provocada por una cepa de nueva entrada (Thomas *et al.*, 2002). HMW1A y HMW2A son dos proteínas codificadas por los loci *hmw1* y *hmw2*, respectivamente (Barenkamp *et al.*, 1994; Grass *et al.*, 2003; St. Geme III *et al.*, 1998; Surana *et al.*, 2004). Las secuencias de *hmw1A* y *hmw2A* muestran un elevado nivel de identidad entre aislados distintos (Barenkamp *et al.*, 1992). Sin embargo, las regiones situadas en los promotores de *hmw1A* y *hmw2A* muestran un número variable del heptanucleótido SSR 5'-ATCTTTC-3' entre cepas, o incluso entre cepas isogénicas aisladas del mismo individuo en momentos distintos (Dawid *et al.*, 1999; Giufrè *et al.*, 2008). Esta variación de fase en la región promotora de ambos operones está asociada a cambios en la expresión de las adhesinas correspondientes. Así, un mayor número de repeticiones se asocia con una menor expresión proteica y viceversa (Dawid *et al.*, 1999; Cholon *et al.*, 2008). OapA es otra adhesina que ha mostrado variabilidad de secuencia entre cepas distintas. La variabilidad entre cepas radica en la existencia de inserciones y repeticiones en tándem en el gen *oapA* (Prasadarao *et al.*, 1999). La variabilidad de *ompP5* radica en la existencia de sustituciones nucleotídicas que son no sinónimas (Dum *et al.*, 1997). Así, la proteína P5 presenta varias regiones hipervariables cuya modelización indica que quedan expuestas hacia el exterior de la bacteria. El número de regiones hipervariables varía entre tres y cinco según el tipo de modelización empleada (Webb *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2000; Munson *et al.*, 1993; Mullins *et al.*, 2009). Una predicción de la estructura de P5 llevada a cabo mediante el uso del programa de predicción de barriles  $\beta$  transmembrana PRED-TMBB (<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/>) muestra la presencia de diez dominios transmembrana y cinco regiones extracelulares con secuencias hipervariables (Mullins *et al.*, 2009).

En esta Tesis Doctoral, la variabilidad de secuencia de OapA y P5 ha sido objeto de estudio en dos colecciones de aislados clínicos de HiNT. Los resultados obtenidos se muestran en el Capítulo 2 de la sección de Resultados.

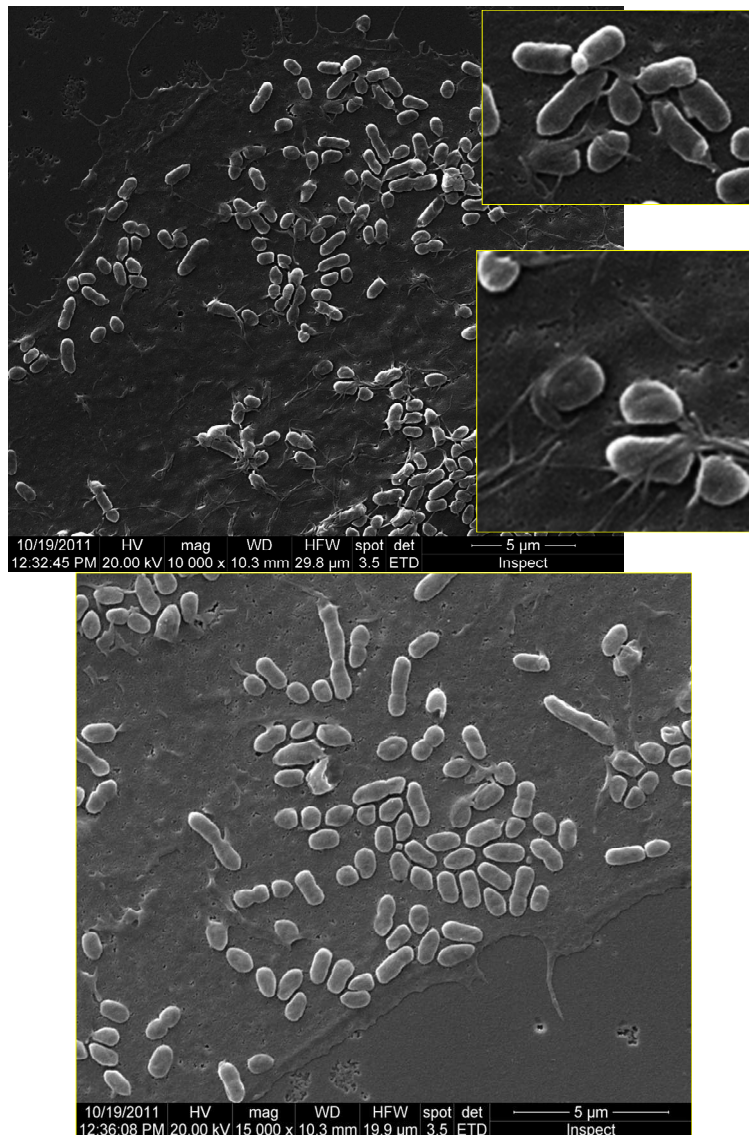
#### 4.4.2. Dinámica de la interacción de HiNT con células del tracto respiratorio humano

Trabajo realizado en nuestro grupo de investigación ha permitido definir un conjunto de eventos que tienen lugar durante la interacción de HiNT con el epitelio pulmonar humano. Estos eventos presentan un conjunto de etapas resumidas en la **Fig. 10**: (i) adhesión del patógeno a la superficie epitelial y formación de microcolonias; (ii) invasión del epitelio pulmonar; (iii) localización intracelular persistente no replicativa en el interior de un compartimento con características de endosoma tardío (Morey *et al.*, 2011; López-Gómez *et al.*, 2012). La invasión del epitelio respiratorio por HiNT es un proceso dependiente de la correcta polimerización de los citoesqueletos de actina y microtúbulos, y del correcto ensamblaje de las balsas lipídicas. El metabolismo de fosfoinosítidos interviene en el proceso de invasión bacteriana, al ser dependiente de la activación de Akt mediada por PI3K (Morey *et al.*, 2011). Además, hemos identificado que la invasión del epitelio respiratorio por HiNT es un proceso dependiente de la actividad de las integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 1$ , y posterior activación de las tirosina quinasas FAK y Src. La invasión de las células epiteliales por HiNT requiere la activación de la GTPasa Rac1, el GEF (GEF, del inglés *Guanine Exchange Factor*) Vav2 y el efector Pak1. El papel de Pak1 está ligado a la inactivación del agente destabilizador de microtúbulos Op18/estatmina, lo que facilita la polimerización de los microtúbulos y la entrada de la bacteria en la célula. Asimismo, la invasión epitelial por HiNT es un proceso controlado por los niveles de AMPc citosólico, de forma que el incremento de la concentración de AMPc en el citosol eucariota reduce los niveles de entrada de HiNT en células epiteliales (López-Gómez *et al.*, 2012).



**Figura 10. (A) Modelo mostrando las etapas del proceso de infección de células epiteliales por HiNT. (B) Modelo mostrando los eventos de señalización activados por HiNT375 durante la invasión de células epiteliales de pulmón A549 (neumocitos tipo II inmortalizados). Las moléculas representadas en negro contribuyen positivamente a la entrada de HiNT375 en células A549. Las moléculas representadas en rojo previenen la invasión de HiNT, dado que su inhibición aumenta el nivel de invasión bacteriana. Las moléculas representadas en azul previenen la invasión de HiNT375, ya que su activación reduce la entrada bacteriana. Las flechas negras son eventos de activación; las flechas rojas son eventos de inhibición (López-Gómez *et al.*, 2012).**





**Figura 11.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de HiNT375 a células del epitelio respiratorio humano A549. Fotografía cortesía del Dr. José Ramos Vivas, Fundación Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

El macrófago alveolar es otro tipo celular residente en el pulmón que juega un papel relevante en el mantenimiento de la función pulmonar. Al comienzo de esta Tesis Doctoral, las características de la interacción de HiNT con el macrófago alveolar eran desconocidas. La disección de esta interacción ha sido objeto de estudio durante en este trabajo y se muestra en el Capítulo 1 de la sección de Resultados.

## 4.5. Infección por HiNT e inducción de la respuesta inflamatoria

La infección del epitelio respiratorio por HiNT desencadena la respuesta inflamatoria del hospedador, mediada por la secreción de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-8 (Erwin *et al.*, 2007). El reconocimiento de estructuras bacterianas por receptores celulares lleva a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo de la célula hospedadora, donde activa la transcripción de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias. Existen evidencias que indican que la infección epitelial por HiNT desencadena la activación de la quinasa JNK (Furukawa *et al.*, 2007), así como la secreción de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  a través de la activación de NF- $\kappa$ B vía TLR2-TAK, de las quinasas MKK3/6-p38 y de las quinasas Raf1-Mek1/2-ERK (Shuto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Regueiro *et al.*, 2009). Por otra parte, la infección epitelial por HiNT estimula la producción de mucina a través de la expresión de *muc2* y *muc5AC*, lo que favorece la hipersecreción mucosa. Durante la infección por HiNT, la quinasa MAP p38 estimula la expresión de *muc5AC* en un proceso regulado negativamente por PI3K-Akt y por TGF- $\beta$  (Wang *et al.*, 2002; Jono *et al.*, 2003); asimismo, NF- $\kappa$ B estimula la expresión de *muc2* en un proceso regulado positivamente por TGF- $\beta$  (Jono *et al.*, 2002).

Las estructuras bacterianas y los receptores celulares implicados en la inducción de una respuesta inflamatoria durante la infección por HiNT identificados son: (i) la molécula de LOS de HiNT, que interacciona con el receptor TLR4 a través de las proteínas LBP y CD14 (Clemans *et al.*, 2000; Wieland *et al.*, 2005); (ii) la molécula de PCho, que interacciona con el receptor PAF, desencadenando la señalización mediada por PI3K (Swords *et al.*, 2001); (iii) las proteínas de membrana externa P6 y P2, que son reconocidas por el receptor TLR2, lo que determina un aumento en la transcripción del gen *muc5AC*, responsable de la producción de mucina (Chen *et al.*, 2004; Galdiero *et al.*, 2004; Shuto *et al.*, 2001); (iv) HiNT estimula el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*), lo que activa la MAP quinasa p38 a través de la tirosin quinasa Src (Mikami *et al.*, 2005). Además, EGFR está implicado en la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B durante la infección por HiNT (Xu *et al.*, 2011); (v) HiNT es reconocido por el receptor TLR3, lo que induce la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias CCL-5 y CXCL-10 (Teng *et al.*, 2010). Por otra parte, el dominio L7 de la proteína de membrana externa P2 muestra una actividad pro-inflamatoria en monocitos U937 (Severino *et al.*, 2010).

Como se ha indicado previamente, el macrófago alveolar juega un papel relevante en el mantenimiento de la función pulmonar. En este trabajo, se ha analizado la respuesta inflamatoria del macrófago alveolar debido a la infección por HiNT. Los resultados se muestran en el **Capítulo 1** de la sección **Resultados**.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



*Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT) es un patógeno oportunista que causa infecciones agudas y que coloniza de forma crónica las vías respiratorias bajas de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas. Con frecuencia, la enfermedad respiratoria crónica subyacente a la infección por HiNT está asociada al tabaquismo y es tratada mediante terapia anti-inflamatoria. El fagocito profesional residente que ejerce función de centinela pulmonar es el macrófago alveolar. La dinámica de la interacción de HiNT con el macrófago alveolar es un aspecto desconocido. En este trabajo formulamos la siguiente **hipótesis: “La exposición al humo de tabaco y la terapia anti-inflamatoria modulan la interacción de HiNT con el macrófago alveolar”**.

HiNT presenta un grado elevado de variabilidad genética y antigénica entre cepas. Se desconoce si, a pesar de esta variabilidad, los aislados clínicos de HiNT presentan patrones moleculares prevalentes que pueden resultar ventajosos para el patógeno durante la colonización y/o infección del hospedador. En este trabajo planteamos la siguiente **hipótesis: “Los aislados clínicos de HiNT presentan un patrón molecular prevalente que puede resultar ventajoso para el patógeno en su interacción con elementos de la inmunidad innata del hospedador durante el proceso infeccioso”**.

Las **hipótesis** planteadas fueron abordadas mediante los siguientes **objetivos**:

1. Análisis de las características de la interacción del patógeno respiratorio *H. influenzae* no tipable con el macrófago alveolar.
2. Estudio de la modulación de la interacción *Haemophilus influenzae* no tipable-macrófago alveolar por la exposición celular a humo de tabaco y a terapias anti-inflamatorias.
3. Análisis de patrones moleculares y fenotípicos en cepas clínicas de *Haemophilus influenzae* no tipable con origen patológico diverso, aisladas de individuos no relacionados.
4. Análisis de patrones moleculares en sets de cepas clínicas de *Haemophilus influenzae* no tipable aisladas de pacientes respiratorios crónicos en episodios independientes de agudización de la enfermedad crónica subyacente.

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan a continuación en dos capítulos.

El **capítulo 1** incluye los resultados obtenidos a partir de los Objetivos 1 y 2. Esta parte del trabajo ha generado una publicación que se adjunta en el **anexo III (Martí-Lliteras P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D.W., Saus, C., Sauleda, J., Agustí, A.G., Bengoechea J.A. y Garmendia, J. (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. Infect Immun 77:4232-4242).**

El **capítulo 2** incluye los resultados obtenidos a partir de los objetivos 3 y 4. Esta parte del trabajo ha generado una publicación que se adjunta en el **anexo III (Martí-Lliteras P, López-Gómez A, Mauro S, Hood DW, Viadas C, Calatayud L, Morey P, Servin A, Liñares J, Oliver A, Bengoechea JA y Garmendia J. (2011) Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. (PLoS ONE 6(6): e21133).**

Los capítulos 1 y 2 se han organizado con estructura “tipo publicación”, incluyendo cada uno de ellos una introducción específica del contenido del capítulo, una descripción de los métodos empleados y los resultados obtenidos, y una discusión de dichos resultados.

# CAPÍTULO 1





# Capítulo 1: Disección de la infección del macrófago alveolar por *Haemophilus influenzae* no tipable

## 1.1. INTRODUCCIÓN

El tracto respiratorio es una de las mayores superficies del cuerpo humano en contacto con el medio ambiente y, por este motivo, es una de las principales vías de entrada de microorganismos. Los componentes de la inmunidad innata pulmonar incluyen barreras mecánicas, elementos humorales, epitelio pulmonar, y células del sistema inmune residentes en el pulmón como los macrófagos alveolares (Standiford *et al.*, 1997; Whitsett *et al.*, 2002). Los macrófagos alveolares son fagocitos profesionales y células presentadoras de antígeno que patrullan los pulmones a modo de centinela. Los macrófagos están dotados de receptores PRR que reconocen PAMPs. Los macrófagos alveolares reconocen, fagocitan y procesan material extraño usando la ruta fagolisosomal, jugando un papel esencial en la eliminación de infecciones pulmonares (Mizgerd *et al.*, 2008). El humo de tabaco es el principal factor de riesgo relacionado con el desarrollo de cáncer de pulmón, EPOC y de un repertorio de infecciones respiratorias (Ruiz *et al.*, 1999). En este contexto, la llamada “*British hypothesis*” indica que las infecciones bronquiales recurrentes favorecen la obstrucción progresiva de las vías aéreas en muchos fumadores (Fletcher *et al.*, 1959). La exposición al humo de tabaco altera la inmunidad pulmonar debido a la disrupción de la función muco-ciliar, la hipersecreción de moco y la destrucción de la integridad de la mucosa respiratoria (Sopori *et al.*, 2002). El humo de tabaco causa también estrés oxidativo, que provoca inflamación pulmonar local mediante la activación de las células epiteliales, los macrófagos alveolares, los neutrófilos y los linfocitos T (Barnes *et al.*, 2008). Estas células secretan citoquinas inflamatorias, proteasas y ROS, causando necrosis, daño tisular y una amplificación de la respuesta inflamatoria con reclutamiento de neutrófilos al pulmón. El daño tisular promueve la liberación de mediadores inflamatorios que contribuyen al deterioro tisular progresivo e irreversible en los pulmones de individuos fumadores (Wang *et al.*, 2001; Wickenden *et al.*, 2003; Witherden *et al.*, 2004). Estas alteraciones favorecen el acceso de microorganismos a los pulmones y la colonización microbiana de los mismos (Sethi *et al.*, 2000; Sethi *et al.*, 2001; Sethi *et al.*, 2008). Apoyando esta hipótesis, ratones expuestos a humo de

tabaco muestran una disminución en su capacidad para eliminar una infección por *P. aeruginosa* (Drannik *et al.*, 2004). La exposición de neutrófilos del torrente sanguíneo humano a nicotina inhibe su capacidad para eliminar *Actinomyces naeslundii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, inhibiendo funciones defensivas de neutrófilos y monocitos como la producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno (Pabst *et al.*, 1995). La exposición a nicotina provoca una disminución de la capacidad endocítica y fagocítica de las células dendríticas humanas, además de una menor producción de citoquinas inflamatorias (IL-12) (Nouri-Shirazi *et al.*, 2003). Existe información limitada sobre el efecto del humo de tabaco y de la nicotina en la interacción celular y molecular entre los patógenos y los macrófagos alveolares.

Los glucocorticoides son compuestos usados para controlar enfermedades inmunológicas e inflamatorias, incluyendo las enfermedades respiratorias crónicas. Los glucocorticoides presentan un papel importante como supresores de la respuesta inflamatoria (Garmendia *et al.*, 2012). Sin embargo, son poco conocidos los efectos que pueden tener sobre el hospedador y sus mecanismos de defensa frente a microorganismos patógenos.

HiNT coloniza asintóticamente las vías respiratorias altas en individuos sanos y es un patógeno oportunista de las vías respiratorias bajas, senos faciales y oído medio. HiNT causa enfermedades invasivas como meningitis e infecciones respiratorias agudas como otitis media, sinusitis, neumonía y bronquitis (Rao *et al.*, 1999). HiNT es el patógeno más frecuentemente aislado de las vías respiratorias bajas de pacientes de enfermedades respiratorias crónicas como EPOC y bronquitis crónica. El LOS es el glicolípido más importante en la superficie de HiNT y está compuesto por una molécula de lípido A anclada a la membrana, unida a cadenas de oligosacáridos que se extienden desde la superficie celular bacteriana (Schweda *et al.*, 2007). PCho es un sustituyente frecuente de las extensiones de la cadena del LOS de HiNT (Weiser *et al.*, 1998). Esta modificación es un factor de virulencia involucrado en la adhesión e invasión del epitelio respiratorio por HiNT, lo que favorece la persistencia del patógeno en la superficie mucosa del tracto respiratorio (Swords *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2001). Para mayor detalle, el **apartado 4.3.1.** de la sección Introducción expone todas las sustituciones del LOS conocidas, así como su localización y variabilidad.

La importancia de HiNT como patógeno respiratorio ha sido demostrada, y los macrófagos alveolares juegan un papel esencial en la eliminación de las infecciones bacterianas respiratorias. El origen de este trabajo está en el desconocimiento acerca de las características de la interacción entre HiNT y los macrófagos alveolares, así como sobre el papel de los sustituyentes del LOS de esta bacteria en dicha interacción.

Además, dada la asociación clínica entre humo de tabaco y las infecciones respiratorias causadas por HiNT, planteamos la posibilidad de que el humo de tabaco o componentes concretos del mismo pueden modificar las características de la interacción entre HiNT y los macrófagos alveolares.

A continuación se presenta el trabajo realizado para diseccionar las características de la interacción entre HiNT y el macrófago alveolar, así como el impacto del humo de tabaco, la nicotina y los glucocorticoides en la capacidad fagocítica del macrófago alveolar.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

La cepa HiNT398 (también conocida como HiNT157925 (Regueiro *et al.*, 2009) es una cepa aislada de un paciente EPOC en el Hospital Universitario Son Dureta (Palma de Mallorca, España), que expresa un nivel alto de PCho en su superficie. La cepa de HiNT375 es un aislado clínico de otitis media que expresa un nivel intermedio de PCho en su superficie. Esta cepa fue descrita originalmente por (Bouchet *et al.*, 2003). Las cepas de HiNT se crecieron en placas de Agar-chocolate (Biomérieux) o en placas de BHI-Agar suplementado con hemina (10 µg/ml) y β-NAD (10 µg/ml) (sBHI-Agar). Los cultivos líquidos se realizaron en sBHI. En todos los casos, las bacterias se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

A continuación, se describe brevemente la construcción de un conjunto de cepas mutantes empleadas durante este trabajo que fueron generadas por el Dr. Pau Morey en nuestro laboratorio. Las secuencias empleadas para el diseño de cebadores de los genes de interés proceden de la cepa *H. influenzae* Rd KW20 (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?database=ghi>). Los genes *lic1BC* (HI1538 y HI1539), *siaB* (HI1279), *lic2A* (HI550), *lgtF* (HI653), *lpsA* (HI765) y *opsX* (HI261), junto con sus respectivas regiones adyacentes, se amplificaron a partir de ADN genómico de la cepa HiNT375 con polimerasa *Taq* y las parejas de cebadores *lic1BC-F1/lic1BC-R1*, *siaB-F1/siaB-R1*, *lic2A-F1/lic2A-R1*, *lgtF-F1/lgtF-R1*, *lpsA-F1/lpsA-R1*, y *opsX-F1/opsX-R1*, respectivamente (Tabla 5). Los productos de PCR obtenidos, de aproximadamente 2,5 kb para todos los genes excepto *lic1BC* (2 kb), se clonaron en pGEM-T Easy (Promega). Los plásmidos pGEM-T/*lic1BC*, pGEM-T/*siaB*, pGEM-T/*lic2A*, pGEM-T/*lgtF*, pGEM-T/*lpsA* y pGEM-T/*opsX* se utilizaron como molde en reacciones de PCR inversa con polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores *lic1BC-F2/lic1BC-R2*, *siaB-F2/siaB-R2*, *lic2A-*

F2/lic2A-R2, lgtF-F2/lgtF-R2, lpsA-F2/lpsA-R2, y opsX-F2/opsX-R2, respectivamente (**Tabla 5**). Estas amplificaciones generaron una delección de aproximadamente 30 pb en la región central de cada gen. Los productos de PCR inversa se utilizaron como vectores en los que se clonó un fragmento romo de ADN de 1,1 kb que contiene el gen *ermC*. *ermC* confiere resistencia a eritromicina y fue obtenido mediante digestión *SmaI* a partir del plásmido pBSLerm (Swords *et al.*, 2000). Así, se generaron los plásmidos pPMO-6, pPMO-7, pPMO-8, pPMO-9, pPMO-10 y pPMO-11, que contienen casetes de disrupción para los genes *lic1BC*, *siaB*, *lic2A*, *lgtF*, *lpsA* y *opsX*, respectivamente. Estos plásmidos fueron digeridos con *NotI* para obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 3,6 kb (3,1 para *lic1BC*). Los casetes de disrupción se utilizaron para transformar la cepa HiNT375 mediante el método M-IV. La generación de las cepas mutantes se llevó a cabo mediante la selección de eventos de doble recombinación homóloga para cada uno de los genes, los cuales fueron sustituidos por el casete de disrupción correspondiente. Los eventos de doble recombinación homóloga fueron seleccionados mediante plaqueo en sBHI-Agar con eritromicina 10 µg/ml. Las disrupciones se comprobaron mediante PCR. De esta forma, se generaron las cepas HiNT375Δ*lgtF*, HiNT375Δ*lic1BC*, HiNT375Δ*lpsA*, HiNT375Δ*siaB*, HiNT375Δ*lic2A*, HiNT375Δ*lgtF*Δ*lpsA* y HiNT375Δ*opsX*.

La cepa doble mutante HiNT375Δ*lgtF*Δ*lpsA* se generó mediante dos eventos sucesivos de doble recombinación homóloga. El primero se llevó a cabo con el fragmento de ADN lineal que contiene el casete de disrupción Δ*lgtF::ermC*, obtenido a partir de la digestión de pPMO-9 con *NotI*, e introducido en la cepa HiNT375 mediante el método M-IV. De esta forma, se generó la cepa HiNT375Δ*lgtF*. El segundo evento de recombinación se llevó a cabo sobre la cepa HiNT375Δ*lgtF* con el casete de disrupción Δ*lpsA::Km<sup>r</sup>*. Para generar este casete, el vector procedente de la PCR inversa de pGEM-T/*lpsA*, generado con los cebadores *lpsA-F2/lpsA-R2*, se utilizó para clonar un fragmento romo de ADN que contiene un casete de resistencia a Km (*Km<sup>r</sup>*). Este fragmento se obtuvo mediante digestión con *HincII* a partir del plásmido pUC4K (GE Healthcare). Así, se generó pPMO-12, que fue digerido con *NotI*, creando un fragmento de 3,8 kb que contiene el casete de disrupción Δ*lpsA::Km<sup>r</sup>*. El casete de disrupción Δ*lpsA::Km<sup>r</sup>* se introdujo en HiNT375Δ*lgtF* mediante el método M-IV y se seleccionaron los eventos de doble recombinación mediante plaqueo en sBHI-Agar con eritromicina 10 µg/ml y kanamicina 11 µg/ml. Las disrupciones se comprobaron mediante PCR. El listado completo de cepas mutantes se muestra en la **tabla 23, anexo II**.

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para la generación de cepas mutantes

Nombre	Secuencia (5' – 3')
lic1BC-F1	GAAACCTATTGCAATCAGACAAATAAA
lic1BC-R1	AACTCTATTTTCACCTGAAAATCTGAC
siaB-F1	ATCTTCATCACTGATTTTTTTTTGTTGG
siaB-R1	AATTGATTAATCCAATGTCACAATGTT
lic2A-F1	TAGGATTGAAATCTACACGTTCTAATA
lic2A-R1	AACTCTATTTTCACCTGAAAATCTGAC
lgtF-F1	GCGGTTGAATTAACCTCCAACACACCTTGC
lgtF-R1	GATGCCCTTGGGTTGGCGAACAACCTATTT
lpsA-F1	TACTTAGCTCGCATTCTCAGGGCAGGGTGA
lpsA-R1	AACTCAAATGCTCATCAGAACAGGCTGA
opsX -F1	TTTCAAAGGAACGTTTTAAACGGTTCAGAT
opsX-R1	CACTACCCATAAGGAGCTACTTGGCCCTT
lic1BC-F2	AGCAGCAGGATTAGGCAGCCGATTTA
lic1BC-F1	GAAACCTATTGCAATCAGACAAATAAA
siaB-F2	CTTTAGATATTCGTAATGCAATGGAAA
siaB-R2	CGGCGGTGCCTTGTGAAATATTAAGTG
lic2A-F2	AACTTGAGAAACAAACTAAAATTCCAC
lic2A-R2	TAAAAATATCATTAAAATCAAAACGTG
lgtF-F2	TAATGATTCACCTGTACATGAAAAAGTGGA
lgtF-R2	ACATAATCGGGATACCAGCCTGAATGGCGA
lpsA-F2	TCTGATGATATTCATGTCTTAAAATTAGAA
lpsA-R2	ATTTTCCCCAAATGAATATCATCTTCAA
opsX-F2	CAGAAAAAGATTGGCTAATTGAACGTTATG
opsX-R2	TACGAGAAAAATCAATAAATTGATCGGCAA

### 1.2.2. Transformación química de *E. coli* con cloruro de rubidio

Este método se utilizó para generar cepas de *E. coli* competentes para su transformación con ADN plasmídico. Para ello, 1 ml de un cultivo de *E. coli* crecido en fase estacionaria en medio LB se inoculó en 100 ml de medio LB con MgSO<sub>4</sub> 20 mM. Este cultivo se incubó a 37°C con agitación (180 r.p.m.) hasta que alcanzó una DO<sub>600</sub>= 0,4-0,6. Las bacterias se centrifugaron (4000 × g, 5 min, 4°C) y se resuspendieron en 0,4 volúmenes (respecto a los 100 ml de cultivo inicial) de TFB1 frío (30 mM CH<sub>3</sub>COOK, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) glicerol, pH 5,8). Las bacterias se incubaron en hielo durante 5 min antes de ser recogidas de nuevo mediante centrifugación (2000 × g, 5 min, 4°C). El cultivo se resuspendió en un 1/25 volumen (respecto al cultivo inicial)

de TFB2 frío (10 mM MOPS o PIPES, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15% (v/v) glicerol, pH 6,5) y se incubó en hielo durante 60 min. Seguidamente, las bacterias competentes se distribuyeron en alícuotas de 200 µl y se congelaron rápidamente a -80°C.

Las bacterias competentes se transformaron con ADN plasmídico mediante un protocolo de choque térmico. Para ello, una alícuota de bacterias competentes se descongeló en hielo y se añadió el ADN de interés. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y, a continuación, fue sometida a un choque térmico de 90 s a 42°C en un baño termostático. Seguidamente, la mezcla se mantuvo en hielo durante 2 min y se añadieron 800 µl de medio LB previamente atemperado a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante 90 min en agitación (180 r.p.m.) y se plaqueó en LB-Agar con los antibióticos adecuados para seleccionar colonias transformadas con el ADN plasmídico de interés.

### 1.2.3 Transformación de *H. influenzae* mediante inducción de la competencia natural (Método M-IV)

Este método se utilizó para la transformación de *H. influenzae* con ADN lineal. La competencia natural en *H. influenzae* se desarrolló en medio M-IV, tal y como fue descrito con anterioridad (Barcak *et al.*, 1991; Herriott *et al.*, 1970). El medio M-IV, cuya preparación está detallada en la **Tabla 6**, es un medio en el que no se produce crecimiento bacteriano y que se prepara fresco para cada transformación a partir de las soluciones 21, 22, 23, 24 y 40.

En detalle, 50 µl de un cultivo en fase estacionaria de HiNT crecido en medio sBHI se inocularon en 35 ml de sBHI atemperado en un matraz estéril de 500 ml que se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y en agitación (180 r.p.m.). Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub>= 0.4–0.6, las bacterias se recogieron por centrifugación (6000 × *g*, 4 min, TA). El *pellet* se lavó con 20 ml de medio M-IV a TA. La suspensión bacteriana se centrifugó (6000 × *g*, 4 min, TA) y el *pellet* se resuspendió en 35 ml de M-IV a TA. La suspensión bacteriana se transfirió a un matraz estéril de 500 ml que se agitó a 100 r.p.m., 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 100 min. En este momento, la mayor parte del cultivo bacteriano ha desarrollado competencia natural que se mantendrá durante al menos 1 h. La suspensión bacteriana se distribuyó en alícuotas de 1 ml a las que se añadieron 176 µl de glicerol 100% por alícuota (15% v/v) y se congelaron a -80°C.

Para transformar las bacterias competentes, se descongeló una alícuota en frío, se

centrifugó y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de M-IV fresco. Se añadió al menos 1 µg de ADN lineal y las bacterias se incubaron con el ADN de interés durante 30 min a 37°C y 180 r.p.m. Se añadieron 5 ml de medio sBHI y la suspensión se incubó a 37°C y 180 r.p.m. durante 2 h, tras las cuales se plaquearon 100 µl de la suspensión. Alternativamente, la suspensión se centrifugó (14.000 × *g*, 1 min), el *pellet* se resuspendió en 100 µl de PBS y se plaqueó en sBHI-Agar. Las bacterias que integraron el ADN exógeno en su genoma mediante un evento de doble recombinación homóloga crecieron formando colonias que fueron seleccionadas en sBHI-Agar con los antibióticos adecuados.

**Tabla 6:** Preparación del medio M-IV.

<b>Solución 21 (S21, pH = 7.4)</b>	<b>Concentración</b>
Ácido L-Aspártico	4,0 mg/ml
Ácido L-Glutámico	0,2 mg/ml
Ácido Fumárico	1,0 mg/ml
NaCl	4,7 mg/ml
Tween 80	0,02 % (v/v)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,87 mg/ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,67 mg/ml
Solución autoclavada	
<b>Solución 22 (S22)</b>	<b>Protocolo para 100 ml</b>
L – Cisteína	0,04 g
L – Tirosina	0,1 g
Se disolvieron en 10 ml de 1N HCl a 37°C. A continuación se enrasó a 100 ml con agua destilada y se añadió:	
L – Citrulina	0,06 g
L – Fenilalanina	0,2 g
L – Serina	0,3 g
L – Alanina	2 mg/ml
Solución esterilizada por filtración	
<b>Solución 23 (S23)</b>	<b>Concentración</b>
CaCl <sub>2</sub>	0,1 M
Solución autoclavada	
<b>Solución 24 (S24)</b>	<b>Concentración</b>
MgSO <sub>4</sub>	0,1 M
Solución autoclavada	
<b>Solución 40 (S40)</b>	<b>Concentración</b>
Casaminoácidos libres de vitamina	5% (p/v)
Solución esterilizada por filtración	
<b>Preparación de M-IV:</b>	
Se mezclan las soluciones S21, S22, S23, S24 y S40 en una proporción de 100:1:1:1:1, respectivamente.	



#### 1.2.4. Inmunodetección de PCho a partir de colonia

Los niveles de PCho presentes en la molécula de LOS de las cepas de HiNT empleadas en este estudio se determinaron mediante la inmunodetección a partir de colonia (del inglés *colony blot*) (Swords *et al.*, 2000). La biomasa correspondiente a cada cepa crecida en una placa de Agar-chocolate, se recogió con 1 ml de solución amortiguadora de fosfato salino PBS (NaCl 145 mM; NaHPO<sub>4</sub> 7,7 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,27 mM; a un pH=7,2). Diluciones seriadas de la suspensión bacteriana generada se plaquearon en sBHI-Agar. Las placas que contenían entre 100 y 300 colonias se utilizaron para transferir la biomasa bacteriana a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó dos veces durante 15 min/lavado en tampón TSBB (0,5 M NaCl, 0,5% Tween-20, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) y se incubó durante 16 h a 4°C con el anticuerpo monoclonal ratón anti-PCho TEPC-15 (Sigma) diluido 1:10.000 en TSBB. A continuación, las membranas fueron sometidas a cinco lavados consecutivos de 5 min con TSBB, e incubadas durante 16 h en TSBB con un anticuerpo policlonal cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Caltag) diluido 1:10.000. Finalmente, las membranas se lavaron cinco veces con TSBB, se incubaron en tampón AP (100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5) y se revelaron con 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP, Sigma) y nitroazul de tetrazolio (NBT, Sigma) disueltos en tampón AP. Tras varios minutos (entre 1 y 5), las colonias que expresan PCho en la molécula de LOS y que, por tanto, reaccionaron con el anticuerpo TEPC-15, generaron una señal morada. La reacción se paró añadiendo 10 ml de agua d.o.i.

#### 1.2.5. Cultivo celular, mantenimiento de líneas celulares e infección de células en cultivo

La línea celular de macrófagos alveolares de ratón MH-S (ATTC CRL-2019) se cultivó en RPMI-1640 (PAA) suplementado con suero bovino fetal 10% inactivado (SBF, PAA), 10 mM HEPES (PAA) y una combinación de antibióticos y antimicóticos (PAA) que contiene penicilina 100 unidades/ml, sulfato de estreptomina 0,1 mg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml. Este medio fue denominado RPMI completo. Las células se crecieron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, en una atmósfera saturada de humedad al 95%, con 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C. El SBF se inactivó a 60°C durante 1 h.

Los **experimentos de infección** se realizaron en placas de 24 pocillos. Cuando el

experimento requirió la observación del material infectado con un microscopio de fluorescencia, las células se crecieron en pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro. Las células fueron depositadas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $7 \times 10^5$  células/pocillo 15 h antes de la infección, en RPMI completo. Las cepas de HiNT empleadas para infectar las células en cultivo se crecieron en placas de Agar-chocolate durante 16 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. La biomasa de las cepas de HiNT crecidas se recogió con 1 ml de PBS. Esta suspensión bacteriana se ajustó con PBS a una DO<sub>600</sub>=1 (aproximadamente 10<sup>9</sup> u.f.c./ml). Previo a la infección, las células se lavaron tres veces con 1 ml de PBS y se añadió 1 ml de medio RPMI-1640 con SBF y HEPES por pocillo. Se añadieron 50 µl de la suspensión bacteriana generada por pocillo, para obtener una multiplicidad de infección aproximada de 100 bacterias por célula (100:1). Cuando el experimento lo requirió, se analizó la viabilidad celular mediante la cuantificación por ELISA de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo. Para ello, se usó el kit comercial CytoTox 96 (Promega). El porcentaje de viabilidad celular se calculó como  $(DO_{490} \text{ muestra} - DO_{490} \text{ RPMI}) / (DO_{490} \text{ control positivo} - DO_{490} \text{ RPMI}) \times 100$ .

La **dinámica de la infección** del macrófago alveolar MH-S por HiNT se analizó mediante infección de las células en cultivo y procesamiento del material infectado para recuento de u.f.c. o para análisis mediante microscopía. El tiempo de infección fue de 1, 2 ó 3 h para la puesta a punto de los experimentos de adhesión bacteriana. Una vez se fijó el tiempo de adhesión más conveniente, todos los experimentos de adhesión, fagocitosis y tráfico intracelular se realizaron infectando los macrófagos alveolares durante 1 h. El tiempo de infección es el “tiempo de contacto” bacteria-macrófago.

**Experimentos de adhesión:** una vez transcurrido el tiempo de contacto, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS y las células se lisaron con 300 µl de PBS-saponina 0,025% durante 10 min a TA. Se realizaron diluciones seriadas de los lisados celulares y se plaquearon en sBHI-Agar. Las bacterias se enumeraron mediante recuento de u.f.c. El porcentaje de adhesión se determinó como % adhesión =  $(n^{\circ} \text{ de bacterias recuperadas de un pocillo infectado} / n^{\circ} \text{ de bacterias empleadas para la infección de un pocillo}) \times 100$ . Alternativamente, cuando la infección se llevó a cabo sobre cubreobjetos, las células fueron fijadas para su procesamiento posterior mediante microscopía (**apartado 1.2.9.** de la sección Materiales y Métodos). Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos en tres ocasiones independientes ( $n \geq 9$ ).

**Experimentos de fagocitosis:** una vez transcurrido el tiempo de contacto, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en medio RPMI-1640 con HEPES y SBF al que se añadió gentamicina 300 µg/ml durante 1 h. La gentamicina es un antibiótico

que se utilizó para eliminar selectivamente la población bacteriana extracelular. Una vez transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y las células fueron lisadas con 300  $\mu$ l de PBS-saponina 0,025% durante 10 min a TA. Se realizaron diluciones seriadas que fueron plaqueadas en sBHI-Agar. Las bacterias intracelulares se enumeraron mediante recuento de u.f.c. Cuando la infección se realizó sobre células depositadas sobre cubreobjetos, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se fijaron para su procesamiento posterior para microscopía (**apartado 1.2.9.** de la sección Materiales y Métodos). Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos en tres ocasiones independientes ( $n \geq 9$ ).

**Experimentos de tránsito fagolisosomal:** las células MH-S fueron infectadas con HiNT durante 1 h. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en medio RPMI-1640 con HEPES y SBF al que se añadió gentamicina 300  $\mu$ g/ml durante 1 h. A continuación, este medio se sustituyó por RPMI-1640 con HEPES y SBF al que se añadió gentamicina 16  $\mu$ g/ml. Los experimentos se extendieron durante 8 h para analizar el tránsito fagolisosomal del material fagocitado a lo largo del tiempo. A distintos tiempos, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y las células fueron lisadas con 300  $\mu$ l de PBS-saponina 0,025% durante 10 min a TA. Se realizaron diluciones seriadas que fueron plaqueadas en sBHI-Agar. Las bacterias intracelulares se enumeraron mediante recuento de u.f.c. Cuando la infección se realizó sobre células depositadas sobre cubreobjetos, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se fijaron para su procesamiento posterior para microscopía (**apartado 1.2.9.** de la sección Materiales y Métodos).

Cuando fue necesario, los experimentos de adhesión, fagocitosis o tráfico intracelular de HiNT en macrófagos alveolares MH-S se llevaron a cabo sobre células pre-expuestas a compuestos químicos que modulan de forma selectiva distintas funciones celulares. Para ello, los macrófagos alveolares MH-S se depositaron sobre pocillos como se ha descrito previamente. Pevio al experimento, las células se lavaron tres veces con 1 ml de PBS y se añadió 1 ml de RPMI-1640 con HEPES y SBF. A continuación, se añadieron de forma independiente los siguientes inhibidores químicos: Citocalasina D 5  $\mu$ g/ml durante 30 min (disuelta en DMSO, inhibe la polimerización del citoesqueleto de actina); Nocodazol 10  $\mu$ M durante 1 h (disuelto en DMSO, inhibe la polimerización del citoesqueleto de microtúbulos); Metil- $\beta$ ciclodextrina (M $\beta$ CD) 5mM durante 1 h (disuelto en agua, depleciona el colesterol de las balsas lipídicas de la membrana plasmática); LY294002 10  $\mu$ M durante 1 h (disuelto en DMSO, inhibe la señalización dependiente de PI3K); Dexametasona 1  $\mu$ M durante 2 h (disuelta en agua, glucocorticoide anti-inflamatorio, activa la fosfatasa MKP-1). Todos los agentes farmacológicos fueron proporcionados por Sigma. Los compuestos se añadieron sobre

pocillos que contenían 1 ml de medio RPMI-1640 con HEPES y SBF, y se mantuvieron en los pocillos durante el tiempo de contacto bacteriano. En el caso de los experimentos con dexametasona, ésta se mantuvo en los pocillos durante todo el experimento, incluida la incubación con gentamicina. Cuando fue necesario, las células se pre-expusieron a nicotina. La nicotina se añadió al medio de cultivo en forma de sal de nicotina sódica 15 h antes de la infección. Se emplearon las siguientes concentraciones: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M. Se utilizó tartrato sódico como control, que se añadió a pocillos control en paralelo a la nicotina. La nicotina sódica y el tartrato sódico se mantuvieron durante los tiempos de contacto bacteriano.

Para monitorizar la capacidad de los macrófagos para fagocitar partículas inertes, se emplearon bolas de látex. Los macrófagos alveolares MH-S se depositaron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos como se ha descrito anteriormente. Los macrófagos se incubaron durante 1 h con bolas de látex de 1  $\mu$ m de diámetro conjugadas con proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) (Sigma), con una multiplicidad de 20 bolas/célula, dependiendo del experimento. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 1 h con medio RPMI-1640 con HEPES y SBF. Las células fueron fijadas y procesadas para microscopía de inmunofluorescencia. Cuando el experimento lo requirió, las células fueron expuestas a extracto de humo de tabaco durante 3 h antes de la adición de las bolas de látex.

### 1.2.6. Preparación y aplicación de extracto de humo de tabaco

El extracto de humo de tabaco (EHT) se preparó a partir de cigarrillos comerciales (0,8 mg de nicotina, 10 mg de alquitrán, 10 mg de CO; Phillip Morris, España). Para ello, se consumió un cigarrillo usando un aparato basado en una jeringa modificada que dirige el humo dentro de un matraz estéril que contiene 5 ml de medio RPMI-1640 con HEPES y SBF. Se añadieron 60 ml de humo al interior del matraz en un periodo de 10 s, seguidos de un descanso de 30 s. Este proceso se repitió cinco veces por cigarrillo. El EHT se filtró con un filtro de 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore). La solución resultante fue designada solución EHT 100% y se usó en los 30 min posteriores a su obtención (Regueiro *et al.*, 2009). Cuando fue necesario, las células MH-S se incubaron 3 h antes de la infección con HiNT en 1 ml de medio RPMI-1640 con HEPES, SBF y EHT 10% (dilución 1/10 en RPMI-1640 con Hepes y SBF de la solución EHT 100%). La exposición a EHT se mantuvo durante el tiempo de contacto bacteriano. Alternativamente, la incubación de las células con humo de tabaco se realizó durante 3 h antes de la infección, se retiró el medio con EHT, se lavaron los pocillos con PBS y se

realizó la infección en medio sin EHT. Para el análisis del efecto del EHT o de la dexametasona sobre el tránsito fagolisosomal, las células infectadas se incubaron con dichos agentes únicamente durante el tratamiento con gentamicina.

### 1.2.7. Purificación de macrófagos alveolares humanos

Los participantes (12 personas que nunca han fumado, 16 fumadores con función pulmonar normal y 14 pacientes EPOC, todos varones) fueron reclutados en la Unidad de Endoscopia del Hospital Universitario Son Dureta (Palma de Mallorca, España). El criterio de inclusión se basó en que los pacientes requerían una broncoscopia para evaluación clínica. En la **Tabla 7** se muestran los datos clínicos de los sujetos incluidos en este estudio. Todos los pacientes fueron informados de los riesgos, naturaleza, objetivos, características y potenciales beneficios del estudio, el cual fue anteriormente aprobado por el Comité Ético del Hospital. En el momento de la toma de muestra, siete pacientes estaban siendo tratados con esteroides inhalados, ninguno estaba siendo tratado con esteroides orales. Se excluyeron los individuos que padecían otra enfermedad pulmonar, o un fallo renal, cardíaco o hepático.

**Tabla 7.** Información clínica de los pacientes incluidos en este estudio.

Grupo	n	Edad (años)	Historial fumador (paq/año)	VEF (% de referencia)	Cont. cel. total	% Macrófagos	% Linfocitos	% Neutrófilos	Vol. BALF (ml)
No fumadores	12	60±3	0	109±14	25±1	90±1	6±1	1±0,4	70±7
Fumadores con función pulmonar normal	16	55±3	44±5	102±10	75±19	91±2	5±2	1±0,2	94±4
Pacientes EPOC	14	57±2	60±3	72±5	46±1	85±3	9±2	3±2	48±7

El volumen de BAL recogido fue significativamente menor en los pacientes EPOC que en los individuos no fumadores; el número de células fue mayor en los individuos fumadores y en los pacientes EPOC que en los no fumadores. Las muestras obtenidas de los BALs fueron procesadas en condiciones de esterilidad y utilizadas en un tiempo inferior a 1 h tras su recogida. Para ello, los BAL se centrifugaron a 400 x g durante 10 min a 4°C; las células se resuspendieron en medio RPMI completo a una concentración final de 10<sup>6</sup> células/ml, y se depositó 1 ml por pocillo en placas de 24 pocillos. Transcurridas 2 h, las células no adheridas a la superficie del pocillo se retiraron

mediante 3 lavados con PBS, y se procedió a la realización de experimentos de fagocitosis, tal y como se describe en el **apartado 1.2.5.** de la sección Materiales y Métodos.

### 1.2.8. Microscopía electrónica de transmisión

Las células fueron depositadas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2,8 \times 10^6$  células/pocillo 15 h antes de la infección y mantenidas en RPMI completo. Previo a la infección, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 4 ml/pocillo de medio RPMI-1640 con Hepes y SBF. Las células se infectaron con HiNT, con una multiplicidad de infección de 100:1, como se ha descrito previamente (200  $\mu$ l/pocillo de una suspensión bacteriana con  $OD_{600nm}=1$ ). Transcurrida 1 h, los pocillos se lavaron tres veces con PBS frío. Las células se fijaron con glutaraldehído 4% manteniendo las placas en hielo (1 ml/pocillo, 10 min). Las células se recogieron con un descamador celular y se centrifugaron durante 5 min a 4°C y 14000 x *g*. El *pellet*, en forma de bloque, se lavó durante 20 min con glutaraldehído 2% en tampón Cacodilato 0,17 M (pH 7,4) y se centrifugó durante 5 min a 4°C y 14000 x *g*). Las muestras se incubaron con glutaraldehído 2% en tampón Cacodilato 0,17M (pH 7,4) durante 24 h a 4°C. El bloque de células se trató con  $OsO_4$  durante 1 h y se tiñó con acetato de uranilo durante 30 min. El *pellet* fue deshidratado y embebido en resina Epoxi Spurr's. Se realizaron cortes semi-finos, que se tiñeron con colorante de Richardson para su observación al microscopio óptico (Olympus Bx41). Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de grosor, se montaron sobre rejillas de cobre, y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-600. Esta parte de trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Carles Saus, Hospital Universitario Son Dureta.

### 1.2.9. Microscopía de inmunofluorescencia

Los macrófagos alveolares crecidos e infectados sobre cubreobjetos de vidrio se fijaron con paraformaldehído (PFA) 3% durante 20 min a TA. A continuación, se lavaron tres veces con PBS y se mantuvieron en 1 ml de PBS con 14  $\mu$ l de  $NH_4Cl$  1M. Alternativamente, para la tinción de endosoma temprano EEA1, las células se fijaron con PFA 2,5% durante 10 min a TA, seguido de 5 min a -20°C con una mezcla de PFA 1% y metanol 80%.

Las bacterias y las moléculas o estructuras celulares de interés se tiñeron para ser analizadas mediante inmunofluorescencia directa o indirecta. Los anticuerpos primarios usados en este trabajo están descritos en la **Tabla 8**. Los anticuerpos secundarios burro anti-conejo, burro anti-rata, burro anti-ratón y burro anti-cabra, conjugados con rodamina-RedX (RRX) o con Cy2, fueron proporcionados por Jackson Immunological, y se utilizaron a una dilución 1:200. Cuando fue necesario, se utilizaron moléculas que se unen específicamente a estructuras celulares y/o bacterianas. El citoesqueleto de actina se tiñó con Faloidina conjugada con RRX (Faloidina-RRX, Invitrogen) diluida 1:200. El ADN se tiñó con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido 1:2.500. Los compartimentos subcelulares ácidos se analizaron mediante el marcador fluido LysoTracker Red DN-99 (Invitrogen), que se añadió a las células crecidas e infectadas sobre cubreobjetos 45 min antes de su fijación con PFA 3%.

**Tabla 8:** Anticuerpos primarios usados en este trabajo.

Antígeno	Origen	Nombre anticuerpo	Marcaje	Dilución	Proveedor/Fuente
HiNT	Conejo	-	HiNT	1:800	Este trabajo. Generado por el Dr. Pau Morey, en Charles Rivers
EEA1	Cabra	N19	Endosoma temprano	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Lamp-1	Rata	1D4B	Endosoma tardío	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
Lamp-2	Rata	ABL-93	Endosoma tardío	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
PCho	Ratón	TEPC-15	PCho	1:200	Sigma

En todos los casos, las tinciones se realizaron en 40 µl de PBS con 10% suero de caballo, 0,1% saponina y los marcadores y/o anticuerpos correspondientes. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-0,1% saponina, una vez con PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad con el anticuerpo primario durante 30 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-0,1% saponina, una vez con PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad con el anticuerpo secundario durante 30 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0,1%, una vez con PBS y una vez con agua destilada, y se montaron sobre un portaobjetos de vidrio con gel montador Prolong Gold antifade (Invitrogen) o con Aqua Poly/Mount (Polysciences). Las muestras se conservaron a 4°C en oscuridad. El material teñido se analizó con un microscopio de fluorescencia Leica CTR6000. Las imágenes se tomaron con una cámara Leica DFC350FX. Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos en tres ocasiones independientes ( $n \geq 9$ ). Se muestran

imágenes representativas en cada caso.

### **1.2.10. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT**

Las células MHS fueron depositadas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2,8 \times 10^6$  células/pocillo 15 h antes de la infección y mantenidas en RPMI completo. Pevio a la infección con HiNT, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 4 ml/pocillo de medio RPMI-1640 con HEPES y SBF. Las células se infectaron con HiNT a una multiplicidad de infección de 100:1 como se ha descrito previamente. Transcurrido el tiempo correspondiente, los pocillos se lavaron tres veces con PBS frío manteniendo las placas en hielo. A continuación, las células se lisaron con 100  $\mu$ l de tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% p/v SDS; 10% glicerol; 50 mM DTT; 0,01% p/v azul de bromofenol)/pocillo. Los lisados celulares se recogieron con un descamador celular y se transfirieron a un tubo Eppendorf®. Los lisados celulares se sonicaron durante 15 s, se hirvieron a 100°C durante 10 min y se enfriaron en hielo. El análisis electroforético de las proteínas presentes en los extractos celulares se realizó mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% con SDS (fase de resolución). Para ello, se utilizó un equipo Mini-protean® Bio-Rad. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia semihúmeda (Trans-Blot® SD semidry transfer cell de Bio-Rad), aplicando un voltaje de 10V 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 4% de leche en polvo disuelta en PBS-Tween 20 0.1% (4 g de leche en polvo en 100 ml de PBS-Tween 20 0.1%) durante 1 h. La membrana bloqueada se sometió a tres lavados de 15 min cada uno en PBS-Tween 20 0.1%. La fosforilación de la proteína Akt se detectó con un anticuerpo primario conejo anti-fosfoSer473 Akt (Cell Signalling Technology) diluido 1:1.000 y con un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) diluido 1:50.000. Las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario se realizaron en 4% de leche en polvo disuelta en PBS-Tween 20 0.1%. Entre anticuerpos, y previo al revelado, la membrana se sometió a tres lavados de 15 min cada uno en PBS-Tween 20 0.1%.

Cuando fue necesario, las membranas se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 0,5% y los anticuerpos se eliminaron mediante el kit comercial “Restore Western Blot Stripping Buffer” (Pierce) incubando la membrana durante 30 min con la solución



suministrada con el kit. Como control de carga, se analizó la cantidad de proteína celular tubulina en los extractos celulares mediante *Western blot* con un anticuerpo primario ratón anti-tubulina humana (Sigma) diluido 1:3.000 y un anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) diluido 1:1.000. Las imágenes se capturaron con un sistema de adquisición de imágenes Gene Genome HR (Syngene). Los experimentos se realizaron al menos en tres ocasiones independientes ( $n \geq 9$ ). Se muestran imágenes representativas en cada caso.

### 1.2.11. Determinación de la secreción de la citoquina TNF- $\alpha$

Los macrófagos alveolares MH-S depositados en placas de 24 pocillos se infectaron con HiNT durante 1 h, como se ha descrito previamente. Cuando el experimento lo requirió, las células fueron pre-tratadas con dexametasona y/o pre-expuestas a EHT. Los tratamientos se mantuvieron durante el tiempo de contacto bacteriano. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS y se añadió 1 ml de RPMI-1640 con HEPES, SBF y gentamicina 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los sobrenadantes de los pocillos se recogieron cada 2 h. Los restos celulares presentes en los sobrenadantes se eliminaron por centrifugación (5 min, 14.000 r.p.m.) y las muestras se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  para su posterior análisis. Los niveles de TNF- $\alpha$  en dichos sobrenadantes se cuantificaron con un kit comercial de ELISA (del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Bender MedSystems). Los valores de absorbancia ( $\lambda=450$  nm) obtenidos fueron convertidos a concentración de proteína por extrapolación, usando una recta patrón de valores conocidos para las concentraciones de proteína 2000  $\text{pg/ml}$ , 1000  $\text{pg/ml}$ , 500  $\text{pg/ml}$ , 250  $\text{pg/ml}$ , 125  $\text{pg/ml}$ , 62,5  $\text{pg/ml}$ , 31,3  $\text{pg/ml}$  y 0  $\text{pg/ml}$ . El kit presenta una sensibilidad  $\geq 1,3$   $\text{pg/ml}$ . Para la determinación de los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  inducidos por el repertorio de cepas de HiNT mutantes analizado se procedió de igual forma, si bien los sobrenadantes se recogieron únicamente tras 4 h de tratamiento con gentamicina. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado en tres ocasiones independientes ( $n \geq 6$ ).

### 1.2.12. Análisis estadístico

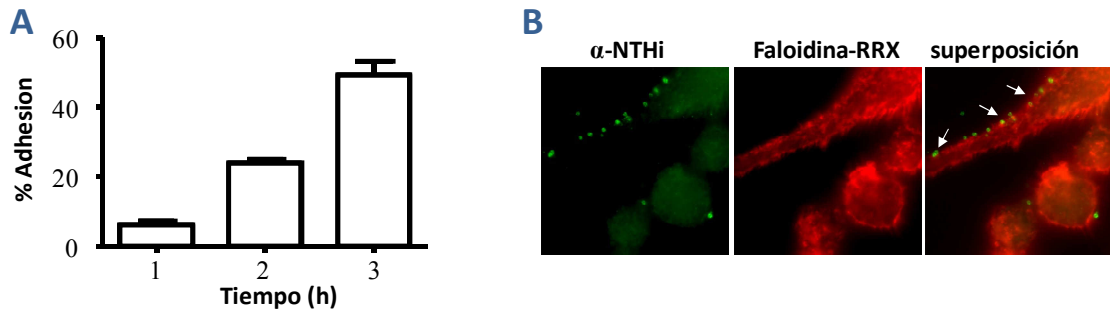
Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Las barras de error de las gráficas corresponden al error típico. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) de una

cola o el test *t* de *Student* de dos colas, empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de *P* fue inferior a 0.05.

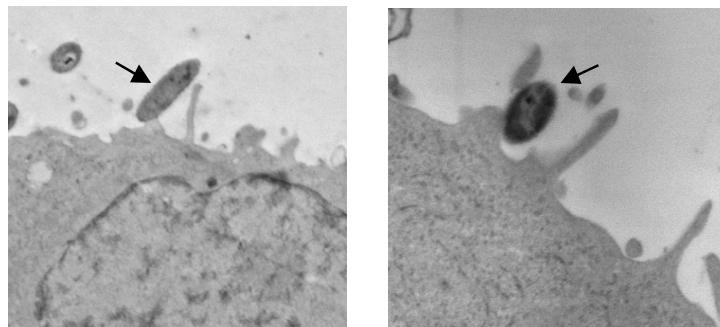
## 1.3. RESULTADOS

### 1.3.1. Análisis de la infección del macrófago alveolar por HiNT: adhesión y fagocitosis bacteriana

La capacidad de HiNT para adherirse al macrófago alveolar se analizó utilizando la línea celular de macrófago alveolar murino inmortalizado MH-S y el aislado clínico HiNT398. Las infecciones se realizaron utilizando bacterias crecidas en fase estacionaria con una multiplicidad de infección de 100:1, durante 1, 2 o 3 h. La adhesión bacteriana se cuantificó mediante lisis de los macrófagos alveolares infectados, dilución seriada de los lisados, plaqueo en sBHI-Agar y recuento de u.f.c. En paralelo, se realizaron infecciones de células crecidas sobre cubreobjetos de vidrio, que se fijaron para su posterior tinción y análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia. La tasa de adhesión de HiNT398 aumentó con el tiempo de contacto bacteria-célula; los niveles máximos de adhesión bacteriana se observaron tras 3 h de infección (**Fig. 12-A**). La observación mediante microscopía de inmunofluorescencia mostró que la confluencia y morfología de las células no se vieron alteradas en infecciones de 1 h. Sin embargo, las células experimentaron cambios en la morfología de los citoesqueletos de actina y de tubulina, una disminución de la confluencia y un descenso significativo de la viabilidad celular en infecciones de 2 y 3 h. Se observó que HiNT398 se adhiere a los macrófagos alveolares MH-S de forma eficiente; tras 1 h de de contacto, aproximadamente 85% de los macrófagos alveolares había sido infectado (**Fig. 12-B**). En base a estas observaciones, las condiciones establecidas para todos los experimentos realizados a continuación utilizando células MH-S fueron tiempo de contacto bacteriano de 1 h, con una multiplicidad de infección de 100:1. La adhesión de HiNT a los macrófagos alveolares se examinó también mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), observándose bacterias adheridas a los macrófagos alveolares (**Fig. 13**).



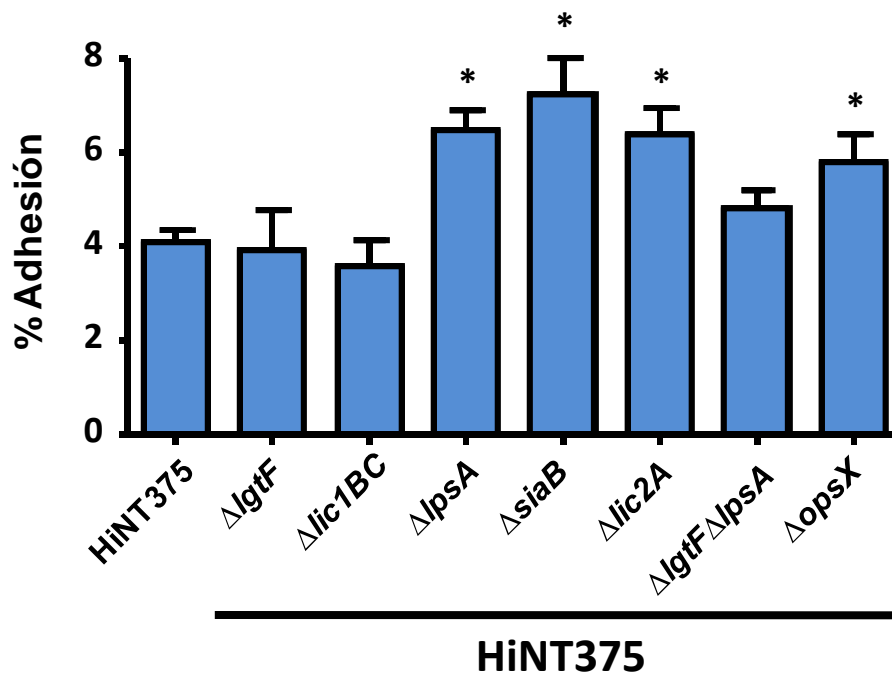
**Figura 12. Adhesión de HiNT a macrófagos alveolares MH-S.** (A) La cepa HiNT398 se utilizó para infectar macrófagos alveolares de ratón MH-S con una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula (100:1) durante 1, 2 ó 3 h. Los niveles de adhesión bacteriana se cuantificaron mediante lisis, diluciones seriadas y recuento de u.f.c. en placas de sBHI-agar. Los datos se muestran como porcentaje de adhesión. (B) Microscopía de inmunofluorescencia mostrando la adhesión de HiNT398 al macrófago alveolar MH-S (flechas blancas). HiNT398 se tiñó con un anticuerpo primario conejo anti-HiNT ( $\alpha$ -HiNT) y un anticuerpo secundario burro anti-conejo conjugado a Cy2 (verde). El citoesqueleto de actina del macrófago alveolar se tiñó con faloidina-RRX (rojo).



**Figura 13. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la adhesión de HiNT398 a la superficie del macrófago alveolar MH-S.**

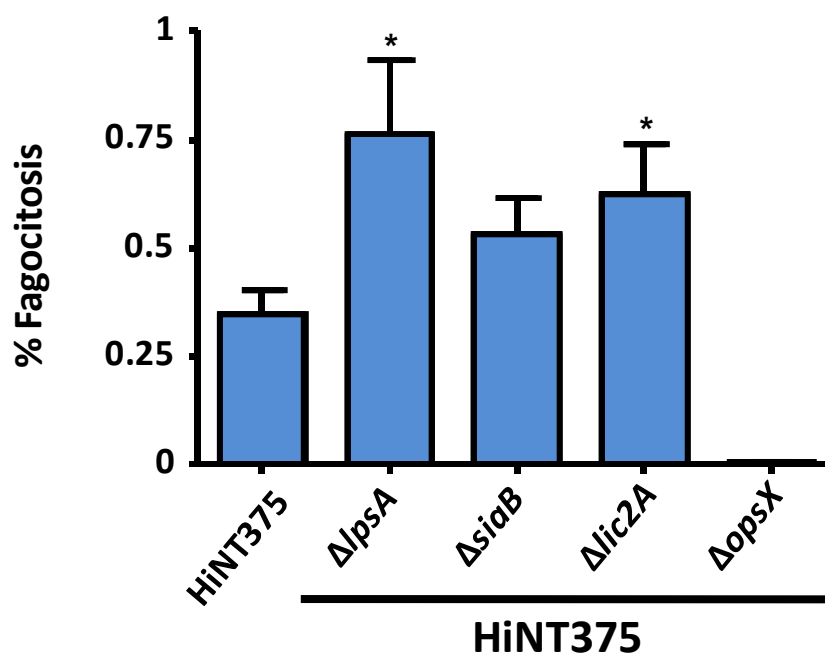
Trabajo previo sugiere que la molécula de PCho del LOS de HiNT puede estar implicada en la interacción del patógeno con el epitelio respiratorio (Swords *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2001). En base a esta observación, se analizó la capacidad de adhesión al macrófago alveolar MH-S de tres cepas de HiNT que expresan diferentes cantidades de PCho en su superficie. Los niveles de PCho presentes en la superficie de las cepas HiNT398, HiNT375 y HiNT375 $\Delta$ lic1BC se determinaron mediante *colony blot*. Los niveles fueron alto, medio y nulo respectivamente (datos no mostrados). No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de adhesión de las tres cepas, lo que sugirió que la presencia de PCho en la superficie bacteriana no tiene un papel relevante en la adhesión de HiNT al macrófago alveolar MH-S (Fig. 14).

Con el fin de extender este estudio al análisis del papel de distintas modificaciones de la molécula de LOS en la interacción de HiNT con el macrófago alveolar (ver Figs. 7 y 8), se utilizó un conjunto de cepas mutantes deficientes en genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de la molécula de LOS. Los mutantes empleados fueron: HiNT375 $\Delta$ *lgtF*, HiNT375 $\Delta$ *lpsA*, HiNT375 $\Delta$ *siaB*, HiNT375 $\Delta$ *lic2A*, HiNT375 $\Delta$ *lgtF* $\Delta$ *lpsA* y HiNT375 $\Delta$ *opsX*. Se analizó la capacidad adhesiva de las cepas mutantes al macrófago alveolar MH-S. Las cepas HiNT375 $\Delta$ *lic2A*, HiNT375 $\Delta$ *siaB*, HiNT375 $\Delta$ *lpsA* y HiNT375 $\Delta$ *opsX* mostraron niveles de adhesión mayores a los de la cepa silvestre (Fig. 14). Las cepas HiNT375 $\Delta$ *lgtF* y HiNT375 $\Delta$ *lgtF* $\Delta$ *lpsA* no mostraron diferencias en cuanto a su adhesión al macrófago alveolar, respecto a la cepa silvestre (Fig. 14).



**Figura 14.** Adhesión de las cepas HiNT375, HiNT375 $\Delta$ *lgtF*, HiNT375 $\Delta$ *lic1BC*, HiNT375 $\Delta$ *lpsA*, HiNT375 $\Delta$ *siaB*, HiNT375 $\Delta$ *lic2A*, HiNT375 $\Delta$ *lgtF* $\Delta$ *lpsA* y HiNT375 $\Delta$ *opsX* a macrófagos alveolares MH-S tras una infección de 1 h. Los datos se muestran en porcentaje de adhesión.

A continuación, se analizaron los niveles de fagocitosis de las cepas mutantes que habían presentado diferencias en la tasa de adhesión al macrófago alveolar. HiNT375 $\Delta$ *lpsA* y HiNT375 $\Delta$ *lic2A* fueron fagocitadas por el macrófago alveolar de forma más eficiente que la cepa silvestre. HiNT375 $\Delta$ *siaB* no mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de fagocitosis respecto a la cepa silvestre. Los niveles de fagocitosis obtenidos para HiNT375 $\Delta$ *opsX* fueron prácticamente nulos (Fig. 15).

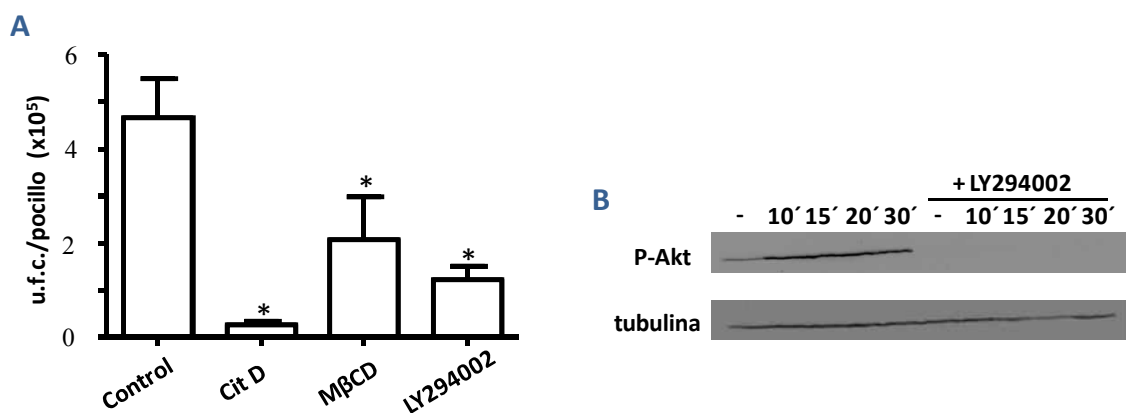


**Figura 15.** Cuantificación de la fagocitosis por el macrófago alveolar MH-S de un repertorio de cepas mutantes en genes implicados en la síntesis de LOS generados. Las células se infectaron durante 1 h y fueron posteriormente incubadas durante 1 h en medio con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. Los datos se muestran como porcentaje de fagocitosis, respecto al porcentaje de adhesión de cada cepa.

