

**Formación de  
estructuras  
multicelulares de  
*Pseudomonas  
aeruginosa* sobre  
células apoptóticas**

**Lic. Dario Nicolás Capasso**

**Directora: Dra. Arlinet Kierbel**

**Codirector: Dr. Fernando Peruani**

**Tesis para optar por el título de Doctor en Biología  
Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional  
de San Martín**

**2019**

## **Agradecimientos**

Son muchas las personas que me han ayudado y me han permitido terminar esta etapa de mi formación.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora, Arlinet Kierbel, por su dirección, confianza y brindarme su apoyo. Quiero agradecer también a Fernando Peruani, mi codirector, con quien colaboramos en los estudios de quimiotaxis.

Agradezco a mis compañeros del grupo de laboratorio que siempre me brindaron su ayuda: María Victoria Pepe, Adriana Jager y Paula Arias.

Por brindarme asistencia técnica en la adquisición y análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal agradezco a Francisco Guaimas. Por ayudarme con el análisis estadístico de los ensayos de quimiotaxis en jeringas agradezco al Lic. Ricardo Bello.

En términos institucionales quiero agradecer a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires por la beca de estudio otorgada. También quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca de finalización de doctorado otorgada.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por acompañarme y apoyarme siempre, a mi papá y a mi mamá, Roberto y María del Carmen, a mi hermano Emiliano y a mi abuelo Antonio. También quiero agradecer a mi novia, Marina, por su apoyo incondicional.

## Abreviaturas

16HBE14o- línea de células epiteliales bronquiales humanas

AI-2 autoinductor 2

ANOVA análisis de la varianza

AnxV Anexina V

BB *binding buffer*

BSA seroalbúmina bovina

CFTR *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CHO células de ovario de hámster chino

c-Met receptor tirosina quinasa Met ó receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

Dct sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos

EspM2 efector EspM secretado por el T3SS

EspO1-2 efector EspO secretado por el T3SS

GFP proteína verde fluorescente

h horas

ILK integrina asociada a quinasa

LB caldo Luria-Bertani

M marcador de peso molecular

MCP proteínas quimiotácticas aceptoras de metilos

MDCK Madin Darby canine kidney

MEM medio esencial mínimo

min minutos

motAB proteínas de motilidad A y B

PA01 *Pseudomonas aeruginosa* 01

PA-IIL LecB lectinaB

PA-IL LecA lectinaA

PAK *Pseudomonas aeruginosa* cepa K

PAK-GFP *Pseudomonas aeruginosa* cepa K que expresa GFP

PBS Buffer fosfato salino

PlanApo plano apocromático

proK proteasaK

Prueba KS prueba de Kolmogorov-Smirnov

RFP proteína fluorescente roja

RhoGEF factor intercambiador de nucleótidos de guanina asociado a Rho

s segundos

S1P esfingosina-1-fosfato

SDS-PAGE electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida

SP<sub>12</sub> receptor SP1 2

SpHK1 esfingosina quinasa-1

T3SS sistema de secreción tipo III

T4P pilus tipo IV

U unidades enzimáticas

UFC unidades formadoras de colonias

UV ultravioleta

wt *wild type*

Parte de los resultados de la presente tesis se encuentran publicados en:

Elimination of *Pseudomonas aeruginosa* through Efferocytosis upon Binding to Apoptotic Cells. Darío Capasso\*, María Victoria Pepe\*, Jéssica Rossello, Paola Lepanto, Paula Arias, Valentina Salzman and Arlinet Kierbel PLOS Pathogens. (2016). doi:10.1371/journal.ppat.1006068. \*Co-primeros autores.

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ambiental de amplia distribución. Pero es también un patógeno oportunista que puede causar infecciones agudas de gran severidad en heridas y quemados e infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística que conllevan a altos índices de mortalidad. En estos pacientes, un factor determinante de la cronicidad de la infección es la formación de biofilms. En las etapas iniciales de la formación de un biofilm, bacterias que se encuentran nadando libremente son reclutadas sobre una superficie, lo que implica una transición desde un estado planctónico a un estado multicelular, sésil y adherido. Este tipo de transición ha sido poco estudiada en general y menos aún cuando ocurre sobre superficies bióticas.

Anteriormente reportamos que *P. aeruginosa* se adhiere a células epiteliales polarizadas principalmente en forma de agregados. Demostramos que la formación de estas estructuras bacterianas multicelulares ocurre *de novo* y en el orden de minutos sobre la superficie epitelial por el reclutamiento de bacterias que nadan impulsadas por el flagelo.

En este trabajo de tesis estudiamos este fenómeno en profundidad. Hemos observado que la adhesión y agregación de *P. aeruginosa* no ocurre en cualquier sitio de la superficie epitelial. Nuestros resultados muestran que los eventos de adhesión/agregación ocurren sobre las uniones célula-célula, particularmente en sitios multi-uniones formadas por cuatro o más células. Estas multi-uniones se pueden formar como consecuencia de la extrusión de células apoptóticas. Indagamos entonces si *P. aeruginosa* estaría adhiriéndose a la superficie de células apoptóticas extruídas.

A partir de distintas aproximaciones experimentales pudimos establecer que, al interactuar con la barrera epitelial, *P. aeruginosa* se adhiere y agrega sobre células apoptóticas extruídas, que se encuentran sobre sitios multi-uniones. La afinidad de esta bacteria por células muertas es independiente del tipo de muerte celular, ya que también observamos adhesión y agregación sobre células necróticas.

Indagamos también en los mecanismos mediante los cuales esta bacteria localiza las células apoptóticas. Para discernir si este encuentro era estocástico o mediado por quimiotaxis, generamos modelos que emularan uno u otro escenario y realizamos simulaciones. A partir de la data *in silico* determinamos que tanto la forma como la cinética de formación de los agregados son parámetros sensibles a la presencia de quimiotaxis.

Mediante microscopía confocal *in vivo* registramos la formación de los agregados en 3D y en el tiempo (xyzt). A partir de estos datos estudiamos la cinética de incorporación al agregado en bacterias wt y en bacterias mutantes de quimiotaxis. Determinamos que los agregados formados por bacterias wt

crecen más rápido que aquellos formados por las mutantes. Nuestros resultados muestran que si bien la quimiotaxis no es imprescindible para la formación de agregados, tiene un rol en la cinética del proceso. Dan cuenta además de un concepto novedoso: la quimiotaxis involucrada en un comportamiento colectivo de las bacterias.

Por otro lado, a partir de tratamientos enzimáticos sobre las células apoptóticas determinamos que las moléculas a las que *P. aeruginosa* se adhiere serían de naturaleza proteica.

Nuestros hallazgos son relevantes para el estudio de las infecciones con *P. aeruginosa* en contextos donde las mismas representan un problema de gravedad, como la fibrosis quística o las heridas y quemaduras, todos ellos caracterizados por la presencia de gran número de células muertas.

Pero además, el fenómeno descrito representa un proceso de transición desde un estado planctónico a uno multicelular en el que es posible registrar en tiempo real la incorporación y la localización individual de cada bacteria. Esto posibilitará en el futuro estudiar cómo influye el posicionamiento de las bacterias individuales y su interacción con la célula blanco y con otras bacterias en la emergencia de la estructura multicelular.

# Indice

<b>1. Introducción</b> .....	10
1.1. Infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i> en heridas .....	11
1.2. Infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística .....	11
1.3. Aislamientos clínicos: Fenotipo mucoide y no mucoide en <i>P. aeruginosa</i> .....	12
1.4. Interacciones patógeno-hospedador en el contexto de los epitelios .....	13
1.5. Arquitectura e integridad epitelial .....	14
1.6. Mantenimiento de la integridad epitelial. Extrusión celular .....	15
1.7. Patogénesis en el contexto de la extrusión celular .....	17
1.8. Cambios morfológicos y bioquímicos de las células durante el proceso de apoptosis .....	19
1.9. Diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis.....	20
1.10. Motilidad y adhesión (pilus tipo IV y Flagelo).....	21
1.11. Quimiotaxis en bacterias. Control de la rotación flagelar .....	24
1.12. Quimiotaxis y patogénesis bacteriana .....	27
1.13. Estudio del fenómeno de quimiotaxis. Ensayos clásicos.....	28
1.14. Experimentación y modelización en quimiotaxis.....	30
1.15. Formación de estructuras bacterianas multicelulares: transición desde un estado plantónico a uno sésil, multicelular y adherido a superficie.....	31
<b>2. Objetivos</b> .....	35
<b>3. Resultados. Primera parte</b> .....	36
3.1. Modelo de células epiteliales polarizadas en cultivo .....	36
3.2. <i>P. aeruginosa</i> adhiere sobre la superficie epitelial en forma de agregados .....	37
3.3. Los agregados se forman sobre sitios de multiuniones .....	39
3.4. Los agregados se forman sobre células apoptóticas extruídas .....	42
3.5. Las células a las que <i>P. aeruginosa</i> se une eran apoptóticas antes de la infección.....	45
3.6. Los agregados también se forman sobre células apoptóticas en una línea epitelial de origen bronquial .....	46
3.7. Aislamientos clínicos provenientes de pacientes con fibrosis quística forman agregados sobre células apoptóticas extruídas.....	48
3.8. <i>P. aeruginosa</i> adhiere preferentemente a células apoptóticas tardías .....	50
3.9. <i>P. aeruginosa</i> adhiere también sobre células apoptóticas generadas <i>in vitro</i> ...	52
3.10. La adhesión sobre células muertas es independiente del tipo de muerte celular.....	54