A continuación, se analizaron los mecanismos moleculares empleados por los macrófagos alveolares para fagocitar HiNT. Se utilizaron compuestos químicos que inhiben específicamente funciones celulares. Las células fueron infectadas con HiNT398 durante 1 h, en ausencia o presencia de los compuestos químicos indicados a continuación. Las células tratadas con Citocalasina D mostraron una reducción de su capacidad fagocítica con respecto a macrófagos control no tratados, indicando que la fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar requiere una correcta polimerización del citoesqueleto de actina (**Fig. 16-A**). Para determinar el papel de las balsas lipídicas en el proceso de fagocitosis, se empleó M $\beta$ CD, un compuesto que depleciona el colesterol de las membranas eucariotas. Las células tratadas con M $\beta$ CD mostraron una disminución en su capacidad para fagocitar HiNT respecto a los macrófagos control, indicando que la correcta distribución del colesterol en la membrana plasmática del macrófago es esencial para la fagocitosis (**Fig. 16-A**). Se analizó también la contribución de la ruta de señalización dependiente de PI3K en el proceso de fagocitosis. El tratamiento del macrófago alveolar con LY294002, un inhibidor específico de la actividad PI3K, provocó una disminución de los niveles de fagocitosis de HiNT (**Fig. 16-A**). La activación de PI3K provoca la fosforilación de Akt y su correspondiente

activación. El análisis mediante *Western blot* de los niveles de P-Akt mostró que la infección del macrófago alveolar con HiNT promueve la activación de Akt (**Fig. 16-B**). El tratamiento de los macrófagos infectados con LY294002 inhibió la fosforilación de Akt (**Fig. 16-B**).

En conjunto, los resultados muestran que el proceso de fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar depende de la integridad del citoesqueleto de actina de la célula eucariota y de una correcta distribución del colesterol en su membrana plasmática. La ruta de señalización PI3K-Akt es activada durante la infección con HiNT, y esta activación es necesaria para que se produzca la fagocitosis de la bacteria.

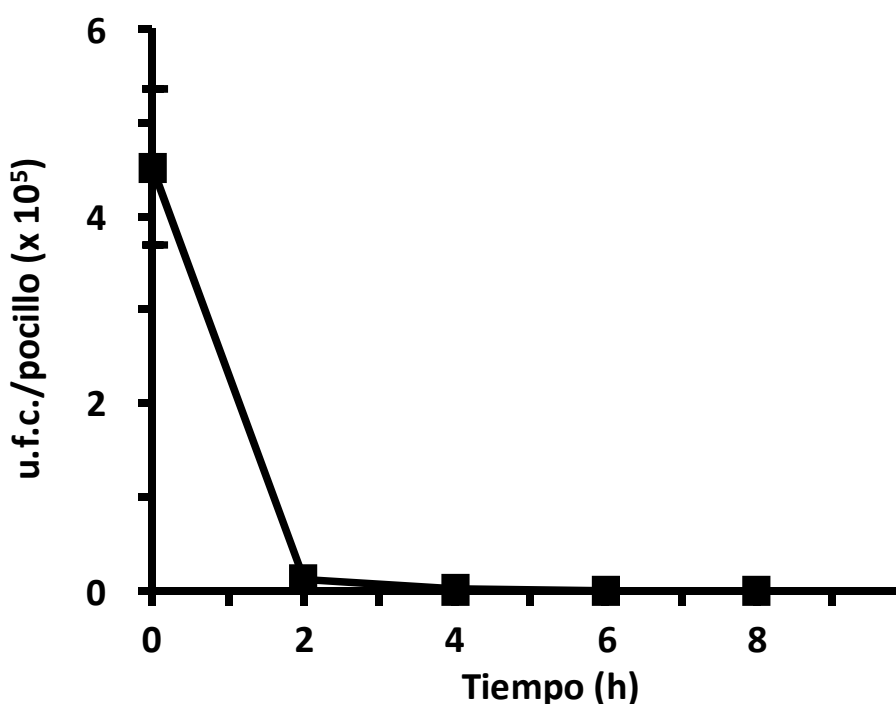


**Figura 16. (A) Mecanismos moleculares implicados en la fagocitosis de la cepa HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S.** Las células se infectaron con HiNT398 durante 1 h; los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron con medio con gentamicina durante 1 h. La fagocitosis bacteriana fue cuantificada mediante lisis, diluciones seriadas y recuento de u.f.c. en placas de sBHI-agar. Cuando fue necesario, las células fueron pre-tratadas durante 1 h con MβCD (1 mM) o LY294002 (75 μM), y durante 30 min con citocalasina D (Cit D) (5 μg/ml). Los inhibidores químicos se mantuvieron durante el contacto bacteria-célula. Los datos se muestran en u.f.c. por pocillo. **(B)** Detección de la fosforilación del efector de PI3K Akt mediante *Western blot* con un anticuerpo primario conejo anti-Akt phosphoSer473 y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Los extractos celulares se prepararon a partir de células no infectadas, o células infectadas con HiNT398 durante 10, 15, 20 o 30 min, en ausencia o presencia del inhibidor de PI3K LY294002. Se monitorizó la cantidad de tubulina como control de carga.

### 1.3.2. El macrófago alveolar elimina la infección por HiNT mediante maduración fagolisosomal

A continuación, se realizaron experimentos de tránsito intracelular del material fagocitado a lo largo del tiempo para determinar el destino intracelular de HiNT tras haber sido fagocitado por el macrófago alveolar MH-S. Las células MH-S se infectaron

con HiNT398 (MOI 100:1) durante 1 h. Los pocillos se lavaron y se incubaron en RPMI-1640 con HEPES, SBF y gentamicina 300 µg/ml durante 1 h. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron y se incubaron y en RPMI-1640 con HEPES, SBF y gentamicina 16 µg/ml hasta el final del experimento. Las bacterias intracelulares se enumeraron mediante lisis con PBS-saponina 0,025% y plaqueo en sBHI-Agar, en intervalos de 2 h hasta 8 h post-gentamicina. Los resultados obtenidos muestran que la carga bacteriana intracelular fue eliminada hasta su práctica totalidad tras 8 h de tratamiento con gentamicina. Se observó el mismo patrón para las cepas HiNT398 y HiNT375 (Fig. 17 y datos no mostrados).



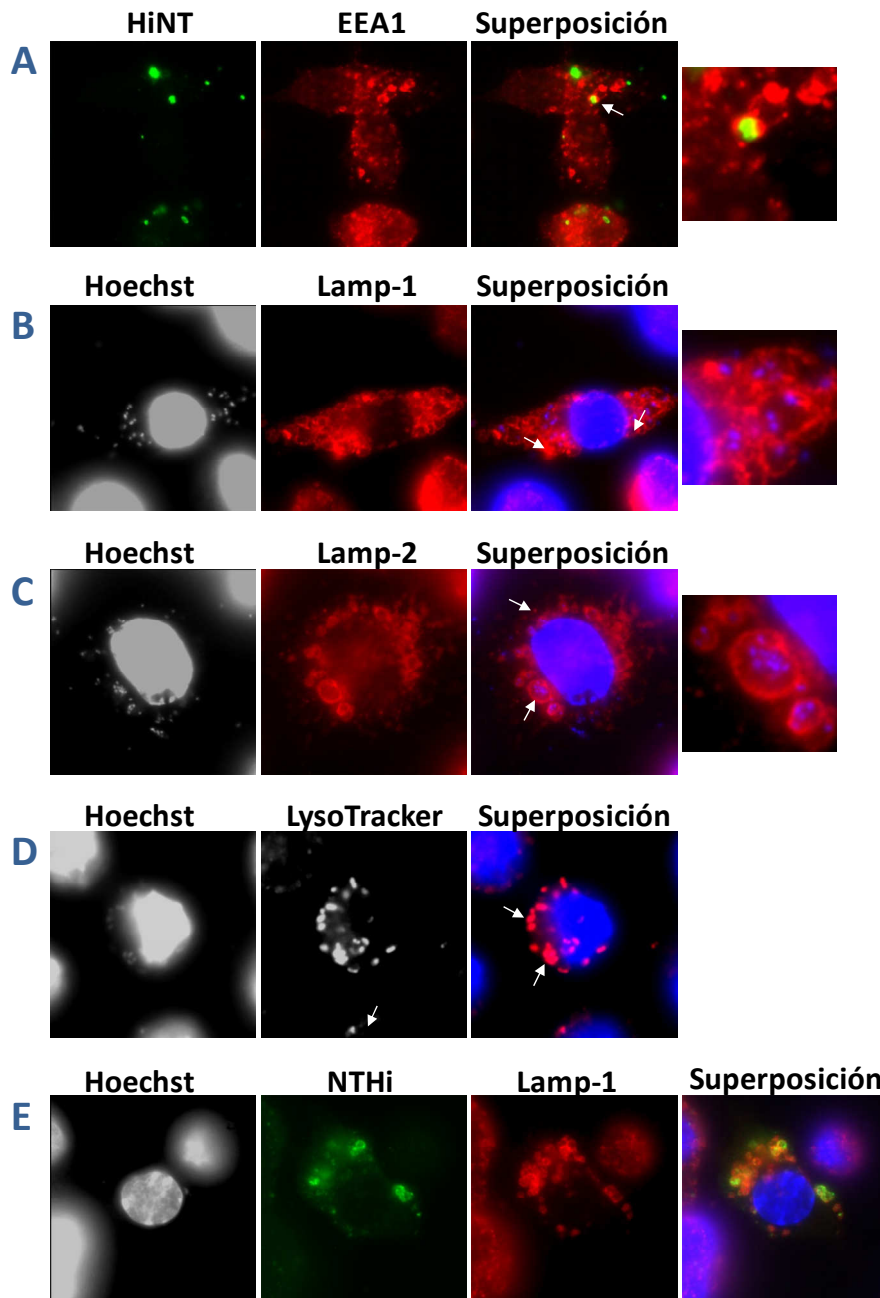
**Figura 17. Progresión de la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT.** Las células se infectaron con HiNT398 durante 1 h. Los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron en medio con gentamicina 300 µg/ml durante 1 h y en medio con gentamicina 16 µg/ml durante 7 h. Las bacterias intracelulares se cuantificaron en intervalos de 2 h. La cuantificación de la carga bacteriana intracelular se realizó por recuento de u.f.c. por pocillo.

Para conocer la dinámica de maduración del fagosoma que contiene HiNT en el macrófago alveolar, se analizó la posición relativa de las bacterias intracelulares respecto a marcadores de la ruta fagolisosomal mediante microscopía de inmunofluorescencia. A tiempos comprendidos entre 10 y 50 min post-infección, se encontraron bacterias localizadas en compartimentos subcelulares con características de endosoma temprano co-localizando con EEA1, elemento integrante de este tipo de compartimento. La **Figura 18-A** muestra una imagen tomada a 15 min post-infección. De la misma manera, se analizó la posición relativa de HiNT398 respecto a los

marcadores de endosoma tardío Lamp-1 y Lamp-2. Se observó co-localización de HiNT con Lamp-1 y Lamp-2 a tiempos comprendidos entre 60 min y 8 h post-infección (**Figs. 18-B y 18-C**). Las **Figuras 18-B, 18-C y 18-D** muestran una imagen tomada tras 2 h de tratamiento con gentamicina. La maduración de las vesículas fagosomales conlleva la acidificación progresiva de su lumen debido a la actividad de la vATPasa (Lukacs *et al.*, 1990). Para analizar el grado de acidificación del compartimento subcelular que contiene HiNT, se utilizó el marcador fluido LysoTracker Red DN-99, una base débil conjugada al fluorocromo Texas Red, que difunde a través de las membranas eucariotas y queda retenido en vacuolas ácidas. Se observó que HiNT398 se localiza en compartimentos vacuolares ácidos durante el tránsito fagolisosomal (**Fig. 18-D**). Se observó también que material de origen bacteriano parecía ser incorporado a las membranas de los compartimentos subcelulares eucariotas, como muestra la co-localización Lamp-1:HiNT en compartimentos endocíticos vacíos (**Fig. 18-E**). Esta observación podría ser consecuencia del procesamiento y reciclaje de material bacteriano en el fagolisosoma del macrófago alveolar.

En su conjunto, los resultados obtenidos mostraron que el macrófago alveolar elimina la infección por HiNT mediante procesamiento intracelular del material fagocitado a través de la ruta fagolisosomal.



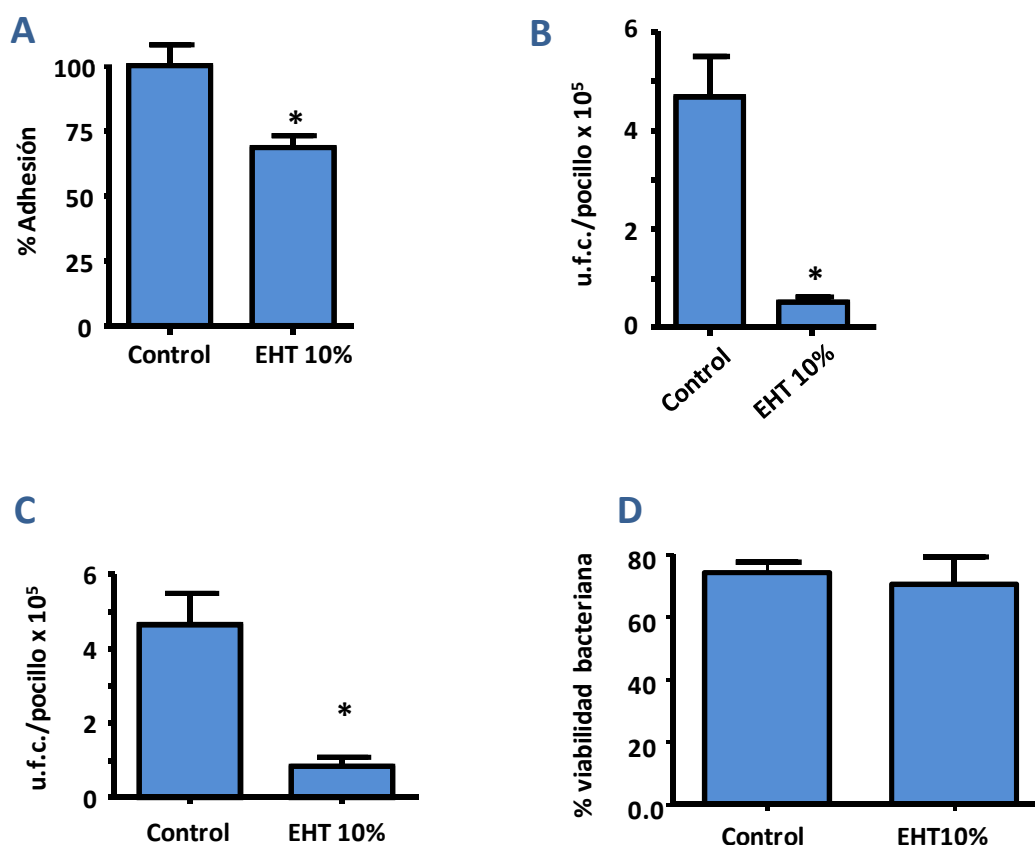


**Figura 18. Maduración y tránsito fagolisosomal durante la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT398. (A)** Co-localización de HiNT con el marcador de endosoma temprano EEA1. HiNT398 se tiñó con un anticuerpo primario conejo anti-HiNT y un anticuerpo secundario burro anti-conejo-Cy2 (verde). EEA1 se tiñó con un anticuerpo primario cabra anti-EEA1 y un anticuerpo secundario burro anti-cabra-RRX (rojo). **(B, C y D)** Co-localización de HiNT398 con Lamp-1, Lamp-2 y LysoTracker Red DN-99. HiNT398 y el núcleo eucariota se tiñeron con Hoechst 33342 (azul). Lamp-1 y Lamp-2 se tiñeron con anticuerpos primarios rata anti-Lamp-1 y rata-anti-Lamp-2, respectivamente, y un anticuerpo secundario burro anti-rata-RRX (rojo). Los compartimentos subcelulares ácidos se tiñeron con el marcador fluido LysoTracker Red DN-99 (rojo). **(E)** Determinación de la incorporación de material de HiNT398 a compartimentos endocíticos de los macrófagos alveolares MH-S durante la maduración fagolisosomal. HiNT398 se tiñó con un anticuerpo primario conejo anti-HiNT y un anticuerpo secundario burro anti-conejo-Cy2 (verde). Lamp-1 se tiñó con un anticuerpo primario rata anti-Lamp-1 y un anticuerpo secundario burro anti-rata-RRX (rojo). El ADN se tiñó con Hoechst 33342 (azul).

### 1.3.3. La exposición a extracto de humo de tabaco disminuye la capacidad del macrófago alveolar para eliminar la infección por HiNT

Una vez establecido que los macrófagos alveolares eliminan la infección por HiNT a través de su ruta fagolisosomal, se analizó el efecto de la exposición a EHT en la capacidad del macrófago alveolar para eliminar dicha infección. En primer lugar, se analizó el efecto de la exposición a EHT en la adhesión de HiNT al macrófago alveolar MH-S. La adhesión de HiNT398 a macrófagos alveolares pre-expuestos durante 3 h a EHT 10% disminuyó aproximadamente un 25% respecto a la adhesión del patógeno a macrófagos control (**Fig. 19-A**). Igualmente, los niveles de fagocitosis de HiNT fueron significativamente menores en macrófagos expuestos a EHT 10% que en macrófagos control (**Fig. 19-B**). El EHT se mantuvo durante el tiempo de contacto en ambos experimentos, pero no durante la incubación con gentamicina en el ensayo de fagocitosis. A continuación, se llevaron a cabo ensayos en los que los macrófagos se expusieron a EHT 10% durante 3 h, tras este tiempo se cambió el medio, y la infección con HiNT398 se realizó en ausencia de EHT. En estas condiciones, también se observó una reducción significativa de los niveles de fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar (**Fig. 19-C**).

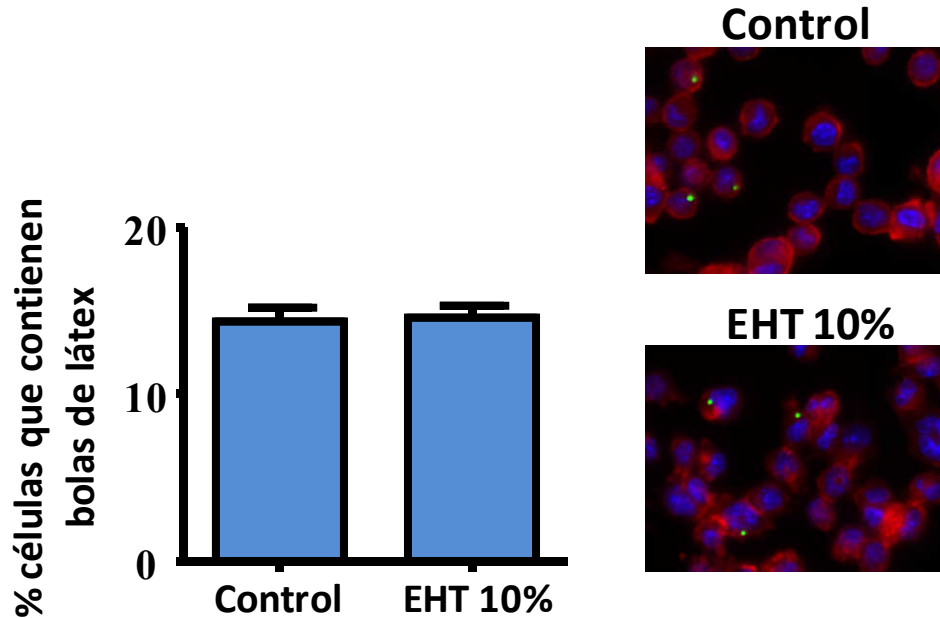
Con el fin de analizar el posible efecto citotóxico del humo de tabaco, se midieron los niveles de LDH liberados al medio de cultivo por macrófagos alveolares expuestos a EHT 10% durante 3 h y por macrófagos control. No se observaron diferencias significativas entre ellos (datos no mostrados). Por otra parte, se realizaron dos experimentos con el objetivo de excluir un posible efecto de la exposición a EHT en la viabilidad bacteriana. Cuando una suspensión de HiNT398 con un número de bacterias equivalente al empleado en los experimentos de infección se incubó con EHT 10% durante 1 h (tiempo de contacto bacteriano establecido previamente) la viabilidad bacteriana no se vio alterada (**Fig. 19-D**). Asimismo, cuando se infectaron macrófagos alveolares no expuestos a EHT con una suspensión de HiNT398 que había sido previamente expuesta a EHT 10% durante 1 h, no se apreciaron diferencias en la capacidad fagocítica de los macrófagos para ingerir la bacteria (datos no mostrados).



**Figura 19. (A) Efecto de la exposición a EHT en la infección de macrófagos alveolares MH-S por HiNT.** Los resultados están expresados como porcentaje de adhesión. La pre-exposición a EHT 10% se realizó durante 3 h y el EHT se mantuvo durante la infección bacteriana (tiempo de contacto). Los valores de adhesión de HiNT a células control se han tomado como 100% adhesión. **(B) Efecto de la exposición a EHT 10% en la fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar MH-S.** Las células se pre-expusieron a EHT 10% durante 3 h. La exposición se mantuvo durante el tiempo de contacto bacteriano. Los macrófagos alveolares MH-S se infectaron con HiNT398 durante 1 h; a continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron en medio con gentamicina 300 µg/ml durante 1 h. Los niveles de fagocitosis bacteriana se cuantificaron mediante lisis, plaqueo de diluciones seriadas y recuento de u.f.c. Los datos se expresan en u.f.c. por pocillo. **(C) Efecto de la pre-exposición a EHT 10% en la fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar MH-S.** Las células se pre-expusieron a EHT 10% durante 3 h, se lavaron y se añadió medio sin EHT. La infección se llevó a cabo durante 1 h en medio sin EHT. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron con medio con gentamicina 300 µg/ml durante 1 h. Los niveles de fagocitosis bacteriana se cuantificaron mediante lisis, plaqueo de diluciones seriadas y recuento de u.f.c. Los datos se expresan como u.f.c. por pocillo. **(D) Efecto de la exposición a EHT en la viabilidad de HiNT.** Las bacterias se incubaron en medio control o en medio con EHT 10% durante 1 h. A continuación, se realizaron diluciones seriadas, plaques en sBHI-Agar y recuento de u.f.c.

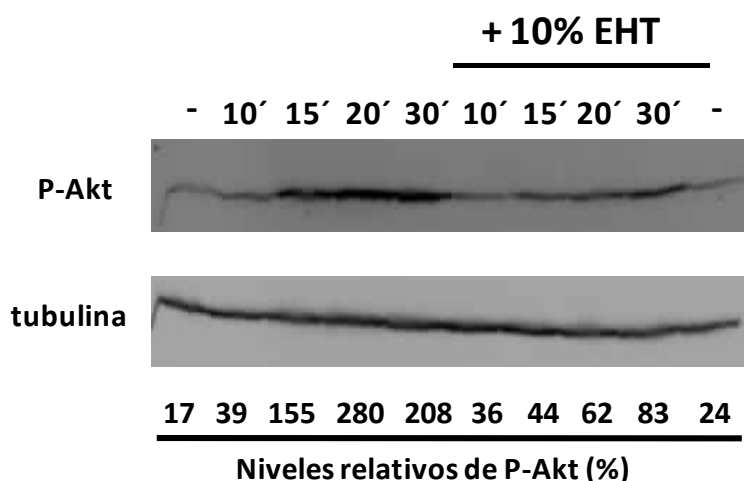
Para determinar si el defecto observado en la capacidad fagocítica del macrófago alveolar para internalizar HiNT es un defecto generalizado que afecta a la ingesta de cualquier tipo de material por el fagocito profesional, se analizó el efecto de la exposición a EHT en la capacidad del macrófago alveolar para fagocitar material inerte.

Para ello, se emplearon bolas de látex-GFP. No se observó ninguna alteración en la capacidad fagocítica de macrófagos alveolares expuestos a EHT 10% respecto a macrófagos control (**Fig. 20**). Este resultado excluyó la posibilidad de que la exposición a EHT provoque un defecto general en la capacidad fagocítica del macrófago alveolar.



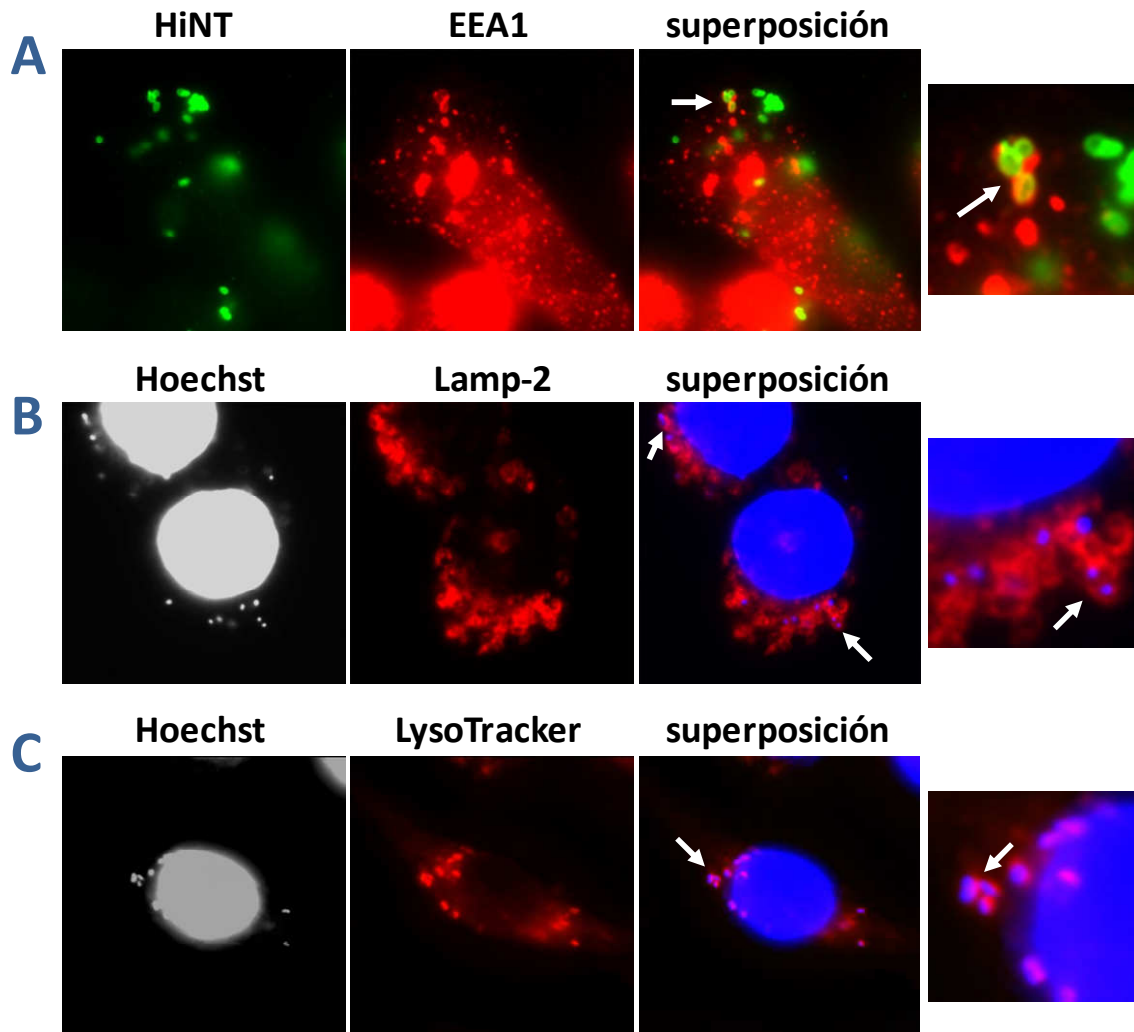
**Figura 20.** Fagocitosis de bolas de látex por el macrófago alveolar MH-S pre-expuesto a EHT 10% durante 3 h. El EHT fue mantenido durante la incubación celular con el material particulado. Los macrófagos se incubaron con bolas de látex-GFP (20 bolas/célula) durante 1 h. Los pocillos se lavaron y se añadió medio durante 1 h. Las células se fijaron con PFA y los cubreobjetos se tiñeron con faloidina-RRX (rojo) y con Hoechst 33342 (azul). La fagocitosis se cuantificó utilizando un microscopio de fluorescencia, mediante recuento celular. Las células que habían fagocitado bolas de látex (verde) se consideraron positivas y las células que no mostraron bolas de látex se consideraron negativas. Se contaron 900 células en tres cubreobjetos (300 células/cubreobjeto) generados en tres experimentos independientes. Los resultados se muestran como porcentaje de células positivas, que contienen bolas de látex.

A continuación, se analizó el mecanismo molecular responsable del defecto observado en la capacidad fagocítica de células expuestas a EHT. Dado que habíamos establecido previamente que el macrófago alveolar MH-S utiliza la vía de señalización PI3K-Akt para fagocitar HiNT, se examinó si la exposición a EHT afecta la activación de esta ruta inducida por la infección por HiNT. El análisis de la fosforilación de Akt mediante *Western blot* mostró que los niveles de P-Akt inducidos por la infección de HiNT eran menores en macrófagos expuestos a EHT que en macrófagos control (**Fig. 21**).

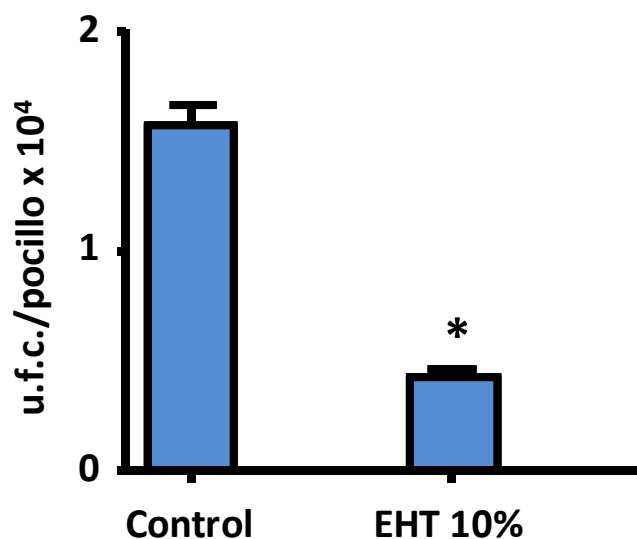


**Figura 21.** Detección de la fosforilación de Akt (P-Akt) mediante *Western blot* con un anticuerpo conejo anti-Akt fosfoSer473 y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Los extractos celulares se obtuvieron a partir de células no infectadas, células infectadas con HiNT398 durante 10, 15, 20 ó 30 min (izquierda), o células pre-expuestas a EHT 10% e infectadas con HiNT398 durante los tiempos indicados (derecha). Se utilizó tubulina como control de carga (panel inferior). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los niveles relativos de P-Akt (parte inferior del panel) se obtuvieron mediante análisis densitométrico de los geles con el programa Image J.

Para determinar el destino de las bacterias fagocitadas por los macrófagos expuestos a EHT, se llevaron a cabo experimentos de tránsito fagolisosomal. Los resultados obtenidos indican que las bacterias internalizadas fueron procesadas y eliminadas mediante la ruta fagolisosomal del macrófago, de modo similar al observado en células control (**Fig. 22**). Posteriormente, se analizó el impacto del EHT en el procesamiento intracelular de HiNT398 exponiendo las células infectadas a EHT 10% únicamente durante el tratamiento con gentamicina. De esta forma, los eventos de adhesión y fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar ocurren normalmente, y analizamos el efecto del humo de tabaco sobre las bacterias intracelulares. Tras 4 h de tratamiento con gentamicina, la infección bacteriana fue eliminada tres veces más deprisa por las células expuestas a EHT que por las células control. Estos datos sugieren que la maduración fagolisosomal ocurre más rápidamente en macrófagos expuestos a EHT que en células control (**Fig. 23**).



**Figura 22. Maduración y tránsito fagolisosomal durante la infección por HiNT del macrófago alveolar MH-S pre-expuesto a EHT 10%. (A)** Co-localización de HiNT con el marcador de endosoma temprano EEA1. HiNT se tiñó con un anticuerpo primario conejo anti-HiNT y un anticuerpo secundario burro anti-conejo-Cy2 (verde). EEA1 se tiñó con un anticuerpo cabra anti-EEA1 y un anticuerpo secundario burro anti-cabra-RRX (rojo). **(B)** Co-localización de HiNT con el marcador de endosoma tardío Lamp-2. HiNT y el núcleo eucariota se tiñeron con Hoechst 33342 (azul). Lamp-2 se tiñó con un anticuerpo primario rata anti-Lamp-2 y un anticuerpo secundario burro anti-rata-RRX (rojo). **(C)** Co-localización de HiNT con el marcador fluido de compartimentos subcelulares ácidos LysoTracker Red DN-99 (rojo). HiNT y el núcleo eucariota se tiñeron con Hoechst 33342 (azul).



**Figura 23. Efecto de la exposición a EHT en la eliminación de HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S.** Las células se infectaron con HiNT398 (MOI 100:1) durante 1 h. Los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron en medio con gentamicina 300 µg/ml, +/- EHT 10%, durante 1 h, seguido de una incubación en medio con gentamicina 16 µg/ml, +/- EHT 10%, durante 3 h. En ese momento, las células se lisaron y la carga bacteriana intracelular se cuantificó mediante diluciones seriadas, plaqueo y recuento de u.f.c. Los resultados se muestran en u.f.c. por pocillo. Control = datos correspondientes a células no expuestas a EHT; EHT 10% = datos correspondientes a células expuestas a EHT durante la incubación con gentamicina.

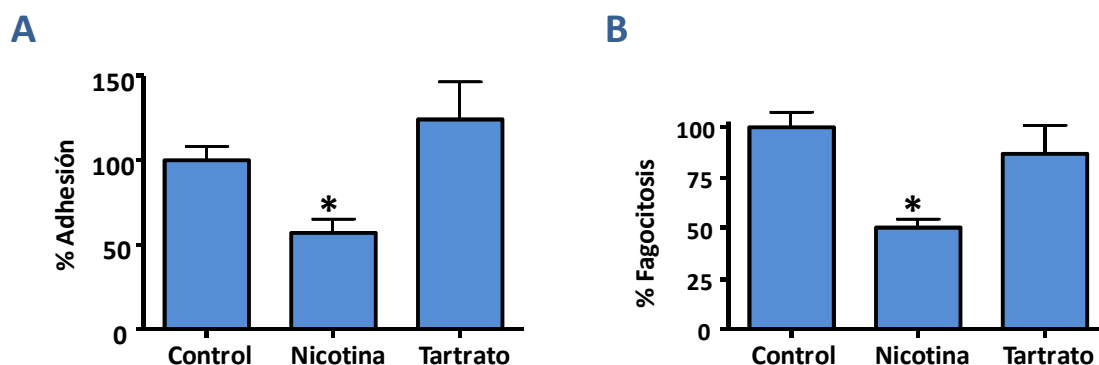
En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la exposición del macrófago alveolar a EHT reduce su capacidad para interactuar con HiNT, especialmente su capacidad fagocítica. Mecánicamente, este defecto se puede deber, al menos en parte, a que la exposición a EHT disminuye la activación de la cascada de señalización PI3K-AKT. Asimismo, la exposición a EHT parece acelerar la maduración fagolisosomal y por tanto, el procesamiento del material fagocitado. El defecto en fagocitosis fue observado únicamente con partículas vivas. En las condiciones empleadas, el EHT no alteró la viabilidad bacteriana ni del fagocito profesional.

#### 1.3.4. La exposición a nicotina disminuye la capacidad del macrófago alveolar para adherir y fagocitar HiNT

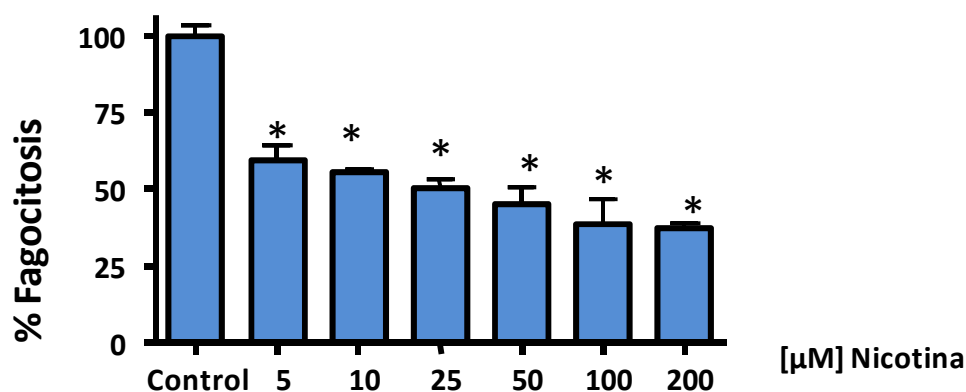
Hemos determinado en las secciones previas que la exposición del macrófago alveolar a EHT disminuye su capacidad para fagocitar HiNT. Por otra parte, la capacidad de la nicotina para modular la respuesta del sistema inmune es un aspecto conocido (Patton *et al.*, 2006; Klettner *et al.*, 2012). En base a estas observaciones, se analizó el efecto de la exposición del macrófago alveolar a nicotina en su capacidad para

fagocitar HiNT. Se utilizó nicotina sódica 100  $\mu\text{M}$  y tartrato sódico 100  $\mu\text{M}$  como control. La exposición celular a nicotina disminuyó los niveles de adhesión y de fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar respecto a las células control (**Figs. 24-A y 24-B**). Las células incubadas con tartrato sódico mostraron niveles de adhesión y fagocitosis de HiNT398 similares a las células control no expuestas a ningún agente. A continuación, se observó que la disminución de la capacidad fagocítica del macrófago por exposición a nicotina es un proceso dependiente de la dosis de nicotina empleada (**Fig. 25**). Así, la concentración mínima de nicotina que provocó una disminución de la capacidad fagocítica del macrófago alveolar fue 5  $\mu\text{M}$ .





**Figura 24. Efecto de la nicotina en la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT.** (A) Se muestran los niveles de adhesión de HiNT398 al macrófago alveolar MH-S control, pre-expuesto a nicotina sódica 100  $\mu$ M durante 15 h y mantenida durante el tiempo de contacto bacteriano; pre-expuesto a tartrato sódico 100  $\mu$ M durante 15 h y mantenido durante el tiempo de contacto bacteriano. Los valores de adhesión de HiNT a células control se tomaron como 100% y a partir de ellos, se calcularon los valores de adhesión a células tratadas. (B) Efecto de la exposición a nicotina en la fagocitosis de HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S. Se muestran los datos de fagocitosis de HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S no tratado, pre-expuesto a nicotina sódica 100  $\mu$ M durante 15 h y mantenida durante el tiempo de contacto bacteriano; pre-expuesto a tartrato sódico 100  $\mu$ M durante 15 h y mantenido durante el tiempo de contacto bacteriano. Tras el contacto bacteriano, los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron en medio con gentamicina 300  $\mu$ g/ml durante 1 h. Los valores de fagocitosis de los macrófagos control se consideraron 100% y a partir de ellos, se calcularon los valores de fagocitosis por células tratadas.

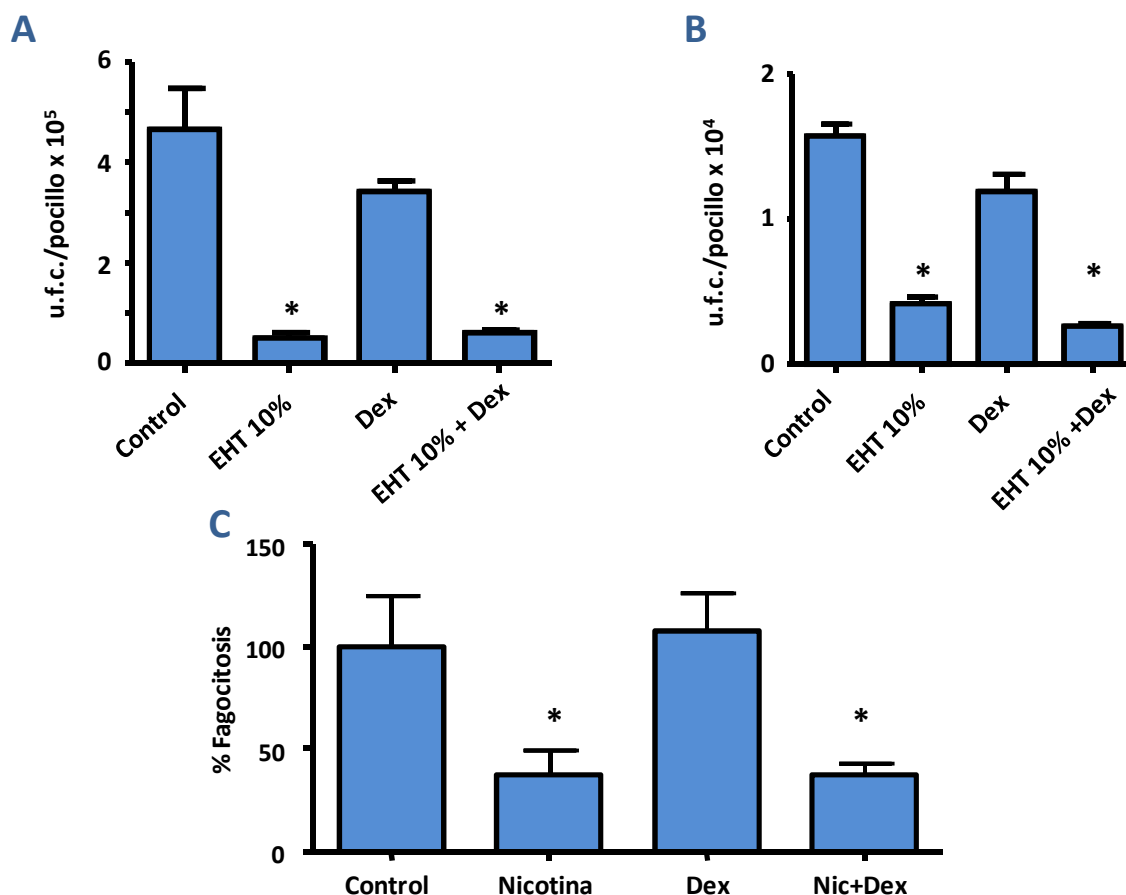


**Figura 25. Efecto de la pre-exposición a distintas concentraciones de nicotina sódica en la fagocitosis de HiNT375 por el macrófago alveolar MH-S.** Condiciones: control (0), 5, 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M. Se muestran los datos de fagocitosis de HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S no tratado, pre-expuesto a nicotina sódica 5-200  $\mu$ M durante 15 h y mantenida durante el tiempo de contacto bacteriano. Tras el contacto bacteriano, los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron en medio con gentamicina 300  $\mu$ g/ml durante 1 h. Los valores de fagocitosis de los macrófagos control se consideraron 100% y a partir de ellos, se calcularon los valores de fagocitosis por células tratadas.

### 1.3.5. El tratamiento con glucocorticoides no restablece la capacidad fagocítica del macrófago alveolar

La terapia glucocorticoide se aplica a pacientes que sufren enfermedades relacionadas con el tabaquismo para controlar los desórdenes inflamatorios causados por la exposición al tabaco (Barnes *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2004). El efecto de este tipo de terapia en la interacción patógeno-hospedador, y en concreto, en la infección del macrófago alveolar por HiNT ha sido objeto de estudio en este trabajo. El tratamiento del macrófago alveolar con el glucocorticoide sintético dexametasona no modificó su capacidad para fagocitar HiNT398 (Fig. 26-A). Igualmente, la adición de dexametasona al medio de cultivo durante el tratamiento de los macrófagos alveolares infectados por HiNT con gentamicina no modificó la habilidad de los mismos para eliminar la infección por HiNT (Fig. 26-B). Sin embargo, el tratamiento con dexametasona no restauró el defecto provocado por la exposición a EHT en la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (Fig. 26-A). Del mismo modo, la adición de dexametasona a células expuestas a EHT e infectadas con HiNT durante el tratamiento de las mismas con gentamicina no modificó la capacidad del macrófago alveolar para eliminar HiNT (Fig. 26-B).

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento del macrófago alveolar expuesto a EHT con glucocorticoides no restablece los cambios provocados por el EHT en la progresión de la infección por HiNT. Del mismo modo, la disminución de la capacidad fagocítica observada en células expuestas a nicotina no se restauró al tratar las células con dexametasona (Fig. 26-C).



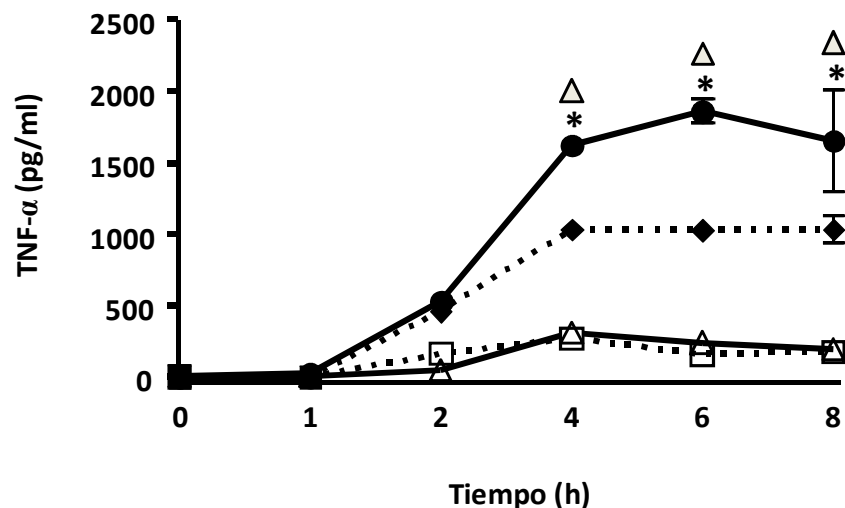
**Figura 26.** Efecto de la exposición a EHT, nicotina y dexametasona en la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT. **(A)** Las células se pre-expusieron a EHT durante 3 h y/o a dexametasona 1  $\mu$ M (Dex) durante 2 h. La exposición al agente externo se mantuvo durante el tiempo de contacto bacteriano. Los macrófagos alveolares MH-S pre-expuestos al agente indicado se infectaron con HiNT398 durante 1 h. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron en medio con gentamicina 300  $\mu$ g/ml durante 1 h. Los niveles de fagocitosis bacteriana se cuantificaron mediante lisis, plaqueo de diluciones seriadas y recuento. Los resultados se muestran en u.f.c. por pocillo. **(B)** Efecto de la exposición a EHT en la eliminación de HiNT398 por el macrófago alveolar MH-S. Las células se infectaron con HiNT398 (MOI 100:1) durante 1 h. Los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron en medio con gentamicina 300  $\mu$ g/ml con EHT, dexametasona o la combinación de ambos durante 1 h. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron en medio con gentamicina 16  $\mu$ g/ml, con EHT, dexametasona o la combinación de ambos durante 3 h. Los resultados se muestran en u.f.c. por pocillo. **(C)** Las células se pre-expusieron a nicotina 200  $\mu$ M, dexametasona 1  $\mu$ M o la combinación de ambos agentes. La exposición al agente externo se mantuvo durante el contacto bacteriano. Los macrófagos pre-expuestos al agente indicado se infectaron con HiNT398 durante 1 h. Los pocillos se lavaron y se incubaron en medio con gentamicina 300  $\mu$ g/ml durante 1 h. Los niveles de fagocitosis bacteriana se cuantificaron como en **(A)**. Los resultados se muestran en % de fagocitosis respecto a las células control, cuyo nivel de fagocitosis se consideró 100%.

### 1.3.6. Las respuestas inflamatoria y fagocítica del macrófago alveolar durante la infección por HiNT no son eventos acoplados

Los macrófagos alveolares, al activarse en respuesta a una infección, secretan citoquinas inflamatorias que desencadenan una inflamación local para eliminar dicha infección (Mizgerd 2008 y Standiford 1997). Se analizó si el EHT interfiere en la secreción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos alveolares durante una infección por HiNT. Para ello, se midieron los niveles de TNF- $\alpha$  secretados por los macrófagos tras diferentes tiempos de infección por HiNT, en ausencia o presencia de EHT 10%. Se emplearon macrófagos MH-S sin pre-exposición a EHT 10% (Control) y macrófagos MH-S pre-expuestos a EHT 10% durante 3 h. Los macrófagos se infectaron con HiNT398 durante 1 h. El EHT 10% se mantuvo durante el tiempo de contacto bacteriano. Posteriormente, los pocillos se lavaron y se incubaron en medio RPMI-1640 con Heparina, SBF y gentamicina 100  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de este momento y cada 2 h hasta 8 h post-gentamicina, se recogió el sobrenadante de los pocillos y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se emplearon para medir los niveles de TNF- $\alpha$  mediante ELISA. Los macrófagos infectados con HiNT secretaron TNF- $\alpha$ , alcanzándose un máximo a 4 h post-gentamicina (**Fig. 27**). HiNT también indujo la secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos expuestos a EHT 10%, si bien los niveles máximos de TNF- $\alpha$  fueron menores a los observados en las células infectadas no expuestas a EHT (**Fig. 27**). La adición de EHT 10% al medio no provocó la secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos alveolares no infectados.

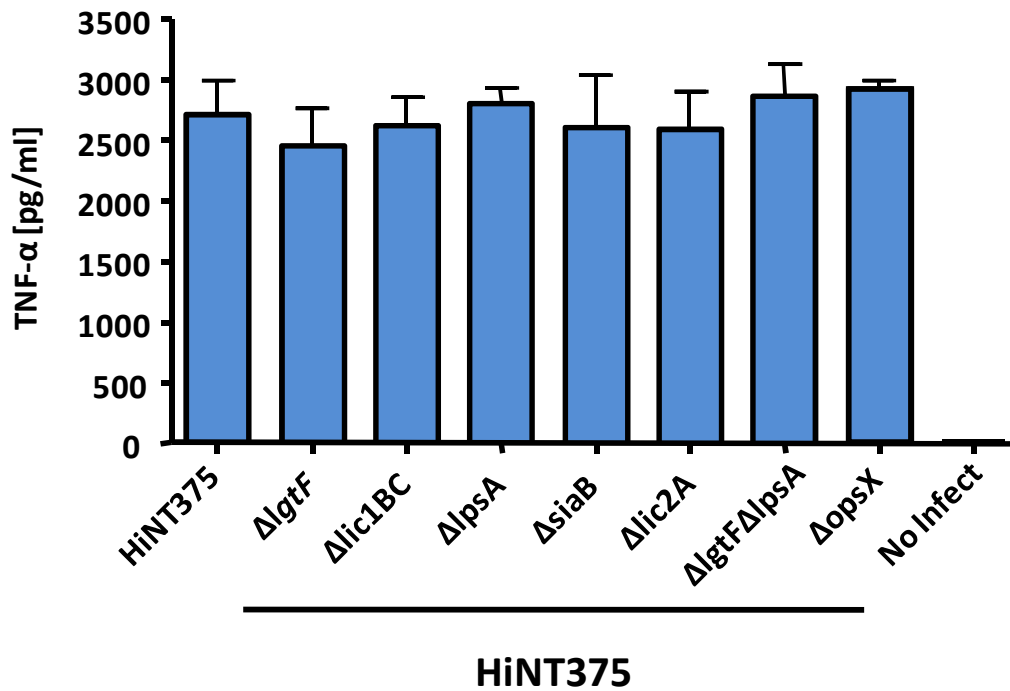
Asimismo, se analizó el efecto de la adición de dexametasona en la secreción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos infectados por HiNT, en ausencia o presencia de EHT. El tratamiento con dexametasona redujo los niveles de TNF- $\alpha$  secretado por los macrófagos infectados con HiNT a valores basales, comparables a los de células no infectadas, independientemente de que las células estuvieran o no expuestas a EHT 10% (**Fig. 27**).

Dado que la exposición a EHT reduce la capacidad del macrófago para fagocitar HiNT, los procesos de inflamación y fagocitosis pueden ser eventos no acoplados durante la infección del macrófago alveolar MH-S por HiNT.



**Figura 27. Respuesta inflamatoria del macrófago alveolar MH-S durante la infección con HiNT.** Cuantificación mediante ELISA de la secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados con HiNT398 (●); macrófagos pre-expuestos a EHT 10 % e infectados con HiNT398 (◆); macrófagos pre-tratados con dexametasona 1  $\mu$ M e infectados con HiNT398 (□); macrófagos pre-expuestos a EHT 10% y dexametasona 1  $\mu$ M e infectados con HiNT398 ( $\Delta$ ). El análisis estadístico (test de Bonferroni,  $P < 0,05$ ) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de TNF- $\alpha$  secretados por: (i) células expuestas a EHT 10 % infectadas con HiNT y células control infectadas no expuestas a EHT; y (ii) macrófagos infectados y macrófagos infectados tratados con dex 1  $\mu$ M.

A continuación, se analizó la contribución de distintos sustituyentes de la molécula de LOS de HiNT a la respuesta inflamatoria de los macrófagos MH-S. Para ello, las células se infectaron con un repertorio de cepas mutantes en genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis del LOS. Como se observa en la Fig. 28, no se detectaron diferencias en los niveles de TNF- $\alpha$  secretados por los macrófagos en respuesta a la infección por este repertorio de mutantes. En todos los casos, los niveles de TNF- $\alpha$  secretados por los macrófagos en respuesta a la infección fueron similares a los obtenidos a partir de células infectadas por la cepa silvestre.



**Figura 28.** Respuesta inflamatoria del macrófago alveolar MH-S durante la infección con HiNT375, HiNT375ΔlgtF, HiNT375Δlic1BC, HiNT375ΔlpsA, HiNT375ΔsiaB, HiNT375Δlic2A, HiNT375ΔlgtFΔlpsA y HiNT375ΔopsX. Los macrófagos alveolares se infectaron con este repertorio de cepas durante 1 h. Posteriormente, los pocillos se lavaron con PBS y se añadió medio con gentamicina 100 μg/ml durante 4 h. Transcurrido este tiempo se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de TNF-α mediante ELISA.

### 1.3.7. Los macrófagos alveolares de fumadores con función pulmonar normal y de pacientes EPOC tienen reducida su capacidad fagocítica

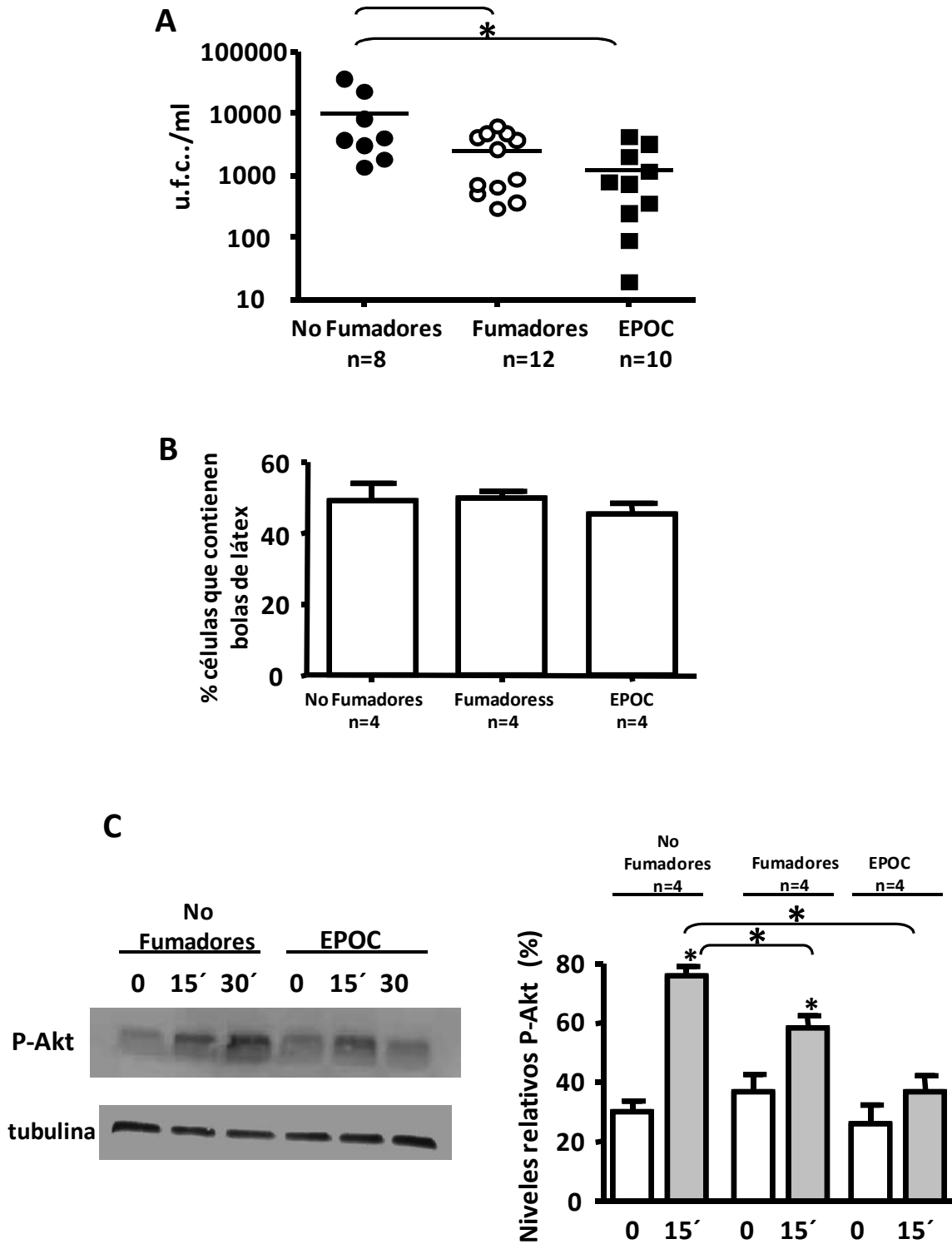
Con objeto de trasladar a un modelo *ex vivo* las observaciones realizadas mediante el uso de una línea celular inmortalizada de macrófago alveolar, se comparó la capacidad fagocítica de macrófagos alveolares aislados de pulmón de pacientes EPOC, de fumadores con función pulmonar normal y de individuos no fumadores. Los macrófagos se aislaron a partir de BALs, se depositaron sobre pocillos en placas de cultivo de 24 pocillos, y se infectaron con HiNT398 durante 1 h (MOI 100:1). Posteriormente, los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h en medio con gentamicina. El material fagocitado fue cuantificado como se ha indicado en las secciones previas. Los recuentos de bacterias fagocitadas por los macrófagos

alveolares aislados de fumadores y de pacientes EPOC fueron comparables, y estadísticamente menores a los obtenidos a partir de macrófagos aislados de individuos no fumadores (**Fig 29-A**).

Como se observó previamente con células MH-S, los macrófagos alveolares de pacientes EPOC, de fumadores con función pulmonar normal, y de individuos no fumadores mostraron niveles comparables en cuanto a su capacidad para fagocitar bolas de látex (**Fig. 29-B**). Estos datos sugieren que el humo no causa un defecto general en el proceso de fagocitosis.

Por último, se analizó si los niveles de activación de la ruta de señalización PI3K-Akt en respuesta a la infección por HiNT son distintos en macrófagos alveolares aislados de fumadores, pacientes EPOC, e individuos no fumadores. El análisis mediante *Western blot* mostró que los niveles de fosforilación de Akt inducidos por la infección con HiNT eran menores en los macrófagos alveolares aislados de individuos fumadores y de pacientes EPOC que en los macrófagos alveolares aislados de individuos no fumadores (**Fig. 29-C**).

En conjunto, estos datos sugieren que la exposición continuada a humo de tabaco deteriora la capacidad fagocítica de los fagocitos profesionales residentes en el pulmón.



**Figura 29. (A)** Fagocitosis de HiNT398 por macrófagos alveolares humanos obtenidos a partir de BALs de individuos no fumadores (control; n = 8), fumadores con función pulmonar normal (n = 12), y pacientes EPOC (n = 10). Los macrófagos alveolares se depositaron en placas de cultivo y se utilizaron para realizar ensayos de fagocitosis. La fagocitosis bacteriana se cuantificó mediante lisis y plaqueo de diluciones seriadas. Los datos se muestran en u.f.c./ml. **(B)** Fagocitosis de bolas de látex por macrófagos alveolares humanos. Las células se obtuvieron mediante BALs de no fumadores (control; n = 4), fumadores con función pulmonar normal (n = 4) y pacientes EPOC (n = 4). Los macrófagos alveolares humanos se depositaron sobre cubreobjetos de vidrio y se utilizaron para realizar ensayos de fagocitosis



con bolas de látex-GFP, utilizando 20 bolas/célula. Los cubreobjetos se fijaron y se tiñeron con faloidina-RRX (rojo) y con Hoechst 33342 (azul). La cuantificación de fagocitosis se realizó mediante recuento empleando un microscopio de fluorescencia. Las células que contenían bolas de látex (verde) se consideraron positivas y las células sin bolas de látex se consideraron negativas. Se contaron 900 células procedentes de tres cubreobjetos (300 células/cubreobjeto) por muestra de paciente. Los resultados están expresados en porcentaje de células positivas. **(C) Izquierda.** Detección de la fosforilación de Akt (P-Akt) mediante *Western blot* con un anticuerpo primario conejo anti-fosfoSer473 Akt y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Los extractos celulares se obtuvieron a partir de células no infectadas, y células infectadas durante 15 ó 30 min con HiNT398. El panel inferior muestra los niveles de tubulina como control de carga. **(C) Derecha.** Gráfico que muestra los niveles relativos de P-Akt obtenidos mediante densitometría de los geles con el programa informático Image J.

## 1.4. DISCUSIÓN

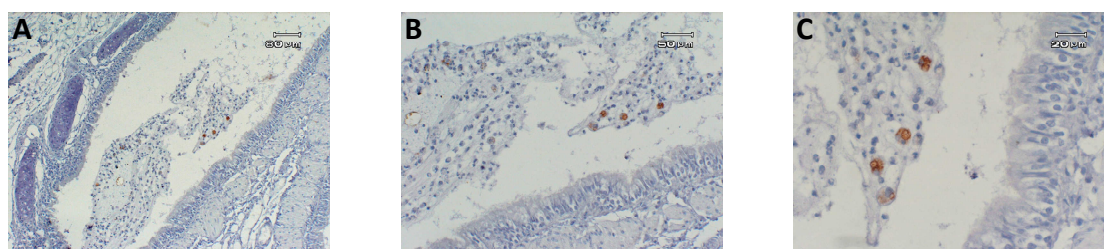
En este trabajo, hemos examinado las características y la dinámica de la infección del macrófago alveolar por el patógeno bacteriano oportunista HiNT. Hemos determinado que la fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar es un proceso que requiere la correcta polimerización del citoesqueleto de actina, la integridad de las balsas lipídicas de la membrana plasmática eucariota y la activación de la cascada de señalización celular PI3K-Akt. Nuestros resultados muestran que los macrófagos alveolares MH-S eliminan la infección por HiNT mediante la maduración fagolisosomal del compartimento subcelular que contiene la bacteria ingerida. Durante el tránsito fagolisosomal, el compartimento subcelular que contiene HiNT adquiere pH ácido y co-localiza progresivamente con marcadores de los estadios temprano y tardío del fagosoma.

En paralelo, los macrófagos alveolares secretan TNF- $\alpha$  en respuesta a la infección por HiNT. Al analizar los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos alveolares infectados por una batería de cepas mutantes de HiNT que presentan un LOS truncado a distintos niveles, no se observaron diferencias entre cepas, ni respecto a los niveles de citoquina inducidos por la cepa silvestre. Estos datos sugieren que las modificaciones del LOS analizadas no están relacionadas con la estimulación de la respuesta inflamatoria del macrófago alveolar por HiNT.

Con anterioridad a este trabajo, dos estudios independientes habían analizado la interacción entre HiNT y los fagocitos profesionales. Un estudio analizó la capacidad de los macrófagos peritoneales de ratón J774 para eliminar una infección por cepas de HiNT procedentes de una colección de aislados clínicos de otitis media. En este estudio, se observan bacterias intracelulares a tiempos comprendidos entre 24 y 72 h post-fagocitosis (Craig *et al.*, 2001). El segundo estudio mostró que HiNT es fagocitado por neutrófilos, que activan el burso respiratorio y secretan IL-8 en respuesta a la infección. Sin embargo, en lugar de destruir a la bacteria, se observó la muerte de los neutrófilos por necrosis (Naylor *et al.*, 2007).

En el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral, se muestra que, en ausencia de estímulos o agresiones externas, los macrófagos alveolares fagocitan el patógeno HiNT y lo eliminan, contribuyendo de este modo al mantenimiento de la esterilidad pulmonar/limitación de la carga bacteriana de las vías respiratorias bajas en individuos con función pulmonar normal. Como apoyo a los datos presentados en esta Tesis Doctoral, hacemos mención en esta sección de Discusión a la estandarización de un

modelo de infección intranasal murina llevada a cabo en nuestro laboratorio que permite analizar la infección por HiNT *in vivo* (A. López-Gómez y C. Viadas, datos no publicados). Trabajo realizado en nuestro laboratorio muestra la localización de la cepa HiNT375 en el interior de células fagocíticas unilobuladas con características de macrófago en secciones traqueales de ratón CD1 infectados (Fig. 30).



**Figura 30. Localización de HiNT en el interior de fagocitos profesionales murinos *in vivo*.** Serie de imágenes de inmunohistoquímica de una sección de tráquea de ratón, mostrando la presencia de HiNT en el interior de células con morfología de macrófago. Los animales fueron infectados intranasalmente con HiNT375 y sacrificados 48 h post-infección. Las tráqueas fueron diseccionadas, fijadas, embebidas en parafina y procesadas para inmunohistoquímica. Tinción: anticuerpo primario conejo anti-HiNT y anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano. La señal marrón en el interior de células con morfología de macrófago es indicativa de la presencia de bacterias intracelulares. Se muestran tres imágenes correspondientes a una diferente magnificación de la misma zona. Cortesía de Dra. María Jesús Grilló, I. Agrobiotecnología-UPNA-CSIC.

En el presente trabajo mostramos que PCho, un sustituyente del LOS con un papel relevante en diferentes aspectos de la patogenicidad de HiNT (colonización del epitelio respiratorio y resistencia a muerte mediada por péptidos antimicrobianos) (Lysenko *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2000), no está implicado en la interacción HiNT-macrófago alveolar en las condiciones experimentales empleadas. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la digalactosa, el ácido siálico y la ramificación de la HepIII de la moléculas de LOS de HiNT parecen estar implicados en la adhesión de HiNT a macrófagos alveolares. Sin embargo, esta implicación parece tener un efecto negativo, como muestran los valores de adhesión mayores obtenidos con las cepas HiNT375 $\Delta$ *lic2A*, HiNT375 $\Delta$ *siaB* y HiNT375 $\Delta$ *psA*, respecto a la cepa control. Una explicación a estos resultados puede basarse en la hipótesis de que estas modificaciones de la molécula de LOS enmascaran la exposición prominente de otro(s) ligando bacteriano que pueda ser reconocido por receptores de la superficie del macrófago alveolar. El mutante HiNT375 $\Delta$ *opsX* muestra valores de adhesión mayores a los de la cepa silvestre. Esta cepa carece de núcleo interno y núcleo externo, y presenta un Kdo desnudo. Esta estructura truncada podría facilitar que la molécula de Kdo y/o el lípido A sea reconocible por receptores del macrófago.

De acuerdo con los datos de adhesión obtenidos con los mutantes analizados, las cepas HiNT375 $\Delta$ lic2A, HiNT375 $\Delta$ siaB y HiNT375 $\Delta$ psA fueron fagocitadas con mayor eficiencia que la cepa control por el macrófago MH-S. Por el contrario, el mutante más truncado que muestra el Kdo expuesto, HiNT375 $\Delta$ opsX, mostró unos niveles de fagocitosis nulos. Esta observación podría estar relacionada con la metodología empleada, de forma que no puede definirse si la ausencia de recuento bacteriano en el ensayo de fagocitosis es debida a que la ausencia de fagocitosis o a que, al ser una cepa con un LOS muy truncado, puede ser eliminada con mayor rapidez y eficiencia por el fagocito profesional.

Por otra parte, hemos mostrado que la exposición de los macrófagos alveolares a EHT y a nicotina disminuye la fagocitosis de HiNT, si bien los macrófagos eliminan las bacterias fagocitadas, independientemente de la presencia o ausencia de EHT. Otros estudios han demostrado con anterioridad que el EHT altera la inmunidad pulmonar, provocando disrupción de la función muco-ciliar, hipersecreción de moco, y destrucción de la integridad de la capa mucosa del epitelio respiratorio (Wang *et al.*, 2001; Wickenden *et al.*, 2003; Witherden *et al.*, 2004). Aunque no ha sido probado experimentalmente, dichos cambios parecen aumentar el riesgo de sufrir infecciones, lo cual está sustentado por análisis epidemiológicos. De esta forma, Drannik *et al.* han mostrado que ratones expuestos a humo de tabaco presentan un retraso en la eliminación de la carga bacteriana, un aumento de la respuesta inflamatoria y una mayor morbilidad (Drannik *et al.*, 2004). Este trabajo sugiere también que el déficit en la eliminación bacteriana observado en animales expuestos a humo de tabaco no es debido a defectos en la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares, porque dichos macrófagos fagocitan bolas de látex con eficiencia similar a la de los macrófagos de ratones no expuestos a humo de tabaco. En nuestro trabajo, mostramos resultados similares en cuanto a la capacidad del macrófago alveolar para fagocitar bolas de látex. Sin embargo, mostramos que los macrófagos alveolares expuestos a EHT presentan una reducción significativa en su capacidad para fagocitar una partícula viva como es HiNT. Esta observación pone de manifiesto el riesgo de formular conclusiones sobre interacciones huésped-patógeno cuando los datos proceden del uso de partículas inertes.

La exposición de macrófagos alveolares a EHT reduce la fosforilación de la proteína Akt promovida por la infección con HiNT y, por tanto, disminuye la señalización celular mediada por PI3K. Considerando que el bloqueo de la activación de PI3K con el inhibidor específico LY294002 reduce la fagocitosis de HiNT por el macrófago alveolar, los datos obtenidos sugieren que el bloqueo de PI3K por el EHT podría explicar, al menos en parte, el descenso en los niveles de fagocitosis bacteriana. Sin embargo, no

se puede excluir que el EHT afecte otras rutas de señalización celular que modulen, junto a PI3K, la fagocitosis bacteriana. Nuestros datos indican también que la exposición a EHT parece acelerar la tasa de eliminación bacteriana tras la fagocitosis. Dado que el EHT contiene ROS y tiene un efecto oxidante (Rahman *et al.*, 2003), la exposición a estos agentes oxidantes y/o radicales libres de oxígeno podría amplificar el potencial oxidativo de los macrófagos alveolares, y de este modo, contribuir a que las bacterias sean eliminadas más rápidamente.

Teniendo en cuenta el riesgo que supone la extrapolación de resultados obtenidos mediante aproximaciones *in vitro* a escenarios *in vivo*, es destacable que en este trabajo obtuvimos resultados similares al emplear macrófagos alveolares de ratón inmortalizados (MH-S) y macrófagos alveolares obtenidos a partir de BALs humanos (muestras *ex vivo*). El hecho de que el EHT disminuye la capacidad fagocítica del macrófago alveolar puede favorecer el escape del patógeno a la muerte fagolisosomal al no acceder a este tipo de compartimento subcelular, lo que puede favorecer a su vez la persistencia del microorganismo en el pulmón. Esta podría ser una explicación para la asociación observada entre la exposición a humo de tabaco y el riesgo de sufrir infecciones respiratorias. El hecho de que los macrófagos alveolares obtenidos a partir de fumadores, con o sin obstrucción respiratoria, presenten una capacidad para fagocitar HiNT menor a la de los macrófagos de individuos no fumadores apoya esta hipótesis. Por el contrario, se ha descrito que el efecto negativo del humo de tabaco sobre la fagocitosis parece restringirse al compartimento pulmonar, debido a la ausencia de diferencias entre los niveles de fagocitosis de HiNT por macrófagos procedentes del torrente sanguíneo de pacientes con obstrucción respiratoria y de individuos no fumadores (Berenson *et al.*, 2006).

Finalmente, se analizó el efecto de los glucocorticoides en la interacción entre HiNT y el macrófago alveolar. El tratamiento con dexametasona no restableció el déficit fagocítico provocado por la exposición a EHT. Sin embargo, tal y como cabía esperar, el tratamiento con dexametasona redujo los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos alveolares durante la infección por HiNT. Es importante destacar que el tratamiento anti-inflamatorio podría provocar el aumento de la colonización bacteriana de las vías respiratorias porque al disminuir la respuesta inflamatoria se puede favorecer la progresión de la infección. Existen evidencias apoyando esta hipótesis que indican que una supresión de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias facilita el establecimiento de neumonía (Burlison *et al.*, 2008). Apoyando estos datos, se ha descrito una asociación entre enfermos EPOC tratados con glucocorticoides inhalados y el riesgo de hospitalización por neumonía con una tasa elevada de mortalidad (Ernst *et al.*, 2007). De hecho, existen estudios que apuntan a la

incapacidad de la dexametasona para disminuir los niveles de IL-8 secretados por los macrófagos alveolares de pacientes EPOC (Culpitt *et al.*, 2002).

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo revelan nuevos efectos del humo de tabaco sobre funciones fisiológicas del macrófago alveolar, y su posible implicación y contribución a la colonización pulmonar por patógenos bacterianos oportunistas como HiNT.

Trabajos anteriores a los realizados en esta Tesis apuntaban a la alteración del proceso de fagocitosis en pacientes EPOC. De esta forma, Hodge *et al.*, describen una disminución de la capacidad fagocítica de células apoptóticas del epitelio respiratorio por macrófagos alveolares de pacientes EPOC y de individuos fumadores, que se recupera parcialmente una vez se abandona el hábito tabáquico (Hodge *et al.*, 2007).

Por otra parte, nuestras observaciones se han visto reforzadas por estudios posteriores como el llevado a cabo por Taylor *et al.*, en el que se describe una inhibición en la fagocitosis de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* por macrófagos alveolares de pacientes EPOC, en comparación con macrófagos alveolares de individuos no fumadores y de individuos fumadores con función pulmonar normal. Esta disminución en los niveles de fagocitosis no está asociada a alteraciones en la expresión de TLR2, TLR4 ni del receptor de manosa del macrófago alveolar (Taylor *et al.*, 2010). Al igual que en nuestro trabajo, la disminución de los niveles de fagocitosis no se observa al emplear bolas de látex (Taylor *et al.*, 2010). De la misma forma, Phipps *et al.*, muestran que la exposición de macrófagos alveolares a humo de tabaco reduce los niveles de fagocitosis de *S. pneumoniae* mediada por complemento, si bien no se observan diferencias en los niveles de fagocitosis de bacterias no opsonizadas (Phipps *et al.*, 2010).

Nuestros resultados, junto a trabajos publicados por otros grupos de investigación, indican el efecto deletéreo del tabaco en la actividad de fagocitos profesionales residentes en el pulmón, así como la ineficacia del tratamiento corticoide como paliativo de este defecto. Los datos sugieren que la exploración de terapias alternativas al uso de corticoides para su aplicación en pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas puede ser de interés en la práctica clínica.









## **CAPÍTULO 2**



## Capítulo 2. Análisis de patrones moleculares y fenotípicos en aislados clínicos de *Haemophilus influenzae* no tipable

### 2.1. INTRODUCCIÓN

La existencia de diferencias en contenido genético entre aislados de HiNT ha sido descrita en estudios previos al trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral (Ecevit, McCrea *et al.* 2004; Fernaays *et al.*, 2006). Existen varios mecanismos moleculares que facilitan la variabilidad genética entre aislados de HiNT: (i) intercambio de ADN mediante transferencia horizontal (Gilsdorf *et al.* 2004); (ii) polimorfismos genéticos causados por mutaciones puntuales y por inserciones y/o deleciones de ADN (Forbes *et al.* 1992; Munson *et al.*, 1993; Duim *et al.* 1994; Duim *et al.* 1997; Gilsdorf, *et al.* 2004); (iii) hipermutación (Watson *et al.* 2004); (iv) variación de fase (Power *et al.*, 2009). Las SSRs median la expresión variable de genes que codifican enzimas relacionados con la adición de PCho, digalactosa y ácido siálico a la molécula de LOS (Harvey *et al.*, 2001; Schweda *et al.*, 2007), y de genes que codifican las adhesinas HMW1A y HMW2A (Dawid *et al.*, 1999). El repertorio de SSRs varía entre cepas de HiNT (Power *et al.*, 2009). Otra estrategia utilizada por HiNT para evadir el sistema inmune del hospedador es el mimetismo molecular. HiNT expresa moléculas de superficie como PCho, que mimetiza el factor PAF eucariota, y puede actuar como ligando del receptor PAF-R; la digalactosa, que mimetiza el antígeno humano P<sup>k</sup>; el ácido siálico, un azúcar presente con frecuencia en glicoesfingolípidos de la membrana plasmática de células del hospedador como los gangliósidos (Harvey *et al.*, 2001; Schweda *et al.*, 2007).

La variabilidad genética influye en la heterogeneidad del núcleo externo del LOS. El LOS de HiNT es un glicolípido complejo compuesto por un lípido A anclado a la membrana y unido a una molécula de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo) El Kdo está unido a su vez a un oligosacárido heterogéneo compuesto de azúcares de heptosa (Hep) y hexosa (Hex) (Schweda *et al.*, 2007). Cada Hep del trisacárido del núcleo interno conservado es un punto para la adición de hexosas y posterior extensión de la ramificación (Schweda *et al.*, 2007) (**Fig. 7**). La composición de las extensiones de hexosas varía entre cepas. *lgtF* codifica una glicosiltransferasa responsable del inicio de la ramificación a partir de la HepI mediante la adición de una glucosa (Hood *et al.*, 2004). *lic2C* y *lpsA* codifican dos glicosiltransferasas encargadas

del inicio de las extensiones de azúcares a partir de las heptosas HepII y HepIII, respectivamente (Hood *et al.*, 2004). *lic1ABCD* codifica cuatro proteínas responsables de la síntesis y transferencia de PCho a la molécula de LOS (Weiser *et al.*, 1997). *lic2A*, *lgtC* y *lex2B* codifican tres enzimas responsables de la adición de digalactosa al LOS (Deadman *et al.* 2006). El LOS de HiNT puede contener ácido siálico (ácido 5-acetilneuramínico o Neu5Ac) en los azúcares de los residuos terminales. Los genes *lic3A*, *siaA*, *lsgB* y *lic3B* codifican cuatro sialiltransferasas encargadas de transferir CMP-Neu5A al aceptor de la lactosa o lacto-N-triosa (Jones *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2006). La sustitución PCho está relacionada con la resistencia bacteriana a la muerte por péptidos antimicrobianos y por suero, está involucrada en la adhesión e invasión de HiNT en células epiteliales y en la formación de *biofilms* (Weiser *et al.*, 1998; Lysenko *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2001; Gould *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2007; Hong, Pang *et al.*, 2007). La presencia de digalactosa en el LOS se asocia con el aumento de la virulencia y de la resistencia de HiNT a la muerte mediada por complemento (Weiser *et al.*, 1998; Erwin *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2007). La sialilación del LOS favorece la resistencia de HiNT a la muerte mediada por complemento y juega un papel en la formación de *biofilms* (Hood *et al.*, 1999; Swords *et al.*, 2004; Jurcisek *et al.*, 2005; Figueira *et al.*, 2007). La presencia de *lic2C*, *lic2B*, *losA*, *losB* y *lic3B* es variable entre cepas (Hood *et al.*, 1999; Pettigrew *et al.*, 2002; Hood *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006). La expresión de *lic1A*, *lic2A*, *losA*, *lgtC*, *lex2A*, *lic3A* y *lic3B* es regulable por variación de fase (Harrison *et al.*, 2005; Moxon *et al.*, 2006; Power *et al.*, 2009).

Para colonizar el epitelio respiratorio, HiNT presenta moléculas adhesivas en su superficie. Se han identificado las adhesinas PE, Hap, HMW1A, HMW2A, Hia, Hap, P2, P5 y OapA (St Geme *et al.*, 1993; Weiser *et al.*, 1995; Barenkamp *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996; Hendrixson *et al.*, 1998; Prasadarao *et al.*, 1999; St Geme *et al.*, 2002; Ronander *et al.*, 2008). *ompP5* codifica la proteína de membrana externa P5 (Duum *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998). P5 se une a mucina y al receptor eucariota CEACAM-1 (Munson *et al.*, 1993; Virji *et al.*, 2000; Hill, *et al.*, 2001; Bookwalter *et al.* 2008). OapA media la adhesión a células epiteliales a través de un receptor desconocido (Prasadarao *et al.*, 1999). P5 y OapA muestran heterogeneidad de secuencia entre cepas (Duum *et al.*, 1997 y Prasadarao *et al.*, 1999). HMW1A, HMW2A y Hia muestran variabilidad en cuanto a su distribución y niveles de expresión entre cepas (Buscher *et al.*, 2004; Ecevit *et al.*, 2004; Giufre *et al.*, 2006; Satola *et al.*, 2008; St Geme *et al.*, 1998 y Xie *et al.*, 2006).

La diversidad genética y fenotípica de HiNT se ha analizado principalmente en cepas no isogénicas, aisladas de individuos no relacionados entre sí, con el fin de identificar factores de virulencia o marcadores genéticos que permitan diferenciar HiNT de otras

bacterias. Estos estudios han analizado la distribución de *lic2B* (Erwin *et al.*, 2005; Pettigrew *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2006); *losAB* (Erwin *et al.*, 2006); *hmw1A* y *hmw2A* (Buscher *et al.*, 2004; Ecevit *et al.*, 2004; Giufre *et al.*, 2006; St Geme *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2006); *hia* (Ecevit *et al.*, 2004; Satola *et al.*, 2008; St Geme *et al.*, 1998); *sodC* (McCrea *et al.*, 2010); o el operón de síntesis de histidina (Juliao *et al.*, 2007).

Trabajos previos han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre el potencial patogénico y el contenido genético de HiNT. Varios de estos trabajos han apuntado la importancia del LOS y de las adhesinas en la patogénesis de HiNT (Krasan *et al.*, 1999; Pettigrew *et al.*, 2002; Ecevit *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2003; Erwin *et al.*, 2005; Satola *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2010; Sandstedt *et al.*, 2010; van Schilfgaarde *et al.*, 2000; Fernaays *et al.*, 2006). Por otra parte, los genomas de todas las cepas de HiNT analizadas hasta la fecha contienen el gen *iga*, que codifica una proteasa de IgA1 de tipo 1; sin embargo, los genomas de cepas aisladas de pacientes EPOC presentan una mayor probabilidad de contener también el gen *igaB*, que codifica una proteasa de IgA1 de tipo 2 (Murphy *et al.*, 2011), lo que sugiere la existencia de una relación entre el potencial patogénico de HiNT y la presencia de dos IgA proteasas.

A pesar de la relevancia clínica de la infección por HiNT en pacientes respiratorios crónicos, al comienzo de este trabajo no disponíamos de información sobre la diversidad genética y fenotípica existente en *sets* de cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios crónicos durante episodios independientes de agudización de la enfermedad respiratoria crónica subyacente.

En base a las evidencias disponibles, planteamos la existencia de patrones génicos/huellas moleculares prevalentes en aislados clínicos de HiNT, y la posibilidad de que estos patrones génicos estén relacionados con la capacidad del patógeno para interactuar con el hospedador. A continuación, se presenta el trabajo realizado para analizar la distribución y conservación de nueve genes que codifican moléculas de la superficie bacteriana en una colección de aislados clínicos de HiNT no isogénicos y en una colección de *sets* de cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios en visitas médicas independientes.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

**Colección 1** de aislados clínicos de HiNT: se emplearon 111 cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes con edades comprendidas entre 17 días y 92 años en dos Hospitales terciarios localizados en dos emplazamientos geográficos distintos. 64 cepas se aislaron en el Hospital Universitario Bellvitge (HUB), en Barcelona, a partir de esputo (52 cepas), aspirado bronquial o traqueal (5 cepas), exudado conjuntivo (2 cepas), sangre (2 cepas), BAL (2 cepas) y absceso pulmonar (1 cepa). 47 cepas se aislaron en el Hospital Universitario Son Dureta (HSD), en Palma de Mallorca, a partir de esputo (24 cepas), aspirado bronquial o traqueal (14 cepas), exudado nasofaríngeo (5 cepas), exudado conjuntivo (3 cepas) y exudado ótico (1 cepa) (**Tabla 10**). El acceso a las cepas de la colección 1 se ha realizado a través del establecimiento de una colaboración con la Dra. Josefina Liñares (HUB) y el Dr. Antonio Oliver (HUSD).

**Colección 2** de aislados clínicos de HiNT: se emplearon 54 cepas clínicas de HiNT aisladas a partir de muestras de esputo de 20 pacientes respiratorios adultos que acudieron al HUB entre los años 1996 y 2007 al sufrir una agudización de una enfermedad respiratoria crónica subyacente. Las enfermedades respiratorias crónicas subyacentes fueron: enfisema (2 pacientes), bronquiectasias (5 pacientes), EPOC (10 pacientes), apnea obstructiva del sueño (1 paciente) y asma crónica bronquial (2 pacientes) (**Tabla 19**). El acceso a las cepas de la colección 2 se ha realizado a través de una colaboración con la Dra. Josefina Liñares (HUB). En cada visita, se recogieron muestras de esputo espontáneo, se homogeneizaron y se incubaron a 37°C durante 15 min con un volumen equivalente de dithiothreitol (Espotolisina; Calbiochem). Se prepararon diluciones seriadas de esputo homogeneizado en PBS y se plaquearon en Agar-chocolate, Agar-sangre y Agar-MacConkey. HiNT se identificó mediante técnicas de identificación microbiológica estándar. A partir de las muestras en las que se identificó HiNT, se seleccionaron cinco colonias/placa con características morfológicas similares en placas incubadas entre 18-24 h. Las colonias seleccionadas/placa se inocularon en un único tubo con 2 ml de caldo de soja triptona (TSB, del inglés *Tryptone Soya Broth*). La suspensión bacteriana generada en cada caso se congeló a -80°C. Cada suspensión bacteriana congelada generó un *stock* que fue considerado como una cepa (n=54).

El material congelado de la colección 2 se usó para análisis de tipado molecular mediante PFGE (ver **apartado 2.2.3.** en la sección Materiales y Métodos). Se analizó el

perfil de PFGE de las 54 cepas. Adicionalmente, en el caso de tres de los *stocks* congelados, se analizó el perfil de PFGE de nueve colonias por *stock*. Las nueve colonias de cada muestra presentaron perfiles de PFGE idénticos entre sí. El análisis de PFGE de las cepas de la colección 2 fue realizado por la Dra. Laura Calatayud (HUB).

*H. influenzae* Rd KW20 (Fleischmann *et al.*, 1995) es una cepa carente de capsula generada a partir de una cepa de *H. influenzae* serotipo d. Es una cepa no patógena; su genoma está secuenciado y disponible (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?database=ghi>). HiNT375 es un aislado clínico de otitis media (Bouchet *et al.*, 2003). HiNT398 es un aislado clínico de EPOC, también denominado HiNT157952 (Regueiro *et al.*, 2009). HiNT2019 es un aislado clínico de EPOC (Swords *et al.*, 2000).

Todas las cepas de HiNT se cultivaron en placas de Agar-chocolote (Biomérieux). Alternativamente, las cepas se crecieron en placas de sBHI-Agar. Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en sBHI. En todos los casos, las bacterias se cultivaron a 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.2.2. Inmunodetección de PCho a partir de colonia (ver apartado 1.2.4. capítulo 1)

### 2.2.3. Gel de electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Las cepas de HiNT se caracterizaron mediante análisis de macro-restricción del ADN cromosómico digerido con *Sma*I y separación de los fragmentos en gel de electroforesis en campo pulsado. Para ello, se sembró una colonia de cada cepa en 5 ml de sBHI y el cultivo se creció durante 15 h a 37°C con agitación a 120 r.p.m. Se introdujeron 500 µl de cada cultivo crecido en fase estacionaria en un tubo con 5 ml de tioglicolato (Biomérieux), que se incubó durante 18 h a 37°C en agitación a 120 r.p.m. El cultivo crecido se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 2 min, y se descartó el sobrenadante. El *pellet* obtenido se resuspendió en 1 ml de PIV (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, NaCl 1 M), se centrifugó de nuevo y el *pellet* se resuspendió en 200 µl de PIV. Los 200 µl de suspensión en PIV se mezclaron con 200 µl de “*low melting point agarose*” (Biorad). Se introdujeron unos µl de esta mezcla en un pocillo para su solidificación. Una vez sólidos, los bloques de agarosa se incubaron a 37°C durante 15 h con solución de lisis (Tris-HCl 6 mM pH 7,6, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, Brij58 0,5%, Desoxicolato



0,2%, Sarcosil 0,5%, RNAasa 20 µg/ml, Lisozima 100 µg/ml, Lisostafina 50 µg/ml). A continuación, la solución de lisis se sustituyó por solución ESP (M EDTA 0,5 pH 9-9,5, Proteinasa K 50 µg/ml, Sarcosil 1%) y los tubos con los bloques de agarosa se incubaron a 50°C durante 16 h. Los bloques se lavaron 5 veces durante 30 min/lavado a TA con TE (EDTA 1 M pH 7,6, Tris-HCl 10 mM pH 7,6). Posteriormente, se realizó la restricción del ADN y la separación electroforética de los fragmentos de restricción. Los bloques de agarosa con el ADN embebido se incubaron a 37°C en agua destilada durante 10 min. Para la restricción del ADN, los bloques de agarosa se introdujeron en 200 µl de mezcla de restricción (3 µl *Sma*I, 20 µl de tampón, 20 µl de BSA, 160 µl de agua destilada) y se incubaron durante 18 h a 25°C. Tras la digestión, los bloques de agarosa se incubaron con 1 ml de TE durante 1 h. Después, los bloques de agarosa se introdujeron en los pocillos del gel y éste se introdujo en la cubeta del CHEF-DR III *contour-clamped homogeneous electric field apparatus* (BioRad) programado a 6 V/cm<sup>2</sup> durante 23 h con pulsos de 1 a 30 s. Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y fueron identificados siguiendo el protocolo establecido por Tenover *et al.*, 1995.

#### 2.2.4. Preparación del ADN bacteriano y amplificación por PCR

La extracción de ADN genómico bacteriano se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.*, 2001. Brevemente, se centrifugó 1,5 ml de un cultivo de bacterias crecidas en fase estacionaria. El *pellet* se resuspendió en 567 µl de tampón TE y se trató con SDS 100 µg/ml y proteinasa K 0,5% p/v durante 1 h a 37°C para lisar las bacterias. A continuación, se añadieron 100 µl de NaCl 5 M, se agitó la preparación y se añadieron 80 µl de solución CTAB 10%-NaCl 0,7 M. Los lisados se incubaron 10 min a 65°C. Seguidamente, se procedió a la purificación del ADN mediante dos pasos sucesivos e idénticos de separación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). En cada paso, 750 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico se añadieron a la muestra que se agitó y se centrifugó 5 min a 14.000 × *g* para separar la fase acuosa donde se encuentra el ADN (superior) de la fase fenólica (inferior). Finalmente, la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se añadieron 300 µl de isopropanol (aprox. 0,6 volúmenes) para precipitar el ADN. El tubo se centrifugó 5 min a 14.000 × *g* y el *pellet* de ADN se lavó con etanol 70% para eliminar sales residuales. Tras una última centrifugación (5 min a 14.000 × *g*), el *pellet* de ADN se resuspendió con 50 µl de agua d.o.i.

Las reacciones de polimerasa en cadena (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) se llevaron a cabo para amplificar fragmentos específicos de ADN. Para ello, se utilizaron las enzimas polimerasa *GoTaq*<sup>®</sup> *Flexi* ADN (*Taq*, Promega) o ADN polimerasa *Vent* (New England Biolabs), cuando fue necesario obtener una mayor fidelidad de amplificación.

Los cebadores usados en este trabajo se describen en la **Tabla 9**. Los tamaños de los amplicones fueron los siguientes: *lgtF* (lgtF-F1+lgtF-R1, 1461 pb), *lic2A* (lic2A-Fs+lic2A-Rs, 909 pb), *lic1D* (lic1DA+lic1DR, 826 pb), *lic3A* (lic3AF1+lic3A-R1, 888 pb; lic3A-F2+lic3A-R1, 846 pb), *lic3B* (lic3B-F1+lic3B-R1, 891 pb; lic3B-F2+lic3B-R1, 851 pb), *siaA* (siaA-F1+siaA-R1, 854 pb), *lic2C* (lic2BA+lic2BC, 1035 pb; lic2BA+lic2BB, 1898 pb), *ompP5* (P5-Fw+P5-Rv, 1046 pb; P5-seqF4+P5-Rv, 912 pb; P5-seqF5+P5-Rv, 985 pb), *oapA* (oapA-Fw+oapA-Rv, 1170 pb), *lic1A* (lic1A-F1+lic1A-R1, 568 pb). Las reacciones de PCR con polimerasa *Taq* se realizaron en un volumen final de 50 µl, tal y como sigue: 1 × tampón de reacción (proporcionado por el fabricante), 0,5 mM dNTPs, 20 pmoles de cada cebador, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,25 U de ADN polimerasa y ADN molde. Las condiciones de reacción fueron: (1) desnaturalización inicial (5 min a 95°C); (2) 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 95°C), anillamiento (1 min, la temperatura se puso a punto para cada pareja de cebadores) y elongación (1 min por kb del fragmento a amplificar, 72°C); (3) elongación final (10 min a 72°C). Las reacciones de PCR con polimerasa *Vent* se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las siguientes condiciones: 1 × tampón de reacción (proporcionado por el fabricante, contiene 2 mM MgSO<sub>4</sub>), 0,5 mM dNTPs, 20 pmoles de cada cebador, 1,25 U de ADN polimerasa y ADN molde. Las condiciones de reacción fueron: (1) desnaturalización inicial (5 min a 95°C); (2) 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 95°C), anillamiento (1 min, la temperatura se puso a punto para cada pareja de cebadores) y elongación (1 min por kb del fragmento a amplificar, 74°C); (3) elongación final (10 min a 74°C).

Los genes amplificados se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de ADN Secugen. Se secuenciaron al menos dos amplicones al azar para los genes que no presentaron variabilidad de tamaños. Para *lic1A*, *lic2A* y *oapA*, que presentaron diversidad de tamaños, se secuenciaron amplicones representativos para cada tamaño y de los aislados seleccionados para análisis fenotípicos. Para *ompP5*, se secuenciaron los amplicones de los clones seleccionados para análisis fenotípicos.

Para la purificación de ADN, en solución o a partir de geles de agarosa, se usaron los kits comerciales *Illustra GFX<sup>®</sup> PCR DNA* y *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) y *NucleoSpin Extract II* (Macherey-Nagel).

**Tabla 9.** Cebadores utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
lgtF-F1	TGGTGGTGGGCAAGACGC	Hood <i>et al.</i> , 2004
lgtF-R1	AGCCTGAATTCGACAGCC	Hood <i>et al.</i> , 2004
lic2BC	CAATTTACTAACTTGCC	Hood <i>et al.</i> , 2004
lic2BA	CAATTTAGCGATGAGTTCC	Hood <i>et al.</i> , 2004
lic2BB	AAGTATGATCCTCAAATG	Hood <i>et al.</i> , 2004
lic1DA	GTGATGATATATTTGAAATG	Fox <i>et al.</i> , 2008
lic1DR	TGGAAGCTTCATATAATCTCCATAA	Fox <i>et al.</i> , 2008
lic2A-Fs	ATGAGTGCTATTGAAAATATTGTCATT	Este estudio
lic2A-Rs	CTACATAAAACGAACAATTTCTTTACCTTG	Este estudio
lic3A-F1	CTTAGGAGGTCATATGTCAAAGCTGTCATTATTGCAGGTAATGG	Fox <i>et al.</i> , 2006
lic3A-F2	TCAATTGACTATAGTTTATTACCTAAA	Este estudio
lic3A-R1	CCTAGGTCGACCTAATCCCATTCTTGATTTTAAGGCGTG	Fox <i>et al.</i> , 2006
lic3B-F1	CTTAGGAGGTCATATGTCAAAGCTGTCATTATTGCAGGTAATGG	Fox <i>et al.</i> , 2006
lic3B-F2	AATCAATTGACTATAGTTTATTACCTA	Este estudio
lic3B-R1	CCTAGGTCGACTTATTTGCGTAGTCTCATTTTCTTTGC	Fox <i>et al.</i> , 2006
siaA-F1	GATGTTATTTTTATTTTTGTT	Este estudio
siaA-R1	ACTTAGGGTGTATTTTGGTTCC	Este estudio
oapA-Fw	CAGCCAAGTTCGTCAATTTTAGGTAAGCA	Este estudio
oapA-Rv	CACAAAACGCGCACCATTGGATAAACGCAT	Este estudio
P5-Fw	CTGCAATCGCATTAGTAGTTGCTGGTTTAG	Este estudio
P5-Rv	AGTACCGTTTACCGCGATTCTACACGACG	Este estudio
P5-seqF4	GAATATAAAGTAGTTATCACCGTAATTCT	Este estudio
P5-seqF5	GAAAACACTTTCTACGCTGGCGTTAAAGCT	Este estudio
lic1A-F1	TCCACTATTAGGCGAAACCTTAGCTTC	Este estudio
lic1A-R1	TAAATAACGAGTCAGTTTTACGCCACTT	Este estudio

### 2.2.5. Purificación y separación electroforética de la molécula de LOS de HiNT y Dot-Blot

Se prepararon lisados bacterianos de HiNT a partir de bacterias crecidas en fase estacionaria en placas de sBHI-Agar suplementadas con ácido siálico (50 µg/ml). Para ello, se recogió la biomasa de la placa con 1 ml de PBS y la suspensión bacteriana se ajustó con PBS a  $DO_{260}=1$ . Alícuotas de 10 µl de esta suspensión se hirvieron durante 5 min a 100°C para lisar las bacterias. Cuando fue requerido, los lisados se trataron con 2,5 µl neuraminidasa (4 U/µl) de *Clostridium perfringens* (Boehringer Mannheim) a 37°C durante 16 h para eliminar el ácido siálico de la molécula de LOS. Los lisados hervidos se separaron mediante electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida con SDS con un gradiente de poliacrilamida del 17.7% (fase de resolución) en tampón SDS-tricina (Lesse *et al.*, 1990). La tinción de plata del gel se realizó con el kit comercial Quicksilver® (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo para cuantificar los niveles de digalactosa en la superficie bacteriana se llevó a cabo con lotes de 2  $\mu$ l de lisado bacteriano en dot-blot, utilizando el anticuerpo monoclonal 4C4, que reconoce de forma específica el motivo Gal- $\alpha$ -(1-4)- $\beta$ -Gal.

Los ensayos de análisis de perfil electroforético de LOS y dot-blot fueron realizados en colaboración con el Dr. Derek Hood (Oxford University, UK).

### 2.2.6. Cultivo celular, mantenimiento de líneas celulares e infección

La línea celular de carcinoma pulmonar humano A549 (ATTC CCL-185) derivada de neumocitos tipo II, se cultivó en RPMI completo. Las células se crecieron en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, en una atmósfera saturada de humedad al 95%, con 5% CO<sub>2</sub>.

Los ensayos con células A549 se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos con un 90% de confluencia (4-5x10<sup>5</sup> células/pocillo). Cuando el experimento requirió observación con un microscopio de fluorescencia, las células se crecieron en pocillos sobre cubreobjetos circulares de vidrio de 13 mm de diámetro. 16 h antes de la infección, el medio RPMI completo se sustituyó por RPMI-1640 con HEPES y antibióticos, sin SBF para sincronizar el ciclo celular de la monocapa a infectar. Previo a la infección, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió 1 ml de EBSS por pocillo. Para la infección con HiNT, las bacterias crecidas en placas de Agar-chocolate durante 16 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> se recogieron con 1 ml de PBS. Esta suspensión bacteriana se ajustó con PBS DO<sub>600</sub>=1 (aproximadamente 10<sup>9</sup> u.f.c./ml). Se añadieron 50  $\mu$ l de esta suspensión a cada pocillo con 1 ml de EBSS, con el fin de obtener una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula (100:1).

La determinación de la adhesión de HiNT al epitelio respiratorio se llevó a cabo mediante la infección de las células en cultivo y el procesamiento del material para recuento de u.f.c. o para análisis mediante microscopía. El tiempo de infección en EBSS fue de 30 min (tiempo de contacto). Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS y las células se lisaron con 300  $\mu$ l de PBS-saponina 0,025% durante 10 min a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas de los lisados celulares, que fueron plaqueadas en sBHI-Agar. Las bacterias se enumeraron mediante recuento de u.f.c. Alternativamente, cuando la infección se llevó a cabo sobre cubreobjetos, las células fueron fijadas para su procesamiento posterior mediante microscopía (**apartado 1.2.9.** sección Material y Métodos del capítulo 1). Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos en tres ocasiones independientes (n $\geq$ 9).

### 2.2.7. Resistencia bacteriana a muerte mediada por suero

Bacterias crecidas en fase estacionaria en placas de sBHI-Agar se resuspendieron en PBSB (PBS con albúmina bovina sérica 1% (p/v)) y se ajustaron a una concentración aproximada de  $10^4$  bacterias/ml. 50  $\mu$ l de esta suspensión bacteriana se añadieron a cada tubo de una colección de tubos con un gradiente de concentraciones de suero humano normal (SHN) en PBSB (entre 10 y 0,15%). Los tubos fueron incubados durante 45 min. La supervivencia bacteriana relativa al inóculo inicial (tiempo=0) se cuantificó mediante plaqueo en sBHI-Agar y enumeración de u.f.c. El SHN fue obtenido de 20 donantes distintos. El resultado es la media de tres réplicas independientes.

### 2.2.8. Análisis de la estructura del lípido A de HiNT

La extracción del lípido A de diferentes cepas de HiNT se realizó mediante un método basado en el empleo de hidróxido de amonio/ácido isobutírico y posterior análisis por espectrometría de masas sujeto a una matriz de iones negativos asistidos por desorción de ionización en tiempo de vuelo por láser (MALDI-TOF). En detalle, 10 mg de liofilizado bacteriano de cada cepa de interés se resuspendieron en 400  $\mu$ l de ácido isobutírico/hidróxido de amonio 1 M (5:3, v/v) y se incubó en un tubo de ensayo a 100°C durante 2 h con agitación (vórtex) ocasional. Las muestras se enfriaron en agua-hielo y se centrifugaron (2000 x g, durante 15 min). El lípido A insoluble se disolvió en 100-200  $\mu$ l de una mezcla de cloroformo/metanol/agua (3/1,5/0,25 v/v/v). El análisis de la estructura del lípido A se llevó a cabo en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Autoflex II (Bruker Daltonics, Incorporated) en modo de reflexión negativa con extracción retardada. El voltaje de aceleración iónica se situó a 20 kV. Para el análisis de las muestras, varios  $\mu$ l de la suspensión del lípido A (1 mg/ml) se desalaron con resina de intercambio iónico (Dowex 50W-X8; H+) en un tubo de 1,5 ml. 50-100  $\mu$ l de la suspensión generada se depositaron en la placa de análisis y se cubrieron con la misma cantidad de matriz de ácido dihidrobenzoico (Sigma) disuelta en ácido cítrico 0,1 M. Alternativamente, el lípido A se mezcló con 5-cloro-2-mercapto-benzotiazol (Sigma) 20 mg/ml en cloroformo/metanol (1/1 v/v) en una proporción 1:5. Cada espectro fue el resultado de una media de 300 disparos. Para la calibración del MALDI-TOF, se utilizó un péptido estándar de calibración (Bruker Daltonics). Las calibraciones posteriores para el lípido A se llevaron a cabo externamente utilizando extractos de lípido A de *E. coli* (cepa MG1655) crecida en LB a 37°C. La interpretación del espectro iónico negativo se basó en estudios previos que mostraban que los iones

con masas mayores a 1000 arrojaban señales proporcionales a las especies de lípido A correspondientes presentes en la preparación. Las masas teóricas para la interpretación de los picos encontrados en este estudio son: C<sub>14:0H</sub>, 226; C<sub>12</sub>, 182; C<sub>14</sub>, 210; aminoarabinosa (Ara4N), 131; C<sub>16</sub>, 239.

### 2.2.9. Análisis estadístico

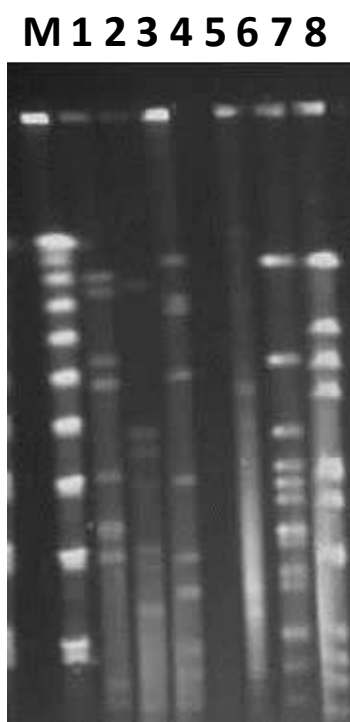
Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Las barras de error de las gráficas corresponden al error típico. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) de una cola o el test *t* de *Student* de dos colas seguido del test de Mann Whitney, utilizando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de *P* fue inferior a 0.05.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Tipado molecular de una colección de cepas de HiNT aisladas de pacientes no relacionados

111 cepas de HiNT se aislaron a partir de muestras obtenidas de 111 pacientes con infecciones respiratorias agudas (neumonía, bronquiolitis, sinusitis, bronquitis aguda, traqueobronquitis aguda, resfriado común), infecciones no respiratorias, (conjuntivitis, bacteremia, otitis media, cáncer de pulmón), y exacerbaciones de enfermedades respiratorias crónicas (EPOC, fibrosis quística, bronquiectasias, enfermedad pulmonar parenquimal difusa, asma crónica, enfermedad intersticial pulmonar crónica, pulmón poliquístico) en dos hospitales españoles, entre Enero y Junio 2008 (**Tabla 10**). La recogida de muestras y el aislamiento de los microorganismos se realizaron en colaboración con los Drs. Josefina Liñares (HUB) y Antonio Oliver (HSD-H. Son Espases). El análisis de clonalidad de las cepas aisladas en HUB fue realizado por la Dra. Laura Calatayud; el análisis de clonalidad de las cepas aisladas en HSD fue realizado por J.P. Martí Llitas (**Fig. 31**). El análisis de clonalidad mediante PFGE y la interpretación de los patrones de restricción obtenidos (Tenover *et al.*, 1995) mostró que los 111 aislados presentaron un perfil electroforético distinto. En

base a este resultado, interpretamos que esta colección de aislados clínicos está formada por 111 cepas no isogénicas, con contenido genético distinto.



**Figura 31.** Gel de electroforesis en campo pulsado (PFGE) mostrando patrones de restricción de ADN cromosomal de distintas cepas de HiNT (números de 1 a 8). M, marcador de peso molecular. El patrón de bandas se obtuvo tras la digestión del ADN cromosómico de las distintas cepas de HiNT con *SmaI*.

### 2.3.2. Distribución, prevalencia y secuencia de genes que codifican estructuras de la superficie de HiNT en una colección de cepas no isogénicas

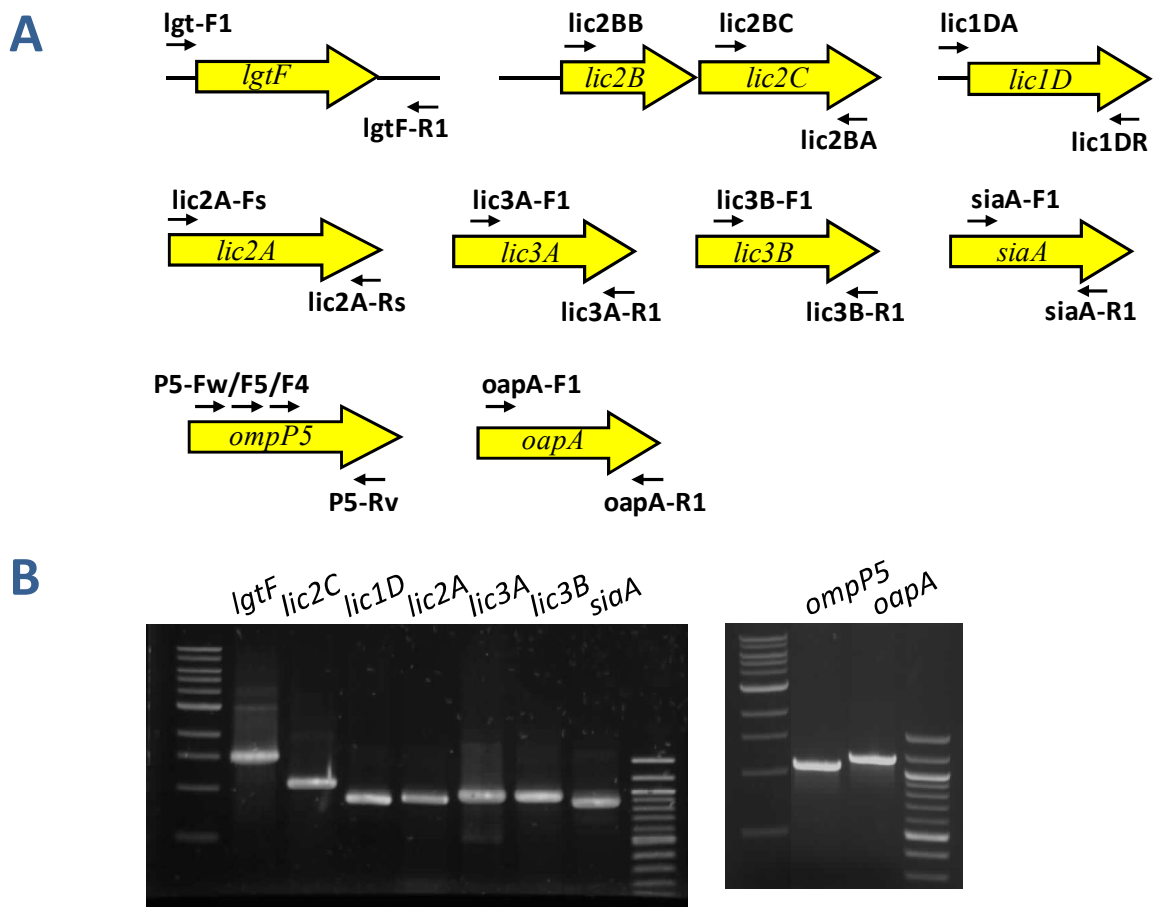
A continuación, se analizó mediante PCR la distribución (presencia o ausencia) de nueve genes en los 111 aislados clínicos de HiNT disponibles (**Fig. 32** y **Tabla 10**). Los genes analizados codifican proteínas responsables de la expresión de moléculas de la superficie bacteriana. La cepa *H. influenzae* Rd KW20 se usó como control (Fleischmann *et al.*, 1995). Los nueve genes analizados se eligieron en base a su potencial presencia o ausencia (*lic3B*, *siaA*, *lic2C*), variabilidad de su expresión (*lic2A*, *lic1D*, *lic3A* y *lic3B*) o de su secuencia (*ompP5* y *oapA*), o por ser genes invariablemente presentes en las colecciones de aislados analizadas previamente (*IgtF*). Para el análisis

de distribución génica, se realizó la purificación de ADN genómico de cada cepa y la amplificación mediante PCR de los genes de interés con cebadores específicos (**Tabla 9**). Se determinó la existencia de 3 patrones moleculares, en cuanto a presencia o ausencia de los nueve genes seleccionados, que fueron denominados patrones 1, 2 y 3. El **patrón 2** (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*) fue el más prevalente, presente en 94,6% de los aislados (92,2% en las cepas aisladas en HUB y 97,9% en las cepas aisladas en HSD (**Tabla 11**). La cepa HiNT398 (Marti-Lliteras *et al.*, 2009 y Morey *et al.*, 2011) pertenece al **patrón 2**. El **patrón 1** (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C-*, *ompP5+*, *oapA+*) se detectó en 4,5% de los aislados, únicamente presente en cepas aisladas en el HUB. La cepa HiNT375 pertenece al patrón 1. El **patrón 3** (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA+*, *lic2C-*, *ompP5+*, *oapA+*) fue observado en 0,9% de los aislados, únicamente en una cepa aislada en el HSD.

**Tabla 10.** Origen clínico de las cepas utilizadas en este estudio que constituyen la colección 1.

Datos clínicos	Nº de cepas (HUB/HSD)
<b>EPOC</b>	<b>47 (30/17)</b>
<b>Otras enfermedades respiratorias crónicas</b>	<b>15 (7/8)</b>
Fibrosis quística	6 (0/6)
Bronquiectasias	4 (3/1)
Enfermedad pulmonar parenquimática difusa	2 (1/1)
Asma crónica	1 (1/0)
Enfermedad pulmonar intersticial crónica	1 (1/0)
Pulmón policístico	1 (1/0)
<b>Infecciones respiratorias</b>	<b>36 (20/16)</b>
Neumonía	14 (6/8)
Bronquiolitis	1 (0/1)
Sinusitis	1 (1/0)
Bronquitis aguda	17 (12/5)
Traqueo-bronquitis aguda	2 (0/2)
Resfriado común	1 (1/0)
<b>Infecciones no respiratorias</b>	<b>10 (5/5)</b>
Conjuntivitis	4 (2/2)
Bacteriemia	1 (1/0)
Otitis media	2 (0/2)
Colonización en carcinoma pulmonar	3 (2/1)
<b>Datos no accesibles</b>	<b>3 (2/1)</b>



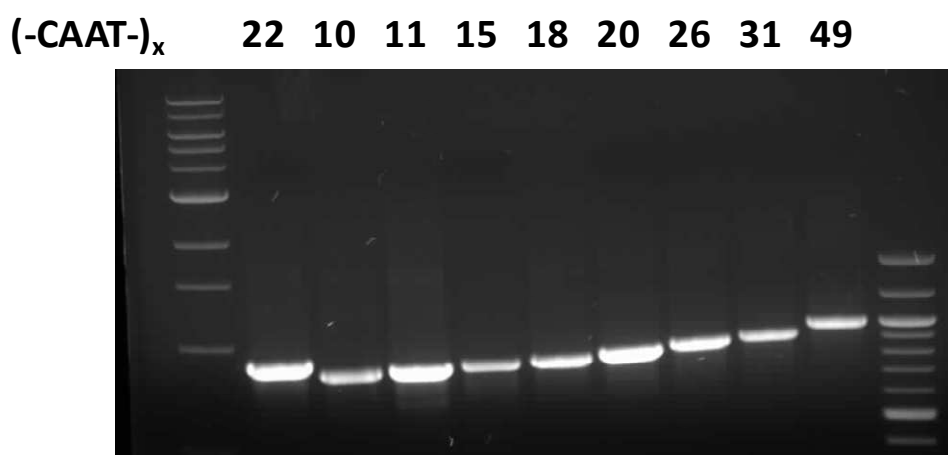


**Figura 32.** Localización de los cebadores y tamaños de los amplicones obtenidos por PCR al amplificar los genes analizados. **(A)** Localización de los cebadores utilizados para amplificar mediante PCR los genes estudiados. **(B)** Gel de agarosa 1% mostrando productos de PCR representativos de la amplificación de los genes *lgtF*, *lic2C*, *lic1D*, *lic2A*, *lic3A*, *lic3B*, *siaA*, *ompP5* y *oapA*. Marcadores de peso molecular: marcador izquierdo, 1 kb ladder (Biotools); marcador derecho, 100 bp ladder (Biotools).

**Tabla 11.** Distribución de los genes que codifican adhesinas y enzimas implicados en la síntesis del LOS en una colección de 111 aislados clínicos de HiNT no isogénicos.

Patrón	<i>lgtF</i>	<i>lic2A</i>	<i>lic1D</i>	<i>lic3A</i>	<i>lic3B</i>	<i>siaA</i>	<i>lic2C</i>	<i>ompP5</i>	<i>oapA</i>	Nº total (HUB/HSD)	% (HUB/HSD)
1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	5 (5/0)	4,51 (4,5/0)
2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	105 (59/46)	94,59 (92,18/97,87)
3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1 (0/1)	0,9 (0/2,1)

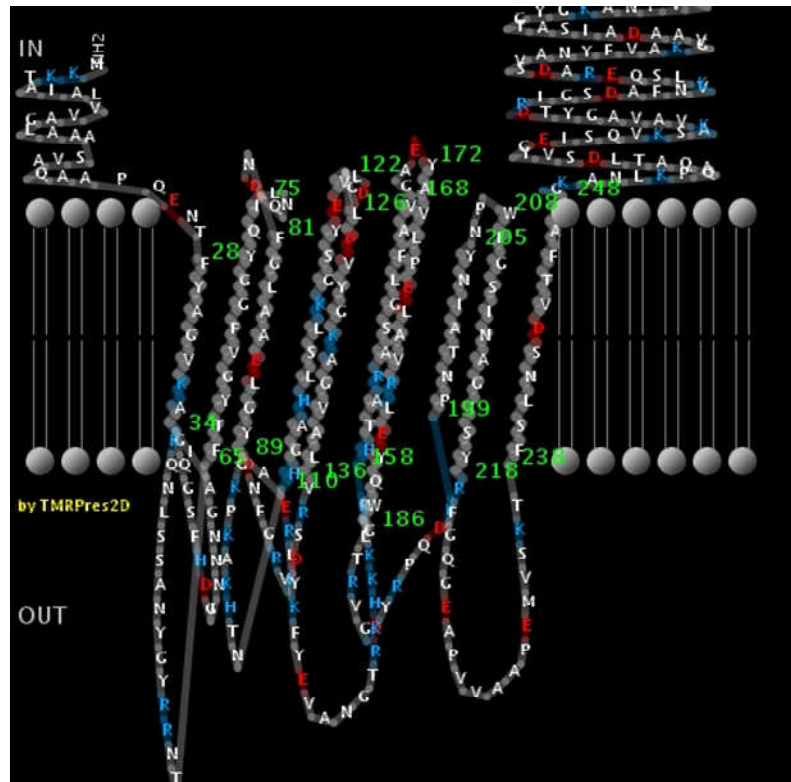
El gen *lic2A* se amplificó en 100% de las cepas, mostrando diferencias de tamaño entre aislados. En base a esta observación, analizamos la posibilidad de que el gen *lic2A* presente un número distinto de repeticiones 5'-CAAT-3' en su extremo 5' (**Fig. 33**). Para analizar esta observación, se seleccionaron 19 aislados representativos de los 3 patrones moleculares definidos. Patrón 1: se seleccionaron los aislados HiNT1500, HiNT1559 y HiNT1560; patrón 2: se seleccionaron los aislados HiNT398, HiNT1513, HiNT1549, HiNT1553, HiNT1556, HiNT1557, HiNT1558, HiNT1566, HiNT1568, HiNT1606, HiNT1607, HiNT1621, HiNT1622 y HiNT1623; patrón 3: se seleccionó el aislado HiNT1619 (**Tabla 12**). Mediante la secuenciación del producto de amplificación de *lic2A*, se determinó que las 19 cepas seleccionadas contienen entre 7 y 33 repeticiones 5'-CAAT-3' en la región codificante de este gen (**Tabla 13**). La región 5' de *lic2A* en la que se localizan las repeticiones 5'-CAAT-3' está precedida por dos putativos codones de inicio, localizados en dos pautas de lectura distintas, los codones x/y en la pauta de lectura 1 y los codones z1/z2 en la pauta de lectura 2 (Dixon *et al.*, 2007; Fox *et al.*, 2008). 15 de los 19 (78,9%) aislados analizados presentaron una de las dos pautas de lectura de *lic2A* conservada. 73,3% de los aislados analizados pertenecientes al patrón 2 conservó una de las dos pautas de lectura (**Tabla 13**). HiNT1550, perteneciente al patrón 2, mostró un producto de PCR correspondiente al gen *lic2A* de tamaño mayor al obtenido al utilizar como molde ADN genómico de los demás aislados analizados (**Fig. 33**). Esta diferencia de tamaño se correlacionó con el número de repeticiones 5'-CAAT-3, 49 en la cepa HiNT1550. En esta cepa, la pauta de lectura de *lic2A* no se conservó.



**Figura 33.** Gel de agarosa 1% mostrando productos de PCR representativos de los distintos tamaños obtenidos al amplificar el gen *lic2A*. La diferencia de tamaños observada en los amplicones de *lic2A* se debe al diferente número de repeticiones del tetranucleótido CAAT en la región 5' de *lic2A*. (CAAT)<sub>x</sub> se refiere al número de repeticiones del tetranucleótido presentes en las cepas Hi Rd KW20 (22 repeticiones), HiNT1609 (10), HiNT1500 (11), HiNT1525 (15), HiNT1556 (18), HiNT1549 (20), HiNT1501 (26), HiNT1553 (31), HiNT1550 (49).

Los genes *lic3A* y *lic3B* se amplificaron en 100% de los aislados, generando productos de PCR de tamaño equivalente en todas las cepas. Los genes *lic3A* y *lic3B* presentan un número variable de SSRs en los extremos 5' de sus regiones codificantes (Power *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2005; Moxon *et al.*, 2006). Las secuencias SSR de *lic3A* y *lic3B* no se incluyeron en las regiones de estos genes que fueron amplificadas por PCR, lo que excluyó el análisis de variabilidad relacionada con el número de SSR en ambos genes. El gen *siaA* se encontró en 0,9% de los aislados. Los genes *ompP5* y *oapA* se analizaron porque presentan diversidad de secuencia entre cepas, lo que podría modular sus propiedades inmunogénicas y/o adhesivas. Ambos genes se amplificaron en 100% de los aislados.

Los productos de PCR obtenidos para *ompP5* presentaron el mismo tamaño en todas las cepas. El análisis de la secuencia de P5 mediante el programa informático de predicción de proteínas transmembrana  $\beta$  PRED-TMBB predijo que P5 presenta 10 dominios transmembrana y cinco regiones extracelulares variables (regiones 1 a 5) (**Fig. 34**) (Mullins *et al.*, 2009). Las secuencias de las cinco regiones extracelulares de P5 se secuenciaron en los 19 aislados de HiNT seleccionados (**Tablas 12 y 14**). La secuencia de *ompP5* en la cepa HiNT1568 presenta una mutación puntual que introduce un codón de parada prematuro. El alineamiento de las secuencias correspondientes a las cinco regiones extracelulares de las cepas seleccionadas mostró un grado distinto de variabilidad según la región. La región 1 mostró 16 secuencias distintas; la región 2 mostró 13 secuencias distintas; la región 3 mostró 11 secuencias distintas, la región 4 mostró 8 secuencias distintas; la región 5 mostró 3 secuencias distintas (**Tabla 14**). La región 1 presentó dos tipos de motivos según la cepa. 17 de los 19 aislados analizados presentan el motivo GINNNGAIK (rojo en la **Tabla 14**); 2 aislados contienen el motivo GVRAMGKQ en la región extracelular 1 de la proteína P5 (azul en la **Tabla 14**). Un trabajo previo describió el mismo tipo de distribución en 16 aislados de HiNT procedentes de regiones anatómicas distintas (Webb *et al.*, 1998). Las regiones extracelulares 2, 3 y 5 son de longitud comparable, todas ellas más cortas que la región 1; la región 4 es más corta.



**Figura 34.** Predicción de la estructura de la proteína P5 de HiNT obtenida con el programa PRED-TMBB. La parte inferior del modelo corresponde a la cara externa de la membrana bacteriana.

Los productos de PCR obtenidos al amplificar el gen *oapA* mostraron variabilidad de tamaño entre aislados. El análisis de la secuencia de *oapA* en los 19 aislados seleccionados mostró 6 tipos de secuencias, que se muestran a partir del aminoácido 195 en la **Tabla 15**. 61,1% de los aislados mostró una secuencia igual a la cepa *H. influenzae* Rd KW20; 5,6% mostró una inserción de 12 aminoácidos, igual a la cepa *H. influenzae* tipo b Eagan (Prasadarao *et al.*, 1999). Los demás aislados mostraron cuatro posibles inserciones adicionales. Tomando como referencia la secuencia más larga (presente en HiNT1622), que contiene dos repeticiones de la secuencia QAEQP (rojo en **Tabla 15**), 61,1% de las cepas presenta una delección de 12 aminoácidos, 5,6% presenta una delección de 32 aa, 5,6% una delección de 35 aa, y 11,1% tiene una delección de 48 aa (**Tabla 15**).

En conjunto, el análisis de siete genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis del LOS y dos genes que codifican proteínas de membrana en una colección de aislados clínicos de HiNT no isogénicos reveló tres patrones de distribución de estos genes, siendo uno de ellos prevalente.

**Tabla 12.** Características de los aislados de HiNT de la colección 1 seleccionados para su posterior caracterización.

Cepa HiNT	Datos clínicos	Tipo de muestra	Patrón molecular	Reactividad $\alpha$ -PCho	Reactividad $\alpha$ -4C4	Ácido siálico
1500	EPOC <sup>a</sup>	Espuito	1	Alta	<sup>d</sup> -	<sup>e</sup> +
1559	Neumonía	BAL	1	Alta	-	-
1560	EPOC	Espuito	1	Alta	+/-	+
398 <sup>b</sup>	EPOC	Espuito	2	Alta	-	+
1513	EPOC	Espuito	2	Alta	-	+
1549	EPOC	Aspiración transtorácica	2	Alta	+/-	+
1553	EPOC	Espuito	2	Doble	-	+
1556	EPOC	Espuito	2	Doble	-	+
1557	EPOC	Espuito	2	Alta	++	+
1558	Bronquiectasia	Espuito	2	Alta	-	-
1566	EPOC	Espuito	2	Doble	-	+
1568	EPOC	Espuito	2	Alta	+/-	-
1606 <sup>c</sup>	Bronquiectasia	Espuito	2	Baja	-	+
1607	EPOC	Espuito	2	Alta	+	-
1621	EPOC	Aspiración bronquial	2	Alta	-	-
1622	Bronquiolitis	Exudado nasofaríngeo	2	Alta	++	+
1623	EPOC	Aspiración bronquial	2	Alta	-	+
1630	Traqueo-bronquiolitis aguda	Espuito	2	Alta	+++	-
1619	Fibrosis quística	Exudado nasofaríngeo	3	Alta	++	+

<sup>a</sup>EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

<sup>b</sup>398: Cepa de referencia de HiNT, aislada en el HSD (Marti-Lliteras *et. Al.*, 2009 y Morey *et. Al.*, 2011).

<sup>c</sup>Las cepas de esta tabla por debajo de HiNT1606 (incluida), fueron aisladas en el HSD. Las cepas de esta lista entre HiNT1500 y HiNT1568 fueron aisladas en el HUB.

<sup>d</sup>Intensidad de la señal observada tras la reacción con el anticuerpo 4C4: (-) sin señal; (+/-), (+), (++) y (+++) indican presencia de señal, con intensidad creciente.

<sup>e</sup>Sialilación del LOS: (-) ausencia de formas sialiladas; (+) presencia de formas sialiladas.

**Tabla 13.** Distribución del número de repeticiones 5'-CAAT-3' en el gen *lic2A* en 20 cepas clínicas de HiNT.

Cepa de HiNT (patrón génico)	Secuencia	Traducción de <i>lic2A</i>
Rd KW20	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>22</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>22</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT 1560 (1)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>7</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>7</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT 1559(1)/1630(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>10</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>10</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT 1500(1)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>11</sub> -C AAA CTC C	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>11</sub> -CA AAC TCC	Si
HiNT 398(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>12</sub> -CAA A CT	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>12</sub> -C AAA CT	No
HiNT1553(2)/1606(2)/1568(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>13</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>13</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT1619(3)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>16</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>16</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT1566(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>17</sub> -C AAA CTC	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>17</sub> -CA AAC TC	Si
HiNT1556(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>18</sub> -CAA ACT C	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>18</sub> -C AAA CTC	No
HiNT 1513(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>19</sub> -CT CCA TAT	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>19</sub> -CTC CAT AT	No
HiNT 1623(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>19</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>19</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT1549(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>20</sub> -C AAA CTC	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>20</sub> -CA AAC TC	Si
HiNT1557(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>21</sub> -CTC CAT	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>21</sub> -CT CCA T	Si
HiNT 1607(2)/1621(2)/1622(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>25</sub> -CA AAC TCC	Si
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>25</sub> -CAA ACT CC	No
HiNT 1558(2)	Pauta x/y: ATGx-ATGy-(CAAT) <sub>33</sub> -CAA ACT C	No
	Pauta z1/z2: ATGz1-ATGz2-(CAAT) <sub>33</sub> -C AAA CTC	No

**Tabla 14.** Secuencia de las regiones extracelulares variables 1 a 5 de la proteína P5 en 18 aislados clínicos de HiNT.

Región 1	Aislado de HiNT	Patrón génico
GQASFHDGINNNGAIKDK-LLGGLASYGYRRNT	398	2
GQGSFHDGINNNGAIKQH-LSSTN—YGYRRNT	1513	2
GQGSFHDGINNNGAIKED-LTLG-----YGYRRNT	1549/1607	2
GQGSFHDGINNNGAIKES-LTSAS----YGYRRNT	1553	2
GQGSFHDGINNNGAIKKE-LS-TS----YGYRRNT	1556	2
GQGSFHDGINNNGAIKDA-LTSAS----YGYRRNT	1557	2
GQGSFHDGINNNGAIQEN-LTL---SYGYRRNT	1558	2
GQGSFHDGINNNGAIKGD-FSSTN—YGYRRNT	1559	1
GQGSFHDGINNNGAIKED-LSLG---YGYRRNT	1560	1
GQGSFHDGINNNGAIKGD-LSSY---YGYKRNT	1566	2
GQGSFHDGINNNGAIKDK-LSSY---YGYKRNT	1619	3
GQASFHDGINNNGAIKED-LALG---YGYRRNT	1621	2
GQGSFHDGINNNGAIKED-LSSY---YGYKRNT	1623	2
GQGSFHDGINNNGAIKQD-LGLG---YGHRRNT	1630	2
GQGSFHDGVRAMGKQFSAGHYRNT—FTYGVF-	1500/1606	1/2
GQGSFHDGINNNGAIKEN-LTSAS—YGYRRNT	1622	2
Región 2	Aislado de HiNT	Patrón génico
DDFGRAKFRAAGKPKVKHTN	1630	2
DDFGRAKLKTTGKLTGKHTN	1500/1606	1/2
DDFGRAKFRATGKPKVKHTN	1558	2
DNFGRVKFRTEGKTTAKHTN	1621	2
DNFGRVKFRAEGKTKAKHTN	1549/1607	2
DNFGRVKFRAEGKAKAKHTN	1560	1
DNFGRAKLRLEGKPKAKHTN	398	2
DNFGRAKLREAGKPKVKHTN	1513	2
DNFGRAKLREVGKPSAKHTN	1553/1557	2
DNFGRAKLREVGDTRAKHTN	1556	2
DNFGRVKLRLAGKPKVKHTN	1559/1619/1623	1/3/2
DNFGRVKLRANGQTLAKHTN	1566	2
DNFGRAKLRLAGKPKAKHTN	1622	2
Región 3	Aislado de HiNT	Patrón génico
VRSDYKFYEVANGTRDHKKGR	1553	2
VRSDYKFYDDANGTRDHKKGR	398	2
IRSDYKYDQ—GVRQRAKSE	1500/1606	1/2
VRSDYKFYNDANGTRDHKKS	1513	2
VRSDYKFYEAANGTRDHKKGR	1557	2
VRSDYKFYEAANGTRDHKKS	1559/1619	1/3
VRSDYKFYEDANGTRDHKKGR	1560/1607/1621/1622/1630/1549	1/2/2/2/2/2
VRSDYKFYTPNSTRDHKKGR	1566	2
VRSDYKHYEDANGTRNHDKGR	1556	2
VRSDYKFYEAANGSRDHKAGR	1558	2
VRSDYKFYEDANGTRDHKKS	1623	2
Región 4	Aislado de HiNT	Patrón génico
LTRVGKYPQDK	398/1513/1553/1559/1622/1630/ 1607/1623/1619/1557	2/2/2/1/2/2/2/2/ 3/2
LTRVGKYPQAK	1560	1
LTRVGKYRTQEK	1566	2
LTRIGKYPQAK	1621	2
VNQIGKLRSHH-	1500/1606	1/2



LTRVGKYRTQDK	1556	2
LTRVGKFRQDK	1558	2
LTRVGKYRSQDK	1549	2
<b>Región 5</b>	<b>Aislado de HiNT</b>	<b>Patrón génico</b>
RFGQGEAPVVAPEVVSKT	1560	1
RFGQGAAPVVAPEVVSKT	398/1549/1557/1559/1607/ 1619/1630/1621/1553	2/2/2/1/2/3/2/ 2/2
RFGQGEAPVVAPEMVSKT	1500/1513/1558/1556/1606/1622/ 1623/1566	1/2/2/2/2/2/2/2

**Tabla 15.** Secuencias de OapA en la región variable identificada (a partir del aminoácido 195) en 19 aislados clínicos de HiNT de la colección 1.

Secuencia	Cepa de HiNT
NPPAQNQMAAEQANQPESAPKAEAAANNTTAQNSVENTPMQQNVVQAPSQMPNEMAAASVMPMPPA <b>QAEQP</b> QMMPVQT <b>QAEQP</b> KPTVPVQPMKKAVE NPPAQNQMAVEQANQSEFAPKAEAAANNTTAQNPLVENAPMQNVVQSPSQMPNEMAAASVAPMQPT <b>QAEQP</b> -----KATAPVQPMKKAVE	1622 1500/1553/1560/1549/1623/1630/1559 1513/1556/1566/1619/398
NPPAQNQMAAEQANQ-----PENAPMQNVVQAPIQMPNEMAAASVAPMQPA <b>QAEQP</b> -----KATAPVQPMKKAVE NPPAQNQMAVEQANQPEFAPKAEAAANNTTAQNPLVENAPMQ-----PA <b>QAEQP</b> -----KATAPVQPMKKAVE NPPAQNQM-----PNEMAAASVMPMQAA <b>QAEQP</b> QMMPAQT <b>QAEQP</b> KPTVPVQPMKKTVE NPPAQNQM-----AAASVAPMQAA <b>QAEQP</b> QMMPAQT <b>QTEQP</b> KPTVPVQPMKKAVE	1607 1568 1606/1557 1558/1621

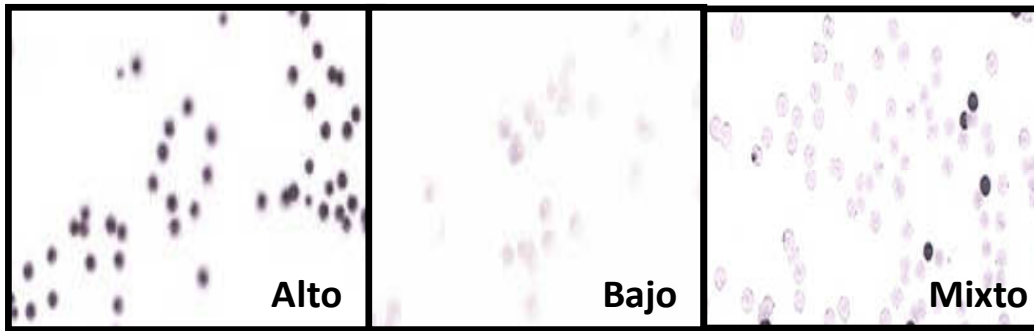
**Tabla 16.** Secuencias de OapA en la región variable identificada (a partir del aminoácido 195) en cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios crónicos en visitas independientes, colección 2.