<b>4. Resultados. Segunda parte</b> .....	57
4.1. <i>P. aeruginosa</i> localiza las células apoptóticas propulsada por el flagelo .....	57
4.2. Mutantes de quimiotaxis forman agregados sobre células apoptóticas extruídas .....	60
4.3. Evaluación del medio condicionado por células apoptóticas como quimioattractante .....	62
4.4. Dinámica de la formación de los agregados .....	68
4.4.1. Obtención de la data <i>in silico</i> .....	68
4.4.1.1. Generación del modelo.....	68
4.4.1.2. Forma de los agregados .....	70
4.4.1.3. Evolución de la masa del agregado.....	71
4.4.2. Obtención de la data experimental .....	73
4.5. El pilus tipo IV media la adhesión de <i>P. aeruginosa</i> sobre células apoptóticas extruídas .....	81
4.6. El tratamiento de células apoptóticas con proteasa modifica la adhesión de <i>P. aeruginosa</i> .....	83
<b>5. Conclusiones y Discusión</b> .....	88
5.1. Conclusión final.....	99
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	100
6.1. Cepas bacterianas.....	100
6.2. Crecimiento de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	100
6.3. Líneas celulares .....	101
6.4. Cultivo de las células.....	101
6.5. Anticuerpos y reactivos .....	102
6.6. Generación de células apoptóticas y necróticas <i>in vitro</i> .....	102
6.7. Adición de células apoptóticas y necróticas.....	102
6.8. Adición de células MDCK Lifeact-GFP tripsinizadas y células apoptóticas.....	102
6.9. Incubación de monocapas con <i>P. aeruginosa</i> .....	103
6.10. Incubación de células apoptóticas con <i>P. aeruginosa</i> en un tubo .....	103
6.11. Preparación de muestras para inmunofluorescencia .....	103
6.12. Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia .....	104
6.13. Preparación de muestras y adquisición de imágenes por microscopía electrónica de barrido .....	105
6.14. Estudio de la formación de agregados por microscopía confocal de fluorescencia .....	105
6.15. Seguimiento ( <i>Tracking</i> ) de bacterias por videomicroscopía.....	106

6.16. Ensayo de quimiotaxis .....	106
6.17. Obtención de medio condicionado por células apoptóticas generadas <i>in vitro</i> . Ensayo de quimiotaxis .....	107
6.18. Tratamiento de células apoptóticas con DNAsal y proteasaK .....	108
6.19. Análisis de imágenes .....	108
6.20. Análisis estadístico .....	110
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>113</b>

## 1. Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram negativa perteneciente a la clase de las gammaproteobacterias. Se trata de una bacteria ambiental ubicua que normalmente habita en el suelo y las superficies de medio ambientes acuosos. Como otras especies del género *Pseudomonas*, es una bacteria versátil con un amplio repertorio metabólico, el cual le permite ocupar diferentes nichos <sup>1</sup>. Tiene la capacidad de prosperar en distintas condiciones, tales como en presencia, ausencia o depleción parcial de oxígeno. Así puede crecer anaeróticamente utilizando nitrato o nitrito como aceptor terminal de electrones <sup>2</sup>. Su genoma, que cuenta con aproximadamente 6000 genes, refleja la versatilidad que tiene *P. aeruginosa* para ocupar distintos nichos gracias a la gran capacidad metabólica que presenta <sup>3</sup>.

*P. aeruginosa* muestra adaptación y alta resistencia intrínseca a los antibióticos, la cual es atribuible a la baja permeabilidad de la membrana a los mismos, así como también a la presencia de bombas de eflujo que los expulsan fuera de la célula <sup>4</sup>. Es considerada un patógeno oportunista que puede causar infecciones agudas y/o crónicas. Es responsable del 11-14% de las infecciones nosocomiales comunes y del 13-22% de las infecciones en unidades de terapia intensiva <sup>5</sup>, siendo uno de los agentes infecciosos más virulentos. Se la encuentra asociada a un amplio rango de infecciones que afectan la piel, oídos, ojos, tracto urinario, vías respiratorias y epitelio pulmonar. La alta frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* que causan infecciones nosocomiales, el incremento de cepas multi resistentes a drogas y la capacidad de resistencia frente a antimicrobianos mostrada por la bacteria en infecciones crónicas representa una severa amenaza a la salud humana. El tipo de infección está relacionado con el estado de salud del hospedador y el estilo de vida adoptado por la bacteria cuando lo coloniza. Las infecciones agudas causadas por esta bacteria representan un grave problema en pacientes inmunocomprometidos, quemados o aquellos que requieren ventilación mecánica. Dentro de las infecciones nosocomiales en pacientes con ventilación mecánica se le atribuye a *P. aeruginosa* una tasa de mortalidad de aproximadamente el 50% <sup>6</sup>.

Las infecciones pulmonares crónicas con *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística afectan severamente la calidad y la expectativa de vida y son uno de los factores principales que contribuyen a la mortalidad <sup>7</sup>.

La patogénesis de *P. aeruginosa* ha demostrado ser combinatoria y multifactorial. Algunos factores de virulencia se han conocido por décadas, pero otros se han identificado recientemente gracias a la secuenciación de genomas provenientes de cepas ambientales y aislamientos clínicos.

## 1.1. Infecciones causadas por *P. aeruginosa* en heridas

La superficie intacta de la piel es vital para la preservación de la homeostasis de los fluidos corporales. Provee termorregulación y actúa como una primera barrera de defensa frente a patógenos. Las heridas generan una brecha en la piel, a través de la cual las bacterias patógenas ingresan al hospedador. La superficie de la herida es un ambiente rico en proteínas conformado por tejido muerto no vascularizado. La falta de vascularización en la herida dificulta la migración de células inmunes a dicha zona, como así también la llegada de agentes antimicrobianos administrados sistémicamente <sup>8</sup>. Este ambiente resulta un nicho susceptible de ser colonizado por bacterias. Cuando las bacterias alcanzan la zona de la herida, se adhieren sobre la superficie de la misma y pueden proliferar dando comienzo al desarrollo de un biofilm. Se trata de una estructura multicelular agregada y sésil asociada a una superficie, la cual se encuentra embebida en una matriz extracelular formada por polímeros secretados por las propias bacterias que lo conforman. Dicha matriz protege a las bacterias del accionar de los antibióticos y del sistema inmune.

Durante las primeras horas y hasta algunos días post-herida miembros residentes de la flora bacteriana de la piel como los estafilococos gram positivos son capaces de colonizar la superficie de la herida. Aproximadamente una semana post-herida puede ocurrir colonización secundaria de la superficie de la misma por otras bacterias, las cuales incluyen a *P. aeruginosa* <sup>9</sup>. Además está reportado que en términos de área las heridas colonizadas por *P. aeruginosa* se muestran más extensas que aquellas que no lo están. La presencia de *P. aeruginosa* en heridas parece retrasar o incluso evitar el proceso de curado <sup>10</sup>. Así la contaminación de la herida con *P. aeruginosa* puede causar una infección invasiva y resultar en sepsis. Recientemente Schwarzer *et al.* mostraron, usando un modelo de heridas sobre monocapas de células epiteliales, que *P. aeruginosa* migra hacia las células muertas presentes en el borde de la herida <sup>11</sup>.

## 1.2. Infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística

Las infecciones crónicas causadas por *P. aeruginosa* ocurren con frecuencia en pacientes con fibrosis quística, donde la bacteria causa una falla progresiva en la función pulmonar <sup>7</sup>.

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva, causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*).

Se han identificado más de 2000 mutaciones, pero sólo 127, aproximadamente, están confirmadas como causantes de la enfermedad <sup>12</sup>. A pesar de la diversidad de mutaciones conocidas, una mutación puntual (delección de la fenilalanina 508) es predominante.

El defecto del canal CFTR afecta principalmente el transporte de cloruro. La reducción en el transporte de cloruro está asociada a una hiperabsorción de sodio y agua en la superficie epitelial, provocando la deshidratación del mucus pulmonar <sup>13</sup>. El canal CFTR también conduce bicarbonato, que regula el pH de la película de líquido de las vías aéreas. El cambio en el pH afecta la eliminación de las bacterias que entran por esta vía, a través de la reducción de la función antimicrobiana de los péptidos secretados por el sistema inmune innato <sup>14</sup>. A su vez el desbalance osmótico generado por la reducción en la concentración de aniones provoca también acumulación y un incremento de la viscosidad del mucus pulmonar. La acumulación de secreción espesa en el pulmón trae aparejado un impedimento en la limpieza mucociliar, la cual se encarga de barrer partículas y microorganismos inhalados. El microambiente del pulmón fibroquístico ofrece un nicho ideal para la colonización por una amplia diversidad de especies bacterianas, pero *P. aeruginosa* establece una infección crónica y es la más prevalente <sup>15</sup>. El daño pulmonar causado por la presencia constante de la infección y por la respuesta inmune inflamatoria, que es inefectiva para eliminar al patógeno, es la principal causa de muerte en pacientes con esta enfermedad.

### **1.3. Aislamientos clínicos: Fenotipo mucoide y no mucoide en *P. aeruginosa***

Como hemos mencionado, *P. aeruginosa* es capaz de establecer infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística. Un factor determinante en el establecimiento de la cronicidad es la formación de biofilms. Como ya mencionamos, se considera un biofilm a una estructura multicelular agregada y sésil asociada a una superficie, la cual se encuentra embebida en una matriz extracelular formada por polímeros secretados por las bacterias.

En el ambiente del pulmón fibroquístico, sólo una porción de la variedad de cepas de *P. aeruginosa* que infecta es capaz de prosperar. Una variante fenotípica que se selecciona con alta frecuencia son las mutantes con fenotipo mucoide.

Dentro de las características fenotípicas más comunes reportadas en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes fibroquísticos crónicos se encuentran: crecimiento lento, auxotrofia, sobreproducción de

alginate (fenotipo mucóide), resistencia a antibióticos y pérdida de factores de virulencia y motilidad <sup>16</sup>.

La conversión hacia un fenotipo mucóide parece estar fomentada por el microambiente único del pulmón fibroquístico. Este fenotipo no se observa fuera del hospedador, aunque es posible observar la conversión de una cepa de fenotipo no mucóide a uno mucóide bajo ciertas condiciones de cultivo, como aquellas que emulan el microambiente pulmonar de la fibrosis quística <sup>17</sup>.

Una característica de las cepas mucóides es su capacidad para sintetizar una gran cantidad del exopolisacárido alginate. El alginate protegería a las microcolonias de la deshidratación, como también incrementaría la resistencia a la opsonización, la fagocitosis y al tratamiento con antibióticos <sup>18</sup>. La conversión a un fenotipo mucóide está asociada en los pacientes con fibrosis quística a un aumento de la mortalidad <sup>19</sup>.

Poblaciones mixtas de cepas mucóides y no mucóides pueden coexistir en los pulmones de los pacientes fibroquísticos. El valor adaptativo de las poblaciones mixtas de *P. aeruginosa* recae en la diversidad fenotípica y funcional de *P. aeruginosa*, la cual contribuye a la adaptación bajo condiciones de estrés, permitiendo la colonización a largo plazo del pulmón fibroquístico.

#### **1.4. Interacciones patógeno-hospedador en el contexto de los epitelios**

En el encuentro entre los epitelios y los patógenos se ponen en juego tanto las estrategias desarrolladas por los primeros para imponer una barrera a la entrada y/o eliminar al patógeno, como las estrategias de los patógenos tendientes a sortear dicha barrera y así acceder a tejidos más profundos. Las estrategias de ambos lados son múltiples y para comprender los pasos iniciales de los procesos infecciosos es necesario entender la particularidad de la interacción del patógeno estudiado con la superficie epitelial.

Una gran cantidad de modelos de células epiteliales en cultivo pertenecientes a distintos linajes (por ejemplo: intestinal, urinario y pulmonar) han sido caracterizados y utilizados para estudiar la interacción de bacterias patógenas con la barrera epitelial. Estos estudios han provisto información acerca de los mecanismos de infección de varios agentes microbianos, como así también sobre muchas de las particularidades de las interacciones patógeno-hospedador. Nuestro grupo estudia la interacción de *P. aeruginosa* con la barrera epitelial y para ello utiliza un modelo de infección de células epiteliales polarizadas en cultivo.

En resumen, los epitelios proveen la primera línea de defensa del organismo. Para comprender como los epitelios cumplen dicha función es crucial conocer

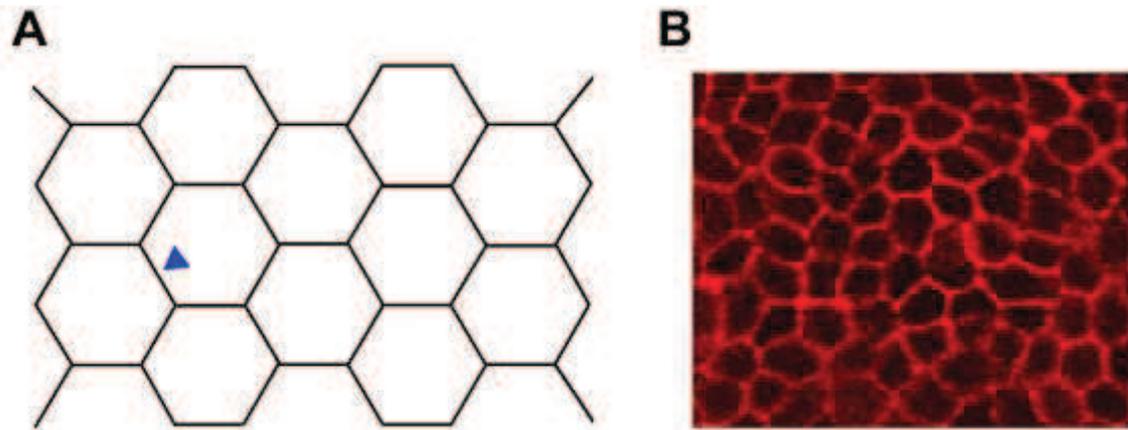
su organización estructural, la cual permite que respondan de manera integrada ante una perturbación.

### **1.5. Arquitectura e integridad epitelial**

Los cuerpos de los metazoos presentan numerosas cavidades y compartimientos, los cuales están revestidos por láminas de células epiteliales. Como parte del sistema inmune innato, las células epiteliales representan la primera línea de defensa contra los patógenos. Las células epiteliales constituyen una barrera difícil de penetrar gracias a que forman láminas de células estrechamente unidas. Las uniones entre células mantienen la integridad de los epitelios, como así también su polaridad constituida por un dominio apical y otro basolateral de composición distinta.

En conjunto las uniones adherentes y estrechas conforman el complejo apical de unión, el cual no sólo mantiene la polaridad sino que rodea a las células y las conecta unas con otras. Así las uniones adherentes, compuestas por cadherinas clásicas (por ejemplo E-cadherina), interaccionan en la cara interna de la célula indirectamente (por ejemplo a través de las cateninas) con el citoesqueleto de actina. Por su parte las uniones estrechas formadas por claudinas y ocludinas regulan la permeabilidad paracelular, aspecto clave para prevenir el pasaje de macromoléculas y patógenos.

De esta manera se genera una red que asocia a las células epiteliales entre sí, permitiéndoles responder de manera integrada a través de la acción coordinada de sus citoesqueletos. Las redes de uniones entre células epiteliales asumen distintos patrones. En patrones más estables propios de tejidos maduros se forma una estructura tipo “panal de abeja” (Fig. 1). Pero los epitelios son estructuras dinámicas. Cuando se produce una perturbación en un epitelio las células responden en forma coordinada y se reorganizan formándose nuevas uniones célula-célula.



**Figura 1.** Las células en un epitelio se encuentran conectadas a través de uniones intercelulares que contactan sus citoesqueletos. A) Vista apical esquematizada de un epitelio. El triángulo azul señala una unión célula-célula. B) Patrón epitelial visto desde la cara apical de células MDCK que expresan E-cadherina RFP (rojo).

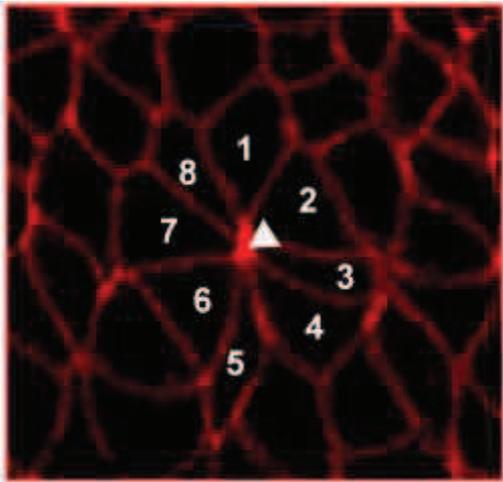
### 1.6. Mantenimiento de la integridad epitelial. Extrusión celular

El mantenimiento de la integridad tisular previene la inflamación, facilita la correcta señalización celular e impide la invasión de patógenos. Los tejidos epiteliales mantienen su homeostasis a través de mecanismos que controlan el número de células y la integridad del epitelio <sup>20</sup>.

En un epitelio las células están renovándose continuamente, mediante división celular y muerte. En este sentido, las tasas de renovación celular de los epitelios se encuentran dentro de las más altas de los organismos <sup>21</sup>, donde el número de células que se dividen está balanceado con el número de células que mueren.

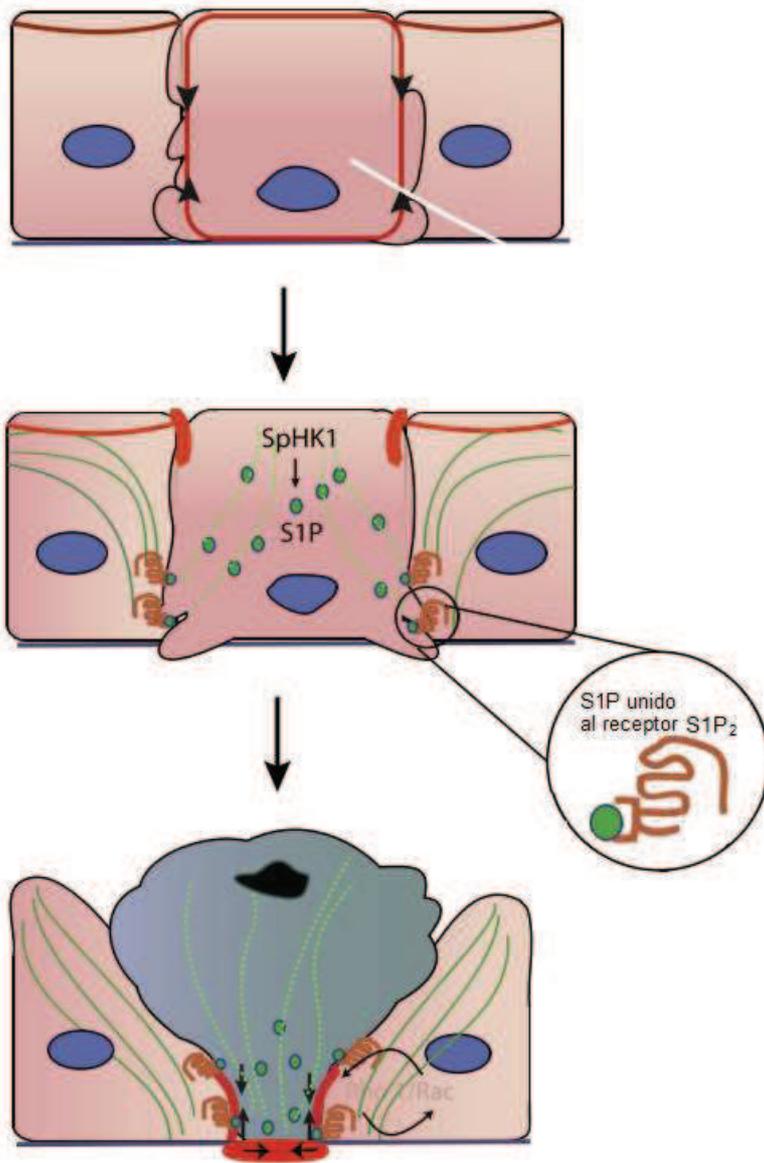
Durante la renovación tisular las células que mueren se van desprendiendo y es fundamental, durante este proceso, mantener la función de barrera del epitelio. Esto es posible gracias a un proceso denominado extrusión celular que remueve a las células senescentes y al mismo tiempo repara las brechas que la remoción de las mismas genera. Cuando una célula epitelial muere por apoptosis, es removida del epitelio en forma controlada por la acción conjunta de las células que la rodean. Así, una célula destinada a morir señala a las células vecinas y éstas forman un anillo de actina-miosina alrededor de la célula senescente. Este anillo provee la fuerza de contracción necesaria para extruir a la célula en cuestión <sup>22 23</sup>. Cabe destacar que este mecanismo opera bajo circunstancias fisiológicas y que la remoción de la célula apoptótica ocurre apicalmente hacia el lumen de la cavidad.

Cuando la célula apoptótica es removida, las células vecinas que la rodeaban se reacomodan espacialmente formando una nueva unión multicelular. Dichas multiuniones están típicamente conformadas por un número de cuatro, cinco o más células. Estas estructuras multicelulares en las cuales cuatro, cinco o más células contactan en un punto central se las conocen como rosetas (Fig. 2).