Secuencia	Cepa de HiNT
NPPAQNQMAAEQANQPENAPRAEEAAANNTTAQNSVENTLMQQNVVQAPSQMPNEMAAASVMPMQPV <b>QAEQP</b> QMMPAQT <b>QAEQP</b> KPTVPVQPMKKTVE NPPAQNQMAVEQANQSEFAPKAEAAANNTTAQNPLVENAPMQNVVQSPSQMPNEMAAASVAPMQPA <b>QAEQP</b> -----KATVPVQPMKKAVE	322/2875 350/411/573/584/628/ 735/846/865/920/1104/ 1244/1250/1340/1715/ 1684/2302/2378/2738/ 2801/1689/2612
NPPAQNQMAVEQANQPEFAPKAEAAANNTTAQNPLVENAPMQ-----PA <b>QAEQP</b> -----KATAPVQPMKKAVE NPPAQNQM-----PNEMAAASVMPMQAA <b>QAEQP</b> QMMPAQT <b>QAEH</b> KPTVPVQPMKKTVE	629 995/1082/955/832

### 2.3.3. Distribución fenotípica de la molécula de LOS en aislados clínicos de HiNT

Como se ha descrito previamente, las cepas de HiNT pueden presentar varias glicofomas en la molécula de LOS, lo que permite la adaptación del microorganismo a diferentes microambientes del hospedador (Schweda *et al.*, 2007; Moxon *et al.*, 2006). Para analizar la expresión y distribución de tres modificaciones del LOS sujetas a variación de fase, se utilizó el grupo de 19 cepas de HiNT seleccionadas previamente. Las modificaciones del LOS analizadas fueron PCho, ácido siálico y digalactosa. La adición de PCho al LOS de HiNT requiere la expresión del operón *lic1ABCD* (Weiser *et al.*, 1997). La amplificación del gen *lic1D*, que codifica una transferasa de PCho, fue positiva en 100% de las cepas (Tabla 11). El gen *lic1A*, que codifica una colina quinasa, está regulado por variación de fase al tener un número variable de repeticiones 5'-CAAT-3' en su región 5'. La incorporación de PCho al LOS está regulada por el número de repeticiones 5'-CAAT-3' presentes en la secuencia de *lic1A*. La presencia de PCho en la superficie bacteriana se analizó mediante inmunodetección de PCho a partir de colonia. Todas las cepas expresaron PCho en su superficie. 77,5% de las cepas mostró niveles altos de PCho, 4,5% mostró niveles bajos de PCho, 18% de las cepas mostró un perfil mixto, con colonias expresando niveles altos y colonias expresando niveles bajos de esta modificación (Tabla 17) (Fig. 35). 76,2% de las cepas con el patrón génico prevalente (patrón 2) mostró niveles altos de PCho.

A continuación, se analizó el perfil electroforético del LOS de los 19 aislados seleccionados previamente mediante SDS-PAGE (Fig. 36). En paralelo, se analizó la presencia de ácido siálico en la molécula de LOS mediante tratamiento de las muestras con neuraminidasa y posterior separación electroforética. Los perfiles electroforéticos mostraron heterogenicidad entre cepas (Fig. 36). El tratamiento con neuraminidasa resultó en la pérdida de una o más bandas en el perfil electroforético del LOS de varias de las cepas en estudio. 13 de las 19 (68,4%) cepas analizadas perdieron una o más bandas, indicando un patrón variable en el grado de sialilación del LOS (Fig. 36). 66,6% de las cepas pertenecientes al patrón 2 mostró sialilación. El análisis mediante PCR de la presencia de sialiltransferasas mostró que todas las cepas contienen una combinación de dos o tres sialiltransferasas (Tabla 11). La variación en el contenido y/o la expresión de estos genes puede contribuir a la diversidad en la sialilación del LOS en las cepas analizadas. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Derek Hood (Oxford University, UK).

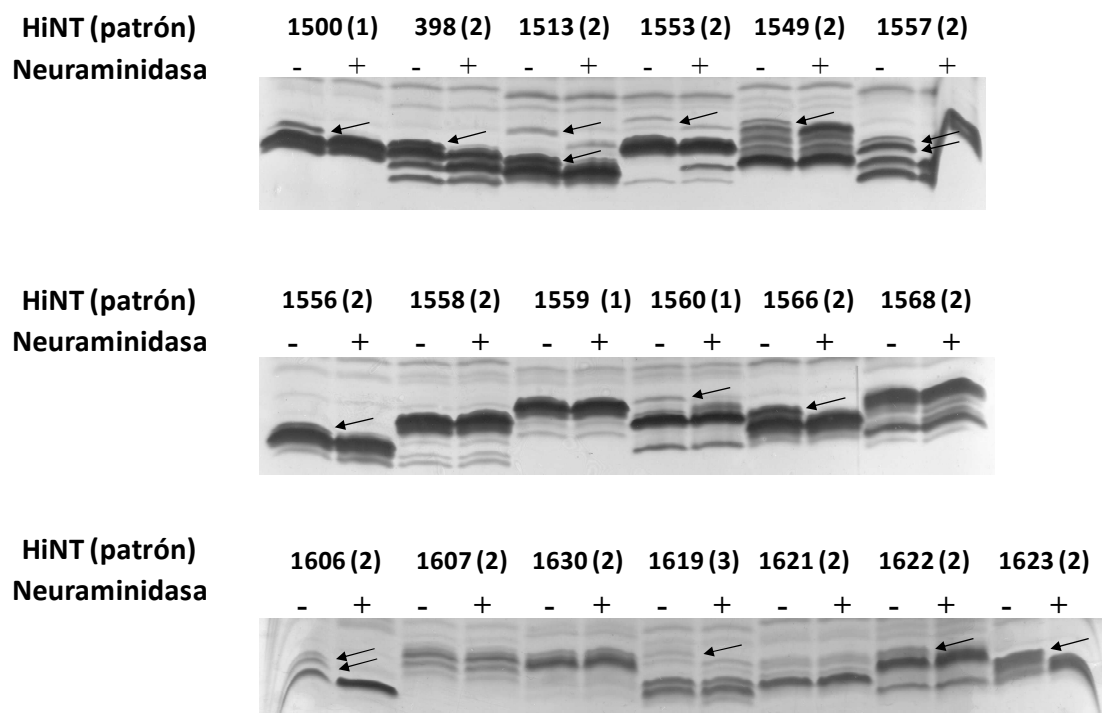


**Figura 35.** Detección de la expresión de PCho mediante *colony blot* en tres cepas de HiNT. Se observan niveles altos (izquierda), bajos (centro) y un perfil mixto (derecha), de expresión de PCho.

**Tabla 17.** Distribución de los niveles de PCho en la colección 1 de aislados clínicos de HiNT no isogénicos.

Expresión de PCho	Nº total (HUB/HSD)	% (HUB/HSD)
Alta	86 (50/36)	77,5 (45,04/32,43)
Baja	5 (5/0)	4,5 (4,5/0)
Población mixta	20 (9/11)	18,0 (8,11/9,91)

Por otra parte, se analizó mediante dot-blot la presencia de digalactosa en el LOS de las 19 cepas seleccionadas previamente. 8 de las 19 cepas (42,1%) reaccionó con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -digalactosa 4C4. 60% de las cepas pertenecientes al patrón 2 generó una señal positiva al reaccionar con el anticuerpo 4C4 (**Tabla 12**). Las cepas con un número de repeticiones 5'-CAAT-3' no permisivo para la traducción de Lic2A (**Tabla 13**), HiNT398, HiNT1513, HiNT1556 y HiNT1558, no reaccionaron con el anticuerpo 4C4. Los aislados con un número de repeticiones 5'-CAAT-3' permisivo para la traducción de Lic2A mostraron niveles variables de reacción con el anticuerpo 4C4 (**Tablas 12 y 13**). El 60 % de los aislados pertenecientes al patrón génico mayoritario, patrón 2, presentan digalactosa en el LOS. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Derek Hood (Oxford University, UK).



**Figura 36. Perfiles electroforéticos del LOS aislado de 19 cepas clínicas de HiNT.** Las cepas HiNT1500, HiNT1559 y HiNT1560 tienen patrón molecular 1; las cepas HiNT398, HiNT1513, HiNT1549, HiNT1553, HiNT1557, HiNT1558, HiNT1566, HiNT1568, HiNT1606, HiNT1607, HiNT1621, HiNT1622, HiNT1623 y HiNT1630 tienen patrón molecular 2; la cepa HiNT1619 tiene patrón molecular 3. El perfil de LOS de cada cepa fue analizado en ausencia (-) y en presencia (+) de neuraminidasa. Las flechas muestran las bandas que desaparecieron o se vieron alteradas tras el tratamiento con neuraminidasa, indicando sialilación de la molécula de LOS correspondiente. Los resultados obtenidos indican que las cepas HiNT1500, 398, 1513, 1553, 1549, 1557, 1556, 1560, 1566, 1606, 1619, 1622 y 1623 contienen ácido siálico en su LOS.

En conjunto, estos datos muestran la existencia de diversidad en el patrón electroforético del LOS entre los aislados de HiNT analizados. Todas las cepas presentaron PCho, con mayor o menor intensidad de señal; la mayoría de los aislados analizados presentó ácido siálico en su molécula de LOS y ausencia de digalactosa.

### 2.3.4. Contribución de los patrones moleculares de HiNT a la resistencia al ataque bactericida del suero y a la adhesión al epitelio respiratorio

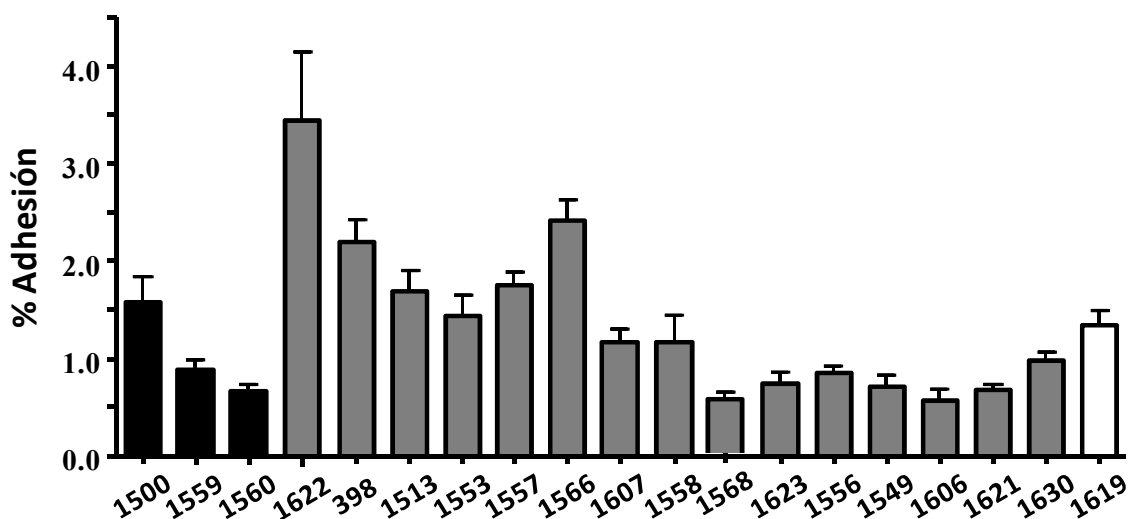
A continuación, se realizaron dos bloques de experimentos para elucidar una posible relación entre el patrón génico prevalente observado en los aislados analizados y la patogénesis de HiNT. Para ello, se analizó la contribución del patrón génico prevalente (patrón 2) a la interacción de HiNT con el suero humano y con el epitelio respiratorio. De esta forma, se analizó la interacción del patógeno con un elemento soluble y con un elemento celular de la inmunidad innata del hospedador, respectivamente. Este análisis se realizó con el grupo de 19 aislados seleccionados previamente.

La resistencia al ataque bactericida del suero fue mayor en términos generales en los aislados pertenecientes al patrón 2 (**Tabla 18**). Además, los niveles de resistencia se correlacionaron con la presencia de ácido siálico en el LOS (**Tabla 18, marcados en color gris**). Destacamos que estos resultados están de acuerdo con resultados de trabajos previos, en los que se ha establecido una asociación entre resistencia al ataque bactericida del complemento y sialilación (Hallstrom *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, extendemos esta observación a un grupo amplio de aislados clínicos no seleccionados *a priori*, lo que da robustez a esta asociación, y la ampliamos a la distribución génica prevalente. A través de los resultados obtenidos, no fue posible establecer una correlación entre la presencia de digalactosa en la molécula de LOS y la resistencia al suero (**Tablas 12 y 18**). Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Derek Hood (Oxford University, UK).

A continuación, se analizó la adhesión del grupo de cepas seleccionadas a células de epitelio pulmonar humano. Para ello, se utilizó la línea celular de neumocito tipo II humano A549. El nivel de adhesión bacteriana varió entre cepas. Cinco de los aislados de HiNT pertenecientes al patrón 2 (HiNT1622, HiNT398, HiNT1566, HiNT1513 y HiNT1557) mostraron una adhesión al epitelio mayor que el resto de cepas (**Fig. 37**). En concreto, HiNT1622 mostró unos valores de adhesión a células A549 significativamente mayores al resto de cepas analizadas (**Fig. 37**).

En resumen, los datos obtenidos muestran que los aislados de HiNT pertenecientes al patrón molecular mayoritario (patrón 2: *lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*) son, en general, más resistentes a la muerte mediada por suero, y se observó una correlación entre la presencia de ácido siálico en

el LOS y la resistencia de la bacteria al ataque bactericida del suero. Por otra parte, se observó que la capacidad de adhesión al epitelio respiratorio humano es un evento variable entre aislados clínicos de HiNT, si bien es destacable que varios de los aislados con patrón génico 2 presentan tendencia a adherirse con mayor eficacia a dicho epitelio respiratorio.



**Figura 37. Adhesión de 19 cepas clínicas de HiNT a células de epitelio respiratorio humano A549.** Las cepas de HiNT se utilizaron para infectar células A549 con una multiplicidad de infección 100:1 durante 30 min. La adhesión bacteriana se cuantificó mediante lisis celular, diluciones seriadas y recuento de u.f.c. La tasa de adhesión se muestra como porcentaje de adhesión. En negro, se muestra el % de adhesión de cepas con patrón molecular 1; en gris, se muestra el % de adhesión de cepas que pertenecen con patrón molecular 2; en blanco, se muestra el % de adhesión de la cepa que pertenece al patrón molecular 3. La adhesión de HiNT1622 y HiNT1566 resultó significativamente mayor a la del resto de cepas analizadas.

**Tabla 18.** Resistencia de 18 aislados clínicos de HiNT al ataque bactericida del suero humano normal. Los resultados se muestran en porcentaje de supervivencia tomando como 100% el recuento de bacterias en ausencia de suero. Las bacterias se incubaron con las concentraciones de suero indicadas en la tabla. Las cepas están separadas por patrones génicos.

Cepa HiNT	Porcentaje de suero humano normal (SHN)						
	10%	5%	2,5%	1,25%	0,6%	0,3%	0,15%
1500*	0	0	0	1,2	36,8	64,6	89,5
1560	0	8,2	29,2	42,5	60,7	70,8	62,6
1559	1,3	6,7	13,8	23,1	39,1	53,1	68,4
1566	16	68,6	110,7	102,8	103	102,8	84,6
1513	13,5	36,5	63,5	82	108,8	105	97,8
1553	10,9	50	74,1	91,5	94,1	102,1	105,9
1557	0	33,7	55	97,6	98,8	103,6	90,5
398	0	21,8	79,2	88,4	99,5	93,5	93,7
1622	1,5	10,8	46,4	74,5	77,8	82,5	84,5
1549	2,1	10,8	22,7	38,6	55,9	75,9	81,7
1623	0,6	5,4	23,2	54,8	75	68,5	82,7
1606	0	0	36,3	55,5	69,2	76,9	93,4
1607	2	28,8	59,9	75,4	91,5	94	83,5
1621	0,3	5,4	23,7	63,2	75,3	70,9	77,9
1558	0,3	0,6	14,1	28	48,5	67,6	71,5
1630	0	0,6	11,4	53,6	80,5	84,7	77
1568	0	0	0,6	7,2	30,2	56,3	75,8
1619	0,9	4,3	20,1	33,8	53,3	68,5	77,7

\* El sombreado gris indica presencia de ácido siálico en la molécula de LOS.

Si bien la relevancia clínica que tiene la infección de HiNT en enfermedades respiratorias crónicas subyacentes ha sido demostrada en numerosos estudios (Moghaddam *et al.*, 2011; Barnes *et al.*, 2008), no se han realizado estudios genotípicos y fenotípicos en cepas de HiNT aisladas de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas en visitas médicas independientes. Por esta razón, realizamos un análisis de distribución y conservación de los nueve genes descritos en las secciones previas (*IgtF*, *lic2A*, *lic1D*, *lic3A*, *lic3B*, *siaA*, *lic2C*, *ompP5*, *oapA*) en una colección de sets de cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios crónicos en varias visitas médicas.



### 2.3.5. Caracterización de cepas de HiNT aisladas de pacientes adultos con enfermedades respiratorias crónicas durante episodios independientes de agudización

Se evaluaron muestras de esputo de adultos con enfermedades respiratorias crónicas, incluyendo EPOC, enfisema severo, bronquiectasias, apnea obstructiva del sueño y asma bronquial crónica. Las muestras se recogieron en el HUB, en el periodo 1996-2007, durante visitas médicas de los pacientes al presentar síntomas de agudización de la enfermedad crónica subyacente. Se recogieron 54 aislados de HiNT de 20 pacientes distintos (**Tabla 19**). Se aisló una cepa por paciente y visita; cada cepa recibió un número, HiNTn. El número de cepas por paciente fue equivalente al número de visitas hospitalarias, varió entre dos y cinco; el intervalo de frecuencia con que se aislaron las cepas varió entre un mes y seis años. Las cepas se organizaron en 20 *sets*, uno por paciente. De esta forma, se identificaron 11 pacientes con dos aislados (pacientes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18), 5 pacientes con tres aislados (pacientes 9, 15, 16, 17, 19), tres pacientes con cuatro aislados (pacientes 1, 13, 14) y un paciente con cinco aislados (paciente 20) (**Tabla 19**).

Para determinar si las cepas de cada paciente eran la misma o cepas distintas, se analizó el perfil de PFGE de cada una. Se determinaron 45 perfiles de bandas distintos (Hi-n). Los pacientes se clasificaron en dos grupos: el grupo A incluyó los pacientes 1 a 14, en los que los aislados recogidos fueron cepas distintas; el grupo B incluyó los pacientes 15 a 20, en los que al menos dos aislados recogidos en visitas médicas independientes mostraron el mismo perfil de PFGE, es decir, son la misma cepa (**Tabla 19, columna PFGE**). 10 de los pacientes en estudio fueron pacientes EPOC que acudieron al Hospital al sufrir una exacerbación de la enfermedad. 9 de ellos presentaron un aislado diferente en cada exacerbación. El paciente 18 fue el único paciente EPOC en el que se aislaron dos cepas con el mismo perfil PFGE en dos visitas hospitalarias distintas. Además de EPOC, otros pacientes a partir de los cuales se aislaron cepas distintas en cada visita sufrieron enfisema severo, bronquiectasia o apnea del sueño.

Por otra parte, los *sets* de cepas aisladas de los pacientes 15, 16 y 17 son tres triplete. Las cepas HiNT1340 y HiNT1684 del paciente 19 y las cepas HiNT2738 y HiNT2801 del paciente 20 son isogénicas entre sí. En resumen, el tipado molecular mediante PFGE definió las características moleculares de una colección de *sets* de cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios crónicos que fue empleada para analizar diversidad

genética de las cepas de forma retrospectiva. Este trabajo se ha realizado en colaboración con las Dras. Laura Calatayud y Josefina Liñares.

### 2.3.6. Distribución de genes que codifican estructuras de la superficie de HiNT en sets de aislados de pacientes respiratorios crónicos

La **sección 2.3.2. del capítulo 2** de esta Tesis Doctoral muestra los resultados obtenidos con una colección de cepas de HiNT no isogénicas, aisladas de individuos no relacionados. Estos resultados muestran la existencia predominante del patrón génico *lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*, que hemos denominado patrón 2.

En base a estos resultados, se analizó la distribución, prevalencia y secuencia de los mismos nueve genes en las 54 cepas de HiNT aisladas de 20 pacientes respiratorios crónicos durante agudizaciones independientes. El análisis se realizó siguiendo los criterios y procedimientos indicados en la **sección 2.3.2. del capítulo 2**. Se observaron dos patrones génicos, que correspondieron a los patrones 1 y 2 descritos anteriormente. El patrón 2 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*) se identificó en 63% de los aislados. El patrón 1 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C-*, *ompP5+*, *oapA+*) se identificó en 37% de los aislados. Los patrones génicos 1 y 2 difieren únicamente en la presencia o ausencia del gen *lic2C*. La distribución del gen *lic2C* se determinó mediante el uso de dos parejas de cebadores (*lic2BA+lic2BC* y *lic2BA+lic2BB*), que además de su presencia, permite determinar la distribución génica de *lic2BC* (Hood *et al.*, 2004; Marti-Lliteras 2011). Dado que *lic2B* y *lic2C* codifican dos glicosiltransferasas implicadas en la síntesis de extensiones de azúcares a partir de la HepII, los resultados obtenidos indican que la naturaleza y estructura de esta extensión puede ser variable.

Considerando los pacientes con diferentes cepas (grupo A, pacientes del 1 al 14, 35 aislados), el patrón 2 se observó en 65,7% y el patrón 1 en 34,3% de los aislados. Teniendo en cuenta los pacientes con al menos dos aislados con el mismo perfil de PFGE (grupo B, pacientes del 15 al 20, 19 aislados), el patrón 2 se observó en 57,8% y el patrón 1 en 42,1% de los aislados. Las cepas aisladas de los pacientes 1, 3, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 19 mostraron el mismo patrón génico en cada paciente. Los aislados con un perfil de PFGE idéntico presentaron el mismo patrón génico, a excepción de HiNT628 y HiNT920, obtenidos a partir del paciente 18 (**Tabla 19**).

En conjunto, el análisis de siete genes involucrados en la síntesis del LOS y dos genes que codifican proteínas de membrana externa en *sets* de cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios adultos en visitas hospitalarias independientes debido a agudizaciones de la enfermedad crónica mostraron dos patrones de distribución génica, dependiendo de la presencia o ausencia de *lic2BC*. El patrón 2 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*) resultó más prevalente que el patrón 1. El patrón génico se mostró conservado entre aislados con un mismo perfil de PFGE.

### 2.3.7. Diversidad de secuencia génica en *sets* de aislados de HiNT de pacientes respiratorios crónicos

A continuación, se analizó la variabilidad de secuencia génica en la colección de *sets* aislados clínicos disponible. Se seleccionaron 28 cepas y se analizaron las secuencias de *oapA*, *lic1A* y *lic2A* (en negrita, **Tabla 19**). Las cepas con patrón 2 seleccionadas fueron: HiNT629, HiNT846, HiNT2302, HiNT2612, HiNT2378, HiNT865, HiNT832, HiNT955, HiNT1082, HiNT350, HiNT573, HiNT1250, HiNT628, HiNT735, HiNT1340, HiNT1684. Las cepas con patrón 1 seleccionadas fueron HiNT1689, HiNT2738, HiNT2801, HiNT2875, HiNT995, HiNT322, HiNT1244, HNT1715, HiNT411, HiNT584, HiNT1104, HiNT920.

**Tabla 19.** Origen clínico, historial, perfil PFGE y patrón genético de las 54 cepas utilizadas en este estudio.

Grupo	Paciente	Cepa HiNT	Fecha aislamiento	Sexo	Edad	Enfermedad subyacente	PFGE	Patrón Genético
A	1	629 <sup>a</sup>	12/12/1997	masc	64	Enfisema severo	Hi-44	2
		846	1/4/1998				Hi-43	2
		2302	8/3/2002				Hi-42	2
		2612	13/1/2003				Hi-41	2
	2	1702	19/10/2000	Masc	65	Enfisema severo	Hi-25	2
		2764	17/4/2003				Hi-26	1
	3	2133	29/12/2001	Fem	53	Bronquiectasia	Hi-17	2
		3513	8/2/2007				Hi-18	2
	4	2411	2/6/2002	Masc	68	EPOC <sup>b</sup> GOLD <sup>c</sup> IV	Hi-21	2
		3581	21/3/2007				Hi-20	1
	5	2222	4/2/2002	Fem	64	Apnea obstructive del sueño, obesidad mórbida	Hi-30	2
		3419	14/3/2006				Hi-22	1
	6	1166	10/2/1999	Masc	60	EPOC GOLD IV	Hi-32	2
		2632	31/1/2003				Hi-31	2
7	313	8/12/1996	Masc	73	EPOC GOLD III	Hi-40	2	
	772	24/2/1998				Hi-39	2	
8	1604	7/4/2000	Masc	51	EPOC GOLD III	Hi-45	2	
	2319	17/3/2002				Hi-46	2	
9	459	26/6/1997	Masc	66	EPOC GOLD IV	Hi-33	1	
	1299	10/5/1999				Hi-35	2	
	2158	9/1/2002				Hi-36	2	
10	995	30/6/1998	Masc	38	EPOC GOLD IV	Hi-27	1	
	2116	11/12/2001				Hi-10	1	
11	1656	30/4/2000	Masc	66	EPOC GOLD III	Hi-37	2	
	2457	14/7/2002				Hi-38	2	
12	2125	19/12/2001	Masc	67	EPOC GOLD III	Hi-11	1	
	2160	9/1/2002				Hi-12	2	
13	322	12/12/1996	Masc	68	EPOC	Hi-60	1	
	865	14/4/1998				Hi-59	2	
	1244	8/3/1999				Hi-58	1	
	1715	16/11/2000				Hi-61	1	
14	2296	6/3/2002	Fem	27	Bronquiectasia	Hi-8	2	
	2573	24/12/2002				Hi-6	1	
	2659	25/2/2003				Hi-7	1	
	3307	14/5/2005				Hi-9	2	

<b>B</b>	<b>15</b>	<b>832</b>	24/3/1998	Masc	50	VIH, ADVP, Asma bronquial crónica	Hi-19	2
		<b>955</b>	29/5/1998				Hi-19	2
		<b>1082</b>	21/10/1998				Hi-19	2
	<b>16</b>	<b>350</b>	13/1/1997	Fem	72	Asma bronquial crónica	Hi-23	2
		<b>573</b>	13/10/1997				Hi-23	2
		<b>1250</b>	8/3/1999				Hi-23	2
	<b>17</b>	<b>411</b>	17/2/1997	Masc	56	Bronquiectasia	Hi-13	1
		<b>584</b>	7/11/1997				Hi-13	1
		<b>1104</b>	9/11/1998				Hi-13	1
	<b>18</b>	<b>628</b>	15/12/1997	Masc	69	EPOC GOLD III	Hi-55	2
		<b>920</b>	8/5/1998				Hi-55	1
	<b>19</b>	<b>735</b>	10/2/1998	Fem	73	Bronquiectasia, pulmón fibroquístico	Hi-56	2
<b>1340</b>		15/6/1999	Hi-57				2	
<b>1684</b>		3/10/2000	Hi-57				2	
<b>20</b>	<b>1689</b>	10/10/2000	Fem	66	Carcinoma células escamosas pulmonares, bronquiectasis	Hi-50	1	
	<b>2378</b>	25/04/2002				Hi-51	2	
	<b>2738</b>	03/04/2003				Hi-52	1	
	<b>2801</b>	13/05/2003				Hi-52	1	
	<b>2875</b>	15/9/2003				Hi-54	1	

<sup>a</sup>Negrita: Aislados de HiNT seleccionados para la secuenciación de los genes *lic1A*, *lic2A* y *oapA*.

<sup>b</sup>EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

<sup>c</sup>GOLD: Del inglés *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD I: Mild COPD, GOLD II: Moderate COPD, GOLD III: Severe COPD, GOLD IV: Very severe COPD)*.

Se analizó la diversidad de secuencia de OapA. Se obtuvieron productos de PCR con un tamaño variable para el gen *oapA*. La secuenciación de los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas seleccionadas reveló la existencia de 4 secuencias distintas en la región que comienza en el aminoácido 195 de la proteína de OapA (tomando la secuencia más larga como referencia) (**Tabla 16**). 75% de los aislados analizados mostraron una secuencia similar a la de *H. influenzae* Rd KW20; 7,4% de los aislados mostró una secuencia similar a la de *H. influenzae* Eagan, que contiene una inserción de 12 aminoácidos; 3,6% de los aislados mostró una secuencia con una inserción de 35 aminoácidos, respecto a la secuencia de OapA de *H. influenzae* Rd KW20; 14,3% mostró una secuencia con una inserción de 44 aminoácidos, respecto a la secuencia de OapA de *H. influenzae* Rd KW20. Utilizando la secuencia de mayor tamaño como referencia, con dos repeticiones del dominio QAEQP (rojo en la **Tabla 16**) (HiNT322 y

HiNT2875), 75% de las cepas muestra una deleción de 12 aminoácidos; 3,6% de las cepas muestra una deleción de 35 aminoácidos y 14,3% de las cepas muestra una deleción de 44 aminoácidos (**Tabla 20**). La existencia de cepas con secuencias de OapA más largas y la existencia de cepas con deleciones de 12, 35 y 44 aminoácidos se ha descrito en la **sección 2.3.2.** del **Capítulo 2** de esta Tesis. En la presente colección de aislados se observa una heterogeneidad menor en el número de variantes de OapA identificadas. La secuencia de OapA resultó variable entre las cepas que presentan distinto perfil de PFGE. Los aislados que resultaron ser la misma cepa, por presentar un patrón de PFGE idéntico, mostraron una secuencia de *oapA* conservada (**Tabla 20**).

**Tabla 20.** Tamaño de la deleción en la proteína OapA en la región variable identificada en aislados de HiNT representativos de la colección 2.

Paciente	Cepa HiNT	Tamaño deleción (aa) en OpaA, en relación a HiNT322 y HiNT2875	<i>lic2A</i> (CAAT) <sub>n</sub>	<i>lic1A</i> (CAAT) <sub>n</sub>
<b>1</b>	629	35	15	28
	846	12	16	6
	2302	12	13	41
	2612	12	7	25
<b>10</b>	995	44	16	10
<b>13</b>	322	0	28	21
	865	12	17	27
	1244	12	16	36
	1715	12	22	27
<b>15</b>	832	44	15	6
	955	44	16	5
	1082	44	16	9
<b>16</b>	350	12	25	20
	573	12	25	21
	1250	12	25	20
<b>17</b>	411	12	13	17
	584	12	13	17
	1104	12	10	17
<b>18</b>	628	12	13	17
	920	12	13	17
<b>19</b>	735	12	16	13
	1340	12	16	14
	1684	12	17	14
<b>20</b>	1689	12	13	24
	2378	12	13	24
	2738	12	13	20
	2801	12	13	20
	2875	0	16	11

A continuación, se analizó la secuencia de los genes *lic2A* y *lic1A*, cuya expresión está regulada por variación de fase. En primer lugar se analizó la conservación de secuencia de *lic2A*, presente en 100% de las cepas disponibles. El análisis mediante separación electroforética de los productos de PCR obtenidos mostró diferencias de tamaño en el amplicón de *lic2A* entre cepas. Estas diferencias de tamaño se deben a variaciones en el número de SSRs 5'-CAAT-3' presentes en la región 5' de *lic2A*. Los aislados analizados contienen entre 7 y 28 repeticiones 5'-CAAT-3' en *lic2A* (Tabla 21). Se observó que las cepas más abundantes fueron las que contienen 13 y 16 repeticiones, y que la pauta de lectura de *lic2A* está conservada en 25 de los 28 (89,2%) aislados analizados. Se observó una variabilidad elevada en cuanto al número de SSRs entre cepas no isogénicas, independientemente de haber sido aisladas del mismo paciente o de pacientes distintos. Las cepas con perfil de PFGE idéntico no mostraron necesariamente conservación en el número de repeticiones 5'-CAAT-3' en *lic2A* (Tabla 21).

La adición de PCho a la molécula de LOS requiere la actividad del operón *lic1ABCD*. El análisis de distribución génica descrito en la **sección 2.3.2.** del **capítulo 2** reveló que *lic1D* está presente en todas las cepas estudiadas. A continuación, se analizó mediante PCR la presencia de *lic1A* en los aislados de HiNT, resultando positiva en 100% de las cepas analizadas. El análisis mediante electroforesis de los productos de amplificación de *lic1A* obtenidos para las distintas cepas reveló diferencias de tamaño, probablemente debidas a la presencia de un número variable de repeticiones de la secuencia 5'-CAAT-3' en la región 5' de *lic1A*. El análisis de secuencia reveló que los aislados analizados contienen entre 5 y 41 repeticiones del tetranucleótido CAAT en *lic1A* (Tabla 21). Se observó variabilidad en el número de SSRs entre cepas no isogénicas, independientemente de si estas habían sido aisladas del mismo paciente o de pacientes distintos. Al igual que en el caso de *lic2A*, cepas con perfiles de PFGE idénticos no mostraron necesariamente el mismo número de repeticiones 5'-CAAT-3' en *lic1A*. Por ejemplo, los aislados del paciente 17, las cepas HiNT1340 y HiNT1684 del paciente 19, y las cepas HiNT2738 y HiNT2801 del paciente 20, conservaron el número de repeticiones en *lic1A*, 17, 17, 14 y 20, respectivamente. Sin embargo, los aislados de los pacientes 15 y 16 presentaron un número variable de repeticiones en *lic1A*.

Una vez determinada la heterogeneidad entre cepas en el número de repeticiones en el extremo 5' de *lic1A*, se analizó el producto final del operón *lic1ABCD*, la presencia de PCho en la superficie bacteriana. El análisis de la expresión de PCho mediante *immunoblot* a partir de colonia en las 54 cepas que componen la colección 2 mostró que todas expresan PCho en su superficie (datos no mostrados). El nivel de expresión de PCho fue variable entre cepas, independientemente del patrón de PFGE.

Sorprendentemente, la predicción de la traducción del gen *lic1A* mostró la pérdida de la pauta de lectura en 16 de los 27 aislados analizados.

**Tabla 21.** Número de repeticiones del tetranucleótido 5'-CAAT-3' en los genes *lic1A* y *lic2A* de las cepas clínicas seleccionadas y predicción de traducción.

Paciente	Aislado de HiNT	<i>lic1A</i>		<i>lic2A</i>	
		(CAAT) <sub>n=</sub>	traducción	(CAAT) <sub>n=</sub>	x/y - z1/z2
<b>1</b>	629	28	no	15	no-no
	846	6	si	16	si-no
	2302	41	no	13	si-no
	2612	25	no	7	si-no
<b>13</b>	322	21	si	28	si-no
	865	27	si	17	no-si
	1244	36	si	16	si-no
	1715	27	si	22	no-no
<b>15</b>	832	6	si	15	no-no
	955	5	no	16	si-no
	1082	9	si	16	si-no
<b>16</b>	350	20	no	25	si-no
	573	21	si	25	si-no
	1250	20	no	25	si-no
<b>17</b>	411	17	no	13	si-no
	584	17	no	13	si-no
	1104	17	no	10	si-no
<b>18</b>	628	18	si	13	si-no
	920	17	no	13	si-no
<b>19</b>	735	13	no	16	si-no
	1340	14	no	16	si-no
	1684	14	no	17	no-si
<b>20</b>	1689	24	si	13	si-no
	2378	24	si	13	si-no
	2738	20	no	13	si-no
	2801	20	no	13	si-no
	2875	11	no	16	si-no

En conjunto, el análisis de secuencia de una proteína de membrana externa y dos genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de LOS en cepas de HiNT aisladas de pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas mostró heterogeneidad de secuencia.

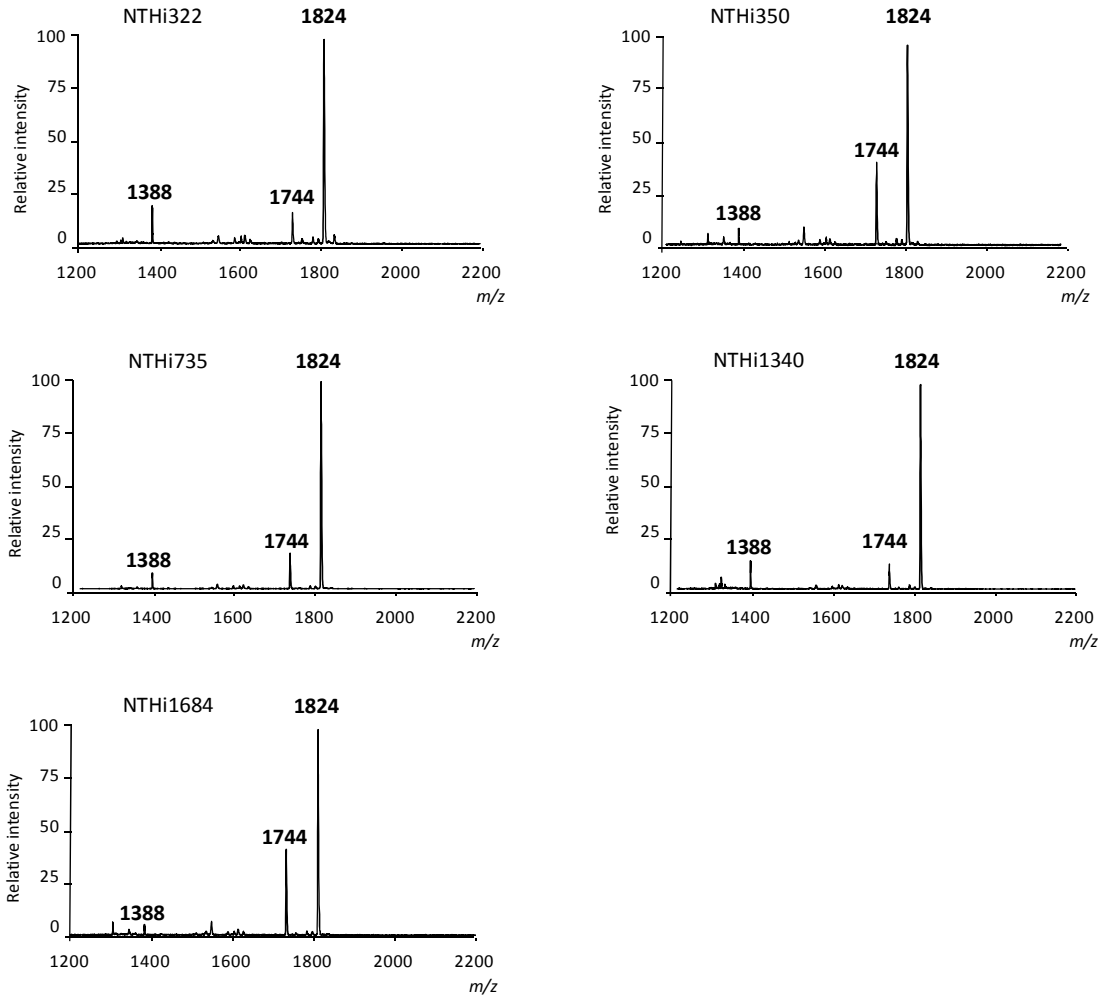


Las cepas no isogénicas mostraron heterogeneidad de secuencia de los tres genes analizados, *oapA*, *lic2A* y *lic1A*. Las cepas isogénicas mostraron conservación de secuencia en *oapA*. En cambio, se observó variabilidad en el número de repeticiones en la región 5' de los genes *lic1A* y *lic2A*.

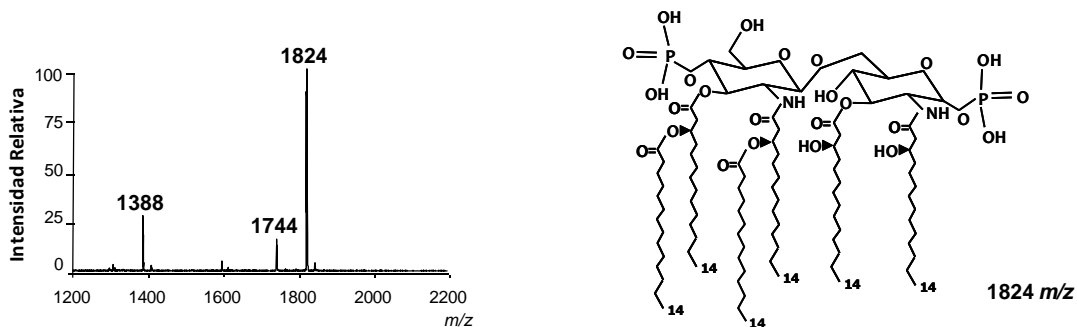
### 2.3.8. Estructura del lípido A en sets de aislados de HiNT de pacientes respiratorios crónicos

Posteriormente, se caracterizó la estructura del lípido A en las cepas HiNT322, HiNT832, HiNT350, HiNT411, HiNT584, HiNT1104, HiNT628, HiNT920, HiNT735, HiNT1340, HiNT1684, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Estudios previos a este trabajo determinaron que el esqueleto disacarídico del lípido A de HiNT se compone de dos residuos 2-amino-2-deoxiglucosa (GlcNI y GlcNII) unidos por un enlace glicosílico  $\beta$ -(1-6) y fosforilado en las posiciones 1 y 4' (Mikhail *et al.*, 2005). Las posiciones C2/C2' y C3/C3' se sustituyen por una cadena 14:0(3-OH) unida a un grupo amida y a un grupo ester, respectivamente. Los aislados analizados mostraron una especie mayoritaria de lípido A correspondiente a la forma hexaacilada (m/z 1,824) descrita previamente (Mikhail *et al.*, 2005). Se detectaron otros picos de iones (m/z 1,744 y m/z 1,388), también encontrados anteriormente (Mikhail *et al.*, 2005). Estos picos representan el lípido A hexa-acilado monofosforilado, el lípido A tetra-acilado, y el lípido A tetraacilado que contiene dos residuos de 2-amino-2-deoxiglucosa, dos fosfatos, tres 14:0 (3-OH) y un 14:0 (3-OH), respectivamente. El espectro resultó similar para todos los aislados analizados (**Tabla 22, Figs. 38 y 39**).

En base a esta observación, la estructura del lípido A y el grado de hexa-acilación del mismo no es una fuente de variabilidad en la colección de cepas analizadas, en las condiciones empleadas de incubación, crecimiento y procesamiento de las mismas.



**Figura 38.** Estructuras del lípido A de los distintos aislados de HiNT analizados. Espectro del lípido A aislado de las cepas de HiNT seleccionadas obtenido con espectrometría de ionización negativa MALDI-TOF.



**Figura 39.** Estructura del lípido A de HiNT322. Espectro del lípido A de HiNT322 obtenido por espectrometría de masas con MALDI-TOF de ionización negativa (Izquierda). Estructura general del Lípido A difosforilado de *Haemophilus influenzae*, tal y como se ha descrito previamente (Helander *et al.*, 1988) (Derecha).

**Tabla 22:** Estructuras de Lípido A identificadas

[M-H] <sup>-</sup>	Sustituciones del ácido graso			
	C3'	C2'	C3	C2
1824	14:0[3-O(14:0)]	14:0[3-O(14:0)]	14:0(3-OH)	14:0(3-OH)
1744	14:0[3-O(14:0)]	14:0[3-O(14:0)]	14:0(3-OH)	14:0(3-OH)
1388	OH	14:0[3-O(14:0)]	14:0(3-OH)	14:0(3-OH)

## 2.4. DISCUSIÓN

### 2.4.1. Distribución y diversidad génica en aislados clínicos de HiNT de origen patológico no relacionado

En la primera parte del Capítulo 2 de Resultados, se analizó la distribución de nueve genes que codifican estructuras localizadas en la superficie de HiNT en una colección de aislados clínicos de origen patológico distinto (**colección 1**). Cada aislado mostró un perfil de PFGE distinto, lo que apoya la heterogeneidad entre cepas descrita previamente (Gilsdorf *et al.*, 2004). El análisis de distribución de los nueve genes seleccionados mostró un patrón molecular prevalente. Las cepas que pertenecen al patrón molecular prevalente, denominado patrón 2, mostraron niveles altos de resistencia al ataque bactericida del suero. Estos datos sugieren que esta “huella molecular” prevalente podría resultar ventajosa para la patogenicidad de HiNT. Considerando que HiNT es un miembro habitual de la microbiota respiratoria humana, esta huella molecular podría también contribuir a mejorar el *fitness* bacteriano en general, tanto durante la colonización asintomática como en infecciones sintomáticas. Las cepas que pertenecen al patrón 2 contienen los genes *lgtF*, *lic2A*, *lic1D*, *lic3A*, *lic3B*, *lic2C*, *ompP5* y *oapA*. La cepa *H. influenzae* Rd KW20 ha sido utilizada en numerosos trabajos como cepa de referencia; sin embargo, no presenta el patrón molecular mayoritario, lo que limita la generalización de los resultados obtenidos en tales estudios. El patrón molecular 2 permite la extensión de cadenas de azúcares a partir de las HepI y HepII del LOS. En este trabajo, no se analizó la posibilidad de extensión de cadena de azúcares a partir de la HepIII; sin embargo, trabajos previos con otras colecciones de aislados clínicos han descrito la presencia del gen *lpsA* en 100% de las cepas analizadas (Hood *et al.*, 2004). Un estudio realizado con aislados clínicos de HiNT de otitis media mostró que el gen *lic2C* estaba presente en 48,1% de las cepas (Hood *et al.*, 2004). En el presente trabajo, se observó la presencia de *lic2C* en 94,6% de las cepas analizadas. El análisis del gen *lic3B* mostró la presencia de este gen en 100% de los aislados, a diferencia de estudios previos en los que se había descrito su presencia en 60% de las cepas de HiNT de otitis media analizadas (Fox *et al.*, 2006). Estas diferencias podrían deberse al tamaño de las colecciones de cepas analizadas o al diferente origen anatómico de las mismas.

Los genes *lic1A*, *lic2A*, *lic3A* y *lic3B* contienen un número variable de repeticiones del tetranucleótido CAAT en sus extremos 5'. El número variable de SSRs puede modificar

la expresión de estos genes y, en último término, la estructura del LOS (Weiser *et al.*, 1998). Todas las cepas de la colección 1 expresaron PCho, en su mayoría en niveles altos. Sabiendo que la adición de PCho al LOS es variable y dependiente de la variación de fase de *lic1A* (Weiser *et al.*, 1998), la expresión de esta sustitución en todas las cepas analizadas podría indicar que la presencia de PCho es ventajosa para el patógeno. Esta observación está apoyada por el hecho de que PCho promueve la infección y persistencia de HiNT, reduciendo la respuesta inflamatoria del hospedador y favoreciendo la formación de *biofilms* estables (Weiser *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2007). El análisis del gen *lic2A* mostró su presencia en todas las cepas analizadas. Sin embargo, cuando se analizó la presencia de digalactosa en el LOS, se observó que era variable entre cepas. El anticuerpo monoclonal 4C4 interacciona con la molécula de digalactosa cuando ésta está situada en la extensión de globotetraosa de las Hepl o II. La presencia de digalactosa en el LOS puede cambiar debido a la variación de fase de los genes *lic2A*, *lgtC* o *lex2*.

Todas las cepas analizadas contienen al menos dos genes que codifican sialiltransferasas, y la mayoría de ellas expresan ácido siálico en el LOS. En este trabajo, como en trabajos anteriores (Hood *et al.*, 1999), se observó una relación directa entre sialilación del LOS y resistencia bacteriana a la muerte por la exposición a suero. Asimismo, los datos epidemiológicos sugieren que la sialilación del LOS podría estar ligada a la severidad de la enfermedad (Hallstrom *et al.*, 2010).

El gen *ompP5* codifica una putativa proteína de membrana externa con regiones variables expuestas hacia el exterior. Estudios previos han mostrado la variabilidad de secuencia de *ompP5* en otros aislados (Duim *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998). Se ha descrito, también, diversidad de secuencia entre cepas en un gen ortólogo de *ompP5* presente en *Haemophilus parasuis* (Mullins *et al.*, 2009). Dado que P5 tiene propiedades inmunodominantes (Novotny *et al.*, 2000), HiNT podría haber evolucionado hacia la generación de una elevada variabilidad en esta proteína para evadir la inmunidad adaptativa del hospedador. Por otra parte, dado que P5 muestra también propiedades adhesivas a células del hospedador (Hill *et al.*, 2001), la diversidad observada podría modular la adhesión bacteriana a la superficie celular.

OapA contribuye a la colonización de la nasofaringe (Weiser *et al.*, 1995) y a la adhesión celular (Prasadarao *et al.*, 1999). La diversidad de secuencia de OapA observada podría modular la interacción bacteriana con la superficie del hospedador. La adhesión bacteriana es una etapa generalmente crucial durante un proceso infeccioso (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2006). Existen evidencias que sugieren que la adhesión de HiNT es el resultado de la acción combinada de múltiples y variables moléculas

adhesivas, cuyas combinaciones, además, varían entre cepas. Las cepas analizadas mostraron heterogeneidad en su capacidad adhesiva. Las cepas que mostraron valores de adhesión más altos muestran el patrón molecular prevalente. Así, HiNT1622, HiNT398 y HiNT1566, que mostraron valores de adhesión significativamente mayores al resto de las cepas analizadas, contienen las secuencias más largas de *OapA*, el motivo GINNNGAIK en la región 1 de P5, PCho y ácido siálico en su LOS, y pertenecen al patrón 2 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*).

En conjunto, los datos obtenidos a partir de la colección 1 de cepas clínicas de HiNT indican que, si bien existe una amplia variabilidad genómica entre aislados (cada cepa presenta un perfil de PFGE distinto), parece existir un patrón génico prevalente, directa o indirectamente relacionado con la resistencia del patógeno al ataque bactericida del suero y con la adhesión al epitelio respiratorio humano.

#### 2.4.2. Distribución y diversidad génica en sets de aislados de HiNT de pacientes respiratorios crónicos

En la segunda parte del Capítulo 2 de Resultados, se analizó de forma retrospectiva la distribución de los nueve genes indicados previamente en una colección de *sets* de cepas de HiNT aisladas a partir de esputo de 20 pacientes adultos respiratorias crónicas en visitas hospitalarias independientes debidas a agudizaciones de una enfermedad respiratoria subyacente (colección 2). El tipado molecular mediante PFGE mostró que los *sets* de aislados de los pacientes 1 a 14 eran cepas con perfiles de bandas distintos (grupo A) y que los *sets* de aislados de los pacientes 15 a 20 contenían cepas con el mismo perfil de PFGE (grupo B). 63% de las cepas presentaron el patrón molecular *lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*. En relación a la conservación de secuencia génica, la secuencia de *oapA* pareció conservada entre cepas idénticas, pero el número de repeticiones en *lic1A* y *lic2A* fue variable entre cepas con el mismo perfil de PFGE.

En base a los resultados obtenidos, planteamos que los pacientes del grupo A podrían haber sufrido episodios de agudización provocados o facilitados por la adquisición de una nueva cepa de HiNT. Las cepas aisladas de pacientes EPOC fueron en su mayoría no isogénicas, de acuerdo con la hipótesis que sostiene que las exacerbaciones de EPOC de naturaleza microbiana son debidas principalmente a la adquisición de una nueva cepa bacteriana patógena (Sethi *et al.*, 2002). Por otra parte, los *sets* de cepas aisladas de los pacientes 15 a 20 (grupo B) contienen cepas con el mismo perfil de

PFGE. Se consideró que los aislados con el mismo perfil de PFGE son la misma cepa. En base a estos resultados, planteamos que los pacientes del grupo B están colonizados por cepas que pueden causar una infección crónica. Disponer del primer aislado de las cepas colonizadoras es altamente improbable, y una limitación de nuestro estudio. Solventar esta limitación requiere el diagnóstico de la enfermedad respiratoria crónica previo a una primera infección, lo que resulta muy complicado en la práctica clínica.

Con anterioridad a este trabajo, los únicos estudios disponibles con *sets* de aislados de HiNT habían sido llevados a cabo en pacientes EPOC. Así, el análisis de cepas persistentes de HiNT aisladas de 13 de pacientes EPOC mostró que la secuencia del gen *ompP2* es estable durante la colonización del tracto respiratorio humano (Hiltke *et al.*, 2002). Un estudio independiente en el cual se monitorizó prospectivamente un paciente EPOC en condición estable mostró que el paciente fue colonizado por 3 cepas distintas durante dos años, y que se produce transferencia horizontal del gen *ompP2* entre cepas en el tracto respiratorio (Hiltke *et al.*, 2003). Por otra parte, una colección de cepas de HiNT recogidas mensualmente durante siete años mostró la existencia de pacientes EPOC colonizados persistentemente por determinadas cepas de HiNT (Murphy *et al.*, 2004).

Nuestro trabajo es el primer estudio llevado a cabo con grupos de aislados de HiNT obtenidos a partir de pacientes que sufren un repertorio de enfermedades respiratorias crónicas, además de EPOC. Igualmente, es el primer estudio en el que se realiza tipado molecular y análisis de distribución y conservación de secuencia de nueve genes que codifican proteínas implicadas en la configuración de la superficie bacteriana. Sin embargo, este trabajo es retrospectivo, y la colección de cepas disponibles no permitió analizar la dinámica y *turnover* de poblaciones bacterianas en pacientes respiratorios crónicos.

63% de los aislados analizados mostraron el patrón génico 2 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*), descrito también al analizar la **colección 1** de aislados clínicos de HiNT (**apartados 2.3.1. y 2.3.2.**). El resto de cepas mostró la misma distribución génica a excepción de los genes *lic2BC*, que estuvieron ausentes. El locus *lic2BC* se analizó en base a la organización genómica descrita anteriormente (Hood *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de *lic2BC* es prevalente en los *sets* de aislados analizados, si bien no en la misma extensión que en los aislados de la colección 1. Esta diferencia podría estar relacionada con la distinta naturaleza de las dos colecciones de cepas. El gen *lic2B* se asoció previamente con aislados de HiNT asociados a infecciones de oído medio (Erwin *et al.*, 2005; Pettigrew

*et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren también una prevalencia de *lic2B* en aislados respiratorios de adultos.

Si bien la variación de fase es una fuente importante de variabilidad en HiNT, existen pocos estudios sobre variación de fase en grupos de aislados procedentes del mismo individuo. Un estudio realizado sobre aislados seriados persistentes de HiNT en pacientes EPOC muestra una disminución de los niveles de HMW1 y HMW2, correlacionada con un aumento del número de SSRs en los promotores de ambos genes (Cholon *et al.*, 2008). Del mismo modo, se ha observado una variación en el número de SSRs en cepas de HiNT genéticamente homogéneas durante la colonización persistente de pacientes con fibrosis quística (Renders *et al.*, 1999). En nuestro trabajo, mostramos cambios en el número de SSRs en los genes *lic1A* y *lic2A* en aislados de HiNT con un perfil de PFGE idéntico, si bien no detectamos un aumento o descenso evidente en el número de repeticiones. Estas observaciones sugieren que el número de repeticiones SSR de un locus puede variar independientemente de un cambio mayor en el genoma. Si consideramos que HiNT puede modificar sus genes de virulencia durante la colonización del tracto respiratorio inferior de pacientes respiratorios crónicos, la frecuencia de variación de fase podría ser mayor que la de mutaciones puntuales o inserciones/deleciones en la diversificación clonal de HiNT, jugando por tanto un papel prominente en la adaptación del microorganismo al nicho colonizado.

La predicción de traducción del gen *lic1A* mostró la pérdida de la pauta de lectura del gen en 16 de los 27 aislados analizados, en base al análisis de secuencia del extremo 5' del gen, incluyendo las repeticiones SSR. Sin embargo, todos los aislados mostraron PCho en su superficie. Esta observación podría deberse a la existencia de otros genes que codificaran otras enzimas con la misma función, no descritos en la literatura. Sin embargo, sería importante analizar la secuencia completa del gen *lic1A*, así como los niveles de expresión de este gen en los aislados seleccionados, para tener información adicional que permita asociar con mayor precisión el número de repeticiones SSR y la detección de PCho en cada cepa.

Estudios previos sobre poblaciones bacterianas han aportado varias observaciones, entre las que destacan la asociación entre el genotipo *IS1016+*, *hia+*, *hmw-* y cepas invasivas de HiNT (Satola *et al.*, 2008); y la asociación entre la presencia de *lic2B+*, *hmw+* y nueve *locus* génicos con aislados de HiNT de otitis media (Pettigrew *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2006). En conjunto, en este trabajo se observó un patrón molecular prevalente en una colección de cepas de HiNT no isogénicas, de origen clínico heterogéneo, y en una colección de sets de cepas de HiNT aisladas de pacientes



respiratorios crónicos durante episodios de agudización. Este patrón génico puede ser un rasgo general ventajoso para el patógeno durante el proceso infeccioso, y puede aportar información relevante sobre la adaptación de HiNT durante la infección. Asimismo, la asociación génica definida podría tener implicaciones clínicas, ya que estructuras prevalentes de la superficie bacteriana son potenciales dianas terapéuticas para el diseño de moléculas antimicrobianas. Trabajo futuro intentará expandir la información sobre el significado biológico y las posibles implicaciones de la existencia de los patrones moleculares descritos.





# **CONSIDERACIONES FINALES**



En esta Tesis Doctoral se han analizado dos aspectos de la patogénesis de *Haemophilus influenzae* no tipable, lo que ha generado información acerca de la interacción de este patógeno respiratorio con el macrófago alveolar, y ha permitido la identificación de un patrón molecular que podría estar asociado a patogénesis. El hecho de que el macrófago alveolar expuesto a humo de tabaco muestre unos niveles de fagocitosis menores a los observados al emplear macrófagos control no expuestos a agentes externos podría favorecer la presencia del patógeno en el tracto respiratorio inferior de fumadores y pacientes EPOC. Trabajos realizados en nuestro laboratorio muestran la capacidad de HiNT para invadir y persistir en células epiteliales de pulmón (Morey *et al.*, 2011). La deficiencia fagocítica provocada por el EHT y por la nicotina puede favorecer el escape bacteriano de la eliminación fagolisosomal, favoreciendo a su vez la invasión y supervivencia intracelular en el epitelio respiratorio, lo que puede facilitar el escape del ataque bactericida de elementos solubles de la inmunidad innata (deposición de IgA, efecto bactericida de los PAs, etc.) o de terapias antimicrobianas, favoreciendo en último término la infección respiratoria crónica.

Por otro lado, considerando que la resistencia a los corticosteroides es un problema clínico importante en EPOC (Garmendia *et al.*, 2012), la aplicación de tratamientos anti-inflamatorios alternativos resulta conveniente. Existen varias alternativas en distintas fases de estudio, algunas de ellas aprobadas y actualmente administradas a este tipo de pacientes. Los antioxidantes y los inhibidores de iNOS podrían resultar efectivos inhibiendo la generación de peróxido de nitrito asociada al tabaquismo. Si bien las vitaminas C y E y la N-acetilcisteína son antioxidantes disponibles, se están desarrollando actualmente inhibidores selectivos de iNOS y depuradores (*scavengers*) de peróxido de nitrito. Por otra parte, estudios realizados con el activador de HDAC teofilina apuntan que esta molécula es capaz de revertir la resistencia a los esteroides inducida por el estrés oxidativo en macrófagos alveolares de pacientes EPOC. Otras terapias alternativas a los corticoesteroides son: (i) broncodilatadores de largo efecto (*long-acting  $\beta_2$  agonist*) salmeterol (anticolinérgico tiotropium de largo efecto); (ii) antagonistas de mediadores inflamatorios: inhibidores de LTB<sub>4</sub>, IL-8, TNF- $\alpha$  o EGFR; (iii) inhibidores de proteasas: anti-proteasas endógenas como son antitripsina  $\alpha_1$ , SLPI, elafina, cistatinas; (iv) inhibidores de fosfodiesterasa 4 (PDE<sub>4</sub>, del inglés *phosphodiesterase 4*), de p38 MAP quinasa, de NF- $\kappa$ B o de PI3K; (v) resveratrol.

En muchos casos, los receptores potenciales de estos agentes terapéuticos son pacientes respiratorios crónicos, colonizados por microorganismos persistentes, por lo que el impacto de las mismas sobre la dinámica de la interacción hospedador-patógeno debe ser considerado. Si bien escasos, existen algunos estudios al respecto. Así, la administración de salmeterol contribuye a la protección de la barrera del epitelio respiratorio frente a *P. aeruginosa* (Coraux *et al.*, 2004). A pesar de que el

salmeterol parece proteger el epitelio respiratorio frente al daño inducido por *H. influenzae*, datos obtenidos en estudios *in vivo* muestran que la inhalación de este broncodilatador podría influenciar negativamente sobre la eliminación de HiNT del tracto respiratorio murino (Maris *et al.*, 2006). En cambio, el tratamiento con resveratrol mostró una disminución de la neumonía inducida por *Serratia marcescens* en ratas, así como la inhibición del proceso de *swarming* y de la expresión de factores de virulencia en *Proteus mirabilis* (Lu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). El incremento de los niveles de AMPc en las células del hospedador, bien por la activación de adenilato ciclasas (AC) o por la inhibición de PDE<sub>4</sub>, podría tener un beneficio en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli* uropatógena, al disminuir la capacidad invasiva del epitelio urinario por este patógeno y favorecer la eliminación de la infección en un modelo murino (Bishop *et al.*, 2007). Este tipo de terapia parece también revertir la actividad defensiva antioxidante del hospedador, disminuída durante la infección por *Brucella melitensis* (Erdogan *et al.*, 2008). El efecto de la exposición a agentes anti-inflamatorios en la infección epitelial por HiNT está siendo objeto de estudio en la actualidad en nuestro laboratorio. Datos preliminares indican que la exposición celular al activador de ACs forskolin, a prostaglandina E<sub>2</sub>, al inhibidor de PDE<sub>4</sub> roflumilast, al inhibidor de la quinasa MAP P38 SB203580 y al inhibidor de EGFR AG1478 reducen la invasión del epitelio pulmonar en cultivo por HiNT, sin modificar la tasa de adhesión bacteriana (López-Gómez *et al.*, 2012; Begoña Euba, datos no publicados). Estos resultados serán ampliados a un mayor rango de agentes anti-inflamatorios, al análisis de la interferencia de estas terapias en la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección por HiNT, en modelo de infección *in vitro* y un modelo *in vivo* de infección intranasal murina.

Un último aspecto a considerar es que las alteraciones de la microflora respiratoria normal provocadas por la exposición a factores externos como el humo de tabaco pueden impactar en la salud del hospedador y ser un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones y enfermedades respiratorias crónicas. Si bien es esencial conocer la naturaleza de la dinámica de interacción hospedador-patógeno para el desarrollo de terapias efectivas, debe tenerse en cuenta el efecto de la exposición a agentes ambientales/terapéuticos tanto en la interacción hospedador-patógeno como en la interacción hospedador-microbiota normal.

En el Capítulo 2 de esta Tesis se analizó la distribución, conservación y expresión de nueve genes que codifican estructuras localizadas en la superficie de HiNT en dos colecciones de aislados clínicos. Los resultados obtenidos en ambas colecciones muestran la prevalencia de un patrón génico. Este patrón indica la presencia mayoritaria de ocho de los genes analizados, a excepción de *siaA*, que resultó positivo únicamente en una cepa. En base a los resultados obtenidos, hacemos las siguientes consideraciones:

(i) Un aspecto a considerar es la adecuación de los genes seleccionados en este estudio. El motivo de su elección es que son genes asociados a virulencia (Hong *et al.*, 2007a; Hong *et al.*, 2007b; Figueira *et al.*, 2007; Hood *et al.*, 1999; de Vries *et al.*, 2009; Prasadarao *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 1996; Hood *et al.*, 2002). Sin embargo, no podemos excluir que estos genes estén relacionados de forma general con la supervivencia del microorganismo en un ambiente hostil como puede ser la nasofaringe humana.

(ii) Todas las cepas empleadas son aislados clínicos, lo que nos ha llevado a establecer una asociación entre patrón génico y patogénesis. Sin embargo, esta asociación puede no ser cierta, o ser una simplificación como consecuencia del material microbiológico empleado. Un estudio completo requerirá disponer de cepas de HiNT asintomáticas, aisladas de individuos portadores sanos. Si bien este tipo de material no fue disponible durante del desarrollo de esta Tesis Doctoral, gracias a la colaboración establecida con los Drs. Josefina Liñares (HUB), Cristina Prat (H. Germans Trias i Pujol) y José Enrique Yuste (Centro Nacional Microbiología), actualmente disponemos de una colección de aislados pediátricos de HiNT que contiene cepas de portadores sanos aisladas en guardería y cepas sintomáticas aisladas a partir de infecciones agudas, en su mayoría otitis pediátrica. Un análisis de distribución y diversidad génica y fenotípica en este grupo de aislados contribuirá a determinar rasgos moleculares asociados a la adaptación o a la patogénesis del patógeno oportunista HiNT.

(iii) Adecuación de las aproximaciones empleadas en estudios de diversidad genética y adaptación/evolución adaptativa microbiana: la progresiva accesibilidad a tecnologías de secuenciación masiva apunta a la secuenciación de genomas completos como una estrategia alternativa al abordaje de un número limitado de genes mediante técnicas convencionales de microbiología molecular, que ofrece información completa y exhaustiva en estudios de diversidad microbiana. Este tipo de aproximación ha sido empleada con éxito en trabajos recientes (Lieberman *et al.*, 2011; Coutinho *et al.*, 2011; Cox *et al.*, 2010).

(iv) Adecuación de las colecciones de aislados de HiNT al estudio de dinámica de poblaciones: un aspecto que no hemos podido abordar durante este trabajo es el recambio (*turnover*) de HiNT en pacientes respiratorios crónicos. Si bien la colección 2 contiene *sets* de cepas aisladas de pacientes respiratorios crónicos en agudizaciones independientes, hay dos aspectos limitantes al tratarse de un estudio retrospectivo. Por una parte, disponemos de una cepa/agudización/paciente. Por otra parte, no disponemos de cepas aisladas de los mismos pacientes en fase estable. La colección 2 disponible nos ha permitido establecer las bases para este tipo de estudio. Trabajo futuro requerirá un estudio prospectivo, en el que un seguimiento exhaustivo de un



número abordable de pacientes respiratorios crónicos en fase estable y en agudización permita el aislamiento de varios clones individuales de HiNT por visita médica, generando así material microbiológico adecuado para el estudio de dinámica de poblaciones de este patógeno oportunista.

# CONCLUSIONES



1. HiNT se adhiere al macrófago alveolar, y es fagocitado mediante un proceso que depende de la ruta de señalización celular PI3K-Akt, de la integridad de las balsas lipídicas de la membrana plasmática eucariota, y de la polimerización del citoesqueleto de actina.
2. El macrófago alveolar elimina la infección por HiNT mediante maduración fagolisosomal.
3. La exposición celular a extracto de humo de tabaco y a nicotina disminuye la capacidad del macrófago alveolar en cultivo para adherir y fagocitar HiNT. La capacidad fagocítica de material inerte no disminuye por exposición celular a extracto de humo de tabaco.
4. La capacidad fagocítica de macrófagos alveolares de individuos fumadores con función pulmonar normal y de pacientes EPOC es menor que la de macrófagos alveolares de individuos no fumadores.
5. La exposición celular a extracto de humo de tabaco limita la activación de la ruta de señalización celular PI3K--Akt desencadenada por la infección por HiNT.
6. El macrófago alveolar expuesto a extracto de humo de tabaco elimina la infección por HiNT mediante maduración fagolisosomal con mayor eficacia que el macrófago control.
7. El tratamiento celular con el corticoide dexametasona no interfiere en la capacidad fagocítica del macrófago alveolar.
8. El tratamiento celular con el corticoide dexametasona no restaura la deficiencia fagocítica provocada por la exposición del macrófago alveolar a extracto de humo de tabaco.
9. El macrófago alveolar secreta la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$  en respuesta a la infección por HiNT. La exposición celular al corticoide dexametasona reduce la inflamación provocada por la infección.
10. El análisis de la distribución de nueve genes relacionados con la patogénesis de HiNT en una colección de cepas clínicas no isogénicas muestra la prevalencia del patrón génico *lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*.

11. El análisis de variabilidad de secuencia génica en una colección de cepas clínicas de HiNT no isogénicas muestra heterogeneidad en la secuencia de los genes *ompP5*, *oapA* y *lic2A*. Las fuentes de variabilidad son, en *ompP5*, la existencia de mutaciones puntuales en las cinco regiones hipervariables expuestas al exterior de la bacteria; en *oapA*, la presencia de inserciones/deleciones; en *lic2A*, el número variable de repeticiones 5'-CAAT-3' en su extremo 5'.
12. El análisis del perfil electroforético del LOS en cepas de HiNT no isogénicas muestra heterogeneidad entre cepas. A pesar de la diversidad observada, el LOS de las cepas analizadas presenta de forma preferente las sustituciones PCho y ácido sálico.
13. El análisis de la resistencia al ataque bactericida del suero humano de cepas de HiNT no isogénicas muestra una asociación entre el patrón génico prevalente *lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*, la sialilación del LOS y la resistencia de la bacteria a la muerte por complemento.
14. El análisis de la adhesión al epitelio respiratorio humano de cepas de HiNT no isogénicas muestra que la adhesión epitelial es variable entre aislados. Las cepas pertenecientes al patrón génico prevalente presentan tendencia a adherirse con mayor eficacia al epitelio respiratorio humano.
15. El análisis de la distribución de nueve genes relacionados con la patogénesis de HiNT en veinte sets de cepas aisladas de pacientes respiratorios crónicos durante visitas médicas independientes debido a agudizaciones de las enfermedades crónicas subyacentes muestra la prevalencia del patrón génico *lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*. Asimismo, el LOS de las cepas analizadas presenta de forma preferente la sustitución PCho y un lípido A hexaacilado.
16. El análisis de variabilidad de secuencia génica en una colección de veinte sets de cepas aisladas de pacientes respiratorios crónicos durante visitas médicas independientes debido a agudizaciones de las enfermedades crónicas subyacentes muestra heterogeneidad de secuencia en los genes *oapA*, *lic2A* y *lic1A*. Las fuentes de variabilidad son la presencia de inserciones/deleciones en *oapA* y un número variable de repeticiones 5'-CAAT-3' en los extremos 5' de *lic2A* y *lic1A*.

# REFERENCIAS



- Agrawal A. and Murphy TF. (2011) *Haemophilus influenzae* infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *J Clin Microbiol* **49**: 3728-32.
- Almirall J, Bolibar I, Balanzo X, González CA. (1999) Risk factors for community acquired pneumonia in adults: a population-based case-control study. *Eur Respir J* **13**: 349-355.
- Almirall J, Gonzalez CA, Balanzo X, Bolibar I. (2005) Proportion of community-acquired pneumonia cases attributable to tobacco smoking. *Chest* **116**: 375-379.
- Allen, S, Zaleski, A, Johnston, JW, Gibson, BW, and Apicella, MA. (2005) Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**: 5291-5300.
- Amedei A, Della Bella C, Niccolai E, Stanflin N, Benagiano M, Duranti R, Del Prete G, Murphy TF, D'Elios MM. (2007) *Moraxella catarrhalis* specific Th1 cells in BAL fluids of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**: 979-990.
- Amin K, Ekberg-Jansson A, Löfdahl CG, Venge P. (2003) Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* **58**: 135-42.
- Arcavi L, and Benowitz NL. (2004) Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med* **164**: 2206-2216.
- Aronson MD, Weiss ST, Ben RL, Komaroff AL. (1982) Association between cigarette smoking and acute respiratory tract illness in young adults. *JAMA* **248**: 181-183.
- Avadhanula, V, Rodriguez, CA, Ulett, GC, Bakaletz, LO, and Adderson, EE. (2006) Nontypeable *Haemophilus influenzae* adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression. *Infect Immun* **74**: 830-838.
- Avadhanula V, Rodriguez CA, Devincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, Ulett GC, Adderson EE. (2006) Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Virol* **80**: 1629-36.
- Bagaitkar J, Demuth DR, and Scott DA. (2008) Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. *Tob Induc Dis* **4**: 12.
- Bagaitkar J, Demuth DR, Daep CA, et al. (2010) Tobacco upregulates *P. gingivalis* fimbrial proteins which induce TLR2 hyposensitivity. *PLoS One* **5**: e9323.
- Bagaitkar J, Williams LR, Renaud DE, et al. (2009). Tobacco-induced alterations to *Porphyromonas gingivalis*-host interactions. *Environ Microbiol* **11**: 1242–1253.
- Bakaletz, L. O., Baker, B. D., Jurcisek, J. A., Harrison, A., Novotny, L. A., Bookwalter, J. E. et al. (2005). Demonstration of type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**: 1635-1643.
- Bals R, and Hiemstra PS. (2004) Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* **23**: 327-333.



- Barenkamp, SJ and St Geme III, JW. (1996) Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **19**: 1215-1223.
- Barenkamp SJ, St Geme III JW. (1994) Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun* **62**: 3320-3328.
- Barenkamp SJ, Leininger E. (1992) Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* **60**: 1302-13.
- Barnes, PJ. (2003) Therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther* **97**: 87-94.
- Barnes, PJ. (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* **8**: 183-192.
- Barnes PJ, Ito K, and Adcock IM. (2004) Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet* **363**: 731-733.
- Barnes PJ, and Stockley RA. (2005) COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Respir J* **25**: 1084-1106.
- Barnes PJ. (2006) Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* **27**: 413-426.
- Barnes PJ. (2004) Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* **56**: 515-548.
- Barnes PJ. (2006) Reduced Histone Deacetylase in COPD: Clinical Implications. *Chest* **129**: 151-155.
- Barnes PJ. (2007) Prevention of death in COPD. *N Engl J Med* **356**: 2211.
- Barnes PJ, and Celli BR. (2009) Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* **33**: 1165-1185.
- Barnes PJ. (2009) The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**: 631-638.
- Bates MN, Khalakdina A, Pai M, et al. (2007) Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and metaanalysis. *Arch Intern Med* **167**:335-42
- Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, et al. (2009) *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol* **58**: 174-179.
- Berenson, CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, and Sethi S. (2006) Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Infect. Dis* **194**: 1375-1384.

- Bishop BL, Duncan MJ, Song J, Li G, Zaas D, Abraham SN. (2007) Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med* **13**: 625-30.
- Bookwalter, JE, Jurcisek, JA, Gray-Owen, SD, Fernandez, S, McGillivray, G, and Bakaletz, LO. (2008) A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 homologue plays a pivotal role in nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization of the chinchilla nasopharynx via the outer membrane protein P5-homologous adhesin. *Infect Immun* **76**: 48-55.
- Borgerding M, Klus H. (2005) Analysis of complex mixtures – cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* **57**: 43-73.
- Bouchet, V., Hood, D. W., Li, J., Brisson, J. R., Randle, G. A., Martin, A. *et al.* (2003) Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8898-8903.
- Bratke K, Klug M, Bier A, et al. (2008) Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**: 655-660.
- Brook I, Gober AE. (2005) Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of smokers and nonsmokers. *Chest* **127**: 2072-5.
- Burleson, GR, and Burleson FG. (2008) Testing human biologicals in animal host resistance models. *J Immunotoxicol* **5**: 23-31.
- Butler, CC, and Der Voort JH. (2001) Steroids for otitis media with effusion: a systematic review. *Arch. Pediatr. Adolesc Med* **155**: 641-647.
- Bresser P, van Alphen L, Habets FJ, Hart AA, Dankert J, Jansen HM, Lutter R. (1997) Persisting *Haemophilus influenzae* strains induce lower levels of interleukin-6 and interleukin-8 in H292 lung epithelial cells than nonpersisting strains. *Eur Respir J* **10**: 2319-26.
- Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, et al. (2006) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **173**: 1139-1144.
- Carruthers MD, Tracy EN, Dickson AC, Ganser KB, Munson RS Jr, and Bakaletz LO. (2012) Biological roles of nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus proteins encoded by the *pil* and *com* operons. *J Bacteriol* **194**: 1927-1933.
- Castranova V, Huffman LJ, Judy DJ, et al. (1998) Enhancement of nitric oxide production by pulmonary cells following silica exposure. *Environ Health Perspect* **106**: 1165-1169.
- Celli BR and Barnes PJ. (2007) Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **29**: 1224-1238.
- Chaudhuri N and Sabroe I. (2008) Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatr Respir Rev* **9**: 236-242.
- Chen R, Lim JH, Jono H, Gu XX, Kim YS, Basbaum CB, Murphy TF, Li JD. (2004) Nontypeable *Haemophilus influenzae* lipoprotein P6 induces MUC5AC mucin transcription via TLR2-TAK1-

dependent p38 MAPK-AP1 and IKKbeta-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 19: **324**: 1087-94.

Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S, and Look DC. (2005) *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* **172**: 85-91.

Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al. (2004) Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8<sup>+</sup> lymphocytes in patients with COPD. *Chest* **125**: 71-76.

Clark SE, Snow J, Li J, Zola TA, Weiser JN. (2012) Phosphorylcholine allows for evasion of bactericidal antibody by *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* **8**: e1002521.

Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, St Geme JW 3rd, Marrs CF, Gilsdorf JR. (2000) Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **68**: 4430-40.

Coraux C, Kileztky C, Polette M, Hinnrasky J, Zahm JM, Devillier P, De Bentzmann S, Puchelle E. (2004) Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**: 605-12.

Cosio, B. G., L. Tsaprouni, K. Ito, E. Jazrawi, I. M. Adcock, and P. J. Barnes. (2004) Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J. Exp. Med.* **200**: 689–695.

Cosío MG, Saetta M, and Agustí A. (2009) Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **360**: 2445-2454.

Coutinho CP, de Carvalho CC, Madeira A, Pinto-de-Oliveira A, Sá-Correia I. (2009) Burkholderia cenocepacia phenotypic clonal variation during a 3.5-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Infect Immun.* **79**: 2950-60.

Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, Karaoz U, Andersen GL, Brown R, Fujimura KE, Wu B, Tran D, Koff J, Kleinhenz ME, Nielson D, Brodie EL, Lynch SV. (2010) Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One* **23**;5: e11044.

Craig, JE, Cliffe A, Garnett K, and High NJ. (2001) Survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 55-61.

Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell REK, Barnes PJ, and Donnelly LE. (2003) Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* **58**: 942-946.

Dawid S, Barenkamp SJ, St Geme III JW. (1999) Variation in expression of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1077-1082.

- Deadman ME, Hermant P, Engskog M, Makepeace K, Moxon ER, Schweda EK *et al.* (2009) Lex2B, a phase-variable glycosyltransferase, adds either a glucose or a galactose to *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Infect Immun* **77**: 2376-2384.
- Deadman ME, Lundstrom SL, Schweda EK, Moxon ER, and Hood DW. (2006) Specific amino acids of the glycosyltransferase LpsA direct the addition of glucose or galactose to the terminal inner core heptose of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide via alternative linkages. *J Biol Chem* **281**: 29455-29467.
- Deitsch KW, Lukehart SA, and Stringer JR. (2009) Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol* **7**: 493-503.
- Delima SL, McBride RK, Preshaw PM, et al. (2010) Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *J Clin Microbiol* **48**: 2344-2349.
- DeMaria TF, Apicella MA, Nichols WA, and Leake ER. (1997) Evaluation of the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide *htrB* and *rfaD* mutants in the chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **65**: 4431-4435.
- de Vries SP, Bootsma HJ, Hays JP, Hermans PW. (2009). Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:389-406.
- Dixon K, Bayliss CD, Makepeace K, Moxon ER, and Hood DW. (2007) Identification of the functional initiation codons of a phase-variable gene of *Haemophilus influenzae*, *lic2A*, with the potential for differential expression. *J Bacteriol* **189**: 511-521.
- Dougherty BA and Smith HO. (1999) Identification of *Haemophilus influenzae* Rd transformation genes using cassette mutagenesis. *Microbiology* **145**: 401-409.
- Drannik AG, Pouladi MA, Robbins CS, Goncharova SI, Kianpour S, and Stampfli MR. (2004) Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir. Crit Care Med* **170**: 1164-1171.
- Duim B, Bowler LD, Eijk PP, Jansen HM, Dankert J, et al. (1997) Molecular variation in the major outer membrane protein P5 gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* during chronic infections. *Infect Immun* **65**: 1351-1356.
- Duim B, Eijk van AL, Jansen P, H. M., and Dankert J. (1994) Antigenic drift of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* major outer membrane protein P2 in patients with chronic bronchitis is caused by point mutations. *Mol Microbiol* **11**: 1181-1189.
- Ecevit IZ, McCrea KW, Pettigrew MM, Sen A, Marrs CF, et al. (2004) Prevalence of the *hifBC*, *hmw1A*, *hmw2A*, *hmwC*, and *hia* genes in *Haemophilus influenzae* isolates. *J Clin Microbiol* **42**: 3065-3072.
- El Ahmer OR, Essery SD, Saadi AT, et al. (1999) The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**: 27-36.
- Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, and Huffnagle GB. (2011) Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One* **6**: e16384.

- Erdogan S, Aslantas O, Celik S, Atik E. (2008). The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Res Vet Sci* **84**:18-25.
- Ernst P, González AV, Brassard P, and Suissa S. (2007) Inhaled corticosteroid use in chronic obstructive pulmonary disease and the risk of hospitalization for pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **176**: 162-166.
- Erwin AL, Allen S, Ho DK, Bonthuis PJ, Jarisch J, Nelson KL *et al.* (2006) Role of *IgtC* in resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2866 to human serum. *Infect Immun* **74**: 6226-6235.
- Erwin AL, Nelson KL, Mhlanga-Mutangadura T, Bonthuis PJ, Geelhood JL, *et al.* (2005) Characterization of genetic and phenotypic diversity of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**: 5853-5863.
- Erwin AL, and Smith AL. (2007) Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol* **15**: 355-362.
- Feng Y, Kong Y, Barnes PF, *et al.* (2011) Exposure to cigarette smoke inhibits the pulmonary T-cell response to influenza virus and *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **79**: 229-237.
- Fereol S, Fodil R, Pelle G, *et al.* (2008) Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs). *Respir Physiol Neurobiol* **163**: 3-16.
- Fernaays MM, Lesse AJ, Cai X, and Murphy TF. (2006) Characterization of *igaB*, a second immunoglobulin A1 protease gene in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **74**: 5860-5870.
- Fernaays MM, Lesse AJ, Sethi S, Cai X, and Murphy TF. (2006) Differential genome contents of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains from adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun* **74**: 3366-3374.
- Ferson M, Edwards A, Lind A *et al.* (1979) Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int J Cancer* **23**: 603-609.
- Figueira MA, Ram S, Goldstein R, Hood DW, Moxon ER, and Pelton SI. (2007) Role of complement in defense of the middle ear revealed by restoring the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae siaB* mutants. *Infection and Immunity* **75**: 325-333.
- Fink DL, Green BA, and St. Geme III J. (2002) The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun* **70**: 4902-4907.
- Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**:355-66.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR *et al.* (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.

- Fletcher CM. (1959) Chronic bronchitis. Its prevalence, nature, and pathogenesis. *Am Rev Respir Dis* **80**: 483-494.
- Fletcher CM, Elmes PC, Fairbairn AS, and Wood CH. (1959) The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br Med J* **2**: 257-266.
- Forbes KJ, Bruce KD, Ball A, and Pennington TH. (1992) Variation in length and sequence of porin (*ompP2*) alleles of non-capsulate *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **6**: 2107-2112.
- Fox KL, Cox AD, Gilbert M, Wakarchuk WW, Li J, Makepeace K et al. (2006) Identification of a bifunctional lipopolysaccharide sialyltransferase in *Haemophilus influenzae*: incorporation of disialic acid. *J Biol Chem* **281**: 40024-40032.
- Fox KL, Dowideit SJ, Erwin AL, Srikhanta YN, Smith AL, and Jennings MP. (2007) *Haemophilus influenzae* phasevarions have evolved from type III DNA restriction systems into epigenetic regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res* **35**: 5242-5252.
- Fox KL, Li J, Schweda EK, Vitiaseva V, Makepeace K, Jennings MP et al. (2008) Duplicate copies of *lic1* direct the addition of multiple phosphocholine residues in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**: 588-600.
- Fox KL, Yildirim HH, Deadman ME, Schweda EK, Moxon ER, and Hood DW. (2005) Novel lipopolysaccharide biosynthetic genes containing tetranucleotide repeats in *Haemophilus influenzae*, identification of a gene for adding O-acetyl groups. *Mol Microbiol* **58**: 207-216.
- Foxwell AR, Kyd JM, and Cripps AW. (1998) Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 294-308.
- Furumoto Y, Nunomura S, Terada T, Rivera J, Ra C. (2004) The FcepsilonR1beta immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IkkappaB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J Biol Chem* **279**: 49177-87.
- Galdiero M, Galdiero M, Finamore E, Rossano F, Gambuzza M, Catania MR, Teti G, Midiri A, Mancuso G. (2004) *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* **72**: 1204-9.
- Garcia-Rodriguez JA and Fresnadillo-Martinez MJ. (2002) Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* **50** S2: 59-73.
- Garmendia J, Morey P, and Bengoechea JA. (2012) Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *Eur Respir J* **39**: 467-77.
- Gilsdorf JR, Marrs CF, and Foxman B. (2004) *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infect Immun* **72**: 2457-2461.
- Gilsdorf JR, McCrea KW, and Marrs CF. (1997) Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect Immun* **65**: 2997-3002.

Giufre M, Carattoli A, Cardines R, Mastrantonio P, and Cerquetti M. (2008) Variation in expression of HMW1 and HMW2 adhesins in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *BMC Microbiol* **8**: 83.

Goldstein-Daruech N, Cope EK, Zhao KQ, et al. (2011) Tobacco smoke mediated induction of sinonasal microbial biofilms. *PLoS One* **6**: e15700.

Grass S, Buscher AZ, Swords WE, Apicella MA, Barenkamp SJ, Ozchlewski N, St Geme JW 3rd. (2003) The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* **48**: 737-51.

Gray-Owen SD, Dehio C, Haude A, Grunert F, Meyer TF. (1997) CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J* **16**: 3435-3445.

Greenberg D, Givon-Lavi N, Broides A, et al. (2006) The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers. *Clin Infect Dis* **42**: 897-903.

Griffin FM Jr, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. (1975) Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* **142**: 1263-82.

Griffin R, Bayliss CD, Herbert MA, Cox AD, Makepeace K, Richards JC et al. (2005) Digalactoside expression in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* and its role in intravascular survival. *Infect Immun* **73**: 7022-7026.

Gronow S, Brabetz W, Lindner B, and Brade H. (2005) OpsX from *Haemophilus influenzae* represents a novel type of heptosyltransferase I in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* **187**: 6242-6247.

Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1957-76.

González-Quintela A, Alende R, Gude F, et al. (2008) Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol* **151**: 42-50.

Gould JM and Weiser JN. (2002) The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis* **186**: 361-371.

Haffajee AD, and Socransky SS. (2001) Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* **28**: 377-388.

Hallström T, Blom AM, Zipfel PF, and Riesbeck K. Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J Immunol* 2009; **183**: 2593-2601.

- Hallström T, Jarva H, Riesbeck K, and Blom AM. (2007) Interaction with C4b-binding protein contributes to nontypeable *Haemophilus influenzae* serum resistance. *J Immunol* **178**: 6359-6366.
- Hallström T, Resman F, Ristovski M, and Riesbeck K. (2010) Binding of complement regulators to invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates is not increased compared to nasopharyngeal isolates, but serum resistance is linked to disease severity. *J Clin Microbiol* **48**: 921–927.
- Hallström T and Riesbeck K. (2010) *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol* **18**: 258-265.
- Hallström T, Singh B, Resman F, Blom AM, Mörgelin M, and Riesbeck K. (2011) *Haemophilus influenzae* protein E binds to the extracellular matrix by concurrently interacting with laminin and vitronectin. *J Infect Dis* **204**: 1065-74
- Hansel TT, and Barnes PJ. (2009) New drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **374**: 744-755.
- Harrison A, Dyer DW, Gillaspay A, Ray WC, Mungur R, et al. (2005) Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. *J Bacteriol* **187**: 4627-4636.
- Harvey HA, Swords WE, and Apicella MA. (2001) The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun* **16**: 257-262.
- Hendrixson DR and St Geme III JW. (1998) The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* **2**: 841-850.
- Herriott RM, Meyer EM, and Vogt M. (1970) Defined non-growth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* **101**: 517-524.
- High NJ, Deadman ME, Hood DW, and Moxon ER. (1996) The identification a novel gene required for lipopolysaccharide biosynthesis by *Haemophilus influenzae* RM7004, using transposon Tn916 mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett* **145**: 325-331.
- Hill DJ, Toleman MA, Evans DJ, Villullas S van AL, and Virji M. (2001) The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM-1. *Mol Microbiol* **39**: 850-862.
- Hiltke TJ, Schiffmacher AT, Dagonese AJ, Sethi S, and Murphy TF. (2003) Horizontal transfer of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* **188**: 114-117.
- Ho DK, Ram S, Nelson KL, Bonthuis PJ, and Smith AL. (2007) *IgtC* expression modulates resistance to C4b deposition on an invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Immunol* **178**: 1002-1012.



Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, and Reynolds PN. (2007) Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability implications in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**: 748-755.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **350**: 2645-2653.

Hong W, Mason K, Jurcisek J, Novotny L, Bakaletz LO, and Swords WE. (2007a) Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **75**: 958-965.

Hong W, Pang B, West-Barnette S, and Swords WE. (2007b) Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* **189**: 8300-8307.

Hood DW, Cox AD, Wakarchuk WW, Schur M, Schweda EK, Walsh SL et al. (2001) Genetic basis for expression of the major globotetraose-containing lipopolysaccharide from *H. influenzae* strain Rd (RM118). *Glycobiology* **11**: 957-967.

Hood DW, Deadman ME, Allen T, Masoud H, Martin A, Brisson JR et al. (1996) Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* **22**: 951-965.

Hood DW, Deadman ME, Cox AD, Makepeace K, Martin A, Richards JC et al. (2004) Three genes, *lgtF*, *lic2C* and *lpsA*, have a primary role in determining the pattern of oligosaccharide extension from the inner core of *Haemophilus influenzae* LPS. *Microbiology* **150**: 2089-2097.

Hood DW, Makepeace K, Deadman ME, Rest RF, Thibault P, et al. (1999) Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol Microbiol* **33**: 679-692.

Iles K, Poplawski NK, Couper RT. (2001) Passive exposure to tobacco smoke and bacterial meningitis in children. *J Paediatr Child Health* **37**: 388-391.

Imasato A, Desbois-Mouthon C, Han J, et al. (2002) Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced expression of Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **277**: 47444-47450.

Jones LL, Hashim A, McKeever T, et al. (2011) Parental and household smoking and the increased risk of bronchitis, bronchiolitis and other lower respiratory infections in infancy: systematic review and meta-analysis. *Respir Res* **12**: 5.

Jones PA, Samuels NM, Phillips NJ, Munson RS, Jr, Bozue JA, et al. (2002) *Haemophilus influenzae* type b strain A2 has multiple sialyltransferases involved in lipooligosaccharide sialylation. *J Biol Chem* **277**: 14598-14611.

Johnson AP, and Inzana TJ. (1986) Loss of ciliary activity in organ cultures of rat trachea treated with lipooligosaccharide from *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* **22**: 265-268.

- Jurcisek J, Greiner L, Watanabe H, Zaleski A, Apicella MA, and Bakaletz LO. (2005) Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* **73**: 3210-3218.
- Jurcisek JA, and Bakaletz LO. (2007) Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* *in vivo* contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol* **189**: 3868-3875.
- Jurcisek JA, Bookwalter JE, Baker BD, Fernandez S, Novotny LA, Munson RS Jr et al. (2007) The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. *Mol Microbiol* **65**: 1288-1299.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, et al. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* **6**: 288-301.
- Kanthakumar K, Taylor GW, Cundell, DR, Dowling RB, Johnson M, Cole PJ et al. (1996) The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. *Pulm Pharmacol* **9**: 223-230.
- Kannan S, Audet A, Knittel J, Mullegama S, Gao GF, Wu M. (2006) Src kinase Lyn is crucial for *Pseudomonas aeruginosa* internalization into lung cells. *Eur J Immunol*. **36**:1739-52.
- Kannan S, Audet A, Huang H, Chen LJ, Wu M. (2008) Cholesterol-rich membrane rafts and Lyn are involved in phagocytosis during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Immunol*. 2008 **180**(4):2396-408.
- Kariya C, Chu HW, Huang J, et al. (2008) *Mycoplasma pneumoniae* infection and environmental tobacco smoke inhibit lung glutathione adaptive responses and increase oxidative stress. *Infect Immun* **76**: 4455-4462.
- Kilian M. (2005) Family I. Pasteurellaceae. Genus III. *Haemophilus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Garrity, G. M., Staley, J. T., Brenner, D. J., and Krieg, N. R. (ed.) New York: Springer, pp. 883-904.
- Kilian, M., Mestecky, J., and Schrohenloher, R. E. (1979) Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun* **26**: 143-149.
- Kita H, and Nikaido H. (1973) Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* IV. Anomeric configuration of L-rhamnose residues and its taxonomic implications. *J Bacteriol* **113**: 672-679.
- Klettner AK, Doths J, Roider J. (2012) Nicotine reduces VEGF-secretion and phagocytotic activity in porcine RPE. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. **250**: 33-8.
- Knobloch J, Schild K, Jungck D, et al. (2011) The T-helper cell type 1 immune response to Gram negative bacterial infections is impaired in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 204-214.

Komatsu K, Jono H, Lim JH, et al. (2008) Glucocorticoids inhibit nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC5AC mucin expression via MAPK phosphatase-1-dependent inhibition of p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* **377**: 763-768.

Korczak BM, and Kuhnert P. (2008) Phylogeny of *Pasteurellaceae*. In *Pasteurellaceae*. Biology, Genomics and Molecular Aspects. Kuhnert, P. and Christensen, H. (ed.) Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 27-52.

Kowalski MP, Pier GB. (2004) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J. Immunol*, 1:172: 418-25.

Kruskal BA, Sastry K, Warner AB, Mathieu CE, and Ezekowitz RA. (1992) Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor. *J Exp Med* **176**: 1673-1680.

Kubiet M, Ramphal R, Weber A, and Smith A. (2000) Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infect Immun* **68**: 3362-3367.

Laarmann S, Cutter D, Juehne T, Barenkamp SJ, and St Geme III JW. (2002) The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor. *Mol Microbiol* **46**: 731-743.

Lafont F, Abrami L, van der Goot FG. (2004) Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr Opin Microbiol* **7**:4-10. Review.

Lamers RP, Stinnett JW, Muthukrishnan G, Parkinson CL, and Cole AM. (2011) Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. *PLoS One* **6**: e16426.

Larsson L, Szponar B, Ridha B, et al. (2008) Identification of bacterial and fungal components in tobacco and tobacco smoke. *Tob Induc Dis* **4**: 4.

Lee NG, Sunshine MG, Engstrom JJ, Gibson BW, and Apicella MA. (1995) Mutation of the *htrB* locus of *Haemophilus influenzae* nontypable strain 2019 is associated with modifications of lipid A and phosphorylation of the lipo-oligosaccharide. *J Biol Chem* **270**: 27151-27159.

Lee YG, Lee J, Byeon SE, Yoo DS, Kim MH, Lee SY, Cho JY. (2011) Functional role of Akt in macrophage-mediated innate immunity. *Front Biosci* **16**: 517-30. Review.

Li JD. (2003) Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens. *J Pharmacol Sci* **91**: 1-7.

Lieberman TD, Michel JB, Aingaran M, Potter-Bynoe G, Roux D, Davis MR Jr, Skurnik D, Leiby N, LiPuma JJ, Goldberg JB, McAdam AJ, Priebe GP, Kishony R. (2011) Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. *Nat Genet* **43** :1275-80.

- Lima JB, Ribeiro GS, Cordeiro SM, Gouveia EL, Salgado K, et al. (2010) Poor clinical outcome for meningitis caused by *Haemophilus influenzae* serotype A strains containing the IS1016-bexA deletion. *J Infect Dis* **202**: 1577-1584.
- Ling SH, and van Eeden SF. (2009) Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **4**: 233-243.
- Look DC, Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S. (2006) Modulation of airway inflammation by *Haemophilus influenzae* isolates associated with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Proc Am Thorac Soc*. **3**:482-3.
- López-Gómez A, Cano V, Moranta D, Morey P, García Del Portillo F, Bengoechea JA, and Garmendia J. (2012) Host cell kinases,  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrins, and Rac1 signaling on the microtubule cytoskeleton are important for nontypable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology* 2012; *in press*.
- Lu CC, Lai HC, Hsieh SC, Chen JK. (2008) Resveratrol ameliorates *Serratia marcescens*-induced acute pneumonia in rats. *J Leukoc Biol* **83**: 1028-37.
- Lysenko ES, Clarke TB, Shchepetov M, et al. (2007) Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog* **3**: e118.
- Lysenko ES, Ratner AJ, Nelson AL, et al. (2005) The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog* **1**: e1.
- Lysenko ES, Lijek RS, Brown SP, et al. (2010) Within-host competition drives selection for the capsule virulence determinant of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Biol* **20**: 1222-1226.
- Lysenko E, Richards JC, Cox AD, Stewart A, Martin A, Kapoor M et al. (2000a) The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol Microbiol* **35**: 234-245.
- Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, and Weiser JN. (2000b) Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**: 1664-1671.
- Macfadyen LP. (2000) Regulation of competence development in *Haemophilus influenzae*. *J Theor Biol* **207**: 349-359.
- MacNee W. (2005) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**: 258-266.
- Margolis E, Yates A, and Levin BR. (2010) The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. *BMC Microbiol* **10**: 59.
- Marin A, Monsó E, Garcia-Nuñez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Agustí A, Morera J. (2010) Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J* **35**: 295-302.

- Maris NA, Florquin S, van't Veer C, de Vos AF, Buurman W, Jansen HM, van der Poll T. (2006) Inhalation of beta 2 agonists impairs the clearance of nontypable *Haemophilus influenzae* from the murine respiratory tract. *Respir Res* **4**;7: 57.
- Marshall JG, Booth JW, Stambolic V, Mak T, Balla T, Schreiber AD, Meyer T, Grinstein S. (2001) Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* **153**: 1369-80.
- Martínez-Solano L, Maciá MD, Fajardo A, et al. (2008) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* **47**: 1526-1533.
- Marston BJ, Lipman HB, and Breiman RF. (1994) Surveillance for Legionnaire's disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med* **154**: 2417-2422.
- Mason KM, Munson RS Jr, and Bakaletz LO. (2005) A Mutation in the *sap* operon attenuates survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **73**: 599-608.
- Mason RJ. (2006) Biology of alveolar type II cells. *Respirology*; S12-S15.
- Mason KM, Raffel FK, Ray WC, and Bakaletz LO. (2011) Heme utilization by nontypeable *Haemophilus influenzae* is essential and dependent on Sap transporter function. *J Bacteriol* **193**: 2527-2535.
- Maughan H, Sinha S, Wilson L, and Redfield RJ. (2009) Competence, DNA uptake and transformation in *Pasteurellaceae*. *Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Kuhnert, P. and Christensen, H. (ed.) Norfolk (UK): Caister academic press, pp. 80-98.
- Maunder H, Patwardhan S, Phillips J, et al. Human bronchial epithelial cell transcriptome: gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke *in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: 1248-1256.
- McGillivray G, Mason KM, Jurcisek JA, Peeples ME, and Bakaletz LO. (2009) Respiratory syncytial virus-induced dysregulation of expression of a mucosal  $\beta$ -defensin augments colonization of the upper airway by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Cell Microbiol* **11**: 1399-1408.
- Mehta H, Nazzal K, and Sadikot RT. (2008) Cigarette smoking and innate immunity. *Inflamm Res* **57**: 497-503.
- Meng G, Spahich N, Kenjale R, Waksman G, St Geme JW 3rd. (2011) Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation. *EMBO J*. **30**: 3864-74.
- Metchnikoff Elie (1968), advocate of phagocytosis. *JAMA* **8**;203: 139-41.
- Mikami F, Gu H, Jono H, Andalibi A, Kai H, Li JD. (2005) Epidermal growth factor receptor acts as a negative regulator for bacterium nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced Toll-like receptor 2 expression via an Src-dependent p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* **280**: 36185-94.

- Mikhail I, Yildirim HH, Lindahl EC, and Schweda EK. (2005) Structural characterization of lipid A from nontypeable and type f *Haemophilus influenzae*: variability of fatty acid substitution. *Anal Biochem* **340**: 303-316.
- Miyamoto N. and Bakaletz LO. (1996) Selective adherence of non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) to mucus or epithelial cells in the chinchilla eustachian tube and middle ear. *Microb Pathog* **21**: 343-356.
- Mizgerd JP. (2008) Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* **358**: 716-727.
- Mogensen TH, Berg RS, Paludan SR, et al. (2008) Mechanisms of dexamethasone-mediated inhibition of Toll-like receptor signaling induced by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **76**: 189-197.
- Morey P, Cano V, Martí-Lliteras P, López-Gómez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA and Garmendia J. (2011) Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* **157**: 234-250.
- Moxon R, Bayliss C, and Hood D. (2006) Bacterial Contingency Loci: The role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Ann Rev Gen* **40**: 307-333.
- Mukundan D, Ecevit Z, Patel M, Marrs CF, and Gilsdorf JR. (2007) Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. *J Clin Microbiol* **45**: 3207-3217.
- Mullins MA, Register KB, Bayles DO, Loving CL, Nicholson TL, et al. (2009) Characterization and comparative analysis of the genes encoding *Haemophilus parasuis* outer membrane proteins P2 and P5. *J Bacteriol* **191**: 5988-6002.
- Munger JS, Shi GP, Mark EA, Chin DT, Gerard C, and Chapman HA. (1991) A serine esterase released by human alveolar macrophages is closely related to liver microsomal carboxylesterases. *J Biol Chem* **266**: 18832-18838.
- Munson RS, Grass S, and West R. (1993) Molecular cloning and sequence of the gene for outer membrane protein P5 of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **61**: 4017-4020.
- Murphy TF, Sethi S, Klingman KL, Brueggemann AB, and Doern GV. (1999) Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. *J Infect Dis* **180**: 404-409.
- Murphy TF, Lesse AJ, Kirkham C, Zhong H, Sethi S, Munson RS Jr. (2009) A clonal group of nontypeable *Haemophilus influenzae* with two IgA proteases is adapted to infection in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **6**: e25923.
- Naito M. (2008) Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int* **58**: 143-155.

Nakamura S, Shchepetov M, Dalia AB, Clark SE, Murphy TF, Sethi S, Gilsdorf JR, Smith AL, and Weiser JN. (2011) Molecular basis of increased serum resistance among pulmonary isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* **7**: e1001247.

Nathan C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**: 173-82. Review.

Naylor EJ, Bakstad D, Biffen M, Thong B, Calverley P, Scott S, Hart CA, Moots RJ, and Edwards SW. (2007) *Haemophilus influenzae* induces neutrophil necrosis: a role in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J. Respir Cell Mol Biol* **37**: 135-143.

Niewoehner DE, Erbland ML, Deupree RH, Collins D, Gross NJ, Light RW, Anderson P, and Morgan NA. (1999) Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **340**: 1941-1947.

Novotny LA, Jurcisek JA, Pichichero ME, and Bakaletz LO. (2000) Epitope mapping of the outer membrane protein P5-homologous fimbrin adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **68**: 2119-2128.

Nuorti JP, Butler JC, Farley MM, et al. (2000) Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med* **342**: 681-689.

Olivera DS, Boggs SE, Beenhouwer C, et al. (2007) Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes *in vitro*. *Inhal Toxicol* **19**: 13-22.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, et al. (2005) Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol* **32**: 180-195.

Pang B, Winn D, Johnson R, Hong W, West-Barnette S, Kock N et al. (2008) Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**: 2037-2043.

Patton GW, Powell DA, Hakki A, Friedman H, Pross S. (2006) Nicotine modulation of cytokine induction by LPS-stimulated human monocytes and coronary artery endothelial cells. *Int Immunopharmacol* **6**: 26-35.

Pauly JL, Smith LA, Rickert MH, et al. (2010) Is lung inflammation associated with microbes and microbial toxins in cigarette tobacco smoke? *Immunol Res* **46**: 127-136.

Pellic V. (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**: 827-837.

Peltola H. (2000) Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* **13**: 302-317.

Pettigrew MM, Foxman B, Marrs CF, and Gilsdorf JR. (2002) Identification of the lipooligosaccharide biosynthesis gene *lic2B* as a putative virulence factor in strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* that cause otitis media. *Infect Immun* **70**: 3551-3556.

- Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, et al. (2010) Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **78**: 1214-1220.
- Pittman M. (1931) Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* **53**: 471-492.
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**: 715-727.
- Poje G, and Redfield RJ. (2003) General methods for culturing *Haemophilus influenzae*. In *Haemophilus influenzae protocols*. Herbert MA, Hood DW, and Moxon ER (ed.) New Jersey: Humana Press: 51-56.
- Pons AR, Noguera A, Blanquer D, Sauleda J, Pons J, and Agustí AG. (2005) Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *Eur Respir J* **25**: 647-652.
- Power PM, Sweetman WA, Gallacher NJ, Woodhall MR, Kumar GA, Moxon ER et al. (2009) Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol* **9**: 216-228.
- Prasadarao NV, Lysenko E, Wass CA, Kim KS, and Weiser JN. (1999) Opacity-associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to Chang epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 4153-4160.
- Rabinovitch M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* **5**: 85-7.
- Rahman I. (2003) Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* **36**: 95-109.
- Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Dawid S, and St. Geme III JW. (1999) Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to nontypable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 99-129.
- Ratner AJ, Lysenko ES, Paul MN, et al. (2005) Synergistic proinflammatory responses induced by polymicrobial colonization of epithelial surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3429-3434.
- Reddy MS, Bernstein JM, Murphy TF, and Faden HS. (1996) Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infect Immun* **64**: 1477-1479.
- Regueiro V, Campos MA, Morey P, Sauleda J, Agustí AG, Garmendia J, and Bengoechea JA. (2009) Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Eur Respir J* **33**: 273-281.
- Roche RJ, High NJ, and Moxon ER. (1994) Phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide: characterization of lipopolysaccharide from individual colonies. *FEMS Microbiol Lett* **120**: 279-283.



Rodriguez CA, Avadhanula V, Buscher A, Smith AL, St Geme III JW, et al. (2003) Prevalence and distribution of adhesins in invasive non-type b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **71**: 1635-1642.

Roitt IM, and Delves PJ. (2006) Roitt's Essential Immunology. Oxford: *Blackwell Science*.

Ronander E, Brant M, Eriksson E, Morgelin M, Hallgren O, Westergren-Thorsson, G, et al. (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhesin protein E: characterization and biological activity. *J Infect Dis* **199**: 522-531.

Ronander E, Brant M, Janson H, Sheldon J, Forsgren A, and Riesbeck K. (2008) Identification of a novel *Haemophilus influenzae* protein important for adhesion to epithelial cells. *Microbes Infect* **10**: 87-96.

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

Ruiz M, Ewig S, Marcos MA, Martínez JA, Arancibia F, Mensa J, and Torres A. (1999) Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am J Respir Crit Care Med* **160**: 397-405.

Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al. (1999) CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **160**: 711-717.

Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. (2002) Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **165**: 1404-1409.

Sapkota AR, Berger S, and Vogel TM. (2010) Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ Health Perspect* **118**: 351-356.

Satoh S, Oishi K, Iwagaki A, et al. (2001) Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. *Clin Exp Immunol* **126**: 266-273.

Satola SW, Napier B, and Farley MM. (2008) Association of IS1016 with the *hia* adhesin gene and biotypes V and I in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**: 5221-5227.

Schweda EK, Richards JC, Hood DW, and Moxon ER. (2007) Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol* **297**: 297-306.

Sethi, S. (2000) Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* **117**: 286S-291S.

Sethi S, and Murphy TF. (2001) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* **14**: 336-363.

Sethi S and Murphy TF. (2008) Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **359**: 2355-2365.

- Sethi S, Wrona C, Grant BJ, and Murphy TF. (2004) Strain-specific immune response to *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **169**: 448-453.
- Sethi S, Mallia P, and Johnston SL. (2009) New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease II. *Proc Am Thorac Soc* **6**: 532-534.
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. (2002) New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **347**: 465-471.
- Sethi S, and Murphy TF. (2008) Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **359**: 2355-2365.
- Severi E, Randle G, Kivlin P, Whitfield K, Young R, Moxon R et al. (2005) Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *Mol Microbiol* **58**: 1173-1185.
- Severino V, Chambery A, Vitiello M, Cantisani M, Galdiero S, Galdiero M, Malorni L, Di Maro A, Parente A. (2010) Proteomic analysis of human U937 cell line activation mediated by *Haemophilus influenzae* type b P2 porin and its surface-exposed loop 7. *J Proteome Res* **9**: 1050-62.
- Shchipkova AY, Nagaraja HN, and Kumar PS. (2010) Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res* **89**: 1247-1253.
- Shelton CL, Raffel FK, Beatty WL, Johnson SM, and Mason KM. (2011) Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. *PLoS Pathog* **7**: e1002360.
- Shuto T, Imasato A, Jono H, et al. (2002) Glucocorticoids synergistically enhance nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced Toll-like receptor 2 expression via a negative cross-talk with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **277**: 17263-17270.
- Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, and Li JD. (2001) Activation of NF- $\kappa$ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK  $\alpha/\beta$ -I  $\beta$ B and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8774-8779.
- Singh B, Brant M, Kilian M, Hallstrom B, and Riesbeck K. (2010) Protein E of *Haemophilus influenzae* is a ubiquitous highly conserved adhesin. *J Infect Dis* **201**: 414-419.
- Skornik WA, and Dressler DP. (1974) The effects of short-term steroid therapy on lung bacterial clearance and survival in rats. *Ann Surg* **179**: 415-421.
- Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Eitel J, et al. (2008) CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol* **9**: 1270-1278.
- Snelgrove RJ, Jackson PL, Hardison MT, et al. (2010) A critical role for LTA<sub>4</sub>H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science* **330**: 90-94.

Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A. (2004) TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest.* **113**(10):1482-9.

Sopori M. (2002) Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**: 372-377.

Srikhanta YN, Fox KL, and Jennings MP. (2010) The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes. *Nat Rev Microbiol* **8**: 196-206.

Srikhanta YN, Maguire TL, Stacey KJ, Grimmond SM, and Jennings MP. (2005) The phasevarion: a genetic system controlling coordinated, random switching of expression of multiple genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 5547-5551.

St Geme III JW. (2002) Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol* **4**: 191-200.

St Geme III JW. (1994) The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3881-3889.

St Geme III JW, Falkow S, and Barenkamp SJ. (1993) High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2875-2879.

St Geme III JW, and Yeo HJ. (2009) A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. *Trends Microbiol* **17**: 355-360.

St Geme III JW, Pinkner JS, Krasan GP, Heuser J, Bullitt E, Smith AL et al. (1996) *Haemophilus influenzae* pili are composite structures assembled via the HifB chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11913-11918.

Standiford TJ. (1997) Cytokines and pulmonary host defenses. *Curr Opin Pulm Med* **3**: 81-88.

Starner TD, Swords WE, Apicella MA, and McCray PB Jr. (2002) Susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human  $\beta$ -defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect Immun* **70**: 5287-5289.

Stringer KA, Tobias M, O'Neill HC, et al. (2007) Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**: L1572-L1579.

Surana NK, Cutter D, Barenkamp SJ, St Geme JW 3rd. (2004) The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **9**; **279**: 14679-85.

Swords WE, Buscher BA, Ver S, Preston IA, Nichols WA, Weiser JN, Gibson BW, and Apicella MA. (2000) Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* **37**: 13-27.

- Swords WE, Ketterer MR, Shao J, Campbell CA, Weiser JN, and Apicella MA. (2001) Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell Microbiol* **3**: 525-536.
- Swords WE, Chance DL, Cohn LA, Shao J, Apicella MA, and Smith AL. (2002) Acylation of the lipooligosaccharide of *Haemophilus influenzae* and colonization: an *htrB* mutation diminishes the colonization of human airway epithelial cells. *Infect Immun* **70**: 4661-4668.
- Swords WE, Moore ML, Godzicki L, Bukofzer G, Mitten MJ, and VonCannon J. (2004) Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **72**: 106-113.
- Taylor JD. (2010) COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol Ther* **23**: 376-383.
- Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CMR, Tudhope SJ, Wedzicha JA, Barnes PJ, and Donnelly LE. (2010) Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* **35**: 1039-1047.
- Teng F, Slavik V, Duffy KE, San Mateo L, Goldschmidt R. (2010) Toll-like receptor 3 is involved in airway epithelial cell response to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Cell Immunol* **260**: 98-104.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, et al. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233-2239.
- Hiltke TJ, Sethi S, and Murphy TF. (2002) Sequence stability of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the human respiratory tract. *J Infect Dis* **185**: 627-31.
- Twelkmeyer B, Deadman ME, Haque E, Li J, Hood DW, and Schweda EK. (2011) The role of *lic2B* in lipopolysaccharide biosynthesis in *Haemophilus influenzae* strain Eagan. *Carbohydr Res* **346**: 1262-1266.
- Vander Top EA, Wyatt TA, and Gentry-Nielsen MJ. (2005) Smoke exposure exacerbates an ethanol-induced defect in mucociliary clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res* **29**: 882-887.
- van der Weijden GA, de Slegte C, Timmerman MF, et al. (2001) Periodontitis in smokers and non-smokers: intra-oral distribution of pockets. *J Clin Periodontol* **28**: 955-960.
- van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, et al. (2001) Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol* **72**: 666-671.
- Varma-Basil M, Dwivedi SK, Kumar K, et al. (2009) Role of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Microbiol* **58**: 322-326.

- Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* **366**: 689-704.
- Vimr E, and Lichtensteiger C. (2002) To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol* **10**: 254-257.
- Virji M, Evans D, Griffith J, Hill D, Serino L, Hadfield A, et al. (2000) Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **36**: 784-795.
- Voges M, Bachmann V, Kammerer R, et al. (2010) CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiol* **10**: 117.
- Wang H, Liu X, Umino T, Skold CM, Zhu Y, Kohyama T, Spurzem J R, Romberger DJ, and Rennard SI. (2001) Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *Am J Respir. Cell Mol Biol* **25**: 772-779.
- Wang WB, Lai HC, Hsueh PR, Chiou RY, Lin SB, Liaw SJ. (2006) Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J Med Microbiol* **55** (Pt 10):1313-21
- Watson MEJ, Burns JL, and Smith AL. (2004) Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* **150**: 2947-2958.
- Webb DC, and Cripps AW. (1998) Secondary structure and molecular analysis of interstrain variability in the P5 outer-membrane protein of non-typable *Haemophilus influenzae* isolated from diverse anatomical sites. *J Med Microbiol* **47**: 1059-1067.
- Weiser JN, Chong ST, Greenberg D, and Fong W. (1995) Identification and characterization of a cell envelope protein of *Haemophilus influenzae* contributing to phase variation in colony opacity and nasopharyngeal colonization. *Mol Microbiol* **17**: 555-564.
- Weiser JN and Pan N. (1998) Adaptation of *Haemophilus influenzae* to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Mol Microbiol* **30**: 767-775.
- Weiser JN, Pan N, McGowan KL, Musher D, Martin A, and Richards J. (1998) Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med* **187**: 631-640.
- Weiser JN, Shchepetov M, and Chong ST. (1997) Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **65**: 943-950.
- Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, and MacNee W. (2003) Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**: 562-570.

- White KA, Kaltashov IA, Cotter RJ, and Raetz CRH. (1997) A Mono-functional 3-Deoxy-d-manno-octulosonic Acid (Kdo) Transferase and a Kdo kinase in extracts of *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem* **272**: 16555-16563.
- Whitsett JA. (2002) Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Investig* **109**: 565-569.
- Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K, Akira S, van der Poll T. (2005) The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J Immunol* **175**: 6042-9.
- Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. (2010) *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. **15**: 1037-56.
- Williams BJ, Morlin G, Valentine N, and Smith AL. (2001) Serum resistance in an invasive, nontypeable *Haemophilus influenzae* strain. *Infect Immun* **69**: 695-705.
- Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, and Tetley TD. (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.
- Wong SM, St Michael F, Cox A, Ram S, and Akerley BJ. (2011) ArcA-regulated glycosyltransferase *lic2B* promotes complement evasion and pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **79**: 1971-1983.
- Xie J, Juliao PC, Gilsdorf JR, Ghosh D, Patel M, et al. (2006) Identification of new genetic regions more prevalent in nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media strains than in throat strains. *J Clin Microbiol* **44**: 4316-4325.
- Yao H, Hwang JW, Moscat J, Diaz-Meco MT, Leitges M, KishoreN, Li X, Rahman I. (2010) Protein kinase C zeta mediates cigarette smoke/aldehyde and lipopolysaccharide-induced lung inflammation and histone modifications. *J Biol Chem* **285**: 5405-5416.
- Zaas DW, Duncan MJ, Li G, Wright JR, Abraham SN. (2005) *Pseudomonas* invasion of type I pneumocytes is dependent on the expression and phosphorylation of caveolin-2. *J Biol Chem* **280**: 4864-72.
- Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, et al. (1996) Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* **67**: 1050-1054.
- Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. (2008) Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**: 519-35.
- Zhang W, Case S, Bowler RP, et al. (2011) Cigarette smoke modulates PGE<sub>2</sub> and host defence against *Moraxella catarrhalis* infection in human airway epithelial cells. *Respirology* **16**: 508-516.
- Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, et al. (2000) Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* **173**: 39-51.



**ANEXOS**

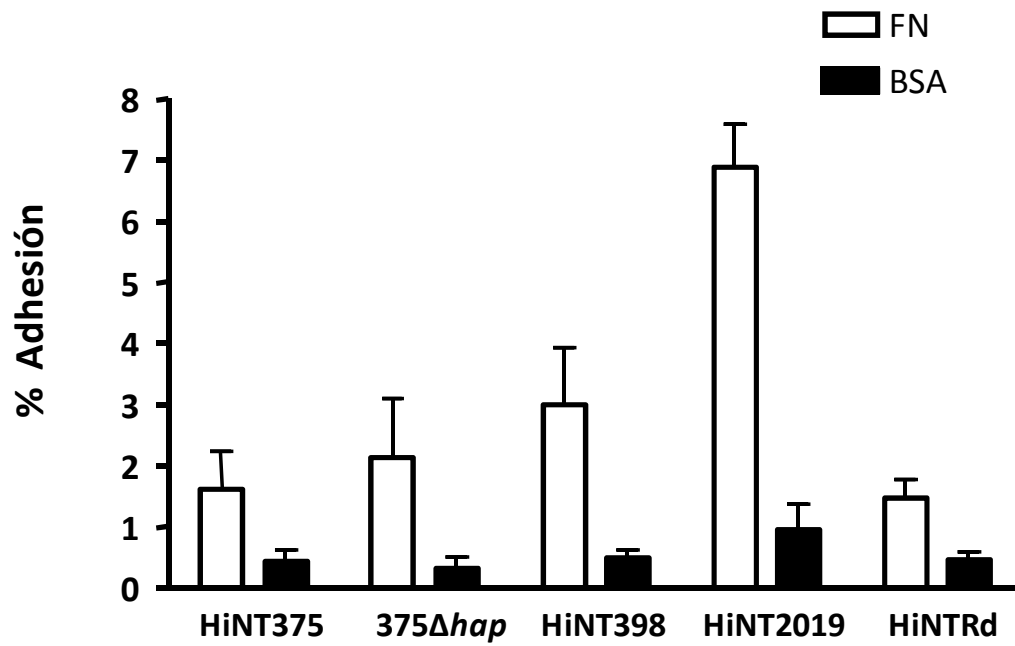




## ANEXO I: Adhesión de HiNT a la proteína de matriz extracelular fibronectina

La colonización del tracto respiratorio inferior por HiNT se produce en un ambiente en el que están presentes componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, con los que la bacteria puede interactuar. Se han descrito moléculas de HiNT capaces de interactuar con fibronectina, como es el autotransportador Hap (Fink *et al.*, 2002; Hendrixson; St Geme III *et al.*, 1998). Hemos analizado la capacidad adhesiva a fibronectina de varias cepas de HiNT. Las cepas analizadas son: HiNT375, HiNT375 $\Delta$ hap, HiNT398, HiNT2019 y HiNT Rd KW20. La cepa NTHi375 $\Delta$ hap es una cepa mutante construida en nuestro laboratorio a partir de HiNT375 en la que se ha introducido un casete de disrupción *hap::ermC* en el gen *hap* (Antonio López-Gómez).

Se depositaron 300  $\mu$ l/pocillo de una solución de fibronectina (Sigma) 17  $\mu$ g/ml en placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante 16 h a 4°C. A continuación, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS y se añadieron 300  $\mu$ l de una solución PBS-BSA 3% por pocillo para bloquear las zonas del pocillo no tapizadas por fibronectina. En paralelo, se añadieron 300  $\mu$ l de PBS-BSA 3% a pocillos sin fibronectina, como controles de unión a BSA. Las placas se mantuvieron 2 h a 25°C. Los pocillos se lavaron 2 veces con PBS a 37°C, se añadieron 300  $\mu$ l de la suspensión bacteriana de interés y se mantuvieron durante 2 h a 37°C. La suspensión bacteriana de interés se generó con un ajuste  $DO_{600}=1.0$  de HiNT en PBS a partir de las bacterias crecidas en una placa de Agar-chocolate. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y, a continuación, se añadieron 300  $\mu$ l de tripsina por pocillo. Los 300  $\mu$ l de tripsina se recogieron de los pocillos, se realizaron bancos de diluciones y se plaquearon en sBHI-Agar para el recuento de u.f.c. Se analizó la capacidad de las cepas HiNT375, HiNT398, HiNT2019, HiNT375 $\Delta$ hap y Rd KW20 para unirse a fibronectina. Las cepas se depositaron sobre pocillos con fibronectina y sobre pocillos control con BSA. La cepa HiNT2019 mostró valores de adhesión a fibronectina superiores al resto de cepas analizadas. No se observaron diferencias significativas en los valores de adhesión entre HiNT375 y HiNT375 $\Delta$ hap (Fig. 40).



**Figura 40.** Valores de adhesión de las cepas HiNT375, HiNT375 $\Delta$ hap, HiNT398, HiNT2019 y Hi Rd KW20 a fibronectina. Los valores se muestran como porcentaje de adhesión. Los valores de adhesión a BSA se toman como control negativo.

## ANEXO II: Cepas utilizadas en este trabajo

Tabla 23. Cepas de HiNT usadas en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<b><i>H. influenzae</i></b>		
HiNT375	Aislado clínico de otitis media. Cepa que expresa un nivel intermedio de PCho en la molécula de LOS.	(Bouchet <i>et al.</i> , 2003)
HiNT398	Aislado clínico de EPOC que expresa un nivel alto de PCho en la molécula de LOS.	(Regueiro <i>et al.</i> , 2009)
HiNT2019	Aislado clínico de EPOC que expresa un nivel bajo de PCho en la molécula de LOS.	(Swords <i>et al.</i> , 2000)
<b><i>H. influenzae</i> Rd KW20</b>	Cepa carente de cápsula, generada a partir de una cepa de <i>H. influenzae</i> serotipo d. No patógena. Genoma disponible en: <a href="http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?database=ghi">http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?database=ghi</a>	(Fleischmann <i>et al.</i> , 1995)
<b>HiNT375Δ<i>lic1BC</i></b>	Mutante de HiNT375 en el que los genes <i>lic1BC</i> han sido sustituidos mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.3 Kb que contiene <i>lic1BC</i> en el que se ha generado una disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a eritromicina (casete de disrupción <i>lic1BC</i> ). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión <i>NotI</i> a partir del plásmido pPMO-6. Erm <sup>r</sup>	(P. Morey)
<b>HiNT375Δ<i>siaB</i></b>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>siaB</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 Kb que contiene <i>siaB</i> en el que se ha generado una disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a eritromicina (casete de disrupción <i>siaB</i> ). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión <i>NotI</i> a partir del plásmido pPMO-7. Erm <sup>r</sup> .	(P. Morey)
<b>HiNT375Δ<i>lic2A</i></b>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>lic2A</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 Kb que contiene <i>lic2A</i> en el que se ha generado una disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a eritromicina (casete de disrupción <i>lic2A</i> ). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión <i>NotI</i> a partir del plásmido pPMO-8. Erm <sup>r</sup> .	(P. Morey)
<b>HiNT375Δ<i>lgtF</i></b>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>lgtF</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 Kb que contiene <i>lgtF</i> en el que se ha generado una disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a eritromicina (casete de disrupción <i>lgtF</i> ). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión <i>NotI</i> a partir del plásmido pPMO-9. Erm <sup>r</sup> .	(P. Morey)
<b>HiNT375Δ<i>lpsA</i></b>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>lpsA</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 Kb que contiene <i>lpsA</i> en el que se ha generado una	(P. Morey)

disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a eritromicina (casete de disrupción *lpsA*). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión *NotI* a partir del plásmido pPMO-10. Erm<sup>r</sup>.

**HiNT375 $\Delta$ opsX** Mutante de HiNT375 en el que el gen *opsX* ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 Kb que contiene *opsX* en el que se ha generado una disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a eritromicina (casete de disrupción *opsX*). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión *NotI* a partir del plásmido pPMO-11. Erm<sup>r</sup>. (P. Morey)

**HiNT375 $\Delta$ lgtF $\Delta$ lpsA** Mutante de HiNT375 $\Delta$ lgtF en el que el gen *lpsA* ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 Kb que contiene *lpsA* en el que se ha generado una disrupción mediante la introducción de un gen de resistencia a kanamicina (casete de disrupción *lpsA-km*). El casete de disrupción fue generado mediante una digestión *NotI* a partir del plásmido pPMO-12. Erm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>. (P. Morey)

**Colección 1 aislados clínicos de HiNT** Ver lista completa en Tabla 10, pág. 149 (Marti-Lliteras *et al.*, 2011)  
**Colección 2 aislados clínicos de HiNT** Ver lista completa en Tabla 19, pág. 169 (este trabajo)

---

## ANEXO III: Publicaciones

**Martí-Lliteras P.**, Regueiro, V., Morey, P., Hood, D.W., Saus, C., Sauleda, J., Agustí, A.G., Bengoechea J.A. and Garmendia, J. (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* 77:4232-4242.

Morey P, Cano V, **Martí-Lliteras P**, López-Gómez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA and Garmendia J. (2011) Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* 157: 234–250.

**Martí-Lliteras P**, López-Gómez A, Mauro S, Hood DW, Viadas C, Calatayud L, Morey P, Servin A, Liñares J, Oliver A, Bengoechea JA and Garmendia J. (2011) Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *PLoS ONE* 6(6): e21133.









## Nontypeable *Haemophilus influenzae* Clearance by Alveolar Macrophages Is Impaired by Exposure to Cigarette Smoke<sup>∇†</sup>

Pau Martí-Llitas,<sup>1,2</sup> Verónica Regueiro,<sup>1,2</sup> Pau Morey,<sup>1,2</sup> Derek W. Hood,<sup>6</sup> Carles Saus,<sup>7</sup>  
Jaume Sauleda,<sup>2,5</sup> Alvar G. N. Agustí,<sup>2,5</sup> José Antonio Bengoechea,<sup>1,2,3,4</sup>  
and Junkal Garmendia<sup>1,2,3\*</sup>

Programa de Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA, recinto Hospital Joan March, carretera Sóller, km 12, 07110, Bunyola, Spain<sup>1</sup>; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain<sup>2</sup>; Área Microbiología, Facultad de Biología, Universitat Illes Balears, carretera Valldemossa, km 7.5, 07122, Palma Mallorca, Spain<sup>3</sup>; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain<sup>4</sup>; Servicios de Neumología<sup>5</sup> and Anatomía Patológica,<sup>7</sup> Hospital Universitario Son Dureta, Palma Mallorca, Spain; and Molecular Infectious Diseases Group, University of Oxford, and Department of Paediatrics, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford, United Kingdom<sup>6</sup>

Received 17 March 2009/Returned for modification 5 May 2009/Accepted 9 July 2009

**Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) is an opportunistic gram-negative pathogen that causes respiratory infections and is associated with progression of respiratory diseases. Cigarette smoke is a main risk factor for development of respiratory infections and chronic respiratory diseases. Glucocorticoids, which are anti-inflammatory drugs, are still the most common therapy for these diseases. Alveolar macrophages are professional phagocytes that reside in the lung and are responsible for clearing infections by the action of their phagolysosomal machinery and promotion of local inflammation. In this study, we dissected the interaction between NTHI and alveolar macrophages and the effect of cigarette smoke on this interaction. We showed that alveolar macrophages clear NTHI infections by adhesion, phagocytosis, and phagolysosomal processing of the pathogen. Bacterial uptake requires host actin polymerization, the integrity of plasma membrane lipid rafts, and activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling cascade. Parallel to bacterial clearance, macrophages secrete tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) upon NTHI infection. In contrast, exposure to cigarette smoke extract (CSE) impaired alveolar macrophage phagocytosis, although NTHI-induced TNF- $\alpha$  secretion was not abrogated. Mechanistically, our data showed that CSE reduced PI3K signaling activation triggered by NTHI. Treatment of CSE-exposed cells with the glucocorticoid dexamethasone reduced the amount of TNF- $\alpha$  secreted upon NTHI infection but did not compensate for CSE-dependent phagocytic impairment. The deleterious effect of cigarette smoke was observed in macrophage cell lines and in human alveolar macrophages obtained from smokers and from patients with chronic obstructive pulmonary disease.**

The human respiratory tract is one of the largest body surfaces in contact with the environment and, therefore, is a main entry portal for microorganisms. In healthy humans, the lungs are sterile due to the combined actions of a repertoire of defense mechanisms. The components of lung innate immunity include mechanical barriers such as the mucociliary barrier, humoral elements present in the fluid in contact with the lung epithelium such as surfactants, complement, antimicrobial peptides, lysozyme, and lactoferrin, and resident innate immunity cells such as alveolar macrophages and dendritic cells (32, 37). Alveolar macrophages are professional phagocytes and antigen-presenting cells which patrol the lungs as sentinels and are endowed with, among other things, a collection of pattern recognition receptors used to recognize microorganisms containing pathogen-associated molecular patterns. As professional phago-

cytes, alveolar macrophages recognize, ingest, and process foreign material using a phagolysosomal pathway and thus play an essential role in the clearance of infections (18).

Cigarette smoke is the main risk factor for the development of lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and respiratory infections (26). In this context, the so-called “British hypothesis” states that recurrent bronchial infections were the reason, at least partially, that some smokers developed progressive airway obstruction and others did not (12, 13). Exposure to cigarette smoke markedly alters lung immunity by disruption of the mucociliary function, mucus hypersecretion, and disturbance of the mucosal integrity (31). Cigarette smoke also causes oxidative stress which triggers local lung inflammation by activation of epithelial cells, alveolar macrophages, neutrophils, and T lymphocytes (2). These cells secrete inflammatory cytokines, proteases, and reactive oxygen species, causing necrosis, tissue damage, and further amplification of the inflammatory response with enhanced recruitment of neutrophils into the lung. Tissue damage promotes the release of inflammatory mediators and inhibits lung tissue repair functions, further increasing the tissue damage in the lungs of smokers (35, 38, 39). It is generally accepted, although it has not been formally proven, that these alterations could

\* Corresponding author. Mailing address: Programa de Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA, recinto Hospital Joan March, carretera Sóller, km 12, 07110, Bunyola, Spain. Phone: 34-971011781. Fax: 34-971011797. E-mail: garmendia@caubet-cimera.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://iai.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 20 July 2009.

allow access of microorganisms to the otherwise sterile lungs, thereby leading to microbial colonization (28–30). Supporting this hypothesis, mice exposed to cigarette smoke were impaired in the ability to clear a *Pseudomonas aeruginosa* infection (10). However, there is currently limited information concerning the effect of cigarette smoke at the molecular and cellular levels on the interaction between pathogens and alveolar macrophages.

Glucocorticoids are drugs that are widely used to control many inflammatory and immune diseases, including respiratory diseases. Moreover, adjunctive glucocorticoid therapy is currently being used against a variety of bacterial infections, including otitis media, and COPD (7, 21). However, despite their importance in suppressing inflammatory responses, little is known about the effects of glucocorticoids in host defense against pathogens.

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) is a frequent gram-negative asymptomatic colonizer of the upper respiratory tract in healthy humans, but it is also an opportunistic bacterial pathogen. NTHI causes invasive diseases such as meningitis and acute respiratory infections such as otitis media with effusion, sinusitis, pneumonia, and bronchitis (24). Moreover, NTHI is the pathogen isolated most frequently from lower respiratory tract secretions from patients suffering from chronic respiratory diseases such as COPD and chronic bronchitis (30). Lipooligosaccharide (LOS) is the main glycolipid on the NTHI cell surface and comprises a membrane-anchoring lipid A molecule linked to oligosaccharide chains that extend from the bacterial cell surface (27). Phosphocholine (PCho) is a substituent frequently present in NTHI LOS chain extensions (36). This modification has been shown to be a virulence factor that is involved in NTHI adhesion and invasion of the respiratory epithelium and hence promotes pathogen persistence on the mucosal surface of the respiratory tract (33, 34).

The importance of NTHI as a respiratory pathogen has been extensively demonstrated, and alveolar macrophages play an essential role in the clearance of bacterial infections. However, little is known about the interaction between NTHI and alveolar macrophages and about the influence of PCho on this interaction. It is tempting to speculate that NTHI might be able to escape alveolar macrophage-mediated killing and that PCho could play an important role in this process. In addition, given the association between cigarette smoke and respiratory infections caused by NTHI, we hypothesized that cigarette smoke could modify the characteristics of the interaction between NTHI and alveolar macrophages. In the present study, we investigated the features of the interaction between NTHI and alveolar macrophages. Furthermore, we analyzed the impact of cigarette smoke on the ability of alveolar macrophages to engulf and process this respiratory pathogen and whether glucocorticoids affect this interaction.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, culture conditions, and reagents.** NTHI strain 398 (formerly strain 157925) is a clinical isolate from a COPD patient (Hospital Son Dureta, Spain) (25); NTHI strain 375 is an otitis media isolate (5). NTHI strains were grown on chocolate agar plates (Biomierix) or on plates containing brain heart infusion (BHI) agar supplemented with hemin (10 µg/ml) and β-nicotinamide adenine. Bacteria were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

An NTHI mutant strain lacking PCho was generated as follows. A 2-kb fragment containing the *lic1BC* genes was amplified by PCR with *Taq* poly-

merase (Promega) using NTHI strain 375 genomic DNA as the template and primers *licBC-F1* (5'-GAAACCTATTGCAATCAGACAAATAAA) and *licBC-R1* (5'-AACGAACCTTTGATATTCATCACGGTG) and cloned into pGEM-T Easy (Promega) to generate pGEM-T/*lic1BC*. The *lic1BC*-containing fragment was disrupted by inverse PCR with *Vent* polymerase (New England Biolabs) using primers *licBC-F2* (5'-TAGCAGCAGGATTAGGCA GCCGATTTA) and *licBC-R2* (5'-TAATAAAGTGTAAACGATCACTCCTG CA), and an internal 30-bp fragment was replaced by a blunt-ended *Sma*I erythromycin resistance cassette from pBSLerm (33), resulting in plasmid pGEM-T/*lic1BC-ermC*. This plasmid was digested with *Not*I to obtain a 3.1-kb *lic1BC-ermC-lic1BC* disruption cassette that was used to transform NTHI strain 375 using MIV medium (14). Recombinants were screened by plating bacteria on supplemented BHI agar plates containing erythromycin 10 µg/ml and performing colony PCR. Loss of PCho reactivity was checked by colony blotting with monoclonal antibody TEPC-15 (Sigma).

**Cell culture and bacterial infection.** MH-S (ATTC CRL-2019) murine alveolar macrophages were grown on RPMI 1640 tissue culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 10 mM HEPES at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. U937 (ATTC CRL-2367) human monocytes were cultured exactly as described previously (8). For bacterial infection, cells were seeded in 24-well tissue culture plates 15 h before the experiment at a density of  $7 \times 10^5$  cells per well. Stationary-phase bacteria were recovered with 1 ml phosphate-buffered saline (PBS) from a chocolate agar plate incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 16 h. The optical density at 600 nm of the bacterial suspension was adjusted to 1 (approximately  $10^9$  CFU/ml). Cells were infected with 50 µl of this suspension at a multiplicity of infection (MOI) of 100:1.