**Figura 2. Roseta en células epiteliales de *Drosophila*.** Células epiteliales de un embrión de *Drosophila* expresando un marcador de membrana (rojo). La roseta está conformada por 8 células (cada célula se indica con un número). El punto central en el cual contactan las células que conforman la roseta se indica con un triángulo. Figura adaptada de Harding et al (2014)<sup>24</sup>.

El proceso de extrusión comienza cuando la célula senescente produce y secreta el fosfolípido esfingosina-1-fosfato (S1P), el cual se une a un receptor acoplado a proteína G, receptor SP1 2 (SP1<sub>2</sub>), en las células vecinas. SP1<sub>2</sub> activa a la pequeña GTPasa Rho a través de p115 RhoGEF y provoca el reclutamiento de actina y miosina que conforman un anillo que estrangula a la célula apoptótica. El anillo se contrae circunferencialmente hacia la cara basal comprimiendo a la célula y expulsándola hacia la superficie apical. Esto a su vez acerca, por debajo de la célula apoptótica, a las células vecinas que forman entre sí nuevas uniones intercelulares, lo que previene que se genere una brecha en el epitelio (Fig.3). La localización basal de la contracción, que dirige la extrusión hacia la superficie apical, estaría facilitada por la reorientación de los microtúbulos, principalmente en la célula apoptótica pero también en las células vecinas. La hipótesis es que la posición de los microtúbulos sería importante para localizar S1P en la superficie basal de la célula en extrusión, y de esa manera, restringir la activación de SP1<sub>2</sub> y consecuentemente la contracción a esa zona<sup>21</sup>.



**Figura 3. Proceso de extrusión apical de células apoptóticas.** Durante el proceso de extrusión la célula destinada a morir produce y exporta el lípido esfingosina-1-fosfato (S1P). S1P se une al receptor SP1 2 (SP1<sub>2</sub>), en las células vecinas. La esfingosina-1-fosfato es generada a partir de esfingosina-1 por medio de la acción de la esfingosina quinasa-1 (SpHK1). SP1<sub>2</sub> activa Rho formándose un anillo de actina-miosina que estrangula a la célula apoptótica y la extruye. Figura adaptada de Gudipaty&Rosenblatt (2017) <sup>21</sup>.

### 1.7. Patogénesis en el contexto de la extrusión celular

Algunas bacterias patógenas han desarrollado estrategias para coaptar o interferir en el proceso de extrusión y así atravesar la barrera epitelial. El estudio de esta interferencia puede ayudar a comprender como es regulado normalmente este proceso, como así también encontrar mejores maneras de combatir esas infecciones.

*Listeria monocytogenes* es una bacteria oportunista capaz de colonizar el epitelio intestinal. Su ingreso al organismo ocurre por medio de la ingesta de alimentos contaminados. Las infecciones por *L. monocytogenes* están

asociadas a mortalidad infantil, aborto espontáneo y meningitis en individuos inmunocomprometidos.

El epitelio intestinal se caracteriza por una alta tasa de recambio de células. Un gran número de células se extruyen de la punta de las vellosidades, que es el sitio de invasión primaria de *L. monocytogenes* <sup>21</sup>.

*L. monocytogenes* aprovecha los sitios de extrusión para invadir el epitelio intestinal. Cuando una célula senescente es extruída del epitelio se forma momentáneamente una brecha. Como mencionamos, las células vecinas que rodean a la célula muerta se reacomodan sellando esta brecha y formando una nueva multiunión celular. Pero, hay un intervalo de tiempo, antes de que el proceso se complete, donde queda expuesta parte de la superficie basolateral de las células vecinas. Es ahí, donde *L. monocytogenes* se contacta con su receptor. Dos proteínas bacterianas de superficie, internalina A y B, interactúan con proteínas presentes en la cara basolateral de las células del hospedador, E-cadherina y C-met (receptor tirosina quinasa), respectivamente. En consecuencia se activa la endocitosis mediada por clatrina, internalizando *L. monocytogenes* unida a E-cadherina de la célula hospedadora <sup>25</sup>. Este mecanismo de infección se descubrió a partir de la observación inicial de que la bacteria se localizaba en sitios de multiuniones celulares.

La alta tasa de recambio y extrusión celular en el epitelio intestinal ayuda a la rápida eliminación de células infectadas, previniendo la invasión de patógenos. Sin embargo, algunas bacterias como *Shigella* y *E. coli* enterohemorrágica han desarrollado mecanismos para inhibir la extrusión evitando que las células epiteliales se despeguen de la membrana basal y así establecer la infección. En humanos *S. flexneri* causa disentería bacilar invadiendo las células epiteliales del colon. *S. flexneri* inyecta la proteína OspE a las células hospedadoras a través de su sistema de secreción tipo III, lo cual provoca un aumento en la adhesión de las células a la matriz e inhibe la extrusión celular. OspE se une a ILK (integrina asociada a quinasa) del hospedador, la cual vincula los receptores de adhesión celular, integrinas y factores de crecimiento con el citoesqueleto de actina, lo cual promueve y estabiliza las adhesiones focales. De modo similar, la proteína homóloga de OspE en *E. coli* enterohemorrágica, EspO1-2 además de unirse a ILK, inhibe al factor intercambiador de nucleótidos de guanina EspM2, el cual activa a RhoA bloqueando la extrusión en las células infectadas <sup>21</sup>.

En 2016 Golovkine et al. mostraron que *P. aeruginosa* usa la vía paracelular para transmigrar e invadir un epitelio. Usando como modelo monocapas de células epiteliales, estos autores propusieron que *P. aeruginosa* aprovecharía la presencia de las brechas momentáneas generadas durante el proceso de extrusión para transmigrar por la vía paracelular y atravesar las monocapas <sup>26</sup>.

## **1.8. Cambios morfológicos y bioquímicos de las células durante el proceso de apoptosis**

En esta sección se describen algunos cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso apoptótico, diferenciando entre eventos tempranos y tardíos. Lejos de ser exhaustivo, este resumen se concentra en aquellos aspectos relevantes para este trabajo de tesis.

Los lípidos aniónicos o con grupos amino como la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfoinosítidos y ácidos fosfatídicos están predominantemente o exclusivamente localizados en la cara interna de la membrana plasmática. La cara externa de la membrana plasmática está enriquecida en fosfolípidos que contienen colina, como la fosfatidilcolina, esfingomielina y glicosfingolípidos. En etapas tempranas del proceso de apoptosis, enzimas conocidas como flipasas y flopasas comienzan a translocar lípidos específicos entre ambas caras de la membrana plasmática. Así ocurre la traslocación y exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática uno de los eventos bioquímicos característicos del proceso de apoptosis.

En el laboratorio para detectar células apoptóticas se usa anexina V conjugada a un fluoróforo <sup>27</sup>. La proteína anexina V (denominada también anexina A5) se une específicamente a fosfatidilserina. Las anexinas son una familia de proteínas relacionadas estructuralmente que se encuentran en el interior celular, excepto las anexinas A1, A2 y A5 que también se han encontrado en sangre. Se trata de una familia de proteínas capaces de unir fosfolípidos en presencia de calcio. Fisiológicamente la anexina V actúa como un factor anticoagulante a través de la competencia con los factores de coagulación Xa y Va por los sitios de unión a fosfatidilserina expuesta en la superficie de células endoteliales y plaquetas activadas <sup>28</sup>.

Otro evento relevante que ocurre durante la apoptosis temprana es la activación de una familia de proteasas, conocidas como caspasas. Las caspasas son una familia de proteasas que reconocen al menos 5 residuos aminoacídicos en sus proteínas blanco y escinden las uniones peptídicas estrictamente después de aspartato. Su nombre proviene de proteasa de cisteínas que escinden después de aspartato y son sintetizadas como precursoras o zimógenos. Varias características del proceso de apoptosis, como la condensación de la cromatina y la exposición de fosfatidilserina están mediadas por proteínas blanco de la caspasa 3. Estas características desaparecen cuando se induce apoptosis en presencia de un inhibidor de caspasas <sup>29</sup>.

Durante la apoptosis temprana la disminución del volumen celular y la picnosis son visibles mediante microscopía óptica. La picnosis ocurre como resultado de

la condensación de la cromatina y se trata de una de las características más salientes del proceso de apoptosis.

Como resultado de la disminución del volumen celular, se forman brotes a partir de la membrana (*blebbing*), y finalmente estos fragmentos se separan en cuerpos apoptóticos. En su interior los cuerpos apoptóticos pueden contener o no fragmentos de cromatina.

Durante el proceso de “*blebbing*” hay pérdida de gran cantidad de membrana plasmática, la cual no es totalmente compensada por la reducción del volumen celular, y es entonces sustituida por membranas internas. Así, membrana proveniente del retículo endoplasmático es usada como fuente de reemplazo, quedando expuestos en la superficie de la célula apoptótica tardía proteínas, lípidos y glicoproteínas inmaduras características de dicha organela<sup>30 31 32</sup>.

En las células apoptóticas tardías también ocurre un cambio en el patrón de exposición de carbohidratos. A diferencia de las células vivas y apoptóticas tempranas, las células apoptóticas tardías y necróticas exponen en sus superficies azúcares como la manosa, fucosa y N-acetilglucosamina<sup>33 34</sup>.

En el proceso de apoptosis, durante el *blebbing* de membrana, ocurren la condensación y fragmentación del núcleo y el desplazamiento de los fragmentos nucleares hacia la superficie celular<sup>31</sup>. Radic et al. identificaron las etapas sucesivas del proceso de fragmentación nuclear: migración de los fragmentos nucleares hacia la superficie celular, protrusión a través de la membrana plasmática y por último su separación de la célula apoptótica en forma de cuerpos apoptóticos<sup>35</sup>. En 2002 Cocca et al. trataron células apoptóticas con un inhibidor del *blebbing* y posterior tinción de las mismas con un anticuerpo que reconoce cromatina observando una disminución en la presencia de ADN asociado a la superficie de esas células apoptóticas<sup>36</sup>.

### **1.9. Diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis**

Inicialmente la apoptosis fue descrita como un proceso de muerte celular regulada. Por el contrario el proceso de necrosis fue considerado como no programado.

Desde estas primeras descripciones nuevos conceptos de muerte celular han surgido. Cuando la muerte celular está involucrada en mantener la homeostasis del tejido se la considera “programada”.

Dentro de las nuevas formas de muerte celular regulada se han descrito formas de necrosis programada como la necroptosis y la piroptosis. La muerte por necroptosis está favorecida por sobre la apoptosis cuando proteínas inhibidoras

de la apoptosis y la caspasa 8 están ausentes o inhibidas por fármacos o proteínas virales. En el caso de la muerte celular por piroptosis se distingue de la apoptosis por mostrar activación de caspasa 1. La caspasa 1 estaría involucrada en la formación de poros en la membrana plasmática provocando la disipación de los gradientes iónicos de la célula lo que genera aumento de la presión osmótica celular que en última instancia lleva a la liberación de los componentes citosólicos al medio extracelular causando inflamación.

En líneas generales el daño necrótico a un epitelio está mediado por dos mecanismos: intervención del suministro de energía de la célula o por daño directo en las membranas celulares. Los distintos tipos de necrosis comparten muchas características morfológicas, dentro de las que se encuentran: aumento del volumen celular (oncosis) y nuclear, expansión del retículo endoplasmático, membranas de las organelas alteradas, mitocondrias y lisosomas agrandados y alteración de la membrana celular. La pérdida de la integridad de la membrana plasmática provoca la liberación del contenido citoplasmático en el medio circundante y el consecuente reclutamiento de células inflamatorias. Por el contrario la apoptosis está caracterizada por disminución del volumen celular y nuclear. La condensación del núcleo y el citoplasma son característicos de la apoptosis. La integridad de la membrana plasmática y la morfología de las organelas (por ejemplo las mitocondrias) es mantenida hasta las últimas instancias del proceso, evitando así la liberación de los componentes citosólicos <sup>29</sup>.

### **1.10. Motilidad y adhesión (pilus tipo IV y Flagelo)**

Muchas bacterias patógenas combinan una variedad de capacidades que les permiten colonizar y establecer una infección en un hospedador. De hecho muchas bacterias son capaces de dirigir su propio movimiento lo que les facilitaría alcanzar los tejidos blanco del hospedador.

La motilidad bacteriana se presenta en una variedad de formas, las cuales son generadas por distintos apéndices presentes en la superficie de las bacterias.

En *P. aeruginosa* uno de los apéndices encargados de proveer motilidad es el pilus tipo IV (T4P). Se trata de fibras expuestas en la superficie de la bacteria formadas principalmente por polímeros de la proteína pilina. En el caso de *P. aeruginosa* la pilina que mayoritariamente compone el T4P se conoce como PilA <sup>37</sup>.

El T4P media diversas funciones en las bacterias, como la locomoción y la adhesión a células hospedadoras. En *P. aeruginosa* el T4P es considerada la adhesina más importante. Está formada por miles de monómeros de la proteína

pilina y se encuentra localizada en el polo de la célula. El pili es una estructura dinámica que tiene aproximadamente 6-9 nm de diámetro y puede alcanzar varios micrómetros de largo <sup>37</sup>.

En 2001, Skerker & Berg estudiaron *in vivo* mediante microscopía total de reflexión interna el movimiento de una mutante aflagelada de *P. aeruginosa* <sup>38</sup>. Por medio de este método pudieron observar las fibras flexibles del T4P extendiéndose desde las células y explorando la superficie adyacente antes de que ocurra adhesión a la misma. El T4P adherido se encuentra tenso y por medio de retracción es capaz de arrastrar a la bacteria a lo largo de una superficie sólida. Este tipo de movimiento dependiente de ATP (dirigido por la ATPasa PilT o PilU <sup>37</sup>) generado por la extensión y retracción del T4P se conoce como *twitching*.

Además de proveer movimiento mediante *twitching* el T4P está también involucrado en otros fenómenos, como la adhesión a células hospedadoras u otras superficies, asistencia en la formación de biofilms, agregados bacterianos y en la formación de microcolonias <sup>39</sup>.

El T4P fue uno de los primeros factores al que se le encontró un rol importante en la formación de biofilms, participando tanto en la adhesión a la superficie como en la formación de microcolonias. Con el fin de estudiar estos fenómenos se desarrollaron distintas cepas mutantes para alguna de las proteínas que componen el T4P. Así en *P. aeruginosa* las mutantes no piliadas ( $\Delta$ pilA) no presentan T4P en su superficie, mientras que las mutantes hiperpiliadas ( $\Delta$ pilT,  $\Delta$ pilU) presentan un T4P en su superficie que no es capaz de retraerse. Usando estas mutantes Comolli et al observaron una reducción, respecto a la wt, en la asociación a células epiteliales (MDCK, A549 y HeLa) <sup>40</sup>. En 2012 Bucior et al demostraron que *P. aeruginosa* a través del T4P se adhiere a los N-glicanos presentes en la superficie apical de células epiteliales Calu-3 polarizadas <sup>41</sup>.

Chiang & Burrows mostraron que la capacidad adhesiva del T4P era importante para el establecimiento de un biofilm y que el movimiento de *twitching* juega un rol en el desarrollo de la arquitectura del mismo <sup>42</sup>. Conrad et al observaron que células no piliadas formaban biofilms aberrantes, indicando que un T4P completamente funcional es importante para estructurar un biofilm <sup>43</sup>.

Otro de los apéndices más difundidos, encargado de proveer motilidad a las bacterias es el flagelo. Se trata de un propulsor helicoidal que rota por medio de un motor flagelar y que confiere motilidad en medio líquido (*swimming*). *P. aeruginosa* posee un único flagelo polar (flagelo monótrico), mientras que *E. coli* posee varios flagelos que parten desde el polo y desde el cuerpo de la bacteria (flagelos peritricos).

La motilidad flagelar es necesaria para la patogénesis de muchas bacterias, como es el caso de *P. aeruginosa*. Pero el flagelo no sólo le confiere motilidad a esta bacteria, sino que además tiene un rol importante en la adhesión<sup>44 45</sup>. Muchos estudios han mostrado que el flagelo cumple un rol en la adhesión sobre tejidos, pero las moléculas a las cuales el flagelo se une no han sido muy exploradas. En 2012 Bucior et al demostraron que *P. aeruginosa* se adhiere a través del flagelo a las cadenas de heparan sulfato de los proteoglicanos de heparan sulfato presentes en la superficie basolateral de células epiteliales pulmonares polarizadas (Calu-3)<sup>41</sup>. En *P. aeruginosa* ha sido demostrado que la proteína FliD que forma parte del capuchón del filamento del flagelo, se encuentra involucrada en la adhesión a las mucinas expuestas por células epiteliales<sup>46 47</sup>. Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas que forman parte del mucus que recubre a los epitelios. En otros estudios se demostró que la flagelina funcionaba como una adhesina uniéndose a la mucina Muc1 de células epiteliales. Los autores ensayaron la adhesión de *P. aeruginosa* y cepas mutantes de flagelo sobre células CHO o sobre células CHO que expresan Muc1 (CHO-Muc1). La adhesión de la cepa wt sobre células CHO-Muc1 fue mayor comparada con la adhesión de la mutante para flagelina<sup>48</sup>.

Algunos investigadores han sugerido un rol del glicolípido asilado (asialoGM1) en la adhesión de *P. aeruginosa* a células epiteliales. Feldman et al mostraron *in vitro* que la flagelina une asialoGM1<sup>49</sup>. Comolli et al determinaron la adhesión de *P. aeruginosa* a monocapas de células MDCK que fueron tratadas o no con asialoGM1. Observaron que la adhesión de *P. aeruginosa* a monocapas previamente tratadas con asialoGM1 fue mayor que sobre monocapas no tratadas. Cuando realizaron el mismo experimento con una cepa de *P. aeruginosa* no piliada ( $\Delta$ pilA) observaron una disminución en la adhesión comparada con la cepa wt<sup>50</sup>.

Estos estudios fueron realizados con cepas de laboratorio (PAO1 y PAK). Sin embargo, Schroeder et al., no observaron adhesión a asialoGM1 al infectar con aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*<sup>51</sup>. Así, hasta el presente no hay estudios que den cuenta de un receptor esencial involucrado en la adhesión de *P. aeruginosa* a células hospedadoras.

En el cuerpo basal del flagelo se encuentra el motor flagelar, el cual se encarga de generar la fuerza necesaria para el movimiento de rotación. Alrededor del rotor se encuentran distribuidos aproximadamente una docena de estatores, los cuales están formados por canales iónicos. El flujo de protones se convierte en el trabajo mecánico necesario para el movimiento de rotación del flagelo<sup>52</sup>. Propulsadas por el flagelo las bacterias son capaces de dirigir su propio movimiento hacia sustancias favorables (atractantes) o alejarse de sustancias desfavorables (repelentes). Las bacterias controlan la dirección de nado mediante cambios en el sentido de rotación del flagelo. El motor flagelar puede operar en dos sentidos, antihorario y horario (visto desde el filamento hacia el

cuerpo basal). Las proteínas FliG, FliM y FliN se encuentran localizadas en el motor flagelar y están involucradas en el cambio de sentido de rotación. Cuando la bacteria sensa una disminución en la concentración de sustancias atractantes, la proteína quimiotáctica fosforilada, CheY-P, se une a FliM y FliN induciendo un cambio conformacional en FliG, el cual provoca que el motor flagelar cambie el sentido de giro del flagelo de antihorario a horario. Así las bacterias son capaces de direccionar sus movimientos debido a cambios en la concentración de ciertas sustancias atractantes, permitiéndoles de este modo recorrer un camino sesgado a lo largo de un gradiente de concentración desde una región de baja concentración hacia una de alta concentración.

### **1.11. Quimiotaxis en bacterias. Control de la rotación flagelar**

Como mencionamos, las bacterias pueden moverse hacia sustancias favorables (atractantes) o alejarse de sustancias tóxicas (repelentes). Este comportamiento denominado quimiotaxis le permite a las bacterias sobrevivir en ambientes cambiantes. La presencia de atractantes o repelentes es sensada por quimiorreceptores localizados en la membrana plasmática y esta señal es transducida a través de un sistema de fosforilación de dos componentes (proteínas CheA/CheY) que incide sobre la dirección de rotación del flagelo (CheY/motor flagelar).