For adhesion experiments, cells were infected for 1 h, washed five times with PBS, and lysed with 300 µl of PBS-0.025% saponin for 10 min at room temperature, and then serial dilutions were plated on supplemented BHI agar plates. The level of adhesion was determined as follows: percent adhesion = (output/input) × 100. For phagocytosis assays, cells were infected for 1 h and washed three times with PBS. Cells were then incubated for an additional hour with RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 10 mM HEPES, and 300 µg/ml gentamicin in order to eliminate extracellular bacteria. Cells were then washed three times with PBS and lysed as described above. Phagocytosis data were expressed in CFU/well. For time course experiments, the culture medium was replaced 1 h after gentamicin treatment by RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 10 mM HEPES, and 16 µg/ml gentamicin and, when required, processed as described above. In all cases, the data are the averages of at least three independent experiments. When indicated below, cells were preincubated for 1 h with methyl-β-cyclodextrin (MβCD) (1 mM) and LY294002 hydrochloride (75 µM), for 30 min with cytochalasin D (5 µg/ml), or for 2 h with dexamethasone (1 µM) before they were infected as described above. Exposure to these drugs had no effect on cell and bacterial viability under the conditions tested. All drugs were purchased from Sigma.

**Purification of human alveolar macrophages.** Participants (12 people who never smoked, 16 smokers with normal lung function, and 14 COPD patients, all male subjects) were recruited consecutively from the endoscopy unit of Hospital Universitario Son Dureta, Spain (a tertiary referral hospital) from patients requiring bronchoscopy for clinical evaluation of a solitary pulmonary nodule or hemoptysis. Participants gave written consent after they were fully informed of the nature, characteristics, risks, and potential benefits of the study, which had been approved previously by the ethics committee of Hospital Son Dureta. Seven patients were being treated with inhaled steroids, but none was receiving oral steroid therapy. We excluded individuals with other chronic lung diseases (asthma, bronchiectasis, and interstitial lung diseases), atopy, or cardiac, hepatic, or renal failure. Table 1 shows the clinical and functional data for the subjects included in the study. The cumulative smoking exposure was not significantly different between the smokers with COPD and the smokers without COPD. Lung function was normal in people who never smoked and in smokers without COPD, whereas, by definition, patients with COPD had airflow obstruction (which was moderate to severe) (Table 1). The volume of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) recovered was significantly lower for COPD patients than for people who never smoked, but the total cell count was higher for patients with COPD and smokers with normal lung function than for people who never smoked (Table 1). The differential cell counts were not different for the different groups (Table 1). All participants underwent bronchoalveolar lavage so that we could obtain alveolar macrophages, as described elsewhere (22). Briefly, BALF samples were processed under sterile conditions within 1 h after collection and were maintained at 4°C until analysis. Cells were recovered from BALF by centrifugation (400 × g for 10 min at 4°C) and suspended at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 25

TABLE 1. Main clinical, functional, and BALF data<sup>a</sup>

Group	<i>n</i>	Age (yr)	Smoking history (packs/yr)	FEV <sub>1</sub> (% of reference) <sup>b</sup>	FEV <sub>1</sub> /FVC (%) <sup>b</sup>	Total cell count (10 <sup>6</sup> cells/ml)	% Macrophages	% Lymphocytes	% Neutrophils	Amt of BALF recovered (ml)
People who never smoked	12	60 ± 3	0	109 ± 14	82 ± 11	25 ± 1	90 ± 1	6 ± 1	1 ± 0.4	70 ± 7
Smokers with normal lung function	16	55 ± 3	44 ± 5	102 ± 10	79 ± 4	75 ± 19 <sup>c</sup>	91 ± 2	5 ± 2	1 ± 0.2	94 ± 4
COPD patients	14	57 ± 2	60 ± 3	72 ± 5 <sup>c</sup>	60 ± 7 <sup>c</sup>	46 ± 1 <sup>c</sup>	85 ± 3	9 ± 2	3 ± 2	48 ± 7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> The data are means ± standard errors of the means.

<sup>b</sup> FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 s determined after bronchodilation; FVC, forced vital capacity.

<sup>c</sup> Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the value for people who never smoked.

U/ml penicillin, and 25 mg/ml streptomycin. After 2 h of incubation, nonadherent cells were removed, and the remaining alveolar macrophages were consistently (98 to 100%) positive for expression of esterase, a marker of alveolar macrophages (19). Cells were recovered using a rubber policeman, the concentration was adjusted to 10<sup>5</sup> cells/ml, and the cells were incubated in 24-well plates (2 × 10<sup>5</sup> cells per well for NTHI phagocytosis assays; 6.8 × 10<sup>5</sup> cells per well for latex bead phagocytosis assays). Cell viability, as determined by trypan blue exclusion, was always greater than 90%.

**Immunofluorescence and transmission electron microscopy.** Cells were seeded on 12-mm circular coverslips in 24-well tissue culture plates. Infection was carried out as described above. Where indicated, cells were washed with PBS three times and fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH 7.4). For early endosome antigen 1 (EEA1) staining, cells were fixed with 2.5% PFA for 10 min at room temperature, followed by 1% PFA with 80% methanol at -20°C for 5 min.

NTHI was stained with rabbit anti-NTHI antibody obtained by repeated immunization of rabbits (Charles Rivers) with a mixture of acetone-killed NTHI strain 398, NTHI strain 375, and NTHI strain 2019 bacteria (34) diluted 1:1,000. The actin cytoskeleton was stained with rhodamine-phalloidin (Invitrogen) diluted 1:200, early endosomes were stained with goat anti-EEA1 (N-19) antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:50, late endosomes were stained with rat anti-Lamp-1 (1D4B) or rat anti-Lamp-2 (ABL-93) antibody (DSHB) diluted 1:150, and DNA was stained with Hoechst stain (Invitrogen) diluted 1:2,500. Donkey anti-rabbit, donkey anti-rat, and donkey anti-goat conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson Immunological and diluted 1:200. Acidic compartments were loaded with LysoTracker Red DND-99 (0.5 μM) 45 min before fixation.

Staining was carried out in PBS containing 10% horse serum and 0.1% saponin. Coverslips were washed twice in PBS containing 0.1% saponin and once in PBS and incubated for 30 min with primary antibodies. The coverslips were then washed twice in PBS containing 0.1% saponin and once in PBS and incubated for 30 min with secondary antibodies. Finally, the coverslips were washed twice in PBS containing 0.1% saponin, once in PBS, and once in H<sub>2</sub>O, mounted with Aqua Poly/Mount (Polysciences), and analyzed with a Leica CTR6000 fluorescence microscope. Images were taken with a Leica DFC350FX camera.

For transmission electron microscopy, cells were seeded in 24-well tissue culture plates. Cells were infected as described above, fixed with glutaraldehyde, and processed for transmission electron microscopy as described previously (15).

**Detection of Akt phosphorylation by Western blotting.** Cells were seeded 15 h before the experiment into six-well tissue culture plates at a concentration of 2.8 × 10<sup>6</sup> cells per well. Cells were infected as described above, washed three times with cold PBS, scraped, and lysed on ice with 100 μl of a lysis buffer, which was 1× sodium dodecyl sulfate sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [wt/vol] sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.01% [wt/vol] bromophenol blue). Samples were sonicated, boiled at 100°C for 10 min, and cooled on ice before polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting were performed. Akt phosphorylation was detected with primary rabbit anti-phosphoSer473 Akt antibody (Cell Signaling Technology) diluted 1:1,000 and secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (Thermo) diluted 1:50,000. Tubulin, used as a loading control, was detected with primary mouse anti-tubulin antibody (Sigma) and secondary goat anti-mouse antibody (Pierce) conjugated to horseradish peroxidase diluted 1:1,000. Images were recorded with a GeneGnome HR imaging system (Syngene) and 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 the mean intensity was recorded. The results were expressed as relative levels of protein (mean intensity of protein/mean intensity of tubulin × 100).

**TNF-α determination.** Cells were seeded in 24-well tissue culture plates and infected as described above. When necessary, cells were treated with dexamethasone and/or exposed to 10% cigarette smoke extract (CSE). Supernatants were recovered every 2 h from the beginning of the infection. The amounts of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) present in supernatants of culture cells were determined by performing an enzyme-linked immunosorbent assay (Bender MedSystems) with a sensitivity of <2 pg/ml.

**Production of CSE and cell exposure.** CSE was prepared from commercial cigarettes (0.8 mg of nicotine, 10 mg of tar, 10 mg of CO; Phillip Morris, Spain) as described previously (25). Briefly, one cigarette was combusted using a syringe-modified apparatus which draws the smoke into a sterile glass containing 5 ml of tissue culture medium. Sixty milliliters of smoke was drawn for 10 s following a 30-s break. This process was repeated five times per cigarette. The CSE was filtered through a 0.22-μm filter. The resulting solution was designated the 100% CSE solution and used within 30 min. Cells were exposed to 10% CSE as follows. Cells were washed once with PBS and incubated for 3 h before bacterial infection with 1 ml RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 10 mM HEPES containing 100 μl (10% CSE) or 50 μl (5% CSE) of the 100% CSE solution prepared previously, and exposure was maintained during bacterial contact. When indicated, cells were exposed to CSE before infection and removed when bacteria were added; alternatively, cells were exposed to CSE only during gentamicin treatment. When necessary, dexamethasone (1 μM) pretreatment and exposure to 10% CSE were combined. Exposure to 10% CSE was used for MH-S experiments. For U937 experiments, 5% CSE was used because it did not alter the viability of phorbol myristate acetate (PMA)-treated U937 cells, whereas 10% CSE did alter the viability (there was a 40% decrease in the number of viable cells).

**Latex bead phagocytosis.** Cells were seeded in 24-well tissue culture plates as described above. Cells were incubated for 1 h with 1-μm-diameter latex beads conjugated to green fluorescent protein (GFP) (Sigma) by adding 10 or 20 beads per cell, depending on the experiment. Wells were then washed three times with PBS and incubated with RPMI 1640 medium for an additional hour. Wells were fixed with 3.7% PFA and processed for immunofluorescence analysis as described above. When required, cells were exposed for 3 h to 5 or 10% CSE before incubation with the latex beads.

**Statistical methods.** Differences between experimental groups were analyzed by using a nonparametric two-sided Mann-Whitney U test or, where indicated below, by using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple-comparison test (GraphPad Software Inc.). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

**Adhesion of NTHI to alveolar macrophages and phagocytosis of NTHI by alveolar macrophages.** The ability of NTHI to adhere to the surface of alveolar macrophages was assessed by infecting MH-S mouse alveolar macrophages with NTHI clinical isolate 398 (25). Infections were carried out using bacteria grown to stationary phase and an MOI of 100:1 for 1, 2, or 3 h. Bacteria were enumerated by plating after macrophage lysis, and the highest levels of bacterial adhesion were observed after 3 h of infection (Fig. 1A). Immunofluorescence microscopy showed that bacteria adhered efficiently to the host cell surface, and approximately 85% of the macrophages were infected after

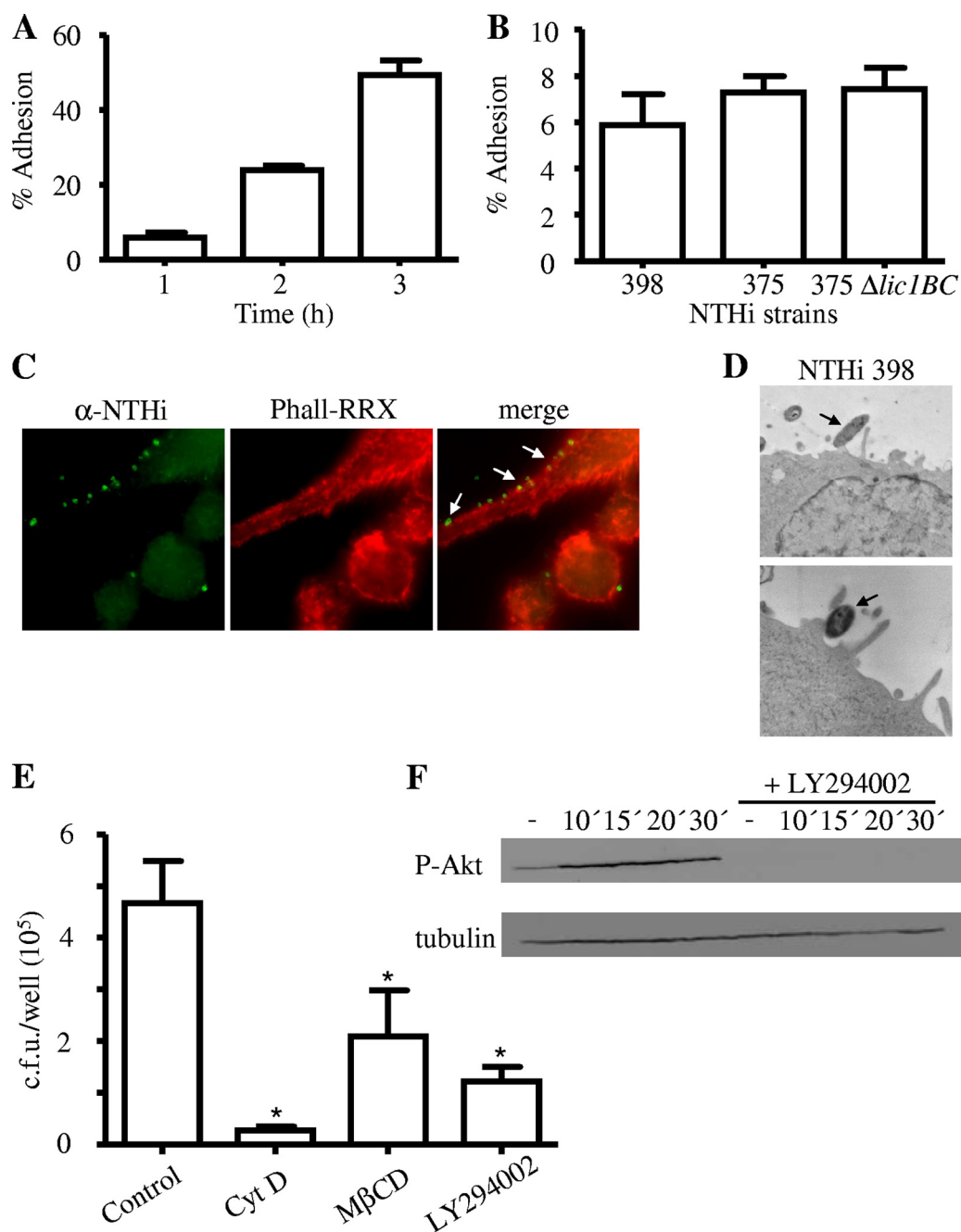


FIG. 1. Adhesion of NTHI to alveolar macrophages and phagocytosis of NTHI by alveolar macrophages. (A) NTHI strain 398 was used to infect MH-S mouse alveolar macrophages at an MOI of 100:1 for 1, 2, or 3 h. Bacterial adhesion was quantified by lysis, serial dilution, and viable counting on supplemented BHI agar plates. The level of adhesion was determined as follows: percent adhesion = (output/input)  $\times$  100. (B) NTHI strains 398, 375, and 375  $\Delta lic1BC$  were used to infect MH-S alveolar macrophages. Bacterial adhesion was quantified as described above. (C) Immunofluorescence microscopy showing NTHI adhesion to MH-S alveolar macrophages (arrows). NTHI was stained with rabbit anti-NTHI antibody ( $\alpha$ -NTHi) and donkey anti-rabbit antibody conjugated to Cy2 (green). The actin cytoskeleton was stained with phalloidin-RRX (Phall-RRX) (red). (D) Transmission electron microscopy showing NTHI strain 398 adhered to the MH-S alveolar macrophage surface. (E) Phagocytosis of NTHI by MH-S alveolar macrophages. NTHI strain 398 was used to infect MH-S mouse alveolar macrophages (MOI, 100:1; 1 h). Wells were washed and incubated with medium containing gentamicin for 1 h. Bacterial uptake was quantified as described above. When required, cells were pretreated for 1 h with M $\beta$ CD (1 mM) or LY294002 (75  $\mu$ M) and for 30 min with cytochalasin D (Cyt D) (5  $\mu$ g/ml). (F) Detection of Akt phosphorylation by Western blotting with rabbit anti-phosphoSer473 Akt antibody and goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (upper panel). Cell extracts were prepared from cells that were not infected (-) or were infected for 10, 15, 20, or 30 min with NTHI strain 398 in the absence (left lanes) or in the presence (right lanes) of LY294002, a PI3K inhibitor. Tubulin was used as a loading control (bottom panel).

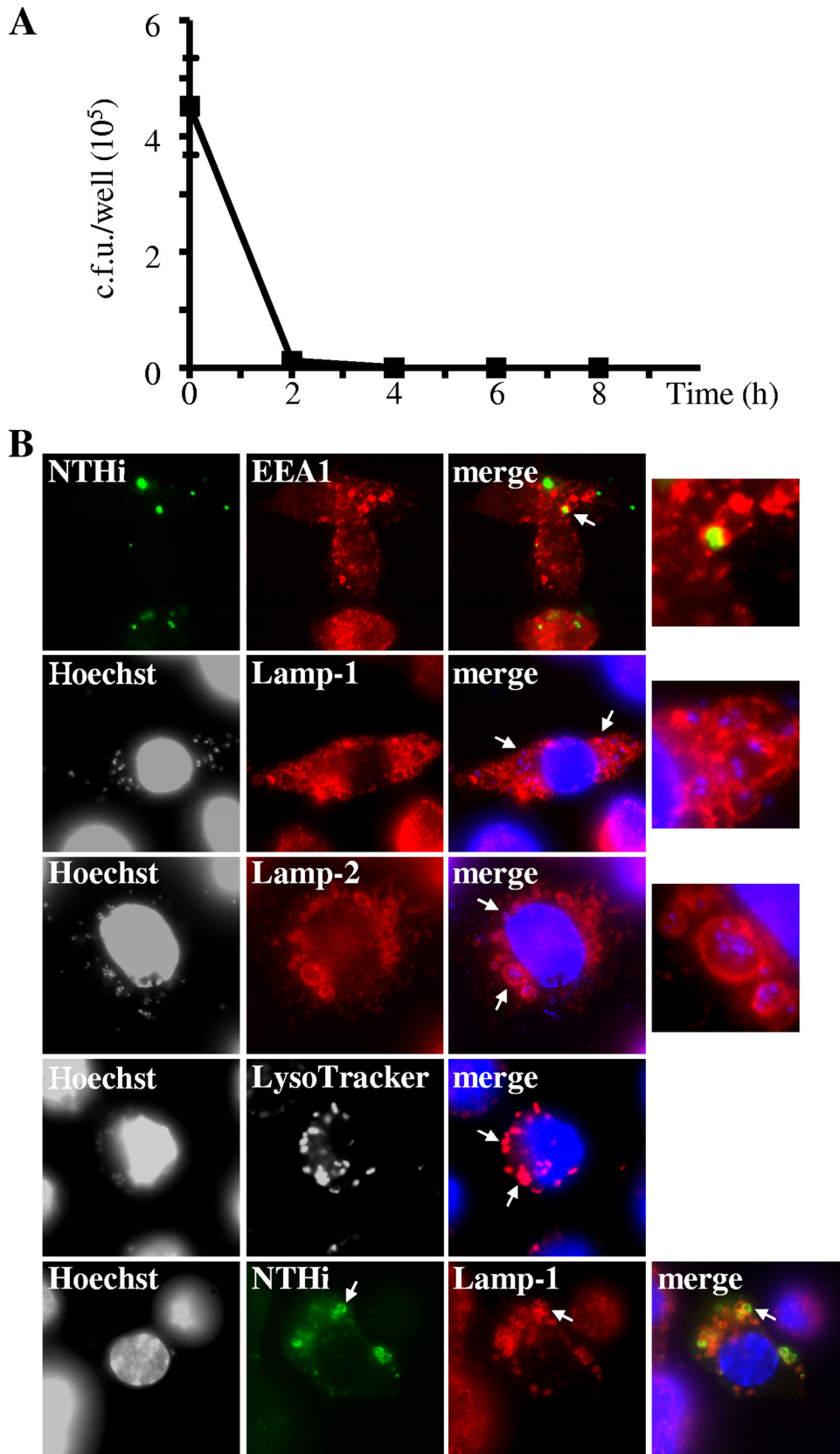


FIG. 2. (A) Dynamics of NTHi clearance by MH-S alveolar macrophages. Cells were infected with NTHi strain 398 for 1 h (MOI, 100:1). Wells were washed and incubated for 1 h with medium containing 300  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin and then with medium containing 16  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin for up to 8 h. Intracellular bacteria were quantified at 2-h intervals as described in the text. (B) Phagolysosomal maturation during NTHi infection of

1 h (Fig. 1C and data not shown). Bacterial adhesion to the macrophage surface was also observed by transmission electron microscopy (Fig. 1D). A significant decrease in cell viability was observed after 3 h of infection; for this reason, the adhesion conditions used for all of the subsequent experiments were an MOI of 100:1 for 1 h.

Given that it has previously been shown that PCho is involved in NTHI adhesion and invasion of the respiratory epithelium (33), we asked if this LOS modification could also mediate NTHI adhesion to alveolar macrophages. Colony blot analysis using a mouse anti-PCho monoclonal antibody (TEPC-15) showed that NTHI strains 398 and 375 displayed high and medium levels of PCho expression on their surfaces, respectively (data not shown). As shown in Fig. 1B, NTHI strains 398 and 375 adhered to alveolar macrophages at comparable levels. Moreover, NTHI strain 375  $\Delta lic1BC$ , a strain 375 isogenic mutant lacking PCho, adhered to alveolar macrophages as efficiently as wild-type strain 375 (Fig. 1B). Together, our data suggested that PCho does not play a significant role in the adhesion of NTHI to alveolar macrophages.

We next assessed the molecular mechanisms used by alveolar macrophages to engulf NTHI. For this purpose, MH-S cells were infected with NTHI strain 398 for 1 h in the presence or absence of drugs which specifically inhibit host cell functions. Cytochalasin D significantly reduced the engulfment of NTHI compared to control infections, indicating that NTHI phagocytosis involved F-actin assembly (Fig. 1E). M $\beta$ CD, which depletes cholesterol from host cell membranes, was used to analyze the involvement of cell plasma membrane lipid rafts in NTHI phagocytosis. As shown in Fig. 1E, cholesterol depletion impaired NTHI engulfment by MH-S alveolar macrophages. Finally, we studied the contribution of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway to NTHI phagocytosis. Pretreatment of MH-S cells with LY294002, a specific inhibitor of PI3K activity, resulted in blockage of NTHI uptake (Fig. 1E). Akt is a downstream effector of PI3K which is phosphorylated upon activation of the PI3K signaling cascade. Western blot analysis revealed that NTHI infection induces the phosphorylation of Akt (Fig. 1F). As expected, LY294002 inhibited NTHI-dependent phosphorylation of Akt (Fig. 1F). The three drugs, cytochalasin D, M $\beta$ CD, and LY294002, also reduced the phagocytosis of NTHI strain 375 by MH-S cells (data not shown). In summary, these results showed that NTHI phagocytosis by alveolar macrophages is an event that depends on the host actin cytoskeleton and on the presence of cholesterol on the host cell membrane. Moreover, the PI3K-Akt host signaling pathway is activated during NTHI infection and is required for bacterial phagocytosis.

**Alveolar macrophages clear NTHI infection by phagolysosomal fusion.** Time course experiments were carried out to determine the fate of intracellular NTHI. MH-S cells were infected with NTHI strain 398, and intracellular bacteria were enumerated by plating at 2-h intervals. As shown in Fig. 2A, the bacterial load was reduced over the time, and bacteria were almost totally cleared at 8 h after gentamicin treatment. Similar results were obtained for NTHI strain 375 (data not shown).

To investigate the maturation of an NTHI-containing phagosome, we analyzed colocalization of intracellular bacteria with early and late endosomal markers using immunofluorescence microscopy. We found that intracellular NTHI strain 398 was located in subcellular compartments with early endosome features as early as 10 min postinfection, based on colocalization with EEA1. Bacteria were seen in EEA1-positive compartments up to 50 min postinfection. Labeling for the late endosome markers Lamp-1 and Lamp-2 around the bacteria was positive at 60 min postinfection and was observed until the pathogen was cleared. Bacteria were located in acidic vacuolar compartments during the entire course of their intracellular life until they were cleared by the macrophage lysosomal machinery, as shown by colocalization with the acidotropic probe LysoTracker Red DND-99, a weak base conjugated to a red fluorophore that freely permeates cell membranes and remains trapped in acidified organelles. Similar data were obtained for NTHI strain 375 (Fig. 2B and data not shown). We observed in these experiments that material that had a bacterial origin appeared to be incorporated into host cell subcellular compartment membranes, as shown by colocalization of Lamp-1 and NTHI labels in empty endocytic compartments (Fig. 2B, bottom panel). This observation could have been a consequence of bacterial processing and material recycling by macrophage phagolysosomes. Collectively, these results showed that alveolar macrophages clear NTHI infection by intracellular processing via their phagolysosomal pathway.

**Exposure to CSE impairs the capacity of alveolar macrophages to clear NTHI infection.** It is a well-established fact that smoking favors chronic colonization of the lower airways by opportunistic pathogens such as NTHI (30). Having established that alveolar macrophages clear ingested NTHI, we explored whether cigarette smoke could affect the capacity of alveolar macrophages to eliminate NTHI infections. First, we tested the effect of CSE on the adhesion of NTHI strain 398 to MH-S cells. The adhesion of NTHI to cells exposed to 10% CSE was 25% lower than the adhesion of NTHI to nonexposed cells (Fig. 3A). Interestingly, CSE-treated MH-S cells phagocytosed significantly fewer NTHI bacteria than nonexposed

---

MH-S alveolar macrophages. For colocalization of NTHI and EEA1, NTHI was stained with rabbit anti-NTHI antibody and donkey anti-rabbit antibody conjugated to Cy2 (green) and EEA1 was stained with goat anti-EEA1 antibody and donkey anti-goat antibody conjugated to rhodamine (red). For colocalization of NTHI and the late endosomal markers Lamp-1 and Lamp-2, NTHI and host cell nuclei were stained with Hoechst stain (blue) and Lamp-1 and Lamp-2 were stained with rat anti-Lamp-1 or rat anti-Lamp-2 antibody and donkey anti-rat antibody conjugated to rhodamine (red). To determine the location of intracellular NTHI in acidic subcellular compartments, NTHI and host cell nuclei were stained with Hoechst stain (blue), and acidic subcellular compartments were loaded with LysoTracker Red DND-99 (red). To determine incorporation of NTHI material in host endocytic compartments, NTHI was stained with rabbit anti-NTHI antibody and donkey anti-rabbit antibody conjugated to Cy2 (green), Lamp-1 was stained with rat anti-Lamp-1 antibody and donkey anti-rat antibody conjugated to rhodamine (red), and DNA was stained with Hoechst stain (blue). Colocalization of NTHI and Lamp-1 occurred in empty compartments, where bacterial DNA could not be visualized.

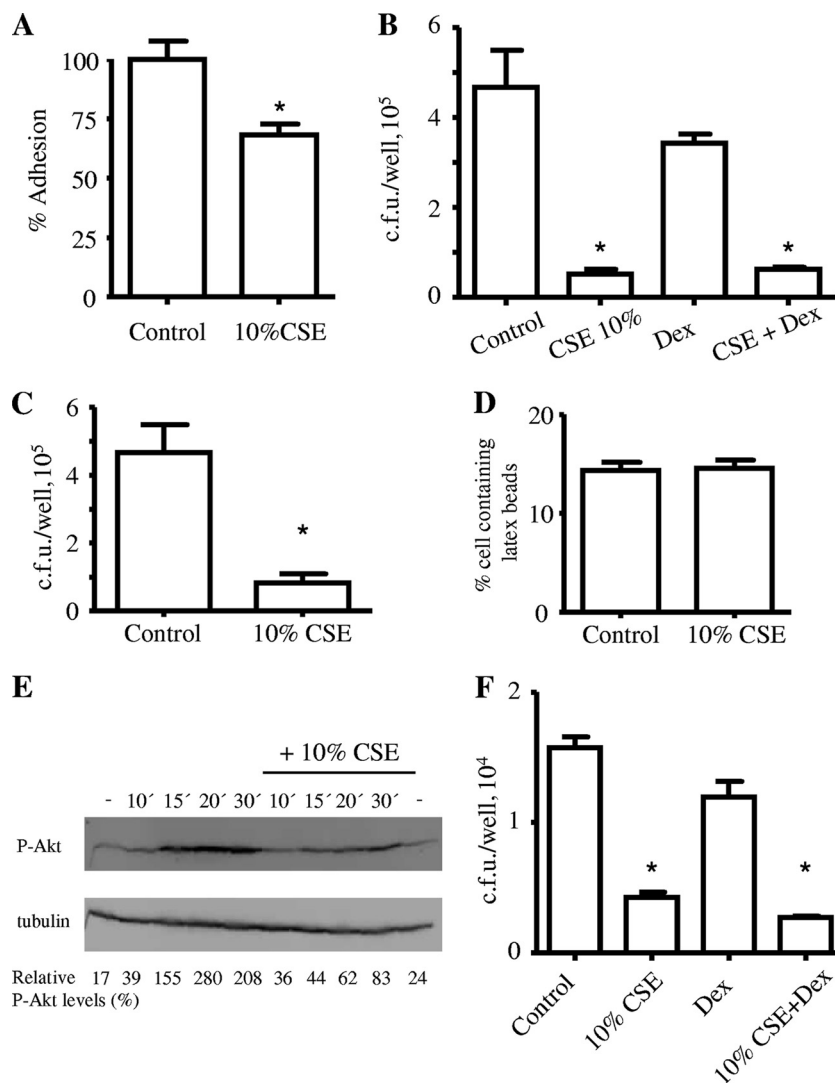


FIG. 3. (A) Adhesion of NTHI to MH-S alveolar macrophages exposed to 10% CSE. NTHI strain 398 was used to infect MH-S mouse alveolar macrophages. Bacterial adhesion was quantified as described in the text. The results are expressed as percentages, and the bacterial adhesion to nonexposed cells was defined as 100%. (B) Phagocytosis of NTHI by MH-S alveolar macrophages exposed to 10% CSE (3 h before infection) and/or 1  $\mu$ M dexamethasone (Dex) (2 h before infection). NTHI strain 398 was used to infect macrophages for 1 h. Wells were washed and incubated with medium containing gentamicin for 1 h. Bacterial uptake was quantified by lysis and serial dilution. (C) Phagocytosis of NTHI by MH-S alveolar macrophages preexposed to 10% CSE. Cells were exposed to 10% CSE for 3 h and washed, and fresh medium was added. NTHI strain 398 was used to infect macrophages. Wells were washed and incubated with medium containing gentamicin for 1 h. Bacterial uptake was quantified as described above. (D) Phagocytosis of GFP-latex beads by MH-S alveolar macrophages exposed to 10% CSE 3 h before infection. One-micrometer-diameter GFP-latex beads were incubated with macrophages (20 beads/cell) for 1 h. Wells were then washed, incubated with fresh medium for 1 h, fixed with PFA, and stained with phalloidin-RRX (red) and Hoechst stain (blue). For quantification, cells which had ingested latex beads (green) were considered positive and empty cells were considered negative. Nine hundred cells from three coverslips (300 cells/coverslip) from three independent experiments were counted. The results are expressed as percentages of positive cells. (E) Detection of Akt phosphorylation (P-Akt) by Western blotting with rabbit anti-phosphoSer473 Akt antibody and goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (upper panel). Cell extracts were prepared from cells that were not infected (lane -) or from cells that were infected for 10, 15, 20, or 30 min with NTHI strain 398 (left lanes) or after 3 h of exposure to 10% CSE (right lanes). The lower panel is an immunoblot showing tubulin levels under the same conditions. The results are representative of three independent experiments. The relative ratios of P-Akt obtained after densitometry analysis of gels are indicated below the lower panel. (F) Effect of exposure to 10% CSE on NTHI clearance by alveolar macrophages. NTHI strain 398 was used to infect macrophages. Wells were washed and incubated with medium containing gentamicin with or without 10% CSE and/or 1  $\mu$ M dexamethasone for 4 h. Intracellular bacteria were quantified as described above.

cells (Fig. 3B). A similar observation was made when MH-S cells were preexposed to CSE and a subsequent NTHI infection was performed in the absence of CSE (Fig. 3C). Control experiments demonstrated that exposure of NTHI to 10% CSE for a period of time identical to the duration of the assay did not affect

the viability of the bacteria (data not shown). Similarly, infection of non-CSE-exposed MH-S cells with NTHI preexposed to 10% CSE did not reveal a significant effect on the phagocytic ability of macrophages (data not shown). Moreover, 10% CSE did not affect the viability of MH-S cells because the percentages of



viable cells were similar for CSE-exposed cells and nonexposed cells, as determined by measuring the release of lactate dehydrogenase into culture supernatants (data not shown). Importantly, this phagocytic defect was not observed when 1- $\mu$ m-diameter GFP-latex beads were used instead of NTHI (Fig. 3D), ruling out the possibility that CSE could trigger a general phagocytic defect. We then investigated the molecular mechanism behind the phagocytic defect caused by CSE. We had previously shown that activation of PI3K–P-Akt signaling is required for NTHI phagocytosis by MH-S cells (Fig. 1F). Therefore, we examined whether CSE could affect the activation of this signaling cascade after bacterial infection by using phosphorylation of Akt as the readout. Western blot analysis showed that the levels of NTHI-induced phosphorylated Akt were lower in CSE-treated cells than in nontreated cells (Fig. 3E). It is noteworthy that bacteria ingested by MH-S cells preexposed to CSE were cleared by intracellular processing via the macrophage phagolysosomal pathway in a manner similar to the manner observed for nontreated cells (see Fig. S1 in the supplemental material).

We next assessed the impact of CSE on the fate of intracellular NTHI by exposing infected cells to 10% CSE during gentamicin treatment. The bacterial clearance after 4 h of gentamicin treatment was three times higher for cells exposed to CSE than for nontreated cells, suggesting that maturation of NTHI-containing phagolysosomes occurs faster upon exposure to CSE (Fig. 3F).

**Glucocorticoids do not restore the capacity of CSE-treated alveolar macrophages to clear NTHI infection.** Glucocorticoids are used as standard therapy for patients suffering from smoking-related diseases due to their efficient control of inflammatory disorders caused by smoking (1, 3). However, our knowledge about the effect of glucocorticoids on the host-pathogen interaction is limited. Treatment of alveolar macrophages with dexamethasone, a synthetic glucocorticoid hormone, did not affect NTHI phagocytosis (Fig. 3B), and addition of dexamethasone during gentamicin treatment did not have a significant impact on the ability of macrophages to clear an NTHI infection (Fig. 3F). We next asked whether dexamethasone could restore NTHI phagocytosis to CSE-treated MH-S cells. As shown in Fig. 3B, dexamethasone treatment did not restore the phagocytic ability of CSE-treated cells. Moreover, addition of dexamethasone to CSE-exposed cells during gentamicin treatment did not have an effect on the macrophage-NTHI interaction (Fig. 3F). Together, these results showed that glucocorticoids do not counteract the deleterious effect of CSE on the ability of alveolar macrophages to engulf NTHI.

**Alveolar macrophage inflammatory and phagocytic responses during NTHI infection are uncoupled events.** Upon activation, alveolar macrophages secrete inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and interleukin-1, promoting early local inflammation in response to bacterial infections (18, 32). We sought to determine whether CSE could also impair the secretion of cytokines by alveolar macrophages upon challenge with NTHI. To this end, we measured the levels of TNF- $\alpha$  secreted by alveolar macrophages at different time points after infection with NTHI strain 398 in the presence or absence of 10% CSE. NTHI triggered TNF- $\alpha$  secretion by MH-S cells, which reached a plateau at 4 h postinfection (Fig. 4). NTHI also

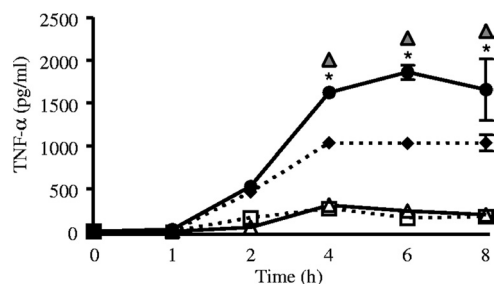


FIG. 4. Quantification by an enzyme-linked immunosorbent assay of TNF- $\alpha$  secreted into the supernatant by MH-S alveolar macrophages after infection with NTHI strain 398 (●), by NTHI-infected MH-S cells exposed to 10% CSE (◆), by NTHI-infected MH-S cells treated with 1  $\mu$ M dexamethasone (□), and by NTHI-infected MH-S cells simultaneously exposed to 10% CSE and dexamethasone (Δ). Statistical analysis was carried out by using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple-comparison test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. Significant differences between the amount of secreted TNF- $\alpha$  after NTHI infection by nontreated cells and the amount of secreted TNF- $\alpha$  after NTHI infection by CSE-treated cells are indicated by asterisks. Significant differences between the amount of secreted TNF- $\alpha$  after NTHI infection by nontreated cells and the amount of secreted TNF- $\alpha$  after NTHI infection by dexamethasone-treated cells are indicated by gray triangles.

induced the secretion of TNF- $\alpha$  by MH-S cells treated with 10% CSE, although the plateau levels reached were significantly lower than those for infected cells not exposed to CSE. Ten percent CSE did not induce secretion of TNF- $\alpha$  by alveolar macrophages (data not shown). As expected, dexamethasone significantly reduced the levels of TNF- $\alpha$  secreted by NTHI-infected cells to the levels of noninfected cells, whether the cells were exposed to 10% CSE or not (Fig. 4). Given that CSE exposure reduces the ability of macrophages to engulf NTHI, it can be concluded that inflammation and phagocytosis are uncoupled events during infection of alveolar macrophages by NTHI.

**Exposure to CSE impairs the ability of PMA-treated U937 cells to phagocytose NTHI.** We next asked if the observations made with mouse alveolar macrophages could be extended to human cells. To this end, we used PMA-treated U937 cells as a model of human alveolar macrophages (8). Macrophage-like U937 cells phagocytosed NTHI strain 398 efficiently. However, exposure to 5% CSE dramatically reduced the ability of the cells to ingest NTHI (Fig. 5A). U937 cells treated with 5% CSE engulfed numbers of latex beads similar to the numbers of beads engulfed by nonexposed U937 cells (Fig. 5B), suggesting that CSE does not cause a general phagocytic defect. Similar to the results for MH-S cells, treatment with dexamethasone did not restore the ability of CSE-exposed macrophage-like U937 cells to phagocytose NTHI (Fig. 5A).

**Alveolar macrophages from smokers and COPD patients have an impaired ability to engulf NTHI.** In order to assess if the deleterious effect of CSE on the phagocytic ability of alveolar macrophages occurs *in vivo*, we tested the abilities of alveolar macrophages isolated from the lungs of COPD patients, smokers, and people who never smoked to ingest NTHI. Figure 6A shows that alveolar macrophages obtained from smokers and COPD patients engulfed NTHI strain 398 at comparable levels, and in both cases the levels were signifi-

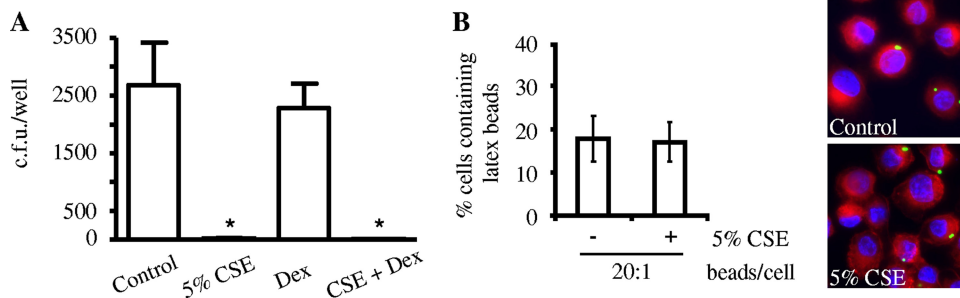


FIG. 5. (A) Phagocytosis of NTHI by U937 macrophages exposed to 5% CSE. NTHI strain 398 was used to infect macrophages. Wells were washed and incubated with medium containing gentamicin for 1 h. Bacterial uptake was quantified by lysis and serial dilution plating. Dex, dexamethasone. (B) Phagocytosis of GFP-latex beads by U937 macrophages exposed to 5% CSE. Control cells or cells exposed to 5% CSE for 3 h were incubated for 1 h with 1- $\mu$ m-diameter GFP-latex beads (green), using 20 beads per cell. Wells were washed, incubated with medium for 1 h, fixed, and stained with phalloidin-RRX (red) and Hoechst stain (blue). For quantification, cells which had ingested latex beads were considered positive and empty cells were considered negative. The distribution was determined using at least 300 cells. The results are expressed as percentages of positive cells.

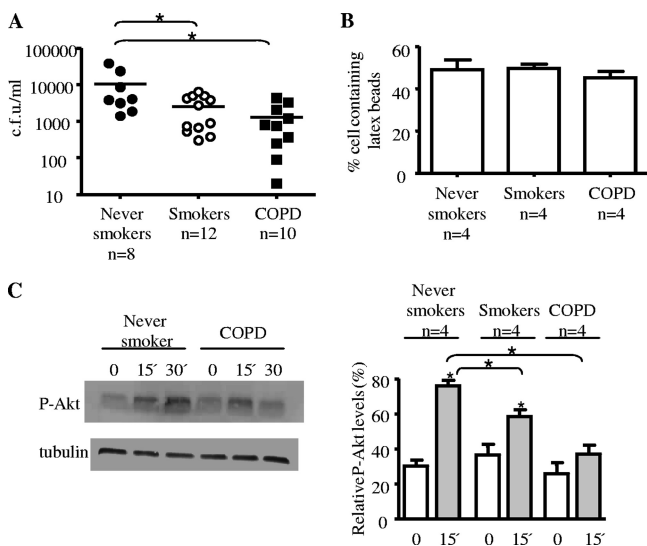


FIG. 6. Phagocytosis of NTHI by human alveolar macrophages. Human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage from people who never smoked (control;  $n = 8$ ), smokers ( $n = 12$ ), and COPD patients ( $n = 10$ ) were seeded on tissue culture plates and used to carry out phagocytosis assays in which the cells were infected with NTHI strain 398 (MOI, 100:1; 1 h). Wells were washed and incubated with fresh medium containing gentamicin for 1 h. Bacterial uptake was quantified by lysis and serial dilution plating (A) Phagocytosis of GFP-latex beads by human alveolar macrophages. Cells obtained by bronchoalveolar lavage from people who never smoked (control;  $n = 4$ ), smokers ( $n = 4$ ), and COPD patients ( $n = 4$ ) were seeded on tissue culture plates and used to carry out phagocytosis assays in which the cells were incubated for 1 h with 1- $\mu$ m-diameter GFP-latex beads (green), using 20 beads per cell. Wells were washed, incubated with medium for 1 h, fixed, and stained with phalloidin-RRX (red) and Hoechst stain (blue). For quantification, cells which had ingested latex beads were considered positive and empty cells were considered negative. Six hundred cells from two coverslips (300 cells/coverslip) were counted for each patient sample. The results are expressed as percentages of positive cells. (C) Detection of Akt phosphorylation (P-Akt) by Western blotting with rabbit anti-phosphoSer473 Akt antibody and goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (upper panel). Cells were obtained from the same BALF that were used for the experiment whose results are shown in panel B. Cell extracts were prepared from cells that were not infected or from cells that were infected for 15 or 30 min with NTHI strain 398. The lower panel is an immunoblot showing the tubulin levels under the same conditions. The relative ratios of P-Akt obtained after densitometry analysis of gels are indicated in the graph.

cantly lower than the levels observed for alveolar macrophages from people who never smoked. In contrast, alveolar macrophages obtained from people who never smoked, smokers, and COPD patients engulfed similar numbers of latex beads (Fig. 6B), suggesting that smoke does not cause a general phagocytic defect. We then asked whether the activation of PI3K-P-Akt signaling after bacterial infection is affected in alveolar macrophages from smokers and COPD patients. Western blot analysis showed that the levels of NTHI-induced phosphorylated Akt were lower in alveolar macrophages obtained from smokers and COPD patients than in alveolar macrophages obtained from people who never smoked (Fig. 6C).

Together, these data support our hypothesis that continuous exposure to cigarette smoke impairs the phagocytic ability of professional phagocytes in the lung.

## DISCUSSION

In this study we examined the features and dynamics of infection of alveolar macrophages by NTHI, a common respiratory pathogen. We demonstrated that bacterial uptake requires host cell actin polymerization, integrity of plasma membrane lipid rafts, and activation of the PI3K signaling cascade. Our results revealed that alveolar macrophages clear NTHI infection by maturation of the NTHI-containing compartment via the phagolysosomal route by subsequent acquisition of early and late endosomal markers in an acidified subcellular environment. Parallel to phagolysosomal maturation, alveolar macrophages secrete TNF- $\alpha$  upon NTHI infection. These conclusions were reached by using murine alveolar macrophages (MH-S cell line).

Two previous studies independently assessed the interaction between NTHI and professional phagocytes. One study analyzed whether J774 mouse macrophage-like cells cleared a collection of otitis media NTHI clinical isolates and found that NTHI could be recovered from macrophages 24 to 72 h after phagocytosis (9). The second study showed that NTHI was ingested by neutrophils, which activated a respiratory burst and interleukin-8 secretion; however, rather than kill the bacteria, the neutrophils themselves were killed by necrosis (20). To the best of our knowledge, this is the first study where alveolar macrophages were used to address NTHI interactions. Our

observations indicate that in the absence of external stresses, alveolar macrophages clear an NTHI infection, which could contribute to the maintenance of lung sterility in healthy individuals. We also found that PCho, a LOS substituent shown to play a relevant role in different aspects of NTHI pathogenicity, such as respiratory epithelium colonization and resistance to killing by antimicrobial peptides (17, 33), does not seem to play a major role in the interaction between NTHI and alveolar macrophages under the experimental conditions used in this study. Thus, we could not detect significant differences in the adhesion of NTHI strains expressing different levels of PCho or no PCho at the bacterial surface.

Another important finding of this study is that exposure of alveolar macrophages to CSE impaired the engulfment of NTHI. However, similar to the results for macrophages not exposed to CSE, bacteria ingested by CSE-pretreated cells were eliminated by phagolysosomal fusion. It has been demonstrated in a number of studies that CSE alters lung immunity, and its effects include disruption of the mucociliary function, mucus hypersecretion, and disturbance of the mucosal integrity (35, 38, 39). Although the hypothesis has not been formally proven, it is generally accepted that these changes should lead to an increased risk of infection, which is supported by epidemiological studies. A recent study showed that mice exposed to cigarette smoke displayed delayed bacterial clearance, increased inflammation, and increased morbidity (10). Thus, Drannik and coworkers suggested that the impaired bacterial clearance by animals exposed to smoke was not due to defects in the phagocytic ability of alveolar macrophages, because alveolar macrophages from animals exposed to smoke engulfed latex beads as efficiently as cells from mice not exposed to smoke (10). In our work, we made similar observations, but importantly, we demonstrated that CSE-treated alveolar macrophages indeed have a reduced ability to engulf bacteria compared to nontreated cells. This highlights the fact that care should be taken when conclusions about host-pathogen interactions are drawn using data obtained with inert particles.

Mechanistically, we observed that exposure to CSE reduced Akt phosphorylation levels after NTHI infection and, subsequently, PI3K signaling. Considering that blockage of PI3K activation by a specific inhibitor reduced NTHI phagocytosis, our data suggest that PI3K blockage by CSE could explain the decrease in bacterial phagocytosis. However, we cannot exclude the possibility that CSE may affect additional host signaling pathways which could modulate bacterial phagocytosis together with PI3K. Intriguingly, exposure to CSE increased bacterial killing, once bacteria had been taken up. At present, we can only speculate on a molecular explanation for this observation because the effect of cigarette smoke on the host-pathogen interaction has been poorly characterized. Given that CSE contains oxygen free radicals and has an oxidant effect (23), exposure to this agent could also amplify the alveolar macrophage oxidative burst, contributing to faster bacterial clearance. Future studies will address these hypotheses.

Although care should be taken to extrapolate findings obtained using *in vitro* approaches to an *in vivo* scenario, it is worth pointing out that in this study we obtained similar results regarding the effect of exposure to cigarette smoke on bacterial phagocytosis by using mouse alveolar macrophages and human

macrophage-like cell lines and alveolar macrophages obtained from humans (*ex vivo* samples). It is worthwhile discussing the clinical implications of the findings obtained in this study. The fact that CSE impairs the phagocytosis of NTHI by alveolar macrophages could help the pathogen escape macrophage-mediated killing and therefore persist in the lung. In fact, we postulate that this could be one of the explanations for the association between cigarette smoking and the risk of respiratory infections. Supporting this hypothesis, we show here that alveolar macrophages from smokers, with or without airway obstruction, had an impaired ability to ingest NTHI compared to cells from people who never smoked. Interestingly, it has been reported that the negative effect of cigarette smoke on phagocytosis is restricted to the lung compartment, since the phagocytosis of NTHI by blood macrophages from patients with airway obstruction was indistinguishable from that by blood macrophages from people who never smoked (4). In this study, we explored this finding in depth, expanding the analysis to the molecular mechanisms involved in the interaction between NTHI and alveolar macrophages and to the modulation of these mechanisms by exposure to external agents.

Finally, we explored the effect of glucocorticoids, which are widely used in the treatment of smoking-related diseases, on the interaction between NTHI and alveolar macrophages. Dexamethasone did not restore CSE-induced phagocytic impairment, although, as expected, it reduced the amount of TNF- $\alpha$  secreted by alveolar macrophages upon NTHI infection. It is important to note that this effect could amplify airway colonization by bacterial pathogens. Evidence indicates that establishment of pneumonia is greatly facilitated by suppression of proinflammatory cytokine expression (6). Supporting this, it has recently become apparent that treatment of COPD patients with inhaled glucocorticoids is associated with an increased risk of hospitalization due to pneumonia, followed by death (11).

In conclusion, this study revealed novel effects of cigarette smoking on alveolar macrophage physiological functions which could contribute to lung bacterial colonization by opportunistic pathogens, such as NTHI.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Apicella for kindly providing NTHI strain 2019 and plasmid pBSLerm and A. Jahn for kindly helping with collection of the BALF samples.

J.G. is a recipient of a Contrato de Investigador del Instituto de Salud Carlos III from Fondo de Investigaciones Sanitarias. This work was funded by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants CP0500027 and PI061251) and from Fundación Mutua Madrileña to J.G. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias is an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Spain.

#### REFERENCES

1. Barnes, P. J. 2003. Therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.* **97**:87–94.
2. Barnes, P. J. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:183–192.
3. Barnes, P. J., K. Ito, and I. M. Adcock. 2004. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet* **363**:731–733.
4. Berenson, C. S., M. A. Garlipp, L. J. Grove, J. Maloney, and S. Sethi. 2006. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Infect. Dis.* **194**:1375–1384.
5. Bouchet, V., D. W. Hood, J. Li, J. R. Brisson, G. A. Randle, A. Martin, Z. Li, R. Goldstein, E. K. Schweda, S. I. Pelton, J. C. Richards, and E. R. Moxon.

2003. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:8898–8903.
6. **Burleson, G. R., and F. G. Burleson.** 2008. Testing human biologicals in animal host resistance models. *J. Immunotoxicol.* **5**:23–31.
7. **Butler, C. C., and J. H. Der Voort.** 2001. Steroids for otitis media with effusion: a systematic review. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **155**:641–647.
8. **Cosio, B. G., L. Tsaprouni, K. Ito, E. Jazrawi, I. M. Adcock, and P. J. Barnes.** 2004. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J. Exp. Med.* **200**:689–695.
9. **Craig, J. E., A. Cliffe, K. Garnett, and N. J. High.** 2001. Survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**:55–61.
10. **Drannik, A. G., M. A. Pouladi, C. S. Robbins, S. I. Goncharova, S. Kianpour, and M. R. Stampfli.** 2004. Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**:1164–1171.
11. **Ernst, P., A. V. González, P. Brassard, and S. Suissa.** 2007. Inhaled corticosteroid use in chronic obstructive pulmonary disease and the risk of hospitalization for pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**:162–166.
12. **Fletcher, C. M.** 1959. Chronic bronchitis. Its prevalence, nature, and pathogenesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **80**:483–494.
13. **Fletcher, C. M., P. C. Elmes, A. S. Fairbairn, and C. H. Wood.** 1959. The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br. Med. J.* **2**:257–266.
14. **Herriott, R. M., E. M. Meyer, and M. Vogt.** 1970. Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **101**:517–524.
15. **Kruskal, B. A., K. Sastry, A. B. Warner, C. E. Mathieu, and R. A. Ezekowitz.** 1992. Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor. *J. Exp. Med.* **176**:1673–1680.
16. Reference deleted.
17. **Lysenko, E. S., J. Gould, R. Bals, J. M. Wilson, and J. N. Weiser.** 2000. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect. Immun.* **68**:1664–1671.
18. **Mizgerd, J. P.** 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* **358**:716–727.
19. **Munger, J. S., G. P. Shi, E. A. Mark, D. T. Chin, C. Gerard, and H. A. Chapman.** 1991. A serine esterase released by human alveolar macrophages is closely related to liver microsomal carboxylesterases. *J. Biol. Chem.* **266**:18832–18838.
20. **Naylor, E. J., D. Bakstad, M. Biffen, B. Thong, P. Calverley, S. Scott, C. A. Hart, R. J. Moots, and S. W. Edwards.** 2007. *Haemophilus influenzae* induces neutrophil necrosis: a role in chronic obstructive pulmonary disease? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**:135–143.
21. **Niewoehner, D. E., M. L. Erbland, R. H. Deupree, D. Collins, N. J. Gross, R. W. Light, P. Anderson, and N. A. Morgan.** 1999. Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N. Engl. J. Med.* **340**:1941–1947.
22. **Pons, A. R., A. Noguera, D. Blanquer, J. Sauleda, J. Pons, and A. G. Agustí.** 2005. Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *Eur. Respir. J.* **25**:647–652.
23. **Rahman, I.** 2003. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**:95–109.
24. **Rao, V. K., G. P. Krasan, D. R. Hendrixson, S. Dawid, and J. W. St. Geme III.** 1999. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:99–129.
25. **Regueiro, V., M. A. Campos, P. Morey, J. Sauleda, A. G. Agustí, J. Garmendia, and J. A. Bengoechea.** 2009. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Eur. Respir. J.* **33**:273–281.
26. **Ruiz, M., S. Ewig, M. A. Marcos, J. A. Martínez, F. Arancibia, J. Mensa, and A. Torres.** 1999. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**:397–405.
27. **Schweda, E. K., J. C. Richards, D. W. Hood, and E. R. Moxon.** 2007. Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**:297–306.
28. **Sethi, S.** 2000. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* **117**:286S–291S.
29. **Sethi, S., and T. F. Murphy.** 2001. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:336–363.
30. **Sethi, S., and T. F. Murphy.** 2008. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **359**:2355–2365.
31. **Sopori, M.** 2002. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:372–377.
32. **Standiford, T. J.** 1997. Cytokines and pulmonary host defenses. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **3**:81–88.
33. **Swords, W. E., B. A. Buscher, S. Ver, I., A. Preston, W. A. Nichols, J. N. Weiser, B. W. Gibson, and M. A. Apicella.** 2000. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol. Microbiol.* **37**:13–27.
34. **Swords, W. E., M. R. Ketterer, J. Shao, C. A. Campbell, J. N. Weiser, and M. A. Apicella.** 2001. Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell. Microbiol.* **3**:525–536.
35. **Wang, H., X. Liu, T. Umino, C. M. Skold, Y. Zhu, T. Kohyama, J. R. Spurzem, D. J. Romberger, and S. I. Rennard.** 2001. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**:772–779.
36. **Weiser, J. N., N. Pan, K. L. McGowan, D. Musher, A. Martin, and J. Richards.** 1998. Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J. Exp. Med.* **187**:631–640.
37. **Whitsett, J. A.** 2002. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J. Clin. Invest.* **109**:565–569.
38. **Wickenden, J. A., M. C. Clarke, A. G. Rossi, I. Rahman, S. P. Faux, K. Donaldson, and W. MacNee.** 2003. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**:562–570.
39. **Witherden, I. R., E. J. Vanden Bon, P. Goldstraw, C. Ratcliffe, U. Pastorino, and T. D. Tetley.** 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.



## SPOTLIGHT

### Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors

---

#### ***Ehrlichia chaffeensis* Nuclear Translocated Ankyrin Protein Interacts with *Alu* Elements**

Host cell gene transcription is modulated by the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* during infection of mononuclear phagocytes, but the mechanisms involved have remained undefined. Zhu et al. (p. 4243–4255) demonstrate that a large, 200-kDa ankyrin repeat-containing protein of *E. chaffeensis* is translocated to the host cell nucleus, where it interacts with a poly(A) stretch within the repetitive mobile element *Alu-Sx* embedded in upstream gene regulatory regions and introns. A genome-wide analysis identified a small subset of p200 gene targets associated primarily with transcription, apoptosis, ATPase activity, and structural components, providing evidence of a novel molecular strategy involved in reprogramming host cell gene expression to promote survival of the pathogen.

#### **Class A Scavenger Receptor (SRA) Modulation of Cytokine Responses to Gram-Negative Bacteria Is Independent of SRA-Mediated Phagocytosis**

Bacterium-elicited host cytokine responses have been demonstrated to correlate inversely with class A scavenger receptor (SRA) expression. However, whether there exists an obligate relationship between SRA-mediated bacterial phagocytosis and the inflammatory response is unknown. Amiel et al. (p. 4567–4573) utilized SRA-dependent and -independent bacterial strains to demonstrate that in vitro and in vivo modulation of cytokine responses by this receptor and the resultant endotoxic shock are functionally independent of SRA-mediated bacterial phagocytosis. These results provide novel insights into an immune function for SRA in the context of bacterial infection by microbes that can evade phagocytic recognition by this receptor.

#### **Nod1 Controls *Salmonella enterica* Infection through Regulation of Lamina Propria Dendritic Cells**

Nod1 is an intracellular pattern recognition molecule that detects peptidoglycan from the bacterial cell wall. The intracellular lifestyle of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is in keeping with the idea that this pathogen may be targeted by Nod1. Le Bourhis et al. (p. 4480–4486) show that Nod1 plays a critical role in dendritic cells (DCs) from the intestinal lamina propria of mice after oral infection with a *Salmonella* strain that invades these cells. The authors show that Nod1 deficiency impairs the ability of these DCs to limit bacterial growth, thereby impacting the survival of the animal.

#### **Cigarette Smoke Impairs the Capacity of Alveolar Macrophages To Clear Infections by Nontypeable *Haemophilus influenzae***

Despite the sterility of the lung, constant exposure to pollutants allows access of pathogens, such as nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI), to the lower respiratory tract. Martí-Lliteras et al. (p. 4232–4242) dissected the interplay between NTHI and alveolar macrophages and its modulation by cigarette smoke extract (CSE), showing that CSE damages the ability of macrophages to clear NTHI infection by impairing their phagocytic capacity. This impairment was associated with a reduction in the activation of phosphatidylinositol 3-kinase signalling triggered upon NTHI infection, which was observed to occur in cell lines and in human alveolar macrophages from smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. Of potential therapeutic relevance, treatment with glucocorticoids did not compensate for CSE-dependent phagocytic impairment.



# Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells

Pau Morey,<sup>1,2</sup> Victoria Cano,<sup>1,2</sup> Pau Martí-Llites,<sup>1,2</sup>  
Antonio López-Gómez,<sup>1,2</sup> Verónica Regueiro,<sup>1,2</sup> Carles Saus,<sup>3</sup>  
José Antonio Bengoechea<sup>1,2,4,5</sup> and Junkal Garmendia<sup>1,2,4,6</sup>

## Correspondence

Junkal Garmendia

juncal.garmendia@unavarra.es

<sup>1</sup>Programa de Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA, recinto Hospital Joan March, carretera Sóller, km 12, 07110, Bunyola, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain

<sup>3</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Son Dureta, Palma Mallorca, Spain

<sup>4</sup>Área Microbiología, Facultad de Biología, Universitat Illes Balears, carretera Valldemossa, km 7.5, 07122, Palma Mallorca, Spain

<sup>5</sup>Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

<sup>6</sup>Instituto Agrobiotecnología (UPNA-CSIC), Campus Arrosadía s/n, 31192 Mutilva Baja, Navarra, Spain

Nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a Gram-negative, non-capsulated human bacterial pathogen, a major cause of a repertoire of respiratory infections, and intimately associated with persistent lung bacterial colonization in patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Despite its medical relevance, relatively little is known about its mechanisms of pathogenicity. In this study, we found that NTHi invades the airway epithelium by a distinct mechanism, requiring microtubule assembly, lipid rafts integrity, and activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signalling. We found that the majority of intracellular bacteria are located inside an acidic subcellular compartment, in a metabolically active and non-proliferative state. This NTHi-containing vacuole (NTHi-CV) is endowed with late endosome features, co-localizing with LysoTracker, lamp-1, lamp-2, CD63 and Rab7. The NTHi-CV does not acquire Golgi- or autophagy-related markers. These observations were extended to immortalized and primary human airway epithelial cells. By using NTHi clinical isolates expressing different amounts of phosphocholine (PCho), a major modification of NTHi lipooligosaccharide, on their surfaces, and an isogenic *lic1BC* mutant strain lacking PCho, we showed that PCho is not responsible for NTHi intracellular location. In sum, this study indicates that NTHi can survive inside airway epithelial cells.

Received 12 April 2010

Revised 30 September 2010

Accepted 1 October 2010

## INTRODUCTION

*Haemophilus influenzae* is a Gram-negative human pathogen that colonizes asymptotically the nasopharynx of healthy individuals. Disease occurs when the bacterium

reaches privileged anatomical sites under various predisposing conditions, including, among others, age, viral infections or a constant exposure to pollutants, leading to otitis media, sinusitis, meningitis, septicaemia or respiratory infections (Foxwell *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 1999). Nontypable *H. influenzae* (NTHi) is the most frequently isolated bacterial pathogen in the lungs of patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and furthermore, NTHi accounts for the majority of bacterial COPD exacerbation episodes (Sethi *et al.*, 2002; Sethi & Murphy, 2001, 2008).

One of the NTHi virulence factors that has been most extensively analysed is its lipooligosaccharide (LOS). It consists of lipid A, an inner core consisting of a

**Abbreviations:** COPD, chronic obstructive pulmonary disease; EEA1, early endosome antigen 1; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; LOS, lipooligosaccharide; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin; NHBE cells, normal human bronchial epithelial cells; NTHi, nontypable *Haemophilus influenzae*; NTHi-CV, NTHi-containing vacuole; PCho, phosphocholine; PFA, paraformaldehyde; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; SCV, *Salmonella*-containing vacuole; TEM, transmission electron microscopy.

Eight supplementary figures and a supplementary table are available with the online version of this paper.



phosphorylated 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO) linked to three heptoses and an outer core consisting of a heteropolymer of glucose and galactose (Schweda *et al.*, 2007). Similar to other bacterial pathogens adapted to mucosal surfaces, such as *Neisseria* spp. and *Moraxella catarrhalis*, NTHi LOS lacks polymeric O-linked sugar chains (Schweda *et al.*, 2007; Virji, 2009). The carbohydrate portion of the NTHi LOS is highly variable, both among strains and within the same strain upon passage, as a result of differences in the composition and linkage of saccharides in the outer core (Schweda *et al.*, 2007). An additional source of LOS heterogeneity is the regulation by phase variation of genes encoding enzymes responsible for LOS modifications with di-galactose, sialic acid and phosphocholine (PCho) (Gilsdorf *et al.*, 2004; Power *et al.*, 2009). PCho has been shown to be involved in different aspects of NTHi pathogenicity, i.e. resistance to antimicrobial peptides and to serum-mediated killing (Lysenko *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 1998). PCho is also involved in the interplay of NTHi with cellular components of innate immunity, including adhesion to and entry into monocytic and epithelial cells (St Geme, 2002; St Geme & Falkow, 1990; Swords *et al.*, 2000). A number of reports associate PCho expression with NTHi biofilm growth, maturation and stability (Hong *et al.*, 2007a, b; West-Barnette *et al.*, 2006), and it has been shown to play a role in host colonization *in vivo*, both in a chinchilla model of otitis media and in a mouse model of pulmonary infection (Hong *et al.*, 2007b; Pang *et al.*, 2008).

Relatively little is known about the interplay between NTHi and the airway epithelium. Even though NTHi has traditionally been considered as an extracellular pathogen (Moxon *et al.*, 2008), a number of reports suggest that this bacterium might also reside within non-phagocytic cells. Wild-type NTHi clinical isolates have been found, *in vitro*, to adhere to and invade Chang epithelial cells, cultured human endothelium, primary human bronchial epithelium and type II pneumocytes (Ahrén *et al.*, 2001; Ketterer *et al.*, 1999; St Geme, 2002; St Geme & Falkow, 1990; Swords *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 1991). Early experiments using Chang epithelial cells and primary human bronchial epithelial cells revealed the accumulation of actin strands beneath adherent bacteria and lamellipodia formation at the site of bacterial entry (Holmes & Bakaletz, 1997; Ketterer *et al.*, 1999). *Ex vivo*, NTHi has been found to appear in an intracellular and viable form in human adenoid tissue and in bronchial human biopsies (Bandi *et al.*, 2001; Forsgren *et al.*, 1994). Transmission electron microscopy (TEM)-based experiments have shown that intracellular NTHi remains within membrane-bound vacuoles (St Geme, 2002). In view of these earlier reports, we based our work on the hypothesis that NTHi might be able to survive within host cells.

We report here that NTHi resides within airway epithelial cells without proliferating. The pathogen survives in a unique intracellular compartment which keeps late endosome features. The modification of LOS with PCho is not a

requirement for NTHi localization inside subcellular compartments.

## METHODS

**Bacterial strains, media and growth conditions.** NTHi strain 375 is an otitis media isolate (Bouchet *et al.*, 2003). NTHi 2019 is a COPD isolate (Swords *et al.*, 2000). NTHi 398 (formerly known as 157925) is a COPD isolate (Hospital Son Dureta, Spain) (Regueiro *et al.*, 2009). NTHi 375 *Δlic1BC* is a mutant strain lacking PCho and has been described previously (Martí-Lliteras *et al.*, 2009). NTHi strains were grown on chocolate agar plates (bioMérieux) or on brain heart infusion (BHI) agar plates supplemented with 10 μg haemin ml<sup>-1</sup> and 10 μg NAD ml<sup>-1</sup>. Bacteria were grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, using 10 μg erythromycin ml<sup>-1</sup> when necessary. *Salmonella typhimurium* SL1344 *ΔinvA* has been described elsewhere (Galán *et al.*, 1992; García-del Portillo & Finlay, 1994), and was transformed with the invasin-encoding plasmid pRI203 (invasin) (Isberg *et al.*, 1987). *Escherichia coli* and *S. typhimurium ΔinvA* (invasin) were grown in Luria-Bertani (LB) broth or on LB agar plates at 37 °C, using antibiotics at the following concentrations, when necessary: ampicillin, 100 μg ml<sup>-1</sup>; erythromycin, 150 μg ml<sup>-1</sup>; chloramphenicol, 25 μg ml<sup>-1</sup>.

**Colony immunoblotting.** The assessment of PCho levels on the surface of NTHi strains was carried out by colony immunoblotting (Swords *et al.*, 2000). Briefly, NTHi strains were plated on supplemented BHI agar plates. Plates with approximately 100–300 colonies were used for transfer onto a nitrocellulose membrane. The membrane was washed twice for 15 min in TSBB buffer (0.5 M NaCl, 0.5% Tween 20, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) and incubated in TSBB for 16 h at 4 °C with monoclonal anti-PCho TEPC-15 (Sigma) diluted 1:10,000, an IgA<sub>κ</sub> with a specificity for PCho obtained from the TEPC-15 tumour line in BALB/c mice. Membranes were washed five times for 5 min with fresh TSBB and incubated for 16 h with TSBB containing goat anti-mouse IgA conjugated to anti-alkaline phosphatase antibody (Sigma) diluted 1:10,000. Finally, membranes were washed five times with TSBB, incubated for 10 min in AP buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCl, pH 9.5), and developed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP; Sigma) and nitro blue tetrazolium (Sigma) in AP buffer.

**Cell culture and bacterial infection.** Carcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549, ATTC CCL-185) were maintained in RPMI 1640 tissue culture medium supplemented with 1% HEPES, 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin and streptomycin) in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Primary normal human bronchial epithelial cells (NHBE cells; Lonza) were grown in the bronchial epithelial cell growth medium BEBM (Bronchial Epithelial cell Basal Medium, Lonza) supplemented with 0.5 ng human epidermal growth factor ml<sup>-1</sup>, 0.5 μg hydrocortisone ml<sup>-1</sup>, 5 μg insulin ml<sup>-1</sup>, 10 μg transferrin ml<sup>-1</sup>, 0.5 μg epinephrine ml<sup>-1</sup>, 6.5 ng triiodothyronine ml<sup>-1</sup>, 50 μg gentamicin ml<sup>-1</sup>, 50 ng amphotericin B ml<sup>-1</sup>, 52 μg bovine pituitary extract ml<sup>-1</sup> and 0.1 ng retinoic acid ml<sup>-1</sup>, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks were coated with collagen from calf skin (Sigma).

For A549, cells were seeded to a density of 10<sup>5</sup> cells per well in 24-well tissue culture plates for 24 h. Cells were then serum-starved for 16 h before infection by replacement of the medium with supplemented RPMI lacking FBS. A confluency of 90% was reached at the time of the bacterial infection. For NHBE cells, cells were seeded at a density of 10<sup>5</sup> cells per well and grown until 80% confluency was reached in collagen-coated 24-well tissue culture plates using 1 ml BEBM per well. For NTHi infection, bacteria were recovered with 1 ml PBS from

a chocolate agar plate grown for 16 h. The bacterial suspension was adjusted to  $OD_{600}$  1 ( $\sim 10^9$  c.f.u.  $ml^{-1}$ ). A549 cells were infected in 1 ml Earle's balanced salt solution (EBSS) with 50  $\mu$ l bacterial suspension to get an m.o.i. of 100:1. NHBE cells were infected on 1 ml BEBM with 30  $\mu$ l of this suspension to get an m.o.i. of 100:1. *S. typhimurium*  $\Delta invA$  (invasin) was grown overnight to stationary phase in LB at 37 °C. The culture was then diluted 1:33 and grown for 3.5 h to exponential phase. A 30  $\mu$ l volume of this suspension was added to each well to get an m.o.i. of 100:1. Infection was carried out for 15 min, and wells were then washed three times with PBS and incubated for up to 1 h with RPMI 1640 containing 10% FCS, HEPES and 100  $\mu$ g gentamicin  $ml^{-1}$ .

For adhesion experiments, cells were infected for 1 or 2 h, washed five times with PBS and lysed with 300  $\mu$ l of PBS/0.025% saponin for 10 min at room temperature, and serial dilutions were plated on supplemented BHI agar plates. Adhesion data are presented as c.f.u. per well. For invasion assays, cells were infected for 2 h and washed three times with PBS. Cells were then incubated for an additional 1 h with RPMI 1640 containing 10% FCS, HEPES and 200  $\mu$ g gentamicin  $ml^{-1}$  to kill extracellular bacteria. Treatment with gentamicin (200  $\mu$ g  $ml^{-1}$ ) did not induce any cytotoxic effect, and this was verified by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) and immunofluorescence microscopy (data not shown). Cells were washed three times with PBS and lysed as described above. Results are expressed as c.f.u. per well. For time-course experiments, culture medium was replaced at 1 h post-gentamicin by RPMI 1640 containing 10% FCS, HEPES and 11  $\mu$ g gentamicin  $ml^{-1}$ , and processed when required.

When indicated, cells were pre-incubated for 1 h with 10  $\mu$ M nocodazole, 30  $\mu$ M colchicine, 1 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), 25  $\mu$ g nystatin  $ml^{-1}$ , 5  $\mu$ g filipin  $ml^{-1}$  or 10  $\mu$ M LY294002 hydrochloride, for 30 min with 5  $\mu$ g cytochalasin D  $ml^{-1}$  or 5  $\mu$ M wortmannin, or for 3 h with 1  $\mu$ g latrunculin B  $ml^{-1}$ , before carrying out infections. All drugs were purchased from Sigma. In all cases, infection experiments were carried out in triplicate and independently at least three times ( $n=9$ ).

**Generation of a rabbit polyclonal anti-NTHi serum.** An overnight-grown culture of NTHi was centrifuged, resuspended in acetone to half of the original volume and agitated for 24 h. Acetone-killed bacteria were centrifuged, resuspended in one-tenth of the original acetone volume and agitated for 1 h. The suspension of acetone-killed bacteria was dried with a vacuum desiccator. This process was performed separately for NTHi strains 398, 375 and 2019, and whole-cell bacterial antigens were mixed in equal proportions. A rabbit anti-NTHi serum was obtained by repeated immunization of one rabbit (Charles River Laboratories) with the mixture of acetone-killed bacteria.

**Immunofluorescence and TEM.** Cells were seeded on 12 mm circular coverslips in 24-well tissue culture plates. Infections were performed as described above. When indicated, cells were washed three times with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) in PBS, pH 7.4, for 15 min at room temperature, or with cold absolute methanol for 5 min at  $-20$  °C. Methanol fixation was used for cathepsin D and tubulin staining. For early endosome antigen 1 (EEA1) staining, cells were fixed with 2.5% PFA for 10 min at room temperature followed by 1% PFA + 80% methanol at  $-20$  °C for 5 min.

NTHi was stained with rabbit anti-NTHi serum diluted 1:800. *S. typhimurium* was stained with rabbit anti-LPS diluted 1:800 (a gift from Dr G. Frankel, Imperial College London, UK). Actin cytoskeleton was stained with rhodamine-phalloidin (Invitrogen) diluted 1:200; microtubule cytoskeleton was stained with mouse anti-tubulin antibody (Sigma) diluted 1:150. Early endosomes were stained with goat anti-EEA1 (N-19) antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted

1:50. Late endosomes were stained with mouse monoclonal anti-human lamp-1 (H4A3), mouse monoclonal anti-human lamp-2 (H4B4) or mouse anti-human CD63 (H5C6) antibodies (Developmental Studies Hybridoma Bank) diluted 1:150. DNA was stained with Hoechst 33342 (Invitrogen) diluted 1:2500. Lysosomes were labelled with goat anti-human cathepsin D (G19) or rabbit anti-human cathepsin D (H-75) antibodies (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100. The Golgi apparatus was stained with mouse anti-GM130 antibodies (BD Laboratories) diluted 1:300. Donkey anti-rabbit, donkey anti-mouse and donkey anti-goat secondary antibodies conjugated to rhodamine or Cy2 were purchased from Jackson Immunological and diluted 1:200. Fixable dextran 70 000 (molecular mass) labelled with Texas red (TR-dextran) at 25  $\mu$ g  $ml^{-1}$  (Molecular Probes) was used in two types of assays: (i) TR-dextran was used to analyse the uptake of bacteria by endocytosis, by addition of this fluid endocytic marker into the medium at the onset of infection; (ii) given that endocytosed TR-dextran is delivered to and retained by endocytic compartments, it was independently used to label lysosomes in a pulse-chase assay. Briefly, epithelial cells seeded on glass coverslips were labelled by pulsing with 25  $\mu$ g TR-dextran  $ml^{-1}$  for 2 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in EBSS medium. To allow the TR-dextran to accumulate in lysosomes, medium was removed, and cells were washed three times with PBS and incubated for 30 min (NTHi) or 2 h (*Salmonella*) in dye-free medium (chase). After the chase period, cells were infected with NTHi or *S. typhimurium*, as described above. Different chase times were applied depending on the pathogen due to the use of different infection protocols for each one, i.e. 2 h for NTHi and 30 min for *S. typhimurium*, thus allowing the same chase time (2 h 30 min) for both pathogens before gentamicin addition. Acidic compartments were loaded with 0.5  $\mu$ M LysoTracker Red DN99 (Invitrogen) 45 min before fixation. At the end of the infection period, the residual fluid marker was removed by washing the cells three times with PBS, followed by fixation.

Staining was carried out in 10% horse serum, 0.1% saponin in PBS. Coverslips were washed twice in PBS containing 0.1% saponin and once in PBS, and incubated for 30 min with primary antibodies. Coverslips were then washed twice in 0.1% saponin in PBS and once in PBS, and incubated for 30 min with secondary antibodies. Finally, coverslips were washed twice in 0.1% saponin in PBS, once in PBS and once in H<sub>2</sub>O, and mounted on glass coverslips using ProLong Gold antifade mounting gel (Invitrogen).

For extra-/intracellular differential staining, PFA-fixed cells were incubated for 10 min with PBS containing 10% horse serum, Hoechst 33342 and mouse anti-PCho TEPC-15 antibody diluted 1:200. Coverslips were washed three times with PBS and stained as described above with donkey anti-mouse secondary antibody conjugated to rhodamine. Coverslips were washed three times in PBS and once in distilled water before mounting onto glass slides using ProLong Gold antifade mounting gel. Immunofluorescence was analysed with a Leica CTR6000 fluorescence microscope. Images were taken with a Leica DFC350FX monochrome camera. Confocal microscopy was carried out with a Leica TCS SP5 confocal microscope. Depending on the marker, an NTHi-containing vacuole (NTHi-CV) was considered positive when it fulfilled these criteria: (i) the marker was detected throughout the area occupied by the bacterium; (ii) the marker was detected around/enclosing the bacterium; and (iii) the marker was concentrated in this area, compared with the immediate surroundings. To determine the percentage of bacteria that co-localized with each marker, all bacteria located inside a minimum of 100 infected cells were analysed in each experiment. Results were calculated from two independent experiments and are presented as the mean percentage of association  $\pm$  SEM. Experimental details for the kinetics shown in Fig. 3(b) are specified in Results. For TEM, cells were seeded in 24-well tissue culture plates. Infections were carried out as described above, and cells were fixed

with glutaraldehyde and processed for TEM as described previously (Kruskal *et al.*, 1992).

**Fluorescent *in situ* hybridization (FISH).** We carried out hybridization of PFA-fixed infected cells with fluorescently labelled oligonucleotides, as described elsewhere (Neef *et al.*, 1996). Cy3- or Alexa 488-conjugated DNA probes EUB338 (5'-GCTGCCTCCCG-TAGGAGT-3') and GAM42a (5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3') are designed for specific labelling of the rRNA of eubacteria and the gamma subclass of the proteobacteria, respectively (Manz *et al.*, 1993). A non-EUB338 DNA probe, complementary to EUB338, was used as a negative control. The detectability of bacteria using such oligonucleotide probes is dependent on the presence of sufficient ribosomes per cell, hence providing qualitative information on the physiological state of the bacteria on the basis of the number of ribosomes per cell. These probes were used together to obtain a stronger signal, and were added to a final concentration of 5 nM each in the hybridization buffer. The hybridization buffer contained 0.9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.01 % SDS and 35 % formamide. Coverslips were first washed with deionized water. Hybridization was carried out for 1.5 h at 46 °C in a humid chamber, followed by a 30 min wash at 48 °C. Washing buffer contained 80 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.01 % SDS and 5 mM EDTA (pH 8). After washing, DNA staining for total bacteria was carried out by incubating the coverslips in PBS containing Hoechst 33342 for 20 min. Coverslips were then washed three times in PBS and once in distilled water before mounting onto glass slides using ProLong Gold antifade mounting gel. As a control, FISH labelling of bacteria located extracellularly in gentamicin-treated wells did not give any detectable signal.

**Plasmids and transient transfections.** For transient transfections with GFP-Rab7Q67L, GFP-TGN46 or GFP-LC3 plasmids, A549 cells were grown on glass coverslips to 40 % confluency ( $4 \times 10^4$  cells per well), maintained in RPMI 1640 medium containing 10 % FCS, and transfected with 1.2 µg DNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were infected with NTHi. To induce autophagy in GFP-LC3-transfected cells, cells were pre-treated with 500 nM rapamycin 1 h before infection and the concentration of rapamycin was maintained throughout the experiment. Cells were then infected. In all cases, samples were fixed, stained and analysed by immunofluorescence microscopy.

**Detection of Akt phosphorylation by Western blotting.** Cells were seeded on six-well tissue culture plates at  $10^6$  cells per well. Cells were infected with NTHi at m.o.i. 100:1, washed three times with cold PBS, scraped and lysed with 100 µl lysis buffer (1 × SDS sample buffer, 62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2 %, w/v, SDS, 10 %, w/v, glycerol, 50 mM DTT, 0.01 %, w/v, bromophenol blue) on ice. Samples were sonicated, boiled at 100 °C for 10 min and cooled on ice before PAGE and Western blotting. Akt phosphorylation was detected with primary rabbit anti-phosphoSer473 Akt antibody (Cell Signalling Technology) diluted 1:1000 and secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (Thermo Scientific) diluted 1:10000. Total Akt was detected with primary rabbit Akt (Cell Signalling Technology) antibody diluted 1:1000 and secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (Thermo Scientific) diluted 1:10000. Tubulin was detected with primary mouse anti-tubulin antibody (Sigma) diluted 1:3000 and secondary goat anti-mouse antibody (Pierce) conjugated to horseradish peroxidase diluted 1:1000. When necessary, the membrane was washed twice for 15 min with 0.5 % Tween-20 in PBS, incubated for 30 min in Restore Western blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) at 37 °C, and washed twice for 15 min with 0.5 % Tween-20 in PBS. Images were recorded with a GeneGnome HR imaging system (Syngene).

**Statistical methods.** Statistical analysis was performed using analysis of variance, the two-sample *t* test with two tails, followed by the Mann-Whitney *U* test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. Error bars in the graphs in all figures were calculated as SEM. The analysis was performed using Prisma 4 for PCs (GraphPad Software).

## RESULTS

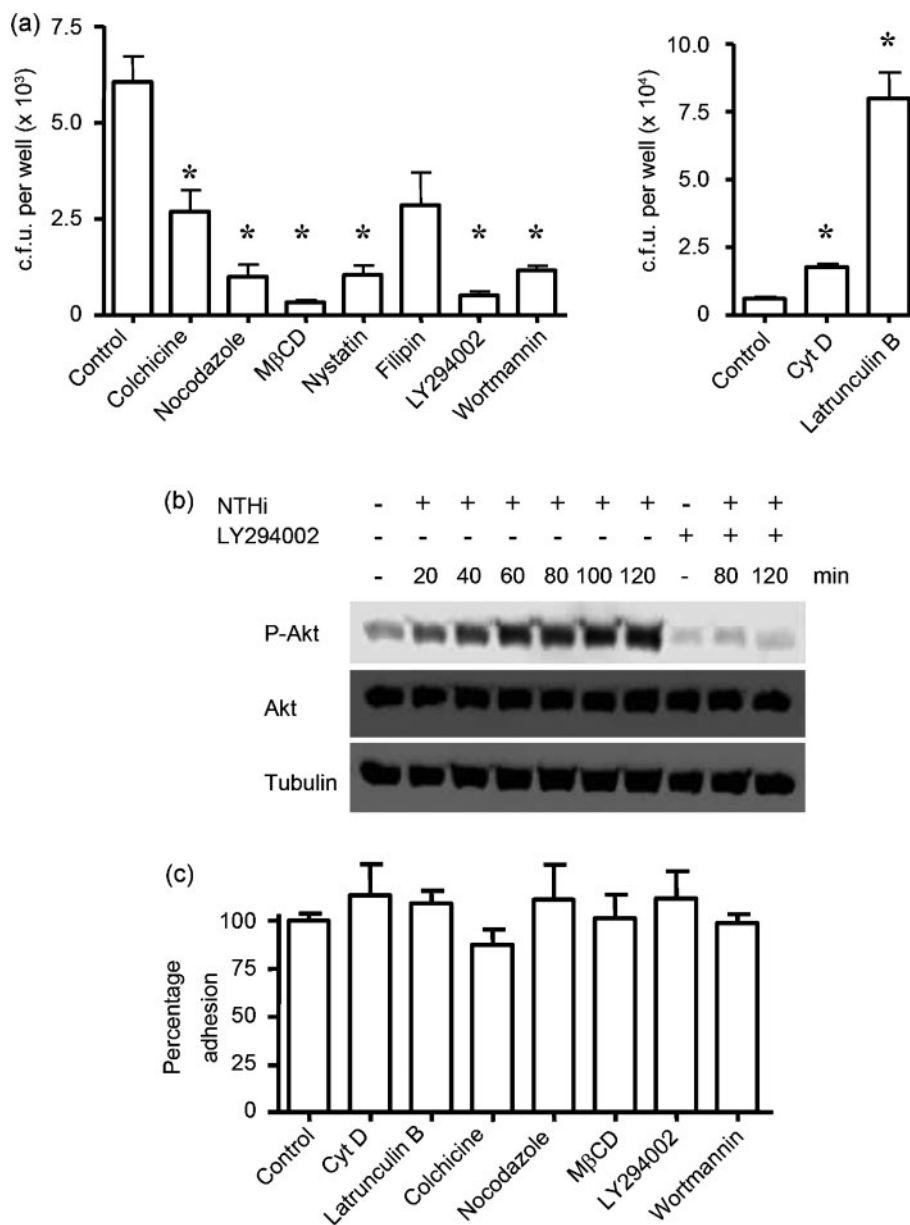
### NTHi infection of airway epithelial cells: invasion requires host microtubules, lipid rafts integrity and activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signalling

A549 cell infection with stationary phase-grown NTHi 375, at m.o.i. 100:1 for 1 and 2 h, showed that bacteria adhered to cells in a time-dependent manner (Supplementary Fig. S1A), that they associated to cells, forming microcolonies on the cell surface (Supplementary Fig. S1B), that approximately 80 % of cells were infected after 2 h, and that cell density and overall morphology remained unaltered when infection was carried out for up to 2 h. An m.o.i. of 100:1 for 2 h was the condition chosen for subsequent experiments. NTHi strains 398, 375 and 2019, displaying high, medium and low PCho levels on their surfaces, respectively (Supplementary Fig. S2A), showed comparable adhesion and formation of adherent bacterial aggregates (Supplementary Fig. S1A, B and data not shown). NTHi adhesion was also observed by TEM, showing cell extensions at the site of attachment (Supplementary Fig. S1C). NTHi internalization into A549 cells, addressed by infection, incubation with medium containing gentamicin, cell lysis and plating of bacteria, showed bacterial recovery and no significant differences among strains (Supplementary Fig. S1D). Bacterial intracellular localization was visualized by confocal microscopy and by a double-fluorescence immunolabelling method (extra-/intracellular differential staining) (Supplementary Fig. S1E and F, respectively). The formation of microcolonies seemed to be relevant for bacterial invasion because the entry rate decreased to almost undetectable levels by a reduction of m.o.i. or by lowering the infection time, which in turn limited the formation of microcolonies (data not shown). These experiments, together with earlier observations by other authors (Ahrén *et al.*, 2001; Bandi *et al.*, 2001; Fink *et al.*, 2003; Forsgren *et al.*, 1994; Hendrixson & St Geme, 1998; Holmes & Bakaletz, 1997; Kenjale *et al.*, 2009; Ketterer *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; St Geme, 2002; St Geme & Falkow, 1990; Swords *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 1991), confirm that NTHi adheres to and can invade epithelial cells.

We next elucidated the contribution of the host cell machinery to NTHi invasion of epithelial cells. Experiments were carried out in the presence of drugs which inhibit specific host cell functions. Nocodazole and colchicine significantly reduced the entry of NTHi 375 when compared with control infections, suggesting that NTHi invasion involves the assembly of the host microtubule network (Fig. 1a). Lipid rafts, specialized dynamic plasma membrane

microdomains enriched with cholesterol and sphingolipids, are structures subverted by several pathogens to gain access to their target hosts (Mañes *et al.*, 2003; Rosenberger *et al.*,

2000). M $\beta$ CD, which depletes cholesterol from host cell membranes, was employed to analyse the involvement of lipid rafts in NTHi invasion. Cholesterol depletion impaired



**Fig. 1.** Mechanisms of NTHi entry into A549 cells. (a) NTHi 375 was used to infect cells. Wells were washed and incubated with medium containing gentamicin for 1 h. Bacterial uptake was quantified by cell lysis, serial dilution and viable counting on supplemented BHI agar plates. When required, cells were pre-treated for 1 h with nocodazole, colchicine, M $\beta$ CD, nystatin, filipin or LY294002, for 30 min with wortmannin or cytochalasin D (Cyt D), or for 3 h with latrunculin B. Bacterial uptake was quantified as described above. Results are expressed in c.f.u. per well. (b) Detection of Akt-Ser473 phosphorylation by Western blotting with rabbit anti-phosphoSer473 Akt and goat anti-rabbit conjugated to horseradish peroxidase antibodies (upper panel). Extracts were prepared from cells non-infected (-) or infected for 20, 40, 60, 80, 100 and 120 min with NTHi 375. Detection of total Akt and tubulin (centre and bottom panels, respectively); LY294002 pre-treated cells (upper-right panel) were used as controls. (c) Pre-treatment with chemical inhibitors does not alter NTHi adhesion. NTHi 375 was used to infect cells for 2 h. When required, cells were pre-treated for 1 h with nocodazole, colchicine, M $\beta$ CD or LY294002, for 30 min with cytochalasin D or wortmannin, or for 3 h with latrunculin B. Bacterial adhesion was quantified as described above. Data are shown as percentage adhesion compared with that of control non-treated cells.

NTHi entry into A549 cells in a dose-dependent manner (Fig. 1a and Supplementary Fig. S3B). Similar results were obtained when cells were treated with filipin and nystatin (Fig. 1a). Given that several pathogens exploit host signalling pathways to their own benefit (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2004), we also studied the contribution of the PI3K signalling pathway to NTHi invasion by pre-treatment of cells with LY294002 or wortmannin, two specific inhibitors of PI3K activity. As shown in Fig. 1(a), these inhibitors reduced NTHi entry. Akt becomes phosphorylated upon activation of PI3K signalling (Ji & Liu, 2008). Western blot analysis revealed that NTHi infection induces the phosphorylation of Akt (Fig. 1b); a mock control is shown in Supplementary Fig. S3(A). Akt phosphorylation upon NTHi infection was abrogated by cell pre-treatment with LY294002 (Fig. 1b, upper-right panel). Akt and tubulin alone were used as controls (Fig. 1b, centre and lower panels). Cell pre-treatment with cytochalasin D or latrunculin B, two inhibitors of actin cytoskeleton polymerization, did not inhibit, but increased NTHi entry into A549 cells (Fig. 1a, right panel). These chemical inhibitors did not affect bacterial viability (Supplementary Fig. S3C) or alter bacterial adhesion (Fig. 1c).

Collectively, these results suggest that NTHi invasion of cells is a microtubule-dependent event which requires the integrity of host plasma membrane lipid rafts and the activation of the PI3K signalling pathway.

### NTHi locates within airway epithelial cells inside acidic compartments

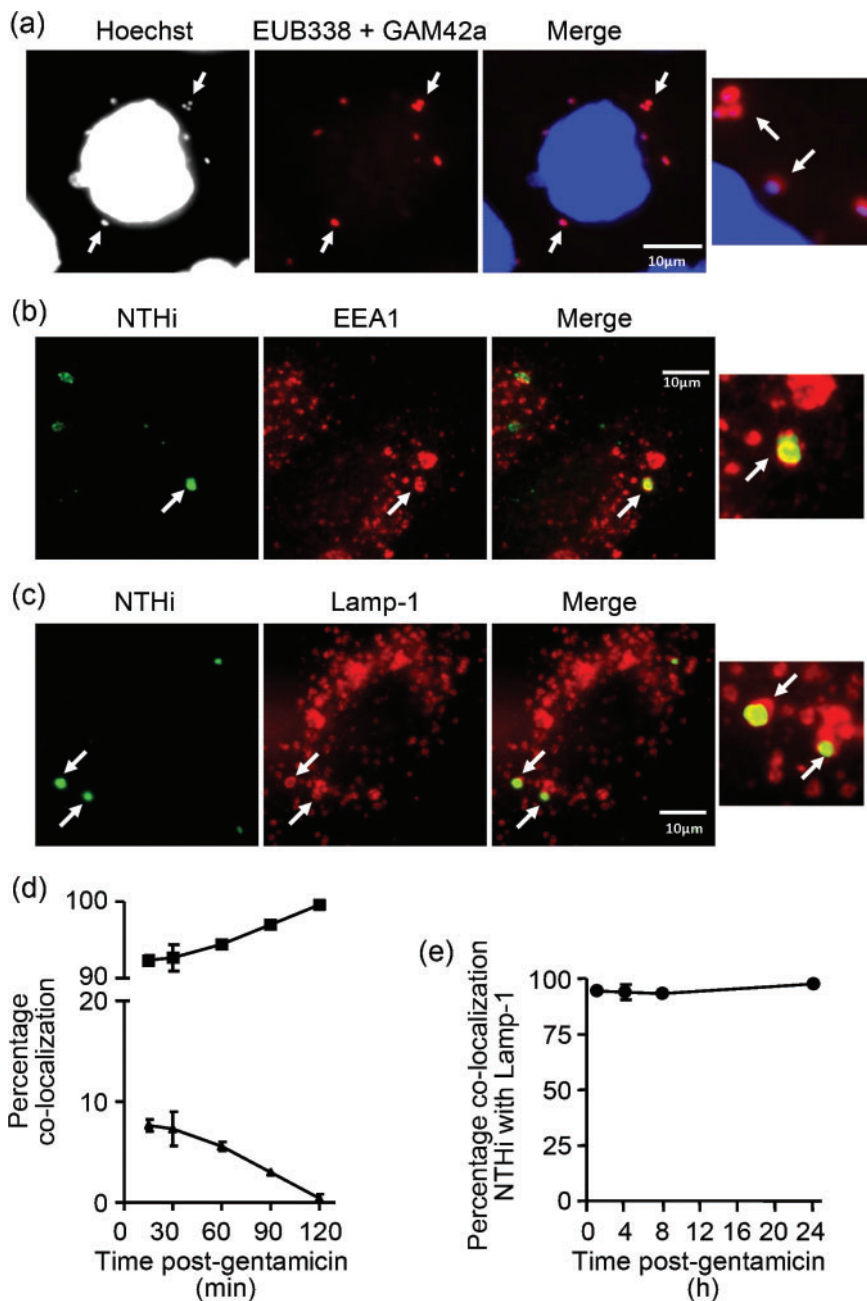
We next examined the ability of NTHi to survive within airway epithelial cells. A549 cells were infected with NTHi 375, washed, incubated with medium containing gentamicin, and lysed with 1% saponin. Intracellular bacteria were enumerated by plating at 2 h intervals up to 24 h post-gentamicin. Data revealed that bacterial numbers decreased continuously over time (data not shown). Identical infections were carried out in parallel and samples were processed for immunofluorescence microscopy. In contrast to the plating data, NTHi could be clearly observed throughout the entire course of infection by staining with the fluorescent DNA dye Hoechst 33342 (the image shown was taken at 24 h post-gentamicin, Fig. 2a, left panel). To elucidate whether those intracellular bacteria were indeed viable, FISH was carried out by using the probes EUB338 and GAM42a (see Methods). Microscopy analysis indicated the presence of metabolically active intracellular bacteria at all time points analysed (1, 4, 8, 12, 16, 24 and 28 h post-gentamicin) (Fig. 2a). The specificity of the FISH probe EUB338 was assessed by the use of the control probe non-EUB338, complementary to EUB338, which did not render any detectable signal (data not shown). Assessment of the number of bacteria metabolically active (FISH-positive) versus the total number of intracellular bacteria (Hoechst-positive) revealed that FISH-positive bacteria were  $76 \pm 8.3$ ,  $77 \pm 1.7$  and  $70 \pm 3.4$  % of total bacteria at 4, 8, and 24 h post-gentamicin, respectively. These data showed that the efficiency of FISH labelling was

maintained throughout the infection. We did not observe changes in overall monolayer density, host cell morphology, or the appearance of actin and microtubule cytoskeleton networks at any infection time (data not shown).

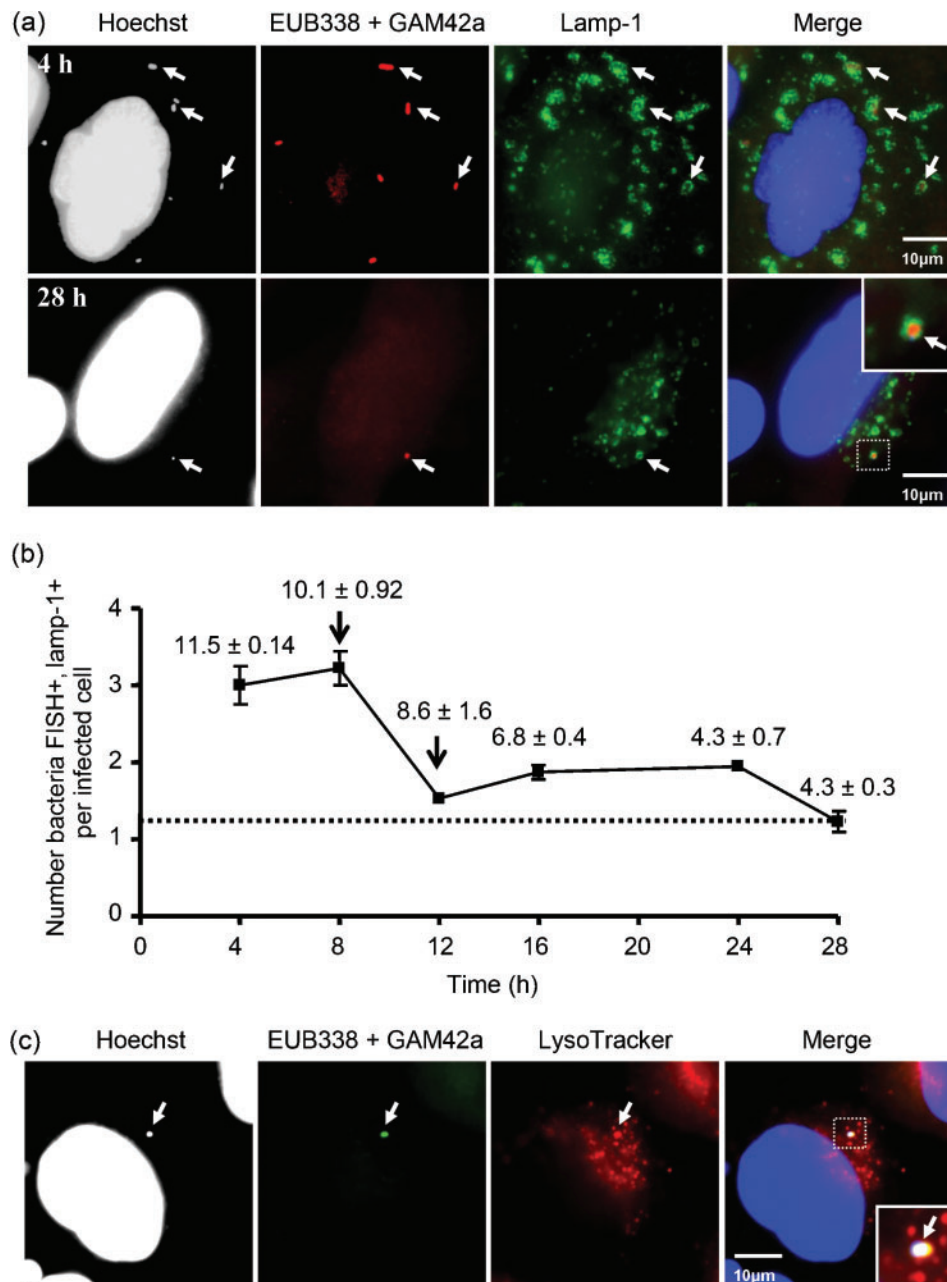
To address the discrepancy observed with c.f.u. plating, infections were carried out as described above and different host cell lysis methods were used separately. The cell lysis solutions used were PBS/saponin (1, 0.5, 0.05 or 0.025 %), PBS/Triton X-100 (1, 0.5, 0.1 or 0.05 %), PBS/Nonidet P-40 (0.5, 0.1 or 0.025 %), PBS, water, PBS/0.25 % trypsin, and scraping with a cell scraper. It should be noted that significant differences in the number of intracellular bacteria recovered were obtained depending on the lysis method used (Supplementary Table S1). Even though cell lysis with PBS/0.025 % saponin gave the highest bacterial recovery (Supplementary Table S1), the c.f.u. values still underestimated the number of bacteria which could be observed by immunofluorescence microscopy, particularly at time points later than 4 h post-gentamicin (Supplementary Table S1 and data not shown).

We next analysed the link between NTHi and the host endocytic machinery by using membrane-impermeant TR-dextran. Fluorescent dextran is a valuable marker for the uptake and internal processing of exogenous materials by endocytic pathways (Swanson, 1989). Addition of this endocytic marker to the medium at the onset of bacterial infection revealed that internalized NTHi co-localized with dextran within cells at 1 h post-gentamicin (Supplementary Fig. S4A), suggesting that NTHi uses elements of the host endocytic machinery to enter epithelial cells. Similar results were obtained for NTHi strains 375, 398 and 2019 (data not shown).

We next assessed the subcellular location of NTHi during infection of A549 cells. We asked whether the subcellular compartment housing NTHi had endosomal features by staining EEA1, an archetypical early endosome marker. A time-course was carried out at 15, 30, 60, 90 and 120 min post-gentamicin. Intracellular NTHi 375 was located in subcellular compartments with early endosome features (EEA1-positive) at 15 min post-gentamicin and could be seen in this type of compartment up to 90 min post-gentamicin (quantification kinetics and an image taken at 1 h post-gentamicin are shown in Fig. 2d and b, respectively). Next, we assessed the location of the late endosome marker lamp-1. The same infection time-course was used to quantify lamp-1 bacterial co-localization (Fig. 2d). EEA1/lamp-1/bacteria triple staining showed that at those time points, bacteria were located intracellularly either in EEA1-positive or in lamp-1-positive compartments, but never in compartments simultaneously labelled with EEA1 and lamp-1. Next, a longer infection time-course was carried out. Co-localization of NTHi with lamp-1 was observed in  $93.8 \pm 4.86$ ,  $93.2 \pm 0.78$  and  $97.5 \pm 1.41$  % of bacteria at 4, 8 and 24 h post-gentamicin, respectively (acquisition kinetics and an image taken at 8 h post-gentamicin are shown in Fig. 2e and c, respectively).



**Fig. 2.** NTHi survival within airway epithelial cells. (a) FISH was used to show that intracellular NTHi is metabolically active. Cells were infected with NTHi 375. Wells were washed and incubated for 1 h with medium containing gentamicin ( $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), and then with medium containing  $11 \mu\text{g gentamicin ml}^{-1}$  for 23 h. Metabolically active bacteria were labelled with probes EUB338-Cy3 and GAM42a-Cy3 (red). DNA was labelled with Hoechst (blue). For a detail, see panel at right. (b) Co-localization of NTHi and the early endosomal marker EEA1. NTHi was stained with rabbit anti-NTHi and Cy2-conjugated donkey anti-rabbit (green) antibodies. EEA1 was stained with goat anti-EEA1 and rhodamine-conjugated donkey anti-goat (red) antibodies. The image was taken at 1 h post-gentamicin. For a detail, see panel at right. (c) Co-localization of NTHi and lamp-1. NTHi was stained with rabbit anti-NTHi and Cy2-conjugated donkey anti-rabbit (green) antibodies. Lamp-1 was stained with mouse anti-lamp-1 and donkey anti-mouse conjugated to rhodamine (red) antibodies. The image was taken at 8 h post-gentamicin. (d) Percentage NTHi 375 co-localization with EEA1 (▲) or with late endosome marker lamp-1 (■) over a 2 h time-course. A549 cells were infected, and coverslips were fixed and stained at the indicated times. (e) Percentage of NTHi 375 co-localization with lamp-1 over a 24 h time-course. Cells were infected, and coverslips were fixed and stained at the indicated times. Results shown in (d) and (e) represent two independent experiments each in which intracellular NTHi from infected cells was scored for EEA1 or lamp-1 co-localization. Values are given as the mean  $\pm$  SEM percentage of NTHi co-localizing with the marker.



**Fig. 3.** NTHi remains metabolically active inside acidic endosomal compartments. (a) Location of FISH-positive NTHi inside lamp-1-positive compartments. NTHi and host cell nuclei were stained with Hoechst (blue), subcellular compartments were labelled with mouse anti-lamp-1 and secondary goat anti-mouse-Cy2 (green) antibodies, and metabolically active bacteria were labelled with the probes EUB338-Cy3 and GAM42a-Cy3 (red). Images were taken at 4 h (upper panels) and 28 h (lower panels) post-gentamicin. (b) Quantification of the number of metabolically active (FISH-positive) intracellular bacteria in lamp-1-positive compartments. Intracellular bacteria were quantified at 4, 8, 12, 16, 24 and 28 h post-gentamicin. Results are represented as number of FISH-positive, lamp-1-positive bacteria per infected cell. At least 1000 cells in two independent experiments were counted per time point. The percentage of infected cells per coverslip at each time point is shown at 4, 8, 12, 16, 24 and 28 h post-gentamicin. (c) Location of FISH-positive NTHi inside acidic compartments. NTHi and host cell nuclei were stained with Hoechst (blue), acidic subcellular compartments were loaded with LysoTracker (red), and metabolically active bacteria were labelled with the probes EUB338-Alexa 488 and GAM42a-Alexa 488 (green). The image was taken at 24 h post-gentamicin. For a detail, see panel at right.

To quantify NTHi intracellular survival, the number of FISH-positive bacteria located inside lamp-1-positive compartments per infected cell was enumerated in at least 1000 cells in two independent experiments, at 4, 8, 12, 16, 24 and 28 h post-gentamicin (images taken at 4 and 28 h post-gentamicin are shown in Fig. 3a). The frequency of FISH-positive, lamp-1-positive NTHi cells per infected cell (i.e. intracellular metabolically active bacteria) was maintained for 8 h, after which a decrease occurred, reaching a plateau that was maintained until the end of the experiment (Fig. 3b). Numbers corresponding to the percentage of infected cells per well at each post-gentamicin time point are shown within Fig. 3(b).

Endosomal compartments acidify during the maturation process (Luzio *et al.*, 2007). The acidotropic probe LysoTracker Red DND-99, a weak base conjugated to a red fluorophore that freely permeates cell membranes and remains trapped in acidified organelles, is used to monitor the maturation of endocytic compartments. Immunofluorescence microscopy revealed intracellular bacteria inside acidic subcellular compartments 15 min post-gentamicin and throughout the entire assay (1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 and 28 h post-gentamicin time points were processed for observation of LysoTracker co-localization). Similar data were obtained for NTHi strains 398, 375 and 2019 (data not shown). Triple staining of subcellular acidic compartments (red), bacteria (blue) and bacterial rRNA (green) was carried out at the time points mentioned above and further confirmed that intracellular bacteria were metabolically active and located inside acidic compartments (an image taken at 24 h post-gentamicin is shown in Fig. 3c). NTHi localization inside acidic compartments was quantified by assessing NTHi/LysoTracker co-localization at 15 min, and 2, 4, 8, 24 and 28 h post-gentamicin. Co-localization was  $53.7 \pm 4.9$ ,  $63.7 \pm 10.2$ ,  $76.5 \pm 4.9$ ,  $74 \pm 2.8$ ,  $76 \pm 8.4$  and  $76 \pm 8.4$ %, respectively.

Given that disturbances of this subcellular niche could affect the intracellular viability of the pathogen, we assessed the effect of inhibiting the vacuolar acidification by treating the cells with bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase. The percentage of infected cells containing FISH-positive, lamp-1-positive bacteria at 4 h post-gentamicin decreased from  $11.5 \pm 0.14$ % (untreated cells) to  $3.70 \pm 1.84$ % (bafilomycin A1-treated cells), and from  $10.05 \pm 0.92$  to  $0.4 \pm 0.57$  at 8 h post-gentamicin.

Together, these data show that intracellular NTHi remains metabolically active in a non-replicative state inside acidic compartments (NTHi-CVs) throughout the course of infection, displaying a persistent population of non-proliferative bacteria from approximately 12 h post-gentamicin to the end of the experiment.

### Acquisition of endocytic markers by the NTHi-CV

We assessed the maturation of the NTHi-CV by analysing bacterial co-localization with late endosomal markers by immunofluorescence microscopy. Labelling of the late endosome markers lamp-2 and CD63 was found to be

positive around intracellular bacteria and was quantified at several post-gentamicin time points. Acquisition kinetics and images taken at 8 h post-gentamicin are shown in Fig. 4.

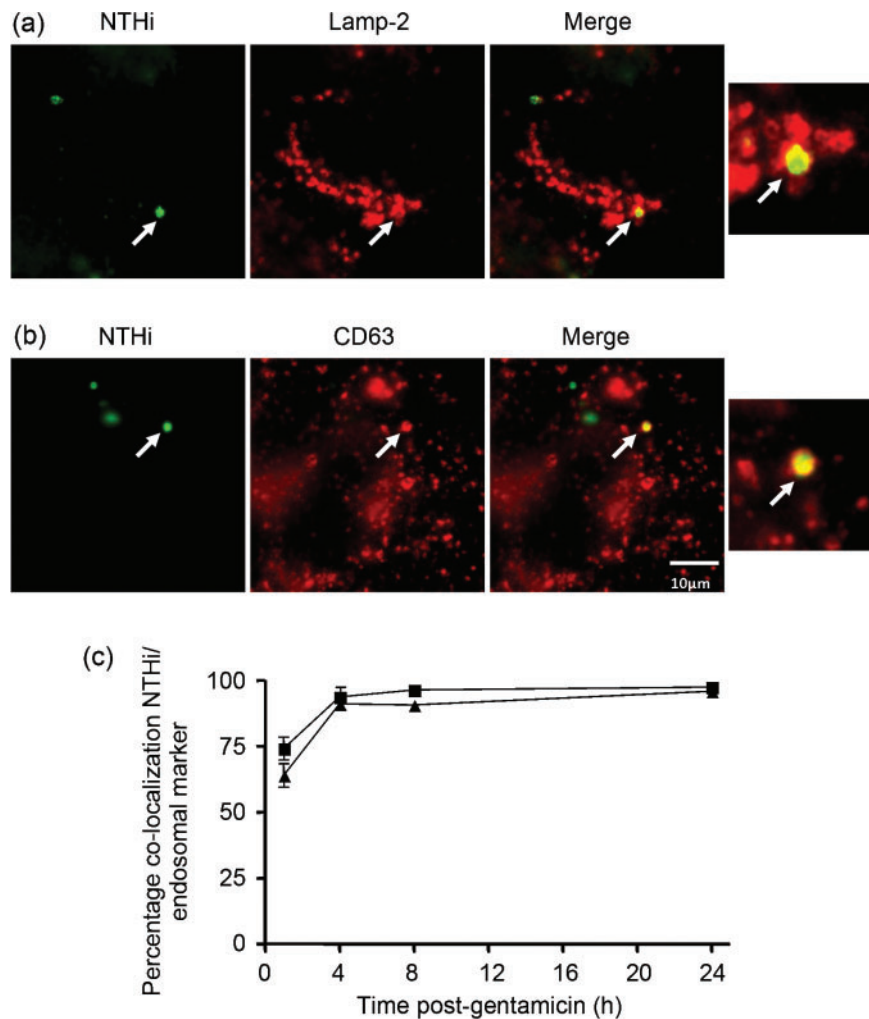
Rab7 is a small G-protein of the Rab family that controls vesicular transport to late endosomes and lysosomes in the endocytic pathway (Haas, 2007). We analysed the trafficking of Rab7 GTPase during NTHi infection of epithelial cells. A549 cells were transfected with a constitutively active Rab7 form fused to GFP (GFP-Rab7Q67L) (Berón *et al.*, 2002) and then infected with NTHi 375. Intracellular bacteria were located in Rab7-positive subcellular compartments at 2 h post-gentamicin, and co-localization could also be observed at later time points, i.e. 4 and 6 h post-gentamicin (Supplementary Fig. S4B).

NTHi may have evolved adaptations to survive within lysosomes or to modulate host cell trafficking events and modify lysosomal fusion, thereby surviving within epithelial cells. To distinguish between these possibilities, we first analysed by immunofluorescence microscopy fusion events between NTHi-CVs and lysosomes by monitoring bacterial co-localization with cathepsin D. Cathepsin D, an aspartyl protease involved in intracellular degradation of exogenous and endogenous proteins, is delivered to the lumen of late endosomes by the mannose-6-phosphate receptor (M6PR) (Kornfeld, 1986; Ludwig *et al.*, 1994; Munier-Lehmann *et al.*, 1996). Cathepsin D is one of the most abundant hydrolases that accumulates in lysosomes as they mature (Garin *et al.*, 2001), and has been used as a marker for lysosomal fusion (Garvis *et al.*, 2001). We used an antibody against cathepsin D to study interactions between this enzyme and the NTHi-CV. At 30, 60 and 90 min, and 2, 4, 6 and 8 h post-gentamicin, cells were fixed, stained and examined by microscopy. At these time-points, fewer than 10% (time-course mean) of NTHi 375 NTHi-CVs co-localized with cathepsin D (Fig. 5a, white bars). Images shown were taken at 8 h post-gentamicin (Supplementary Fig. S5A, B).

To assess the functionality of the A549 host cell lysosomal machinery, an *S. typhimurium*  $\Delta$ invA mutant strain expressing *Yersinia enterocolitica* invasin was used to infect cells (Watson & Galán, 2008). This mutant invaded epithelial cells, and the subcellular compartment in which it resided fused with lysosomes, showing co-localization with cathepsin D ranging from  $32.31 \pm 6.6$ % at 30 min to  $72.27 \pm 5.2$ % at 8 h post-gentamicin (Fig. 5a, black bars, and Supplementary Fig. S5B).

TR-dextran internalized by endocytosis is delivered to and retained by various compartments of the endocytic pathway, including lysosomes. Pulse-chase protocols with TR-dextran have been used to label lysosomes (Lamothe *et al.*, 2007). Prior to NTHi infection, we pulsed epithelial cells with  $25 \mu\text{g TR-dextran ml}^{-1}$  for 2 h followed by a 30 min chase in dye-free medium to allow the probe to be delivered to lysosomes. Cells were then infected and TR-dextran distribution was assessed at 1, 4 and 8 h post-gentamicin,





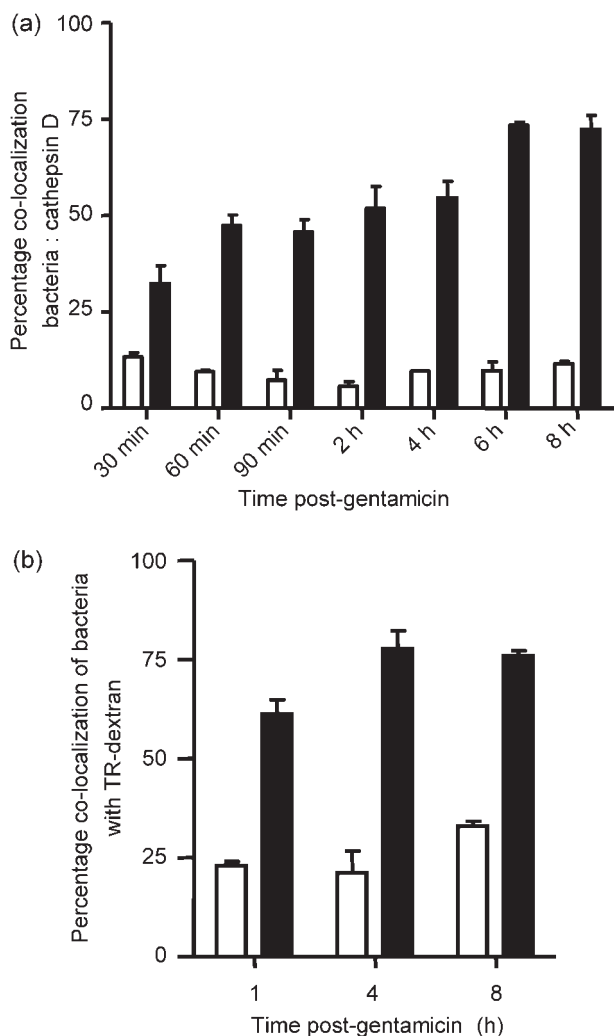
**Fig. 4.** Acquisition of late endosome markers by the NTHi-CV. Co-localization of NTHi with lamp-2 (a) and CD63 (b): NTHi was stained with rabbit anti-NTHi and Cy2-conjugated donkey anti-rabbit (green) antibodies. Lamp-2 and CD63 were stained with mouse anti-lamp-2 or anti-CD63 and donkey anti-mouse conjugated to rhodamine (red) antibodies. Images were taken at 8 h post-gentamicin. (c) Percentage NTHi 375 co-localization with the late endosome markers lamp-2 (■) and CD63 (▲) over a 24 h time-course. A549 cells were infected, and coverslips were fixed and stained at the indicated times. Values are given as mean  $\pm$  SEM percentage of NTHi co-localizing with the marker.

and the marker was shown to be present on average in 25 % of NTHi-CVs (Fig. 5b, white bars). In contrast, when TR-dextran pre-loaded cells were infected with *S. typhimurium*  $\Delta invA$  (invasin), an average of 71.6% of *Salmonella*-containing vacuoles (SCVs) contained the fluid marker, when the distribution was assessed at 1, 4 and 8 h post-gentamicin (Fig. 5b, black bars). Together, these data highlighted that the A549 cell lysosomal machinery was functional.

Several bacterial pathogens exploit a variety of host cell processes, such as the eukaryotic secretory pathway, in which proteins and lipids are modified and transported from the endoplasmic reticulum through the Golgi network to the plasma membrane and other cellular destinations, to establish intracellular organelles (Salcedo & Holden, 2005).

To gain insight into the location and features of the NTHi-CV in relation to host cell organelles, we investigated its position in relation to the Golgi apparatus. A549 cells were infected with NTHi and subsequently stained using an antibody directed against the cis-Golgi-resident protein GM130. Intracellular bacteria, located in acidic compartments, did not co-localize with the cis-Golgi at any time (Supplementary Fig. S6A, upper panels). In a separate set of experiments, cells were transiently transfected with a plasmid expressing GFP-conjugated trans-Golgi-resident protein TGN46, and then infected with NTHi 375. Intracellular bacteria did not co-localize with TGN46 at any time (Supplementary Fig. S6A, lower panels).

Autophagy is a tool of the intracellular host cell defence machinery that bacteria must confront upon cell invasion.



**Fig. 5.** Acquisition of lysosomal markers. (a) Percentage bacterial co-localization with cathepsin D over an 8 h time-course. A549 cells were infected with NTHi (white bars) or with *S. typhimurium*  $\Delta invA$  (invasin) (black bars), and coverslips were fixed and stained at the indicated times. (b) Percentage bacterial co-localization with TR-dextran over an 8 h time-course. Cells were pulse-chased with TR-dextran, then infected and fixed at the indicated times. Cells were infected with NTHi (white bars) or *S. typhimurium*  $\Delta invA$  (invasin) (black bars). In (a) and (b), values are given as mean  $\pm$  SEM percentage of NTHi co-localizing with the marker.

Several pathogens subvert the autophagic pathway as a strategy to establish a persistent infection (Orvedahl & Levine, 2009). We asked whether NTHi-CV displays autophagy features by infecting cells transfected with GFP-tagged LC3 (light chain 3) as an autophagic marker (Guignot *et al.*, 2009) and studying bacterial co-localization with LC3. Autophagy was induced in these cells by treatment with rapamycin. We could not detect co-localization of intracellular NTHi and LC3 at any time (Supplementary Fig. S6B).

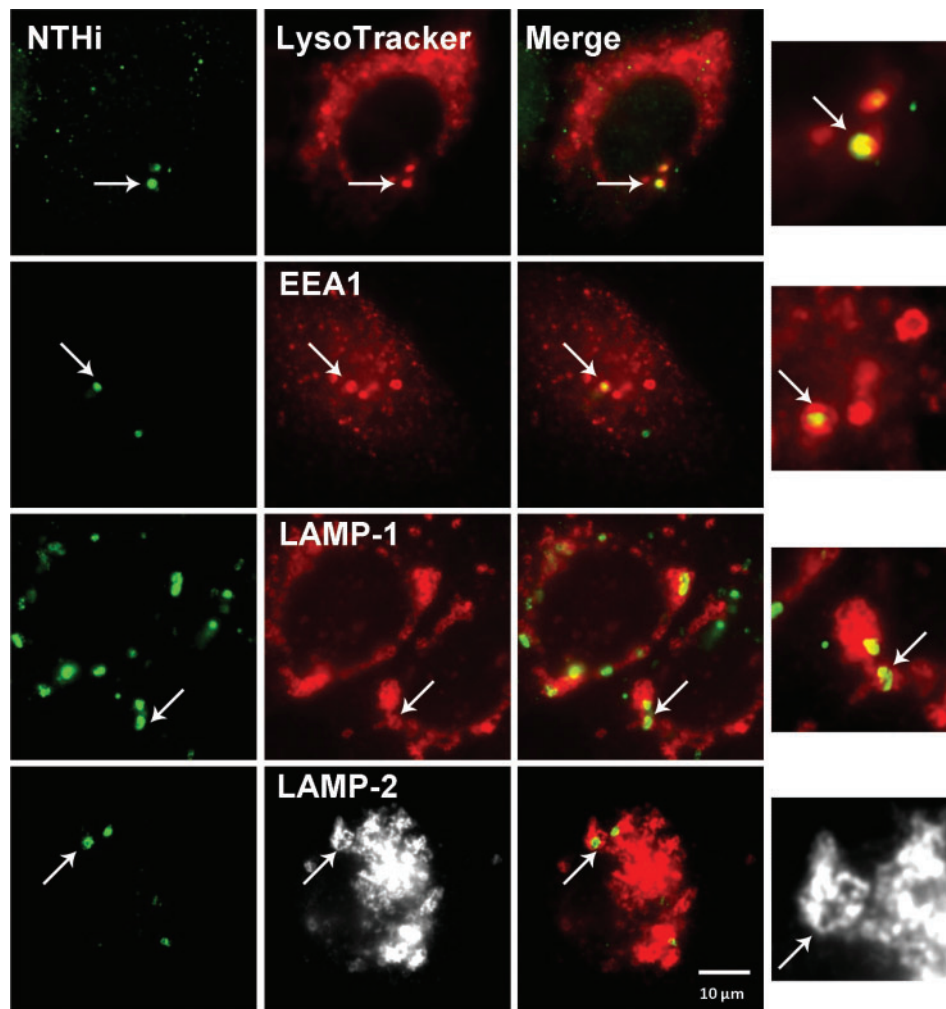
We next asked whether the observations made with A549 cells could be extended to NHBE cells. NHBE cells were

infected with NTHi 375 for 2 h, washed, incubated with medium containing gentamicin at 2 h intervals, fixed and immunostained. Staining of bacteria and host actin or microtubule cytoskeleton(s) did not reveal detectable changes in overall cell morphology upon infection (data not shown). Bacteria located inside NHBE cells co-localized transiently with early endosomal markers, being subsequently located inside subcellular acidic compartments with late endosomal features, identical to the location observed upon A549 cell infection. Transient co-localization with EEA1 was observed at 1 h post-gentamicin (Fig. 6, panels 2). Bacterial co-localization with LysoTracker, lamp-1 and lamp-2 was observed at 4, 8 and 12 h post-gentamicin. Images shown were taken at 4 h post-infection (Fig. 6).

Given its extensively demonstrated role as a virulence factor, we next assessed the involvement of PCho in NTHi survival inside airway epithelial cells. We used a previously described NTHi 375 mutant strain lacking *lic1BC* that does not present PCho modification in its LOS molecule (Supplementary Fig. S2A) (Martí-Llitas *et al.*, 2009). A549 cell infection using the experimental conditions described above showed comparable adhesion and invasion frequencies in wild-type and *lic1BC* mutant strains (Supplementary Fig. S2B, C). Similarly, when the biogenesis and maturation features of the NTHi-CV were determined for NTHi 375  $\Delta lic1BC$ , it was found to transit progressively through subcellular acidic (LysoTracker-positive) compartments, with early (EEA1-positive) or late (lamp-1-, lamp-2- and CD63-positive) endosome features, identical to those of the NTHi wild-type strain (Supplementary Fig. S7). The general appearance of infection was indistinguishable in the two strains. To quantify NTHi  $\Delta lic1BC$  intracellular survival, the number of FISH-positive bacteria located inside lamp-1-positive compartments per infected cell was enumerated as described above (see Fig. 3b and Supplementary Fig. S8). The image shown in Supplementary Fig. S8 was taken at 8 h post-gentamicin. The percentages of infected cells at this time point did not vary significantly between wild-type and  $\Delta lic1BC$  mutant strains, being  $10.1 \pm 0.92$  and  $10.5 \pm 0.14$  %, respectively. Similar findings were observed upon NHBE cell infection with NTHi strain 375  $\Delta lic1BC$  (data not shown).

## DISCUSSION

In this study we provide evidence showing that NTHi resides within airway epithelial cells without proliferating, in a vacuolar compartment referred to as the NTHi-CV. The pathogen transits temporarily through a compartment with early endosome characteristics that later acquires late endosome features, including acidic pH and the late endosomal markers lamp-1, lamp-2, CD63 and Rab7. Most NTHi-CVs do not fuse with lysosomes. On average, fewer than 10 % of NTHi-CVs were associated with cathepsin D at 8 h after gentamicin addition. To the best of our knowledge, the current study describes for the first time the features of NTHi life inside non-phagocytic cells.



**Fig. 6.** Maturation of NTHi-CV inside NHBE cells. Acidic subcellular compartments were loaded with LysoTracker (red). Co-localization of NTHi and the early endosomal marker EEA1: NTHi was stained with rabbit anti-NTHi and donkey anti-rabbit conjugated to Cy2 (green) antibodies. EEA1 was stained with goat anti-EEA1 and donkey anti-goat conjugated to rhodamine (red) antibodies. Co-localization of NTHi and the late endosomal markers lamp-1 and lamp-2: NTHi was stained with rabbit anti-NTHi and donkey anti-rabbit conjugated to Cy2 (green) antibodies. Lamp-1 and lamp-2 were stained with mouse anti-lamp-1 or anti-lamp-2 and donkey anti-mouse conjugated to rhodamine (red) antibodies. For a detail of each staining, see panels at right. The EEA1 image was taken at 1 h post-gentamicin; LysoTracker, lamp-1 and lamp-2 images were taken at 4 h post-gentamicin. Images were taken with a monochrome camera and software-coloured; the last panel was kept monochrome for clarity.

NTHi is a causative agent of persistent respiratory infections. When thinking about chronic bacterial infections, distinctive features should be taken into account for a set of persistent pathogens carried asymptotically in the nasopharynx which have the ability to cause life-threatening diseases under predisposing conditions (Kadioglu *et al.*, 2008; Monack *et al.*, 2004; Perez Vidakovics & Riesbeck, 2009; Virji, 2009). Thus, NTHi is likely to have developed strategies to be an asymptomatic colonizer of the nasopharynx, and also, under certain circumstances, to be a symptomatic colonizer of the lower respiratory tract. A recent study has analysed the events of persistent bacterial infections using game theory, where

pathogen and host are two players with a conflict of interest. This theoretical model predicts that during persistent infections, pathogenic bacteria stay in both intra- and extracellular compartments of the host, implying that the pathogen should be able to survive in both locations to cause persistent infection (Eswarappa, 2009). NTHi nicely fulfils this model by matching the data presented in the current study, in which we introduce NTHi intracellular life features inside non-phagocytic cells, with an extensive body of evidence regarding different aspects of its extracellular life, including, among others, the formation of biofilms (Erwin & Smith, 2007; Hong *et al.*, 2007a, b; Moxon *et al.*, 2008; Murphy & Kirkham, 2002).

Although the NTHi invasion rate may seem low, it should be pointed out that there are multiple examples of bacterial pathogens with a rate of invasion similar to that of NTHi whose intracellular lifestyles contribute significantly to the overall progression of the infection. Examples are, among others, *Neisseria* spp. and *Listeria monocytogenes* (Binker *et al.*, 2007; Lambotin *et al.*, 2005; Veiga & Cossart, 2006; Virji, 2009). Earlier studies have shown that NTHi invades non-phagocytic cells (Ahrén *et al.*, 2001; Ketterer *et al.*, 1999; St Geme, 2002; St Geme & Falkow, 1990; Swords *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 1991); some mechanistic insights into the invasion process have been provided (Ketterer *et al.*, 1999; Swords *et al.*, 2001). Other data indicate that NTHi resides intracellularly within membrane-bound vacuoles (St Geme, 2002). Analysis of human adenoid tissue and bronchial human biopsies further supports the notion that NTHi may remain viable intracellularly (Bandi *et al.*, 2001; Forsgren *et al.*, 1994). In this work, we have extended these earlier observations, and our data show that NTHi internalization is an unusual microtubule-dependent endocytosis process which requires the integrity of host plasma membrane lipid rafts and the activation of PI3K signalling. Most bacterial pathogens able to invade non-phagocytic cells subvert the host actin cytoskeleton to internalize. In contrast, NTHi belongs to a small number of pathogens, including *Campylobacter jejuni*, *L. monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Porphyromonas gingivalis* and *Vibrio hollisae*, which need the polymerization of the host microtubule network to invade, instead of requiring actin assembly (Yoshida & Sasakawa, 2003). In fact, actin cytoskeleton depolymerization stimulated invasion by NTHi, similar to reported data for *C. jejuni* (Oelschlaeger *et al.*, 1993). Given that currently available genomic information excludes the existence of a type III secretion system (T3SS) in the NTHi genome (Harrison *et al.*, 2005), we postulate that NTHi entry into airway epithelium could be regarded as a zipper-like (Cossart & Sansonetti, 2004), microtubule polymerization-dependent process. Future studies will aim to confirm this hypothesis and to analyse the balance between actin and microtubule cytoskeleton dynamics in the context of NTHi entry.

Once inside the host cell, NTHi was found to be metabolically active for a long period of time. However, widely used methods for intracellular bacteria recovery and quantification using detergents (i.e. Triton X-100 or saponin at concentrations higher than 0.025 %) were not appropriate to recover intracellular NTHi, hence underestimating the extent of its intracellular survival at post-gentamicin times longer than 4 h. This is in good agreement with the fact that the NTHi outer membrane is permeable to hydrophobic agents (Martínez de Tejada & Moriyón, 1993). Therefore, special attention should be paid when this type of agent is used. It should be noted that dissection of *C. jejuni* life inside intestinal epithelial cells has shown that intracellular bacteria acquire a metabolic state that renders them unculturable under standard culture conditions (Watson & Galán, 2008). An independent study has shown that it is not possible to

obtain accurate viable cell counts of intracellular *Burkholderia cepacia* inside *Acanthamoeba polyphaga* due to difficulties with the use of membrane-impermeable antibiotics (Lamothe *et al.*, 2004). Together, these observations emphasize the fact that culture and/or recovery conditions should be optimized for each pathogen and sample origin. Moreover, bacteria plating-based methods should be used in parallel with microscopy, to reach a more comprehensive understanding of the host-pathogen interplay under study. In this work, we used microscopic single-cell analysis and assessed bacterial viability based on FISH. FISH-positive staining was taken as an index of bacterial ribosomes, and therefore as a method to address NTHi viability or metabolic activity (Amann *et al.*, 1995; Bertaux *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 1999). We could quantify the metabolically active intracellular bacterial load for up to 28 h post-infection. It should be noted that a 5' fluorescein-tagged DNA oligomer that recognizes *H. influenzae* 16S rRNA has been used as a probe for the *in situ* detection of this pathogen in adenoid tissue sections of human origin (Forsgren *et al.*, 1994).

The features of NTHi-CVs became evident at early post-gentamicin time points, when we could determine the late endosome signature of this subcellular compartment, which was constant to the end of the infection. The intracellular NTHi population was stable for 8 h post-gentamicin, then underwent a decrease to enter a second plateau that was maintained to the end of the assay. The acquisition of cathepsin D or of TR-dextran by intracellular NTHi was observed in a low percentage of bacteria. The host cell lysosomal machinery was shown to be functional, given that the SCV harbouring *S. typhimurium*  $\Delta invA$  (invasin) increasingly co-localized with cathepsin D in a time-dependent manner, and also accumulated TR-dextran. The bacterial decrease observed at 8 h could be due to the small amount of lysosomal fusion observed, but we cannot rule out that it was due to the physiology of the pathogen itself, establishing an intracellular, metabolically active, non-proliferative bacterial population. Pathogens use a variety of strategies to survive intracellularly. Some pathogens, such as *L. monocytogenes* and *Shigella flexneri*, break and escape out of the phagocytic vacuoles and replicate within the cytosol of the infected cells (Ray *et al.*, 2009). Other pathogens, such as *Leishmania*, have evolved adaptations to survive the hostile environment of the phagolysosome, which is characterized by low oxygen tension, poor nutrient content, low pH, and microbicidal agents such as antimicrobial peptides and lysosomal enzymes (Amer & Swanson, 2002). A growing number of intracellular pathogens is now known to have developed strategies to create a unique/customized intracellular niche in which they survive by avoidance of lysosomal fusion and/or by acquisition of autophagic or secretory network-related features (García-del Portillo *et al.*, 2008; Kumar & Valdivia, 2009; Watson & Galán, 2008). The results presented here reveal that the NTHi-CV creates a niche favourable to remaining within host cells without replicating. This could be related to a

separation from the canonical endocytic pathway or to a block in the delivery of lysosomal enzymes from the biosynthetic pathway. In agreement with our observations, it has been reported that *Bartonella*, uropathogenic *E. coli*, *C. jejuni*, *B. cepacia* and *Salmonella enterica* produce long-lasting infections inside cells without proliferating, a means of intracellular colonization that protects the pathogen from host immunity (Cano *et al.*, 2001; Lamothe *et al.*, 2004; Martínez-Moya *et al.*, 1998; Mysorekar & Hultgren, 2006; Schülein *et al.*, 2001; Watson & Galán, 2008; Wright *et al.*, 2007). In turn, this implies that disturbances of this niche should affect the intracellular viability of the pathogen. Indeed, in the case of NTHi, inhibition of vacuolar compartment acidification by treatment of cells with a specific inhibitor of vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase significantly reduced NTHi intracellular survival.

Given that a wealth of evidence has demonstrated the importance of LOS decoration with PCho in several aspects of NTHi pathogenesis, we explored its involvement in NTHi intracellular life. Intracellular bacteria remained within acidic compartments with late endosome features, indistinguishable from wild-type NTHi-CVs. Significant differences between NTHi 375 wild-type and  $\Delta lic1BC$  mutant strains regarding adhesion and invasion were not observed. NTHi isolates display a high variability in terms of genetic content and gene expression, likely to have an impact in bacterial–host interaction dynamics (Gilsdorf *et al.*, 2004). Differences regarding the genetic content of NTHi bacterial isolates, cell lines and the experimental procedures used for infection could explain the divergence observed between our data and the existing literature with respect to PCho involvement in NTHi adhesion and entry into epithelial cells. The data presented here should be considered as complementary to earlier information (Swords *et al.*, 2000). Future studies will attempt to elucidate bacterial factors associated with the intracellular features of NTHi.

NTHi is the most frequently isolated bacterial pathogen in the lungs of COPD patients (Foxwell *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 1999). COPD is a respiratory disease with a 50 % prevalence among heavy smokers, characterized by a not fully reversible airflow limitation associated with an abnormal inflammatory response in the small airways, emphysema, and chronic bacterial colonization of the lower respiratory tract (Cosio *et al.*, 1978; Rennard & Vestbo, 2006; Sethi, 2000; Sethi & Murphy, 2008). There is evidence that COPD patients display elevated levels of antimicrobial peptides, metalloproteases and surfactant in their lower respiratory tract, together with neutrophil infiltration. Moreover, Th1 cell-mediated inflammation and interferon (IFN)- $\gamma$ -mediated activation of macrophages and B lymphocytes contribute to COPD progression (Cosio *et al.*, 2009; Kaufmann & Schaible, 2005). NTHi overcomes humoral and cellular immune responses and, as a result, COPD patients are chronically colonized. Based on the results shown in this work, we propose that NTHi intracellular colonization may contribute to protecting the pathogen from host immunity

and from antibiotic therapies, hence facilitating the chronic colonization frequently observed in COPD patients. In conclusion, we show here a novel aspect of the interplay of NTHi with the human airway epithelium, i.e. the fact that the pathogen can survive inside epithelial cells, located within a subcellular, membrane-bound compartment. The ability of NTHi to survive both intra- and extracellularly during the infection process may be essential to its chronic persistence inside the host.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr M. Apicella (University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, IA, USA) for providing NTHi 2019 and plasmid pBSLerm, Dr G. Frankel (Imperial College London, UK) for anti-*Salmonella* LPS antibody, Dr F. García-del Portillo (CSIC, Madrid, Spain) for providing *S. typhimurium*  $\Delta invA$  (invasin), and Dr J. Pizarro-Cerdá (Institut Pasteur, Paris, France) for providing the GFP-Rab7Q67L, GFP-TGN46 and GFP-LC3 plasmids. We also thank Drs Nogales, Moranta, Llobet, Frank and Berger for their help with experimental procedures and for helpful discussions. J. G. has been a recipient of a Contrato de Investigador Miguel Servet from Instituto de Salud Carlos III. This work has been funded by grants from Instituto de Salud Carlos III (CP05-00027, PI06/1251, PI09/0130) and Fundación Mutua Madrileña to J. G. CIBERES is an initiative from Instituto de Salud Carlos III, Spain.