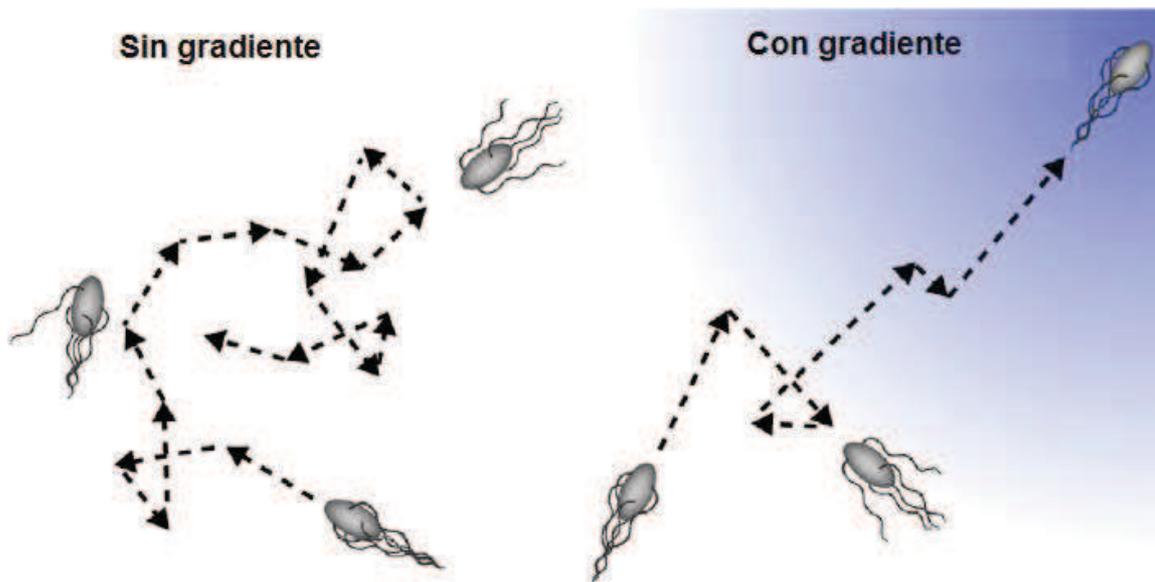
Cuando ocurre una disminución en la concentración de un aminoácido u otro attractante, los quimiorreceptores (MCP o proteínas aceptoras de metilos), dimerizan sufriendo un cambio conformacional que inicia la transducción de la señal hacia el interior de la bacteria a través de la proteína sensora histidina quinasa CheA, la cual se autofosforila (CheA-P). CheA-P actúa como un donador de fosfato, fosforilando a la proteína reguladora de respuesta CheY (CheY-P). CheY-P difunde dentro de la célula e interacciona con la proteína rotacional FliM presente en el motor flagelar.

Cuando el flagelo rota en sentido antihorario la bacteria avanza en línea recta (*run*). En las bacterias peritricas como *E. coli* los flagelos se enrollan unos sobre otros formando un atado que propulsa a la bacteria en una dirección dada (*run*). Cuando CheY-P interacciona con FliM, cambia el sentido de rotación de los flagelos de antihorario a horario, desarmándose el atado de flagelos. En esta situación cada flagelo genera propulsión en una dirección distinta y la bacteria cambia al azar el sentido de orientación (*tumble*).

Un aumento en la concentración del attractante provoca disminución en la autofosforilación de CheA y la frecuencia de las rotaciones del flagelo en sentido horario disminuye. Una disminución en la concentración de attractante

activa la autofosforilación de CheA y aumenta la frecuencia de las rotaciones del flagelo en sentido horario.

La acción de la cascada de señalización es terminada mediante defosforilación de CheY por la fosfatasa CheZ, aunque existe defosforilación intrínseca de CheY. En ausencia de atractantes los quimiorreceptores se activan generando un cambio en el sentido de rotación del flagelo, lo cual genera un cambio al azar en el sentido de orientación de la bacteria (*tumble*). Como consecuencia de sucesivos *runs* y *tumbles* la bacteria se traslada siguiendo un camino aleatorio (Fig. 4, izquierda).



**Figura 4. Quimiotaxis en *E. coli*.** En ausencia de un gradiente de una sustancia quimioattractante, el movimiento de *E. coli* consiste de períodos de *run* (aproximadamente 1 segundo) interrumpidos por períodos cortos de *tumble* (aproximadamente 0,1 segundos). En presencia de un gradiente de una sustancia quimioattractante la bacteria sigue un camino sesgado hacia la zona de mayor concentración del gradiente (*biased random walk*) incrementando la duración de los períodos de *run*. Figura adaptada de Shuangyu Bi et al (2018)<sup>53</sup>.

En presencia de un attractante el sistema se inactiva, disminuye la frecuencia en los cambios de orientación (*tumble*) y la bacteria sigue un camino aleatorio sesgado hacia la zona de mayor concentración del gradiente del quimioattractante. Así los quimiorreceptores se van desensibilizando por sucesivas metilaciones en su porción citoplasmática. Un módulo de retroalimentación integral (mediado por CheR/CheB) modula su estado de metilación (en función de la activación de CheA) sensibilizando y reiniciando el sistema.



## 1.12. Quimiotaxis y patogénesis bacteriana

Distintos autores han sugerido que la quimiotaxis cumple un papel importante en la virulencia ya que sería un mecanismo con el que las bacterias localizan los tejidos blanco del hospedador.

Los primeros experimentos que destacaban la importancia de la quimiotaxis en la patogénesis bacteriana provenían del estudio de cepas mutantes para las proteínas de la vía de señalización de quimiotaxis. Estas investigaciones se han ido complementando con la identificación de quimioattractantes sentidos por las bacterias patógenas.

*Helicobacter pylori* habita el estómago del 50% de la población humana y puede provocar úlceras hepáticas y cáncer de estómago. Recientemente Amieva et al demostraron que *H. pylori* es atraída en segundos por metabolitos provenientes de organoides gástricos. Esta respuesta quimiotáctica es mediada por un receptor que sensa urea, permitiéndole a la bacteria localizar el epitelio gástrico y establecer la infección <sup>57</sup>. Además *H. pylori* es capaz de percibir e integrar otras señales para localizar su nicho. A pesar de habitar en el estómago no es una bacteria acidófila y utiliza el mecanismo de quimiotaxis para alejarse de las zonas más ácidas. Una doble mutante de los receptores que sensan ácido pierde la capacidad de repeler zonas de bajo pH *in vitro* y resulta defectuosa en la colonización del estómago de ratón <sup>58</sup>.

*Salmonella typhimurium* es capaz de prosperar en el ambiente inflamatorio del intestino infectado, desde donde se transmite a un nuevo hospedador. Se adapta a este ambiente mediante el uso de aceptores alternativos de electrones, tales como el nitrato y el tetrionato. Estos aceptores alternativos de electrones se encuentran disponibles durante la colitis intestinal, posibilitándole la respiración anaeróbica y otorgándole valor adaptativo a este patógeno por sobre la flora intestinal. Rivera-Chavéz et al reportaron que *S. typhimurium* es capaz de responder positivamente a gradientes de estos compuestos. Además cepas mutantes para los receptores quimiotácticos que sensan estos compuestos crecen defectuosamente en el ambiente inflamatorio de la colitis <sup>59</sup>.

*Vibrio cholerae*, agente causante del cólera, habita ambientes acuáticos y puede acceder al tracto intestinal humano a través de la ingestión de agua contaminada. Mientras es claro que la motilidad en *V. cholerae* es esencial para la colonización efectiva del hospedador, el rol que cumple la quimiotaxis aún continua siendo explorado <sup>60</sup>. O' Toole et al., usando el ensayo del capilar, evaluaron la respuesta quimiotáctica de dos cepas de *V. cholerae* (cepa *wt* y una mutante para CheR) cuando se las enfrentaba a un extracto de mucus gástrico porcino y a extractos de bilis porcinos y bovinos. Sólo observaron acumulación de la cepa *wt* en los capilares <sup>61</sup>. Dentro de los quimioattractantes

que pertenecían al mucus intestinal encontraron aminoácidos libres y carbohidratos. Realizando una hidrólisis del mucus identificaron monosacáridos como la fucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina. En cuanto a la bilis, se trata de un componente del tracto intestinal que contiene colesterol y fosfolípidos, en particular fosfatidilcolina. Recientemente, Nishiyama et al usando el ensayo del capilar observaron atracción de *V. cholerae* hacia taurina<sup>62</sup>. Esto coincide con el reporte previo de O'Toole et al que mostraron atracción de *V. cholerae* hacia extractos de bilis, ya que la taurina es un componente mayoritario de la misma.

El rol de la quimiotaxis en la patogénesis de *P. aeruginosa* ha sido poco explorado. Un trabajo sugiere un posible rol en la formación de biofilms: una mutante en cheR1 (metiltransferasa del sistema de quimiotaxis che1) muestra una reducción en la frecuencia de sensado de la superficie durante el proceso de formación. Además los biofilms formados por las mutantes no maduran de igual modo que aquellos formados por bacterias *wild type*<sup>63</sup>.

Demostrar de manera directa que el fenómeno de quimiotaxis tiene un rol en el proceso de colonización e infección del hospedador no es siempre sencillo. En los ejemplos de *H. pylori* y *V. cholerae* los autores muestran de manera indirecta que la quimiotaxis cumple un rol en la patogénesis. Para ello aislan el medio o extracto trasladando el gradiente para ensayar quimiotaxis *in vitro*. Así observan que las bacterias son atraídas por gradientes de las sustancias contenidas en ese medio/extracto.

En el ejemplo de *S. typhimurium*, si bien se demuestra de manera directa que la quimiotaxis cumple un rol en la patogénesis, no se demuestra si la misma cumple un rol en la localización del tejido blanco del hospedador. Demostrar este último punto parecería aún más complejo y posiblemente implique el desarrollo de estrategias novedosas.

En la siguiente sección veremos brevemente algunos ensayos clásicos que han sido usados para estudiar quimiotaxis, haciendo hincapié en las ventajas y desventajas de cada uno. Pero más allá de la estrategia particular de cada ensayo, todos ellos tienen un punto en común. Estudian el fenómeno de quimiotaxis en sistemas controlados, *in vitro*, generando gradientes y observando si las bacterias son atraídas hacia las zonas de mayor concentración.

### **1.13. Estudio del fenómeno de quimiotaxis. Ensayos clásicos**

En 1966 Adler fue el primero en llevar a cabo un método cuantitativo para medir quimiotaxis en *E. coli*. En este ensayo se inoculan las bacterias en un

capilar cargado previamente con una solución de la sustancia a ensayar. La sustancia es metabolizada *in vitro*, generándose un gradiente químico<sup>64</sup>. La quimiotaxis es monitoreada observando las bandas de bacterias que se mueven dentro del capilar. La cuantificación se lleva a cabo removiendo del capilar las fracciones de bacterias para luego realizar recuento en placa. El inconveniente de estos ensayos radica en que el gradiente es generado por las bacterias, las cuales metabolizan la sustancia, no permitiendo ensayar compuestos no metabolizables.

Fundamentado en el mismo principio que el ensayo del capilar previamente descrito, en la sección de materiales y métodos se describe un ensayo para cuantificar quimiotaxis, pero que emplea jeringas<sup>65</sup>.

Otro ensayo clásico ampliamente utilizado para determinar respuesta quimiotáctica es el ensayo en agar blando.

En este ensayo, se inocula un colonia de bacterias por punción en placas de agar blando (0,3% agar) conteniendo la sustancia atractante. La baja viscosidad del agar le permite a las bacterias nadar libremente. El gradiente de concentración es establecido por las bacterias al metabolizar el atractante.

En caso de respuesta positiva se observan bandas de bacterias con forma de anillo. Inoculando las mismas cantidades de bacterias y cuantificando el diámetro de los anillos formados es posible hacer al ensayo cuantitativo. En 2002 Ferrández et al., inocularon distintas cepas mutantes de quimiotaxis (CheB, CheZ, CheA, CheW y CheY) en placas de agar blando conteniendo triptona y succinato como atractantes metabolizables. Observaron que los diámetros de los halos de las cepas mutantes de quimiotaxis eran más chicos en comparación con la cepa *wt* correspondiente (PA01)<sup>54</sup>.

Mediante videomicroscopía es posible seguir individualmente a las bacterias (*tracking*) que nadan en una película de líquido cercana a una superficie de vidrio. Para realizar el seguimiento es necesario que las bacterias se desplacen en un plano, como así también adquirir una secuencia de imágenes con una resolución temporal alta, es decir muchas imágenes por segundo. Luego computacionalmente se analizan los recorridos de las bacterias individuales. Estudiando por videomicroscopía la motilidad de una mutante de quimiotaxis en *P. aeruginosa*, Schmidt et al observaron que la cepa mutante cambia la dirección de nado menos frecuentemente que la cepa *wt* y tiende a nadar en línea recta<sup>63</sup>.

El ensayo de agar blando y el ensayo del capilar de Adler presentan la ventaja de ser sencillos y rápidos por lo que resultan de utilidad para empezar a estudiar el fenómeno de quimiotaxis. De hecho han sido ampliamente utilizados para probar atracción hacia distintas sustancias, como por ejemplo carbohidratos y ácidos orgánicos. Pero, como hemos visto, estos ensayos

implican aislar los gradientes para que puedan ser probados. Por otro lado seguir individualmente a las bacterias por videomicroscopía puede resultar complicado más aún cuando el desplazamiento de las bacterias ocurre sobre tejidos.

En este punto nos surge la siguiente pregunta: ¿Qué herramientas pueden ayudar al estudio de la quimiotaxis en el sitio de infección?

#### **1.14. Experimentación y modelización en quimiotaxis**

El uso de la metodología clásica (descrita anteriormente) para evaluar si hay quimiotaxis en el contexto de una infección presenta distintas dificultades. Estas metodologías implican por ejemplo el uso de gradientes controlados y/o el seguimiento individual de las bacterias (*tracking*). Estas herramientas son difíciles de implementar cuando el movimiento ocurre sobre células o tejidos. Una aproximación que ha permitido sortear dificultades en el campo de la quimiotaxis, es el uso de modelos teóricos. Durante los últimos 40 años se ha desarrollado un número considerable de modelos teóricos enfocados en distintos aspectos de la quimiotaxis bacteriana. El avance en el entendimiento de este fenómeno se debe en gran parte a que los modelos teóricos y el trabajo experimental han progresado a la par, complementándose y nutriéndose el uno del otro<sup>66</sup>. El conocimiento experimental detallado de los distintos parámetros del sistema ha permitido generar modelos matemáticos muy precisos y producir simulaciones que reproducen los resultados experimentales. Por ejemplo, un experimento clásico en el cual un quimioattractante difunde desde un capilar generando un gradiente, genera un patrón de distribución de la población bacteriana en torno al mismo, el cual es reproducible mediante experimentos *in silico*<sup>67</sup>. La generación de gradientes estables, muy útiles para estudiar parámetros como la frecuencia de *tumbling* o cambio de orientación de las bacterias, pero muy difíciles de generar *in vitro*, ha resultado un desafío para este campo de estudio. Este inconveniente se ha superado a partir de la realización de experimentos con gradientes estables *in silico*<sup>68</sup>.

El uso de modelos teóricos para estudiar quimiotaxis posibilita la generación de hipótesis de trabajo más sofisticadas y moldea el diseño experimental, permitiendo en ocasiones superar las restricciones experimentales.

### **1.15. Formación de estructuras bacterianas multicelulares: transición desde un estado plantónico a uno sésil, multicelular y adherido a superficie.**

Aunque una visión unicelular de las bacterias ha dominado la microbiología por años, es cada vez más evidente que las bacterias son capaces de intercomunicarse, establecer comportamientos coordinados y formar complejas estructuras multicelulares. A su vez, creciente evidencia muestra que dichas interacciones microbianas resultan clave a la hora de colonizar al hospedador. Los biofilms, por ejemplo representan, como mencionamos, un grave problema para la salud: son altamente resistentes al tratamiento con antibióticos y a la acción del sistema inmune. Son objeto de gran interés y se han desarrollado una variedad de modelos experimentales para su estudio. Sin embargo, una etapa inicial clave en su formación es particularmente poco comprendida: la transición desde un estado planctónico a uno multicelular y asociado a superficie.

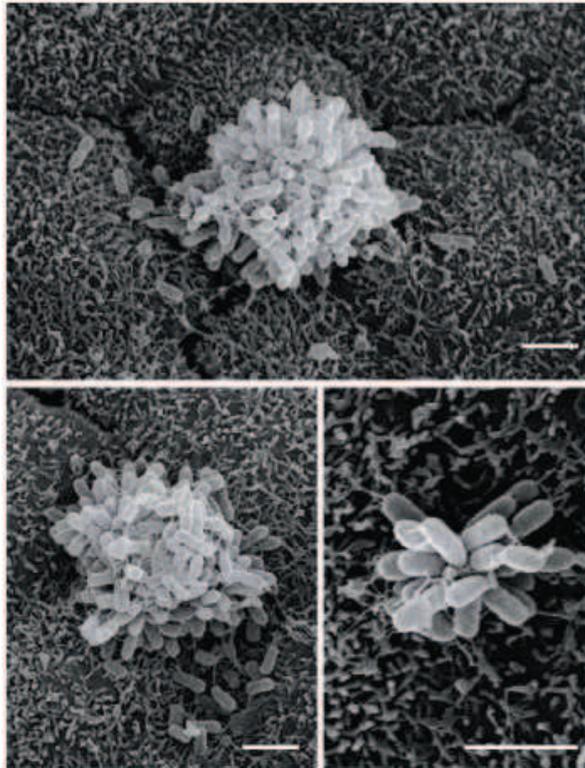
En general, son pocos los modelos disponibles para estudiar esta transición en profundidad, especialmente en el contexto de la interacción con las células hospedadoras.

La interacción con las células hospedadoras a través de la formación de estructuras multicelulares es una característica que comparten muchas bacterias patógenas y que suele resultar beneficiosa para el proceso infeccioso<sup>69</sup><sup>70</sup><sup>71</sup>. A su vez, los mecanismos mediante los cuales estas estructuras multicelulares se forman pueden ser muy diferentes. Por ejemplo, luego de adherirse en forma individual a las células endoteliales, la bacteria *Neisseria meningitidis* se multiplica. Las bacterias hijas permanecen adheridas a través de los pili tipo IV formándose grandes agregados o microcolonias<sup>72</sup>. La presencia de estas microcolonias en la superficie de la célula hospedadora, induce la formación de protrusiones tipo filopodios que ayudan a su cohesión haciéndolas más resistentes a la acción mecánica del flujo sanguíneo<sup>73</sup>.

*Neisseria gonorrhoeae*, el agente causante de la gonorrea, forma también microcolonias en la superficie de células epiteliales, proceso que resulta crucial en la progresión de la infección. Estas microcolonias se forman como consecuencia del agrupamiento de pequeños agregados de bacterias, que se movilizan sobre la superficie de las células hospedadoras. Las bacterias se adhieren a la superficie epitelial en forma dispersa y pueden también multiplicarse sobre la misma. Pero al cabo de unas horas, se visualizan estructuras multicelulares esféricas relativamente grandes, producto del agrupamiento de los agregados. Tanto la cohesión entre bacterias como el movimiento sobre la superficie es dependiente del pilus tipo IV<sup>74</sup>. Taktikos et al. han propuesto, a través de la comparación de modelos matemáticos con

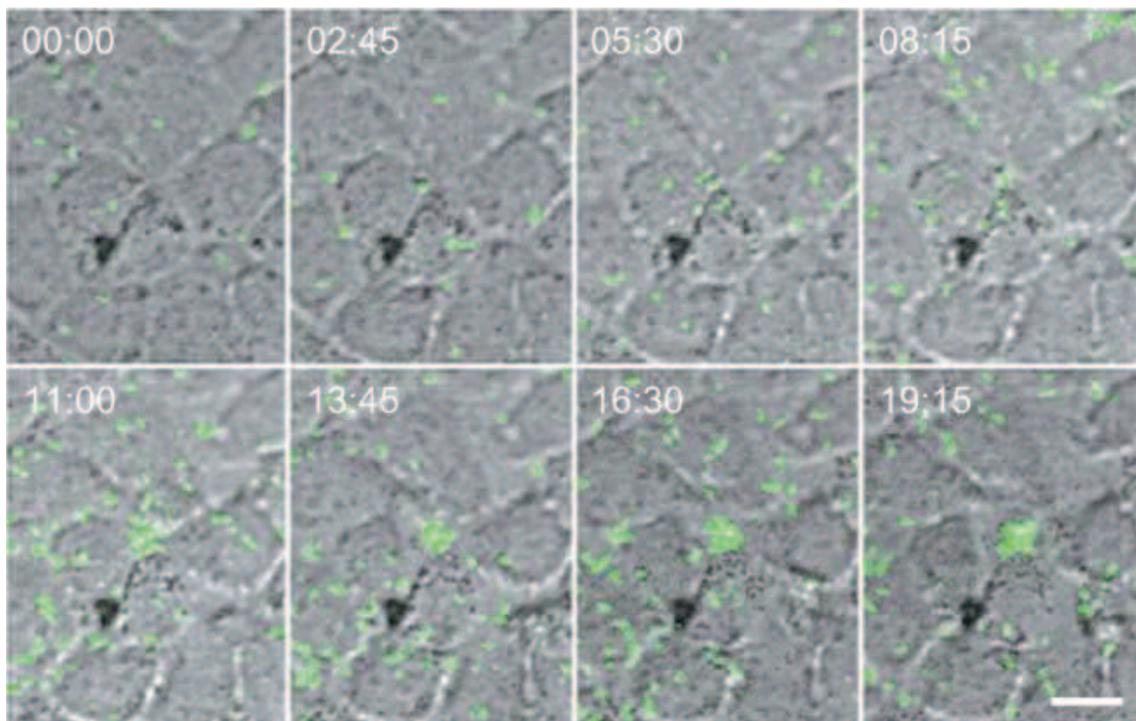
datos experimentales, que la interacción pili-pili es el principal mecanismo de agrupamiento <sup>75</sup>. Recientemente se ha reportado que la agregación reduce la susceptibilidad de esta bacteria a los antibióticos <sup>76</sup>.