## REFERENCES

- Ahrén, I. L., Williams, D. L., Rice, P. J., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2001). The importance of a  $\beta$ -glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic and epithelial cells. *J Infect Dis* **184**, 150–158.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143–169.
- Amer, A. O. & Swanson, M. S. (2002). A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* **5**, 56–61.
- Bandi, V., Apicella, M. A., Mason, E., Murphy, T. F., Siddiqi, A., Atmar, R. L. & Greenberg, S. B. (2001). Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 2114–2119.
- Berón, W., Gutierrez, M. G., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. (2002). *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun* **70**, 5816–5821.
- Bertaux, J., Schmid, M., Prevost-Boure, N. C., Churin, J. L., Hartmann, A., Garbaye, J. & Frey-Klett, P. (2003). *In situ* identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4243–4248.
- Binker, M. G., Cosen-Binker, L. I., Terebiznik, M. R., Mallo, G. V., McCaw, S. E., Eskelinen, E. L., Willenborg, M., Brumell, J. H., Saftig, P. & other authors (2007). Arrested maturation of *Neisseria*-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2. *Cell Microbiol* **9**, 2153–2166.
- Bouchet, V., Hood, D. W., Li, J., Brisson, J. R., Randle, G. A., Martin, A., Li, Z., Goldstein, R., Schweda, E. K. & other authors (2003). Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8898–8903.

- Cano, D. A., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M. G., Groisman, E. A., Casadesus, J. & García-del Portillo, F. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**, 6463–6474.
- Christensen, H., Hansen, M. & Sorensen, J. (1999). Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1753–1761.
- Cosio, M., Ghezzi, H., Hogg, J. C., Corbin, R., Loveland, M., Dosman, J. & Macklem, P. T. (1978). The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med* **298**, 1277–1281.
- Cosio, M. G., Saetta, M. & Agusti, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **360**, 2445–2454.
- Cossart, P. & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**, 242–248.
- Erwin, A. L. & Smith, A. L. (2007). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol* **15**, 355–362.
- Eswarappa, S. M. (2009). Location of pathogenic bacteria during persistent infections: insights from an analysis using game theory. *PLoS ONE* **4**, e5383.
- Fink, D. L., Buscher, A. Z., Green, B., Fernsten, P. & St Geme, J. W., III (2003). The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* **5**, 175–186.
- Forsgren, J., Samuelson, A., Ahlin, A., Jonasson, J., Rynnel-Dagoo, B. & Lindberg, A. (1994). *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by *in situ* hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun* **62**, 673–679.
- Foxwell, A. R., Kyd, J. M. & Cripps, A. W. (1998). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 294–308.
- Galán, J. E., Ginocchio, C. & Costeas, P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA* – homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* **174**, 4338–4349.
- García-del Portillo, F. & Finlay, B. B. (1994). *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infect Immun* **62**, 4641–4645.
- García-del Portillo, F., Núñez-Hernández, C., Eisman, B. & Ramos-Vivas, J. (2008). Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol* **11**, 46–52.
- Garin, J., Díez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. & Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**, 165–180.
- Garvis, S., Beuzón, C. & Holden, D. W. (2001). A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cell Microbiol* **3**, 731–744.
- Gilsdorf, J. R., Marrs, C. F. & Foxman, B. (2004). *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infect Immun* **72**, 2457–2461.
- Guignot, J., Hudault, S., Kansau, I., Chau, I. & Servin, A. L. (2009). Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect Immun* **77**, 517–531.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**, 311–330.
- Harrison, A., Dyer, D. W., Gillaspay, A., Ray, W. C., Mungur, R., Carson, M. B., Zhong, H., Gipson, J., Gipson, M. & other authors (2005). Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. *J Bacteriol* **187**, 4627–4636.
- Hendrixson, D. R. & St Geme, J. W., III (1998). The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* **2**, 841–850.
- Holmes, K. A. & Bakaletz, L. O. (1997). Adherence of non-typeable *Haemophilus influenzae* promotes reorganization of the actin cytoskeleton in human or chinchilla epithelial cells *in vitro*. *Microb Pathog* **23**, 157–166.
- Hong, W., Mason, K., Jurcisek, J., Novotny, L., Bakaletz, L. O. & Swords, W. E. (2007a). Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **75**, 958–965.
- Hong, W., Pang, B., West-Barnette, S. & Swords, W. E. (2007b). Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* **189**, 8300–8307.
- Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. (1987). Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769–778.
- Ji, W. T. & Liu, H. J. (2008). PI3K-Akt signaling and viral infection. *Recent Pat Biotechnol* **2**, 218–226.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* **6**, 288–301.
- Kaufmann, S. H. & Schaible, U. E. (2005). Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Opin Immunol* **17**, 79–87.
- Kenjale, R., Meng, G., Fink, D. L., Juehne, T., Ohashi, T., Erickson, H. P., Waksman, G. & St Geme, J. W., III (2009). Structural determinants of autolysis of the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter. *Infect Immun* **77**, 4704–4713.
- Ketterer, M. R., Shao, J. Q., Hornick, D. B., Buscher, B., Bandi, V. K. & Apicella, M. A. (1999). Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* **67**, 4161–4170.
- Kornfeld, S. (1986). Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* **77**, 1–6.
- Kruskal, B. A., Sastry, K., Warner, A. B., Mathieu, C. E. & Ezekowitz, R. A. (1992). Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor. *J Exp Med* **176**, 1673–1680.
- Kumar, Y. & Valdivia, R. H. (2009). Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe* **5**, 593–601.
- Lambotin, M., Hoffmann, I., Laran-Chich, M. P., Nassif, X., Couraud, P. O. & Bourdoulous, S. (2005). Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipooligosaccharide. *J Cell Sci* **118**, 3805–3816.
- Lamothe, J., Thyssen, S. & Valvano, M. A. (2004). *Burkholderia cepacia* complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of *Acanthamoeba polyphaga*. *Cell Microbiol* **6**, 1127–1138.
- Lamothe, J., Huynh, K. K., Grinstein, S. & Valvano, M. A. (2007). Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. *Cell Microbiol* **9**, 40–53.
- Ludwig, T., Munier-Lehmann, H., Bauer, U., Hollinshead, M., Ovitt, C., Lobel, P. & Hoflack, B. (1994). Differential sorting of lysosomal

- enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J* **13**, 3430–3437.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 622–632.
- Lysenko, E. S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J. M. & Weiser, J. N. (2000). Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**, 1664–1671.
- Mañes, S., del Real, G. & Martínez, A. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**, 557–568.
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K. H. & Stenstrom, T. A. (1993). *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S-rRNA-directed and 23S-rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2293–2298.
- Martí-Literas, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D. W., Saus, C., Sauleda, J., Agustí, A. G., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2009). Non-typable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* **77**, 4232–4242.
- Martínez de Tejada, G. & Moriyón, I. (1993). The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J Bacteriol* **175**, 5273–5275.
- Martínez-Moya, M., de Pedro, M. A., Schwarz, H. & García-del Portillo, F. (1998). Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Res Microbiol* **149**, 309–318.
- Monack, D. M., Mueller, A. & Falkow, S. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* **2**, 747–765.
- Moxon, E. R., Sweetman, W. A., Deadman, M. E., Ferguson, D. J. & Hood, D. W. (2008). *Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact? *Trends Microbiol* **16**, 95–100.
- Munier-Lehmann, H., Mauxion, F., Bauer, U., Lobel, P. & Hoflack, B. (1996). Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* **271**, 15166–15174.
- Murphy, T. F. & Kirkham, C. (2002). Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol* **2**, 7.
- Mysorekar, I. U. & Hultgren, S. J. (2006). Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14170–14175.
- Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. & 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.
- Oelschlaeger, T. A., Guerry, P. & Kopecko, D. J. (1993). Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6884–6888.
- Orvedahl, A. & Levine, B. (2009). Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* **16**, 57–69.
- Pang, B., Winn, D., Johnson, R., Hong, W., West-Barnette, S., Kock, N. & Swords, W. E. (2008). Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**, 2037–2043.
- Perez Vidakovic, M. L. & Riesbeck, K. (2009). Virulence mechanisms of *Moraxella* in the pathogenesis of infection. *Curr Opin Infect Dis* **22**, 279–285.
- Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2004). Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat Cell Biol* **6**, 1026–1033.
- Power, P. M., Sweetman, W. A., Gallacher, N. J., Woodhall, M. R., Kumar, G. A., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2009). Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol* **9**, 216–228.
- Rao, V. K., Krasan, G. P., Hendrixson, D. R., Dawid, S. & St Geme, J. W., III (1999). Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 99–129.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J. & Tang, C. M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 333–340.
- Regueiro, V., Campos, M. A., Morey, P., Sauleda, J., Agustí, A. G., Garmendia, J. & Bengoechea, J. A. (2009). Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Eur Respir J* **33**, 273–281.
- Rennard, S. I. & Vestbo, J. (2006). COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet* **367**, 1216–1219.
- Rosenberger, C. M., Brumell, J. H. & Finlay, B. B. (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol* **10**, R823–R825.
- Salcedo, S. P. & Holden, D. W. (2005). Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**, 92–98.
- Schüle, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C., Hansmann, Y., Piemont, Y. & Dehio, C. (2001). Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med* **193**, 1077–1086.
- Schweda, E. K., Richards, J. C., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2007). Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol* **297**, 297–306.
- Sethi, S. (2000). Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* **117**, 286S–291S.
- Sethi, S. & Murphy, T. F. (2001). Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* **14**, 336–363.
- Sethi, S. & Murphy, T. F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **359**, 2355–2365.
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B. J. & Murphy, T. F. (2002). New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **347**, 465–471.
- St Geme, J. W., III (2002). Molecular and cellular determinants of non-typable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol* **4**, 191–200.
- St Geme, J. W., III & Falkow, S. (1990). *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **58**, 4036–4044.
- Swanson, J. (1989). Fluorescent labeling of endocytic compartments. *Methods Cell Biol* **29**, 137–151.
- Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver, S. I., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2000). Non-typable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* **37**, 13–27.
- Swords, W. E., Ketterer, M. R., Shao, J., Campbell, C. A., Weiser, J. N. & Apicella, M. A. (2001). Binding of the non-typable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell Microbiol* **3**, 525–536.

- Veiga, E. & Cossart, P. (2006).** The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends Cell Biol* **16**, 499–504.
- Virji, M. (2009).** Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol* **7**, 274–286.
- Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D. J., Alexandrescu, C. & Moxon, E. R. (1991).** Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb Pathog* **10**, 231–245.
- Watson, R. O. & Galán, J. E. (2008).** *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog* **4**, e14.
- Weiser, J. N., Pan, N., McGowan, K. L., Musher, D., Martin, A. & Richards, J. (1998).** Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory

tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med* **187**, 631–640.

**West-Barnette, S., Rockel, A. & Swords, W. E. (2006).** Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. *Infect Immun* **74**, 1828–1836.

**Wright, K. J., Seed, P. C. & Hultgren, S. J. (2007).** Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* **9**, 2230–2241.

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

---

Edited by: V. J. Cid





### **Nontypable *Haemophilus influenzae*: an intracellular phase within epithelial cells might contribute to persistence**

In this issue, Morey *et al.* (2011) present experimental evidence showing intracellular survival of nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) in infected epithelial cells *in vitro*. After internalization, bacteria seem to remain in a quiescent non-replicative state inside an acidic subcellular compartment with markers of late endosomes, which the authors name the NTHi-containing vacuole (NTHi-CV). While invasive disease caused by encapsulated type b *H. influenzae* has been efficiently controlled in developed countries due to the widespread use of the conjugated vaccine, unencapsulated NTHi remains prevalent in the aetiology of bacterial respiratory infections, especially in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. It is known that NTHi can persistently colonize the respiratory tract of COPD patients, despite culture-negative sputum, and, more importantly, despite the presence of antibodies against the pathogen (Murphy *et al.*, 2004). This strongly suggests that NTHi has found a way to hide in the tissue. The data of Morey and colleagues showing that NTHi can invade airway epithelial cells at low rates and remain in a metabolically active state intracellularly may shed some light on the potential reservoir for persistent NTHi colonizers. Such an intracellular niche would enable bacteria to resist antibiotic therapy and be protected from the adaptive immune response of the host. It remains to be demonstrated whether these bacteria can then exit cells to be released back into the respiratory tract and be associated with the severe exacerbation episodes characteristic of COPD patients. Nonetheless, the possibility that NTHi has a transient intracellular state during infection should now be considered to improve therapy

and management of COPD patients chronically infected with NTHi.

The virulence determinants of this opportunistic pathogen are largely unknown. Biofilm formation has been related to the chronicity and severity of the disease, although the involvement of biofilms in pathogenicity is still a matter of controversy (reviewed by Moxon *et al.*, 2008; Erwin & Smith, 2007). Also, invasive behaviour has been related to the presence of phosphatidylcholine (PCho) in the exposed lipooligosaccharide (LOS) (Swords *et al.*, 2000), which has also been related to biofilm formation and the resistance to clearance of the bacteria in an animal model (Pang *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2007). In this report, Morey and colleagues conclude that invasion of epithelial cells is independent of the presence of PCho in the LOS, but that the process requires membrane lipid rafts, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity and the involvement of tubulin, but not the actin cytoskeleton. This adds new perspectives to our understanding of the strategies of interaction of NTHi with the host.

The study by Morey and colleagues raises new questions that must now be addressed experimentally to establish the clinical relevance of their observations. Encouragingly, the *in vitro* infection setting established in this report should allow identification in the future of the molecular determinants of invasion and the factors that modulate maturation of the NTHi-CV and their potential arrest in a compartment with late-endosomal features. A note of caution should be

added, since several recent studies have highlighted the fact that pathogens formerly thought to avoid fusion with lysosomes (such as *Salmonella* and *Brucella*) do in fact interact significantly with these compartments, a process only visible with live cell imaging (Drecktrah *et al.*, 2007; Starr *et al.*, 2008). On a bacterial level, it would be interesting to analyse the switch of virulent extracellular NTHi into a quiescent intracellular state, perhaps by further characterizing the physiological properties of these latent bacteria. Understanding the mechanisms underlying the intracellular behaviour of NTHi might shed some light on the pathology of the disease, as well as on the elusive question of what enables NTHi to persist within patients hidden from the host inflammatory response.

**Suzana P. Salcedo<sup>1,2,3</sup> and Víctor J. Cid<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Aix Marseille Université, Faculté des Sciences de Luminy, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), UMR6546, Marseille, F-13288, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U631, F-13288, France

<sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR6102, Marseille, F-13288, France

<sup>4</sup>Dpto de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRyCIS), Madrid-28040, Spain

**Microbiology Comment** provides a forum for discussion of scientific issues arising directly from papers published in the journal. The authors of papers under discussion will be offered an opportunity to respond.

Guidelines on how to submit a *Microbiology Comment* article can be found in the Instructions for Authors at <http://mic.sgmjournals.org>

It should be noted that the Editors of *Microbiology* do not necessarily agree with the views expressed in *Microbiology Comment*.

A. Fouet, Editor-in-Chief

Correspondence: Víctor J. Cid  
(vicjid@farm.ucm.es)

**Drecktrah, D., Knodler, L. A., Howe, D. & Steele-Mortimer, O. (2007).** *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic* **8**, 212–225.

**Erwin, A. L. & Smith, A. L. (2007).** Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol* **15**, 355–362.

**Hong, W., Pang, B., West-Barnette, S. & Swords, W. E. (2007).** Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* **189**, 8300–8307.

**Morey, P., Cano, V., Marti-Llitas, P., López-Gómez, A., Regueiro, V., Saus, C., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2011).** Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* **157**, 234–250.

**Moxon, E. R., Sweetman, W. A., Deadman, M. E., Ferguson, D. J. & Hood, D. W. (2008).** *Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact? *Trends Microbiol* **16**, 95–100.

**Murphy, T. F., Bruer, A. L., Schiffmacher, A. T. & Sethi, S. (2004).** Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 266–272.

**Pang, B., Winn, D., Johnson, R., Hong, W., West-Barnette, S., Kock, N. & Swords, W. E. (2008).**

Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**, 2037–2043.

**Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. & Celli, J. (2008).** *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**, 678–694.

**Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg, K., II, Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2000).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* **37**, 13–27.

DOI 10.1099/mic.0.046722-0

# Nontypable *Haemophilus influenzae* Displays a Prevalent Surface Structure Molecular Pattern in Clinical Isolates

Pau Martí-Llites<sup>1,2,9</sup>, Antonio López-Gómez<sup>1,2,9</sup>, Silvia Mauro<sup>1</sup>, Derek W. Hood<sup>4</sup>, Cristina Viadas<sup>1</sup>, Laura Calatayud<sup>2,5,8,9</sup>, Pau Morey<sup>1,2</sup>, Alain Servin<sup>10</sup>, Josefina Liñares<sup>2,5,8,9</sup>, Antonio Oliver<sup>6</sup>, José Antonio Bengoechea<sup>1,2,3</sup>, Junkal Garmendia<sup>1,2,7\*</sup>

**1** Programa de Infección e Inmunidad, Fundación Caubet-CIMERA, Bunyola, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias-CIBERES, Vitoria, Spain, **3** Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, Madrid, Spain, **4** Molecular Infectious Diseases Group, Department of Paediatrics, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Headington, Oxford, United Kingdom, **5** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Bellvitge, Barcelona, Spain, **6** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma Mallorca, Spain, **7** Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra, Mutilva, Spain, **8** Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, Spain, **9** Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain, **10** INSERM, UMR 756, Signalisation and Physiopathology of Epithelial cells, Paris, France

## Abstract

Non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a Gram negative pathogen that causes acute respiratory infections and is associated with the progression of chronic respiratory diseases. Previous studies have established the existence of a remarkable genetic variability among NTHi strains. In this study we show that, in spite of a high level of genetic heterogeneity, NTHi clinical isolates display a prevalent molecular feature, which could confer fitness during infectious processes. A total of 111 non-isogenic NTHi strains from an identical number of patients, isolated in two distinct geographical locations in the same period of time, were used to analyse nine genes encoding bacterial surface molecules, and revealed the existence of one highly prevalent molecular pattern (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C+*, *ompP5+*, *oapA+*) displayed by 94.6% of isolates. Such a genetic profile was associated with a higher bacterial resistance to serum mediated killing and enhanced adherence to human respiratory epithelial cells.

**Citation:** Martí-Llites P, López-Gómez A, Mauro S, Hood DW, Viadas C, et al. (2011) Nontypable *Haemophilus influenzae* Displays a Prevalent Surface Structure Molecular Pattern in Clinical Isolates. PLoS ONE 6(6): e21133. doi:10.1371/journal.pone.0021133

**Editor:** Dipshikha Chakravorty, Indian Institute of Science, India

**Received:** February 4, 2011; **Accepted:** May 20, 2011; **Published:** June 16, 2011

**Copyright:** © 2011 Martí-Llites 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 was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Spain) with references CP05-0027, PI06-1251 and PS09-0130, and from Fundación Mutua Madrileña 2008 to JG, and by a grant from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Spain) with reference PS09-1904 to JL. 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: junkal.garmendia@unavarra.es

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The Gram-negative bacterium nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a commensal organism in the human upper respiratory tract, and a cause of diseases, including otitis media, conjunctivitis, sinusitis, pneumonia, chronic bronchitis and progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [1]. This opportunistic pathogen is provided of molecular mechanisms devoted to evade host immunity. A number of studies have reported NTHi ability to resist killing by humoral immunity components such as complement and antimicrobial peptides [2–3], and to colonise respiratory epithelial cells by adhesion and biofilm formation [4–5], and invasion and intracellular location [6]. Differential genome content between isolates has been reported [7]; this aspect also contributes to bacterial escape from the host immunity. Genetic polymorphisms occur at a high rate within the NTHi population; a major factor contributing to NTHi genetic diversity is DNA exchange by horizontal gene transfer [8]. Phase variation, the reversible high-frequency on/off switching of gene expression mediated by mutations in simple sequence repeats (SSRs) located

within the open reading frame (ORF) or the promoter of a gene, also contributes to diversity. SSRs, predominantly comprised of tetranucleotide repeat units, mediate phase variable expression of multiple molecules expressed on the bacterial surface; the repertoire of SSRs varies between NTHi strains [9]. SSRs control expression of epitopes playing a role in molecular mimicry: phosphorylcholine (PCho) mimics the eukaryotic platelet associated factor (PAF) and is a ligand for the PAF receptor; digalactose mimics human P<sup>k</sup> antigen; sialic acid (5-acetylneuraminic acid or Neu5Ac) is frequently present in host cell membrane glycosphingolipids [10–11].

Genetic variability between NTHi isolates underlies the striking heterogeneity of the lipooligosaccharide (LOS) outer core, a major virulence determinant. NTHi LOS is a complex glycolipid comprising a membrane-anchoring lipid A linked by a single 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (Kdo) to an heterogeneous oligosaccharide composed of neutral heptose (Hep) and hexose (Hex) sugars, but lacks an O antigen [11]. Each Hep of a conserved trisaccharide inner core can be a point for the addition of Hex and further chain extensions, the degree and pattern of which varies

among strains [11] (Fig. 1). The genetic blueprint for NTHi LOS biosynthesis is known; *lgtF* encodes a glycosyltransferase responsible for adding glucose as the first sugar to HepI [12]; *lic2C* and *lpsA* encode glycosyltransferases that initiate sugar extensions from HepII and HepIII, respectively [12]. The *lic1* operon (*lic1A* to *lic1D*) encodes four proteins responsible for the synthesis and transfer of PCho to the LOS [13]. The *lic2A*, *lgtC* and *lex2B* genes encode glycosyltransferases required to add a digalactose to the LOS [14]. Sialic acid is incorporated to LOS as a terminal sugar by four sialyltransferases encoded by *lic3A*, *siaA*, *lsgB* and *lic3B* [15–16]. The multiple LOS components contribute to its heterogeneity, and influence the biology of the bacteria [11]. PCho plays a role in NTHi resistance to antimicrobial peptides and serum, association with epithelium, and biofilm formation [3,17–20]. Digalactose is associated with virulence and resistance to complement [21–22]. LOS sialylation renders NTHi resistant to complement-mediated killing and plays some role in biofilm formation [23–25]. The *lic2C*, *lic2B* and *lic3B* genes are variably present among NTHi strains [12,15,24,26]; *lic1A*, *lic2A*, *lgtC*, *lex2A*, *lic3A* and *lic3B* contain SSRs based on tetranucleotide repeats [9,27–28].

NTHi strains may express a repertoire of proteins to adhere to the respiratory epithelium; typically, PE, Hap, HMW1, HMW2, Hia, Hap, P2, P5 and OapA outer membrane proteins are nonpilus adhesins [29–31]. These proteins often display sequence diversity between strains; given their potential variability, two of these proteins were selected for further analysis in the current study. P5, encoded by *ompP5* [32–33], is a member of the OmpA protein family; P5 contains host-adhesive domains that bind to human mucin and to the surface-expressed carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in human pulmonary epithelial cells [34–35]. OapA mediates epithelial adhesion via an unknown receptor [29].

A relationship between NTHi pathogenesis and genomic content has been proposed, and several studies have highlighted the importance of LOS and adhesins on NTHi pathogenesis [7,26,36–41]. In this study, we hypothesised that NTHi isolates could be distinguished by genotypic and/or phenotypic signatures,

which could be associated with their capacity to interact with the host. Indeed, a survey of nine genes encoding bacterial surface molecules in a NTHi collection of non-isogenic clinical isolates revealed a highly prevalent molecular pattern with potential clinical implications. Such a molecular pattern could have an influence in bacterial host cell adhesion and in resistance to serum mediated killing.

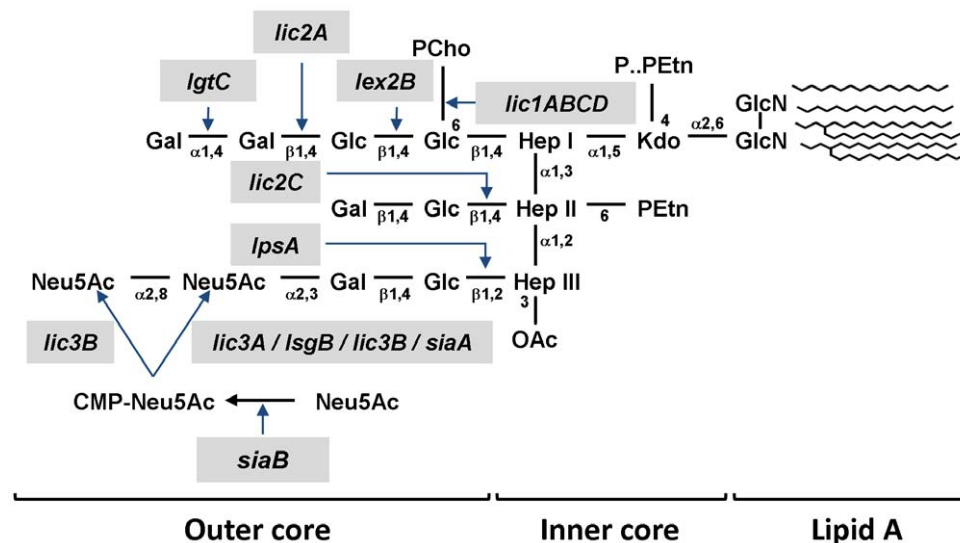
## Results

### Molecular epidemiology of a collection of NTHi clinical isolates

A total of 111 NTHi strains from 111 patients suffering respiratory (pneumonia, bronchiolitis, sinusitis, acute bronchitis, acute tracheobronchitis, common cold) and non-respiratory (conjunctivitis, bacteremia, otitis media, colonisation in lung carcinoma) infections, and chronic respiratory diseases exacerbations (COPD, cystic fibrosis, bronchiectasis, diffuse parenchymatous lung disease, chronic asthma, chronic interstitial lung disease, polycystic lung) were collected in two Spanish hospitals within January–June 2008 (Table S1). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis indicated that all 111 NTHi isolates had unique genomic compositions (data not shown).

### Distribution and prevalence of bacterial surface structure-related genes

The collection of NTHi isolates was PCR-screened for the presence or absence of nine genes encoding proteins responsible for the expression of surface-exposed molecules (Fig. S1A and S1B and Table S2). Strain Rd KW20 was used as a control because its genome has been fully sequenced [42]. Genes were chosen based on their potential to be variably present (*lic3B*, *siaA*, *lic2C*), variably expressed (*lic2A*, *lic1D*, *lic3A*, *lic3B*), sequence variable (*ompP5*, *oapA*), or invariable present (*lgtF*). The screening revealed three different gene patterns, named 1 to 3 (Table S3). Pattern 2 (*lgtF*+, *lic2A*+, *lic1D*+, *lic3A*+, *lic3B*+, *siaA*–, *lic2C*+, *ompP5*+, *oapA*+) was the most prevalent (94.6% of isolates) in both strain sets (92.2% in Hospital Universitario Bellvitge-HUB, 97.9% in Hospital Son



**Figure 1. Schematic representation of NTHi LOS structure.** Relevant sugars linked by the products from the genes *lgtF*, *lic2C*, *lpsA*, *lic3A*, *lic3B*, *siaA*, *lsgB*, *lic1ABCD*, *lic2A*, *lgtC* and *lex2B* are shown. Abbreviations: Kdo, 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; Glc, D-glucose; Gal, D-galactose; PEtn, phosphoethanolamine; P, phosphate; PCho, phosphocholine. For each LOS structure the heptose backbone comprises from top to bottom HepI, HepII and HepIII.

doi:10.1371/journal.pone.0021133.g001

Espases-HSE). NTHi398 [6,43] belongs to pattern 2. Pattern 1 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA-*, *lic2C-*, *ompP5+*, *oapA+*), found in 4.5% of isolates, was present only in strains collected in HUB; pattern 3 (*lgtF+*, *lic2A+*, *lic1D+*, *lic3A+*, *lic3B+*, *siaA+*, *lic2C-*, *ompP5+*, *oapA+*), found in 0.9% of isolates, was present only in strains collected in HSE. Main differences among patterns were driven by *lic2C* and *siaA*. Given that those genes encode a glycosyltransferase initiating sugar extension from HepII and a sialyltransferase, respectively, sugar extension from HepII and sialylation were found to be variable modifications in the NTHi LOS molecule.

The *lic2A* gene was present in 100% of strains. Gel electrophoresis revealed *lic2A* size differences among isolates, likely due to the length of the 5'-CAAT-3' SSR present within the 5' region of *lic2A* ORF (Fig. S1C). Nineteen isolates representing the three molecular patterns defined were selected for further characterization; pattern 1 (NTHi1500, NTHi1559, NTHi1560); pattern 2 (NTHi398, NTHi1513, NTHi1549, NTHi1553, NTHi1556, NTHi1557, NTHi1558, NTHi1566, NTHi1568, NTHi1606, NTHi1607, NTHi1621, NTHi1622, NTHi1623); and pattern 3 (NTHi1619) (Table 1). Those isolates contained between 7 and 33 5'-CAAT-3' repeats in their *lic2A* coding sequences (Fig. S1C and Table S4). The *lic2A* gene has the 5'-CAAT-3' repeat tract preceded by putative initiation codons in two reading frames, x/y codons in frame 1 and z1/z2 codons in frame 2 [44–45]. Fifteen out of 19 (78.9%) isolates contained an in frame *lic2A* gene. The 73.3% of isolates belonging to pattern 2 conserved one reading frame (Table S4). NTHi1550 (pattern 2) showed a *lic2A* PCR product of significantly higher molecular

weight than the rest of strains (Fig. S1C), 49 5'-CAAT-3 units in the SSR within this *lic2A* gene, which would be non-permissive for translation.

The *lic3A* and *lic3B* genes were present in 100% of isolates. PCR products of equivalent size were obtained for each gene in all strains, as the respective SSR was not included in the amplified portion of each gene. The *siaA* gene was found in 0.9% of isolates. The reasons accounting for the low prevalence observed for *siaA* are currently unknown. The extended presence of both *lic3A* and *lic3B* would favour LOS sialylation and, consequently, NTHi phenotypes related to such a LOS modification.

P5 and OapA were selected based on the notion that they display sequence diversity among strains, which could modulate their immunogenic and/or adhesive properties; 100% of isolates contained both genes. The *ompP5* PCR product was size invariable. A PRED-TMBB  $\beta$ -barred analysis predicted five extracellular loop domains (1–5) for P5 [46]. Each predicted P5 extracellular loop was sequenced in the 19 selected isolates (Table S5). A point mutation rendered a premature stop codon in *ompP5* from NTHi1568. Sequence alignments showed different degrees of variability for each predicted loop, i.e. loop 1, 16 different sequences; loop 2, 13 different sequences; loop 3, 11 different sequences; loop 4, 8 different sequences; loop 5, 3 different sequences (Table S5). The sequence of loop 1, predicted to be the longest extracellular domain, was of two types. A region encompassing the motif GINNGAIK (red) was found in P5 from 17 isolates; two isolates contained the motif GVRAMGKQ (blue). A comparable motif distribution had been reported previously [33]. Loops 2, 3 and 5 were of similar length; loop 4 was the shortest.

**Table 1.** Features of NTHi isolates selected for further characterisation.

NTHi strain	Clinical data	Sample type	Molecular pattern	$\alpha$ -PCho reactivity	$\alpha$ -4C4 reactivity	Sialic acid
1500	<sup>a</sup> COPD	sputum	1	high	<sup>d</sup> –	<sup>e</sup> +
1559	pneumonia	BAL <sup>f</sup>	1	high	–	–
1560	COPD	sputum	1	high	+/-	+
<sup>b</sup> 398	COPD	sputum	2	high	–	+
1513	COPD	sputum	2	high	–	+
1549	COPD	transthoracic needle aspiration	2	high	+/-	+
1553	COPD	sputum	2	double	–	+
1556	COPD	sputum	2	double	–	+
1557	COPD	sputum	2	high	++	+
1558	bronchiectasis	sputum	2	high	–	–
1566	COPD	sputum	2	double	–	+
1568	COPD	sputum	2	high	+/-	–
<sup>c</sup> 1606	bronchiectasis	sputum	2	low	–	+
1607	COPD	sputum	2	high	+	–
1621	COPD	bronchial aspiration	2	high	–	–
1622	bronchiolitis	nasopharynx exudate	2	high	++	+
1623	COPD	bronchial aspiration	2	high	–	+
1630	acute tracheobronchiolitis	sputum	2	high	+++	–
1619	cystic fibrosis	nasopharynx exudate	3	high	++	+

<sup>a</sup>COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

<sup>b</sup>398: reference NTHi strain, isolated in HSE and used previously [36–37].

<sup>c</sup>Strains in this table listed below and including NTHi1606 were isolated in HSE. Strains 1500–1568 were isolated in HUB.

<sup>d</sup>Signal intensity upon reaction with 4C4 antibody: –, no signal; from +/- to +++, increasing signal.

<sup>e</sup>LOS sialylation: –, absence of sialylated forms; +, presence of sialylated forms.

<sup>f</sup>BAL: bronchoalveolar lavage.

doi:10.1371/journal.pone.0021133.t001

The *oapA* PCR products were size variable between strains (data not shown). Six different sequences were found; Table S6 shows sequence differences for the region of the gene starting at aa 195. 61.1% of isolates had Rd KW20-like sequence; 5.6% had Hi Eagan (type b)-like sequence containing a 12 amino acid insertion [29]; other isolates displayed four additional insertion sequences. Taking as a reference the OapA longest sequence, encompassing two QAEQP sequence repeats (red) (NTHi1622), we found 61.1% of strains with a 12 aa deletion, 5.6% of strains with a 32 aa deletion; 5.6% of strains with a 35 aa deletion; 11.1% of strains with a 44 aa deletion; and 11.1% of isolates with a 48 aa deletion (Table S6).

Together, the analysis of seven LOS biosynthesis and two outer membrane protein encoding genes in a collection of NTHi clinical isolates revealed three patterns of distribution, one of them being prevalent.

### NTHi lipooligosaccharide phenotypic distribution among clinical isolates

By having multiple phase-variable loci, NTHi can generate a range of LOS glycoforms that allow the organism to adapt to different host microenvironments [11,28]. We assessed the expression and distribution of three phase variable LOS modifications involved in virulence, PCho, sialic acid and digalactose, in the subset of NTHi isolates under study. Addition of PCho to NTHi LOS requires the *lic1ABCD* operon [13]. *lic1D*, encoding the PCho transferase, was shown to be present in 100% of strains. PCho incorporation to LOS is dependent on the number of phase-variable 5'-CAAT-3' repeats in the SSR within the *lic1A* reading frame. All strains expressed PCho; 77.5% of strains (45% from HUB and 32.5% from HSE) displayed high PCho levels; 4.5% displayed low PCho levels (all from HUB); 18% of strains (8.1% from HUB and 9.9% from HSE) displayed a mixture of high or low expressing colonies. 76.2% of strains belonging to the prevalent pattern 2 showed high PCho signal.

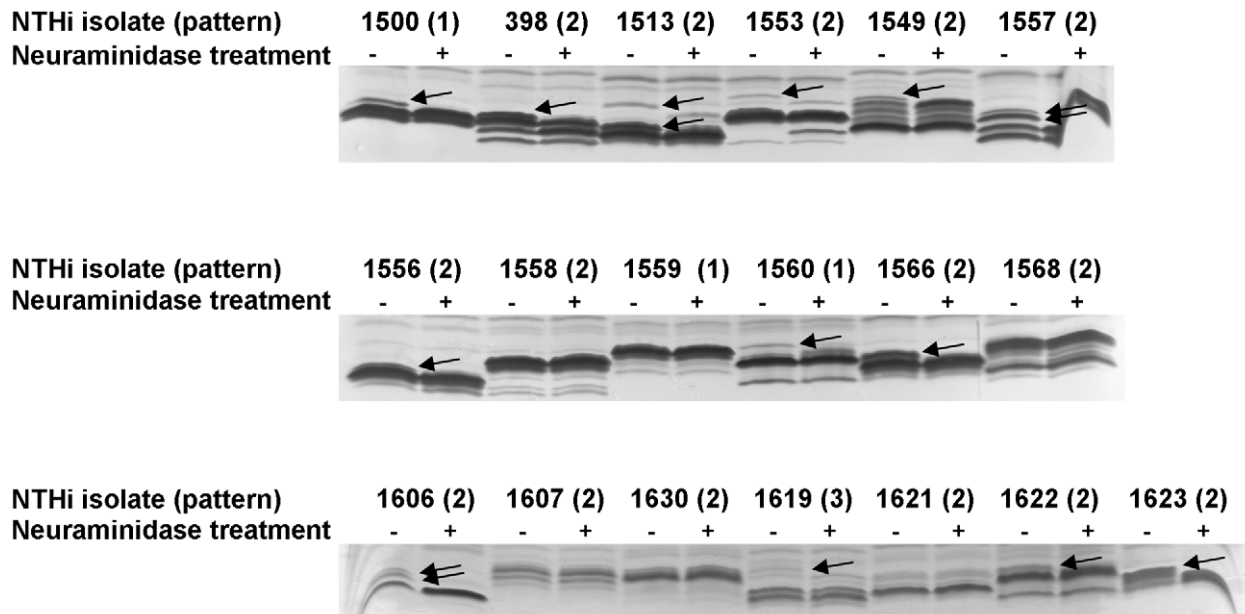
LOS from our selected subset of isolates was analysed by SDS-PAGE, following neuraminidase treatment to assess sialic acid decoration. Electrophoretic profiles showed heterogeneity (Fig. 2). Neuraminidase treatment resulted in lessening or removal of one or more LOS bands in 13/19 (68.4%) of strains, indicating a variable degree and pattern of sialylation (Fig. 2). 66.6% of strains belonging to pattern 2 showed sialylation. All strains contained a combination of two or the three sialyltransferases analysed, *lic3A*, *lic3B* and *siaA*, suggesting that variation in gene content and/or expression could contribute to LOS sialylation diversity.

Analysis of LOS digalactose by dot-blot in our selected subset of isolates showed that 8 of 19 isolates (42.1%) reacted with mAb 4C4; 60% of strains belonging to pattern 2 gave a positive signal with mAb 4C4 (Table 1). Strains with a number of 5'-CAAT-3' repeats in their *lic2A* SSR non-permissive for translation of full-length Lic2A (see Table S4, NTHi398, 1513, 1556, and 1558) did not react with mAb 4C4. Isolates containing a number of 5'-CAAT-3' repeats permissive for Lic2A translation displayed heterogeneous 4C4 reactivity (Table 1).

These data showed diversity among NTHi isolates regarding LOS electrophoretic profile that was independent of gene pattern. PCho decorated all LOS analysed and sialic acid was also present in the LOS of most strains tested.

### Contribution of molecular patterns to NTHi serum resistance and epithelial adhesion

We assessed the contribution of the prevalent genetic signature observed to NTHi interaction with the human serum and the respiratory epithelium. We assessed serum mediated killing by incubating bacteria with an increasing range of serum doses (serum percentage ranged between 0.15% and 10%). Table 2 shows serum resistance for three strains belonging to pattern 1 (table 2 upper region, NTHi1500, NTHi1560, NTHi1559), fourteen strains belonging to pattern 2 (table 2 middle region, NTHi1566-NTHi1568), and one strain belonging to pattern 3



**Figure 2. Electrophoresis profiles of LOS isolated from representative NTHi strains.** LOS from representative NTHi strains were isolated and separated after SDS-PAGE; strains NTHi1500, 1559, 1560 (pattern 1); NTHi398, 1513, 1549, 1553, 1556, 1557, 1558, 1566, 1568, 1606, 1607, 1621, 1622, 1623, 1630 (pattern 2); NTHi1619 (pattern 3). A pair of profiles, before (–) and after (+) neuraminidase treatment, is shown for each strain. Arrows show bands removed or altered following neuraminidase treatment. doi:10.1371/journal.pone.0021133.g002

(table 2 lower region, NTHi1619). Resistance to serum mediated killing was greater for isolates belonging to pattern 2 (NTHi1566, 1513, 1553, 1557, 398 and 1622) (Table 2). The widest differences among strains were observed at 10, 5 and 2.5% serum. Serum resistance levels correlated to the presence of sialic acid on the LOS (Table 2, labeled with \*), in agreement with previous findings [47]. No good correlation between digalactose presence and serum resistance could be established (Table 2, labeled with  $\pm$ ).

We next assessed the adhesion of our selected subset of NTHi strains to human airway epithelium, by using A549 cells as a model. Although the level of bacterial adhesion varied between strains, a number NTHi isolates belonging to pattern 2 (NTHi1622, 398, 1566, 1513, 1557), were more adherent (Fig. 3). NTHi1622 binding to A549 cells was significantly higher than the adhesion of the rest of strains tested; NTHi1566 adhesion was significantly higher than all strains tested, except NTHi398; NTHi398 adhesion was significantly higher than all strains tested, except NTHi1500.

The P5 protein has been shown to be a bacterial ligand for the CEACAM1 receptor [34–35]. CEACAM1 expression on A549 cells has been reported [35–48]; tightly confluent/over-confluent A549 monolayers seem to present significant levels of CEACAM1 [49]. Given that P5 extracellular loops were found to be highly variable among strains, this diversity could account for different bacterial capacity to bind to CEACAM1, which could determine differential bacterial adhesion rates. To guarantee the receptor presence on A549 cells, adhesion assays were carried out by using over-confluent A549 cell monolayers, where CEACAM1 could be detected by western blot (Fig. 4D). Adhesion to A549 over-

confluent cells was analysed for seven strains (representative of genetic patterns 1, 2 and 3, and representative of high, medium and low adhesion to A549 cell). Those strains showed a host cell adhesion trend similar to the one shown before (Figs. 3 and 4A). NTHi1622 adhesion was significantly higher than the adherence shown by the rest of strains tested; NTHi1500, 398, 1566 and 1619 displayed an intermediate adhesion capacity; NTHi1566 and NTHi1606 showed lower adhesion than the rest of strains tested.

To further guarantee CEACAM1 presence, identical adhesion assays were carried out by using HeLa-BGP (biliary glycoprotein or CD66a, currently known as CEACAM1) cells [50], a HeLa derivative cell line stably expressing hCEACAM1-4L (Fig. 4D). Adhesion to HeLa-BGP cells was analysed for the same subset of seven strains, displaying host cell adhesion patterns similar to those found for A549 cells (Figs. 3 and 4B). Considering the heterogeneous isolation sources of the NTHi strains under study, we also assessed bacterial adhesion to a different respiratory epithelial cell type. The analysis of NTHi adhesion to Detroit 562 human pharynx epithelial cells for the same subset of seven strains is shown in Fig. 4C. In general terms, NTHi adhesion to Detroit 562 cells was higher than adhesion to A549 or HeLa-BGP cells. NTHi1622 and NTHi1566 displayed higher adhesion than the rest of strains tested. NTHi398 showed an intermediate adhesion level; NTHi1500, 1560, 1606 and 1619 seemed to be lower binders. CEACAM1 could also be detected on Detroit 562 cell extracts (Fig. 4D).

In summary, NTHi isolates belonging to the most prevalent gene pattern are more resistant to complement mediated killing and adhere better to airway epithelial cells. Adhesion capacity varies among strains. Comparable adhesion diversity was found for a subset of strains showing different P5 extracellular loops sequence when adhesion to three independent human cell lines expressing CEACAM1 receptor was assessed.

**Table 2.** Resistance to normal human serum for representative NTHi strains.

NTHi strain	Serum percentage						
	10%	5%	2.5%	1.25%	0.6%	0.3%	0.15%
1500*	0	0	0	1,2	36,8	64,6	89,5
1560* $\pm$	0	8,2	29,2	42,5	60,7	70,8	62,6
1559	1,3	6,7	13,8	23,1	39,1	53,1	68,4
1566*	16	68,6	110,7	102,8	103	102,8	84,6
1513*	13,5	36,5	63,5	82	108,8	105	97,8
1553*	10,9	50	74,1	91,5	94,1	102,1	105,9
1557* $\pm$	0	33,7	55	97,6	98,8	103,6	90,5
398*	0	21,8	79,2	88,4	99,5	93,5	93,7
1622* $\pm$	1,5	10,8	46,4	74,5	77,8	82,5	84,5
1549* $\pm$	2,1	10,8	22,7	38,6	55,9	75,9	81,7
1623*	0,6	5,4	23,2	54,8	75	68,5	82,7
1606*	0	0	36,3	55,5	69,2	76,9	93,4
1607 $\pm$	2	28,8	59,9	75,4	91,5	94	83,5
1621	0,3	5,4	23,7	63,2	75,3	70,9	77,9
1558	0,3	0,6	14,1	28	48,5	67,6	71,5
1630 $\pm$	0	0,6	11,4	53,6	80,5	84,7	77
1568 $\pm$	0	0	0,6	7,2	30,2	56,3	75,8
1619* $\pm$	0,9	4,3	20,1	33,8	53,3	68,5	77,7

Results are expressed as percentage survival of inoculating bacteria against serum concentration.

\*LOS is sialylated.

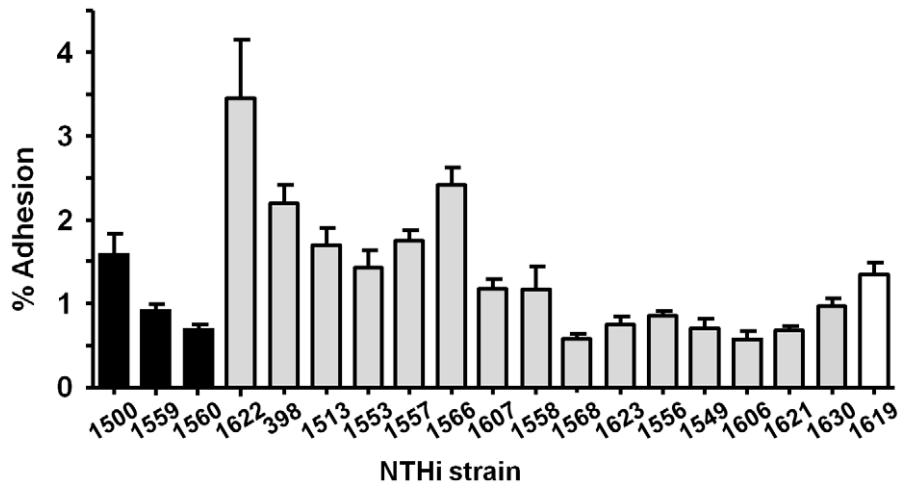
$\pm$ LOS contains digalactose.

doi:10.1371/journal.pone.0021133.t002

## Discussion

We analysed the distribution, conservation and expression of genes encoding NTHi surface structures, which revealed a prevalent molecular pattern in a collection of non-isogenic NTHi clinical isolates from different pathological origins. The fact that all isolates rendered different PFGE profiles gives further support to the notion that NTHi genetic content is heterogeneous among isolates [8]. Strains belonging to the identified prevalent pattern showed prominent levels of resistance to serum mediated killing and adhesion to respiratory epithelium, suggesting that this molecular signature could be advantageous for NTHi pathogenicity. This notion has been observed for *Staphylococcus aureus*, by establishing genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates [51]. Strains endowed with the identified prevalent signature contain *lgtF*, *lic2A*, *lic1D*, *lic3A*, *lic3B*, *lic2C*, *ompP5* and *oapA*. Of note, Rd KW20, extensively used as a reference strain in *H. influenzae* studies, does not present the same molecular profile. Indeed, Rd KW20 molecular profile is *lgtF*+, *lic2A*+, *lic1D*+, *lic3A*+, *lic3B*–, *siaA*+, *lic2C*–, *ompP5*+, *oapA*+. Gene pattern 2 facilitates sugar chain extensions from HepI and HepII in the LOS. Although sugar extensions from HepIII were not analysed here, *lpsA* is present in NTHi strains tested to date [12]. A previous survey on NTHi otitis media isolates showed *lic2C* in 48.1% of strains [12]. We observed significantly higher *lic2C* prevalence (94.6%) in our NTHi collection. Same trend was observed for *lic3B*, present in 100% of isolates in our collection, but in 60% of previously analysed NTHi otitis media isolates [15]. Such different gene prevalence could relate to differences in strain collection size or anatomical origin.

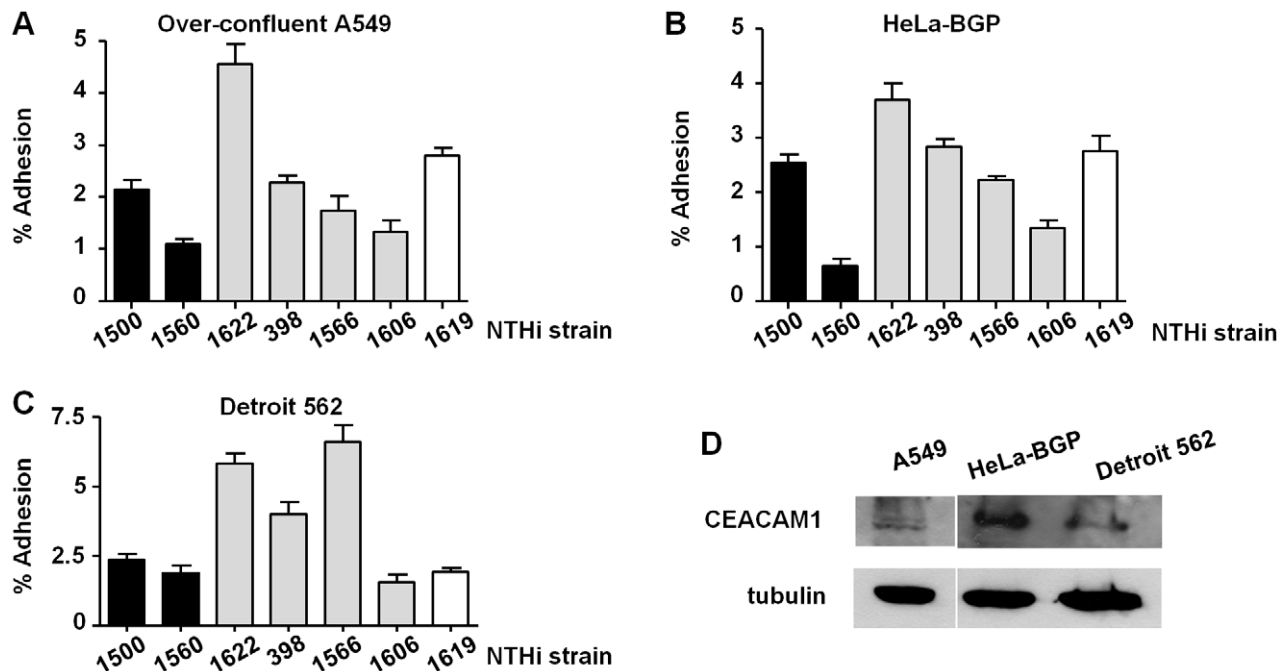




**Figure 3. Adhesion of representative NTHi clinical isolates to A549 airway epithelial cells.** NTHi strains were used to infect A549 cells at an MOI of 100:1 for 30 min. Bacterial adhesion was quantified following lysis of host cells, serial dilution, and viable counting. The level of adhesion was determined as follows: percent adhesion = (cfu output/cfu input) × 100. Black bars correspond to strains with pattern 1; gray bars to strains with pattern 2; white bar to strain with pattern 3. doi:10.1371/journal.pone.0021133.g003

The *lic1A*, *lic2A*, *lic3A* and *lic3B* genes contain multiple copies of a tetranucleotide repeat within the 5' end of their coding sequences. The repeat copy number can vary due to slipped-strand mispairing, resulting in altered gene expression and LOS structural variation [28]. Our complete strain collection expressed PCho, mostly at a high level. Although PCho addition to LOS is variable, dependent on *lic1A* phase variation [22], its ubiquitous

expression in our isolates would support that PCho expression is advantageous for the pathogen. In fact, PCho promotes NTHi infection and persistence by reducing host inflammatory response and promoting the formation of stable biofilms [17–18,52]. The *lic2A* gene was also present in all isolates; however, when LOS decoration with digalactose was assessed, expression was variable within and between strains. MAb 4C4 interacts with a digalacto-



**Figure 4. Adhesion of representative NTHi isolates to over-confluent A549, to HeLa-BGP and to Detroit 562 pharynx epithelial cells.** NTHi strains were used to infect (A) over-confluent A549, (B) HeLa-BGP and (C) Detroit 562 epithelial cells at an MOI of 100:1 for 30 min. Bacterial adhesion was quantified following lysis of host cells, serial dilution, and viable counting. The level of adhesion was determined as follows: percent adhesion = (cfu output/cfu input) × 100. (D) Detection of human CEACAM1 receptor in confluent A549, HeLa-BGP and Detroit 562 epithelial cells by Western Blot with mouse anti-CEACAM1 and goat anti-mouse conjugated to horseradish peroxidase antibodies (upper panel). Extracts were prepared from non-infected cells. Detection of tubulin (bottom panel) was used as control. In (A), (B) and (C), black bars correspond to strains with pattern 1; gray bars to strains with pattern 2; white bar to strain with pattern 3. doi:10.1371/journal.pone.0021133.g004

side epitope when located as the terminus of a globotetraose extension from HepI or HepII; this expression could change due to phase variation in the *lic2A*, *lgtC* or *lex2* loci. All isolates tested carry at least two sialyltransferase genes and most isolates express sialylated LOS. Four sialyltransferase encoding genes have been identified so far in *H. influenzae* strains [15–16]. This functional redundancy could be focused to favor LOS sialylation, supporting the notion of a relevant role for this LOS modification during NTHi infection. In agreement with previous reports [24], we found a correlation between LOS sialylation and serum resistance. Of note, epidemiological data suggest that LOS sialylation could be linked to disease severity [53].

The *ompP5* gene encodes putative surface-exposed loops, highly heterogeneous between strains. Previous studies showed *ompP5* sequence variability [32–33]; an *ompP5* orthologue in *H. parasuis* shows diversity among isolates [46]. Given that P5 has immunodominant properties [54], NTHi is likely to evolve a high variability rate in this protein to evade adaptive immunity. P5 also displays host cell adhesive properties, by binding to CEACAM1 receptor [34–35]; P5 observed diversity may modulate bacterial adhesion to cell surfaces, which may be related to the adhesion heterogeneity among the NTHi strains analysed in this study. NTHi adhesion to A549 and HeLa-BGP cells was similar for the strains tested; NTHi adhesion to Detroit 562 cells was comparable, in general terms, to adhesion to A549 and HeLa-BGP cells, with subtle differences. Of note, different cell types are endowed with distinct receptor molecules; thus, adhesion variability between cell types could be related not necessarily to P5-CEACAM1 adhesion dynamics, but to additional bacterial adhesive molecules which would bind their partners on the host cell surface. OapA is an envelope protein contributing to nasopharynx colonization [31] and cell adhesion [29]. OapA sequence diversity observed here may modulate bacterial interaction with cell surfaces. Adhesion is generally a crucial stage during infection processes [55]. NTHi adhesion is the result of the combined effect of multiple variable adhesive molecules, the combinations of which vary among strains. Strains tested here displayed adhesion heterogeneity; even though, the most adherent isolates belonged to the most prevalent molecular pattern. Of note, NTHi1622, NTHi398 and NTHi1566, displaying significantly higher adhesion rates, contained long OapA sequences, the prevalent GINNNGAIK motif in their P5 loop 1, and PCho and sialic acid decorating their LOS.

Bacterial population studies have suggested the association of the genotype *IS1016+*, *hia+*, *hmv-* with NTHi invasive isolates [41], the presence of the *IS1016-bexA* deletion with non-type b *H. influenzae* [39], and the association of *lic2B+*, *hmv+* and nine other genomic loci with NTHi otitis media isolates [37]. We present here a molecular profile found prevalent in a collection of NTHi strains of heterogeneous clinical origin. Based on our observations, we postulate that this profile could be a general feature providing the pathogen with advantages during infectious processes. These findings provide information with potential clinical implication. The prevalent bacterial surface structures could be suitable targets for designing new antimicrobial molecules. Future studies will attempt to expand our knowledge about the features dependent upon the molecular signature presented here.

## Materials and Methods

### Ethics statement for collection of NTHi clinical isolates

The study was approved by the Ethics Committee of the Balearic Islands and all aspects of the study comply with the Declaration of Helsinki. Ethics Committee of the Balearic Islands specifically approved that not informed consent was required

because data were going to be analysed anonymously. Bacterial strains were isolated from human clinical samples which were collected following Hospital Universitario Bellvitge and Hospital Universitario Son Espases approved procedures by each Microbiology Service.

### Bacterial strains and culture conditions

NTHi strains from 111 patients from 17 days to 92 years of age were isolated between January and June 2008 in Hospital Bellvitge-HUB (Barcelona) and Hospital Son Espases-HSE (Mallorca), two Spanish tertiary reference hospitals. Sixty four strains were isolated in HUB from sputum (52 strains), bronchial or tracheal aspirate (5), conjunctive exudate (2), blood (2), bronchoalveolar lavage (BAL) (2) and pulmonary abscess (1). Forty seven strains were isolated in HSE from sputum (24), bronchial or tracheal aspirate (14), nasopharyngeal exudate (5), conjunctive exudate (3) and ear exudate (1). Rd KW20 is a non-capsular serotype d-derived strain for which a genome sequence has been completed [42]. NTHi398 is a COPD isolate [6,43]. NTHi was grown at 37°C with 5%CO<sub>2</sub> on Chocolate-agar plates or on Brain Heart Infusion (BHI)-agar supplemented with hemin (10 µg/ml) and β-NAD (β-nicotinamide adenine dinucleotide, 2 µg/ml).

### Pulse field gel electrophoresis (PFGE)

NTHi isolates were characterised by macrorestriction analysis of chromosomal DNA after *Sma*I digestion and fragment separation by PFGE using a CHEF-DR III contour-clamped homogeneous electric field apparatus (BioRad), programmed at 6 V/cm<sup>2</sup> for 23 h, with switching times ramped from 1 to 30 s. DNA fragments were visualised by ethidium bromide staining and interpreted following previous criteria [56].

### Genomic DNA preparation and PCR amplification

Chromosomal DNA was isolated from a 5 ml culture grown overnight in sBHI. Bacteria were centrifuged (14.000 g, 5 min), the pellet was resuspended in 567 µl of TE. Subsequently, 30 µl of 10% SDS and 3 µl of proteinase K (20 mg/ml) were added, mixed and incubated, 1 h at 37°C. Then, 100 µl of 5 M NaCl were added, followed by 80 µl of 10% CTAB/0.7 M NaCl. Samples were incubated, 65°C for 10 min. An equivalent volume of chloroform/isoamyl alcohol was added, mixed and centrifuged (14.000 g, 5 min). The aqueous supernatant was transferred to a fresh tube, and re-extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol. Thereafter, 0.6 ml of isopropanol were added to the supernatant, the mixture was centrifuged. The pellet was washed twice with 70% ethanol, dried, and resuspended in 100 µl sterile water.

Genes were screened with primers in Table S2: *lgtF* (*lgtF*-F1+*lgtF*-R1, 1461 bp), *lic2A* (*lic2A*-Fs+*lic2A*-Rs, 909 bp), *lic1D* (*lic1D*-F1+*lic1D*-R1, 826 bp), *lic3A* (*lic3A*-F1+*lic3A*-R1, 888 bp; *lic3A*-F2+*lic3A*-R1, 846 bp), *lic3B* (*lic3B*-F1+*lic3B*-R1, 891 bp; *lic3B*-F2+*lic3B*-R1, 851 bp), *siaA* (*siaA*-F1+*siaA*-R1, 854 bp), *lic2C* (*lic2BA*+*lic2BC*, 1035 bp; *lic2BA*+*lic2BB*, 1898 bp), *ompP5* (*P5*-Fw+*P5*-Rv, 1046 bp; *P5*-seqF4+*P5*-Rv, 912 bp; *P5*-seqF5+*P5*-Rv, 985 bp), *oapA* (*oapA*-Fw+*oapA*-Rv, 1170 bp). PCR was performed on chromosomal DNA using Taq DNA polymerase: 5 min denaturation (94°C); 1 min periods of denaturation (94°C), annealing (55°C) and polymerisation (72°C) for 30 cycles. For genes where one single product size was observed for all isolates, PCR products from two randomly chosen isolates were sequenced. For *ompP5*, PCR products from the subset of selected strains were sequenced. For *lic2A* and *oapA*, at least one representative PCR product per size was sequenced.

## Colony immunoblot

PCho level was assessed by immunoblotting as described previously, by using mouse anti-PCho TEPC-15 antibody [13].

## Analysis of LPS by electrophoresis and dot-blot

LPS patterns from selected NTHi isolates were analysed as previously described [57]. Bacterial lysates were prepared from cells grown overnight on BHI plates supplemented with Neu5Ac, then suspended in PBS (pH 5.8) to a concentration with an absorbance of 1 at 260 nm. Lysates were treated with neuraminidase and analysed by Tricine-SDS-PAGE and staining with silver (Quicksilver; Amersham Biosciences). The neuraminidase, purified from *Clostridium perfringens*, cleaves terminal sialic acids bound to oligosaccharides. Assessment of digalactose levels on the surface of NTHi strains was performed using 2 µl lots of bacterial lysates in dot-blot [57], using monoclonal antibody 4C4, which recognises Gal- $\alpha$ -(1-4)- $\beta$ -Gal [58].

## Cell culture and bacterial infection

A549 human alveolar epithelium (immortalised type II pneumocytes, ATCC CCL-185) was maintained as before [6]. Cells were seeded (to reach  $4 \times 10^5$  cells/well) in 24-well plates, and serum starved 16 h before infection by replacement of medium with supplemented RPMI lacking FBS. When necessary, cells were seeded for a longer period of time to reach an over-confluent monolayer (approximately  $8 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  cells/well) [49]. HeLa-BGP is a stably transfected HeLa cell line expressing hCEACAM1-4L receptor [50]. HeLa-BGP cell line was propagated as described before [50]. Cells were seeded ( $4 \times 10^5$  cells/well) in 24-well plates, 24 h before each experiment. Detroit 562 human pharynx epithelium (immortalised pharynx epithelial cell line, ATCC CCL-138) was maintained following manufacturer's instructions. Briefly, Detroit 562 cells were maintained in DMEM tissue culture medium supplemented with 1% HEPES, 10% heat inactivated foetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin and streptomycin) in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were seeded ( $10^5$  cells/well) in 24-well plates, 24 h before each experiment. Stationary phase grown NTHi were recovered with 1 ml PBS from a Chocolate-agar plate and adjusted to OD<sub>600</sub> = 1 ( $10^9$  c.f.u./ml). In all cases, cells were infected in 1 ml EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) with the freshly obtained bacterial suspension, at approximately MOI 100:1, for 30 min, washed three times with PBS, and lysed with 300 µl of PBS-Saponin 0.025% for 10 min at room temperature. Serial dilutions were plated on sBHI-agar. Bacterial adhesion is represented as % = (c.f.u. output/c.f.u. input) × 100.

## Serum resistance assay

Bacteria grown on medium supplemented with Neu5Ac (30 µg/ml) were assayed for survival against the killing effect of normal human serum [24].

## Detection of CEACAM1 by Western blotting

A549 cells were seeded on 6-well tissue culture plates to reach over-confluence (approximately  $4 \times 10^6$  cells/well). HeLa-BGP cells were seeded on 6-well tissue culture plates at  $2 \times 10^6$  cells/well. Detroit 562 cells were seeded on 21 cm<sup>2</sup> tissue culture dishes at  $10^7$  cells/dish. In all cases, cells were highly confluent before processing. Cells were washed 3 times with cold PBS, scraped and lysed with 100 µl lysis buffer (1 × SDS Sample Buffer, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.01% w/v bromophenol blue) on ice. Samples were sonicated,

boiled at 100°C for 10 min and cooled on ice before polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blotting. CEACAM1 was detected with primary mouse anti-human CEACAM1 (R&D Systems, clone MAB2244) antibody diluted 1:500 and secondary goat anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (Thermo Scientific) diluted 1:1,000. Tubulin was detected with primary mouse anti-tubulin antibody (Sigma) diluted 1:3,000 and secondary goat anti-mouse antibody (Pierce) conjugated to horseradish peroxidase diluted 1:1,000. When necessary, the membrane was washed twice for 15 min with PBS-0.5% Tween-20, incubated for 30 min in Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) at 37°C, and washed twice for 15 min with PBS-0.5% Tween-20.

## Statistical methods

Statistical analyses were performed using analysis of variance, the two sample *t* test with two tails followed by the Mann Whitney test. When required, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test was performed. A P value of <0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad.

## Supporting Information

**Figure S1 Location of primers and PCR fragment sizes of genes analysed in the present study.** (A) Localization of primers used for PCR amplification of LOS biosynthesis and adhesin encoding genes in a collection of NTHi clinical strains. (B) 1% agarose gel showing representative PCR products obtained for *lgtF*, *lic2C*, *lic1D*, *lic2A*, *lic3A*, *lic3B*, *siaA*, *ompP5* and *oapA*. (C) 1% agarose gel showing representative *lic2A* PCR products displaying size differences associated with variations in the number of -CAAT- repeats in the 5' region of the reading frame. (-CAAT)<sub>x</sub> refers to the number of tetranucleotide repeats present in strains Rd KW20 (22 repeats), NTHi1609 (10 repeats), NTHi1500 (11 repeats), NTHi1525 (15 repeats), NTHi1556 (18 repeats), NTHi1549 (20 repeats), NTHi1501 (26 repeats), NTHi1553 (31 repeats), NTHi1550 (49 repeats). 1 Kb and 100 bp ladders (New England Biolabs) were used to assess PCR product sizes (B and C). 1 Kb ladder includes fragments of 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1 and 0.5 Kb. 100 bp ladder includes fragments of 1.517; 1.2; 1 (Kb), 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 and 100 bp. (TIF)

**Table S1 Clinical origin of NTHi isolates used in this study.** (DOC)

**Table S2 Primers used in this study.** (DOC)

**Table S3 Distribution of LOS biosynthesis genes in a collection of 111 clinical NTHi isolates.** (DOC)

**Table S4 Distribution of *lic2A* phase-variable 5'-CAAT-3' tetranucleotide repeats for representative NTHi isolates.** (DOC)

**Table S5 P5 sequence in predicted extracellular loops 1 to 5 for representative NTHi isolates.** (DOC)

**Table S6 OapA protein sequence in the variable region identified for representative NTHi isolates.** (DOC)



47. Hallstrom T, Riesbeck K (2010) *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol* 18: 258–265.
48. Avadhanula V, Rodriguez CA, Devincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, et al. (2006) Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Virol* 80: 1629–36.
49. Singer BB, Scheffrahn I, Kammerer R, Suttorp N, Ergun S, et al. (2010) Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One* 5: e8747.
50. Gray-Owen SD, Dehio C, Haude A, Grunert F, Meyer TF (1997) CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J* 16: 3435–3445.
51. Lamers RP, Stinnett JW, Muthukrishnan G, Parkinson CL, Cole AM (2011) Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. *PLoS One* 6: e16426.
52. Hong W, Pang B, West-Barnette S, Swords WE (2007) Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* 189: 8300–8307.
53. Hallstrom T, Resman F, Ristovski M, Riesbeck K (2010) Binding of complement regulators to invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates is not increased compared to nasopharyngeal isolates, but serum resistance is linked to disease severity. *J Clin Microbiol* 48: 921–927.
54. Novotny LA, Jurcisek JA, Pichichero ME, Bakaletz LO (2000) Epitope mapping of the outer membrane protein P5-homologous fimbrin adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 68: 2119–2128.
55. Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124: 715–727.
56. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, et al. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233–2239.
57. Roche RJ, High NJ, Moxon ER (1994) Phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide: characterization of lipopolysaccharide from individual colonies. *FEMS Microbiol Lett* 120: 279–283.
58. High NJ, Deadman ME, Hood DW, Moxon ER (1996) The identification a novel gene required for lipopolysaccharide biosynthesis by *Haemophilus influenzae* RM7004, using transposon Tn916 mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett* 145: 325–331.