Hace ya varios años que nuestro grupo de trabajo estudia la interacción de *P. aeruginosa* con la barrera epitelial. Realizando infecciones con *P. aeruginosa* sobre monocapas de células epiteliales polarizadas observamos que *P. aeruginosa* se adhería principalmente en forma de agregados (Fig. 6).



**Figura 6. *P. aeruginosa* adhiere sobre la superficie epitelial de células MDCK polarizadas principalmente en forma de agregados.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de agregados de *P. aeruginosa* adheridos a la superficie apical de células MDCK. Barra de escala 2  $\mu$ m. Figura adaptada de Lepanto et al (2011)<sup>77</sup>.

A partir de distintos estudios, incluyendo videomicroscopía, determinamos que los agregados se formaban *de novo* sobre la superficie epitelial, y que dicho proceso ocurría en forma secuencial y en el orden de minutos, a través del reclutamiento de bacterias que nadaban activamente impulsadas por el flagelo <sup>77</sup>. La figura 7 muestra una secuencia de imágenes, tomadas de un video, en donde se ve el proceso de formación de un agregado sobre la superficie de células epiteliales.



**Figura 7. La formación de agregados de *P. aeruginosa* ocurre *de novo* sobre la superficie epitelial, en forma secuencial y en el orden de minutos.** Imágenes a distintos tiempos provenientes de una videomicroscopía representativa. Células MDCK polarizadas crecidas en placas con fondo de vidrio y se infectaron con *P. aeruginosa* expresando GFP (verde). En las imágenes se observa la monocapa de células MDCK en campo claro. Los agregados se forman sobre el epitelio por el reclutamiento de bacterias planctónicas que nadan impulsadas por el flagelo. Barra de escala: 10  $\mu$ m. El tiempo en el que fue adquirida cada imagen está indicado en minutos:segundos (margen izquierdo superior). Figura adaptada de Lepanto et al (2011)<sup>77</sup>.

Observamos además que la agregación ocurría en sitios muy localizados de la superficie apical y que prácticamente no había adhesión en otras áreas de la misma. Este mecanismo de agregación es muy diferente a los anteriormente descritos ya que no está mediado por la multiplicación bacteriana y es sumamente rápido. Bacterias que nadan activamente se inmovilizan al adherirse a zonas puntuales de la superficie epitelial, se verifica unión bacteria-epitelio y unión bacteria-bacteria, generándose agregados esféricos y conspicuos cuyo crecimiento es limitado. Este hallazgo nos generó muchas preguntas, algunas de las cuales fueron respondidas durante el desarrollo de este trabajo de tesis ¿Qué hay en esos sitios puntuales de la superficie epitelial a los que las bacterias quedan adheridas? ¿Es importante la estructura epitelial *per se* para que se produzca este fenómeno? ¿Qué rol cumplen los apéndices bacterianos (pili y flagelo) en este proceso? ¿Se trata de un fenómeno estocástico o interviene algún mecanismo regulado que favorece la agrupación?

Pero además, el fenómeno resulta interesante desde el punto de vista de la dinámica del ensamblaje. Pensamos que el seguimiento en tiempo real del posicionamiento individual de cada bacteria durante el proceso de formación del agregado, podría ayudar a entender cómo influye la interacción coordinada bacteria-epitelio y bacteria-bacteria en la organización global del sistema. En este sentido, avances técnicos en el registro de imágenes ha posibilitado coleccionar datos experimentales de bacterias individuales que permiten generar modelos para explicar fenómenos colectivos. Por ejemplo, en dos trabajos recientes se registró la formación de biofilms de *Vibrio cholerae* con gran resolución siguiendo a nivel individual desde la primera bacteria que se adhiere a superficie hasta que por multiplicaciones sucesivas llegan a 10.000. Con esa información se generaron modelos que emulan la dinámica del proceso. Los autores concluyen que la arquitectura global del biofilm emerge del potencial de interacción célula-célula <sup>78</sup> y de la proliferación direccional de los bacilos <sup>79</sup>.

Consideramos que la formación de agregados de *P. aeruginosa* sobre superficie epitelial representa un fenómeno de transición desde un estado planctónico a uno multicelular y adherido con características muy diferentes a los estudiados hasta ahora, y que su estudio reviste gran interés. Provee además un modelo muy interesante para estudiar la dinámica de ensamblaje y la emergencia de estructuras multicelulares en el contexto de la infección.

## 2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es dilucidar mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación de estructuras multicelulares de *P. aeruginosa* en el contexto de interacción con células hospedadoras.

Como mencionamos, en trabajos previos del laboratorio se había determinado que *P. aeruginosa* interacciona con la superficie epitelial formando agregados en sitios puntuales de la misma.

Nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- i) Analizar los sitios de agregación/adhesión de *P. aeruginosa* desde el punto de vista de la estructura epitelial.
- ii) Determinar qué particularidad de dichos sitios posibilita o induce el fenómeno de adhesión/agregación.
- iii) Determinar si la agregación es consecuencia de un fenómeno estocástico o interviene algún mecanismo regulado que favorece la agrupación de las bacterias.
- iv) Indagar sobre qué moléculas median la adhesión bacteria-superficie epitelial.

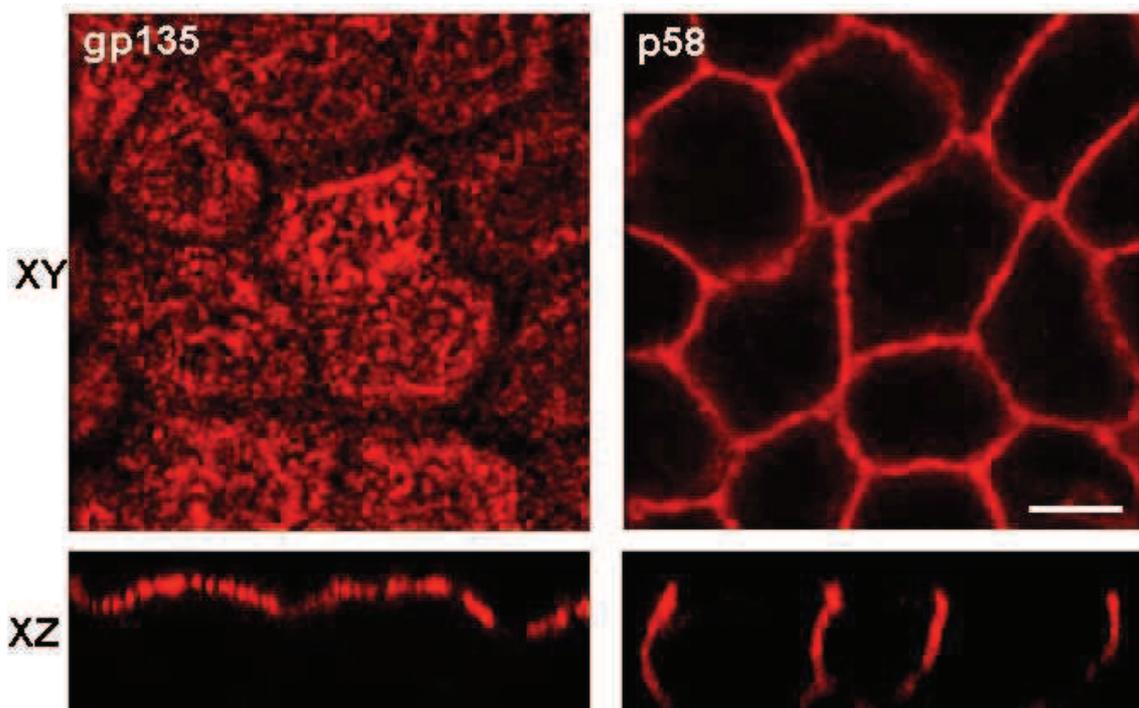
### 3. Resultados. *Primera parte*

#### 3.1. Modelo de células epiteliales polarizadas en cultivo

Nuestro grupo de trabajo viene utilizando hace muchos años el modelo de infección de células epiteliales polarizadas con *P. aeruginosa*. Cuando crecen sobre soportes permeables o sobre cubreobjetos de vidrio siguiendo un protocolo especial distintas líneas de células epiteliales forman monocapas confluentes y polarizadas conectadas por uniones estrechas y adherentes con la superficie apical y basolateral, de composición distinta, claramente distinguibles.

En este trabajo de tesis usamos como modelo de células epiteliales principalmente la línea Madin Darby Canine Kidney (MDCK) de túbulo colector renal de perro. Para permitir que las células polaricen las sembramos en soportes permeables conocidos como filtros *transwell*. Estos soportes cuentan con una membrana porosa sobre la cual se siembran las células distinguiéndose dos compartimientos uno por arriba de la membrana del soporte (a donde se expone la superficie apical) y uno por debajo de la membrana del mismo (a donde se expone la superficie basolateral). Una vez sembradas las células se cultivaron por 48 h en estufa gaseada (5% de CO<sub>2</sub> 37°C). Para corroborar que efectivamente las células habían polarizado, realizamos tinciones con anticuerpos específicos contra proteínas que se localizan exclusivamente en la cara apical ó en la basolateral y las analizamos por microscopía confocal. En la figura 8 se muestran monocapas de células epiteliales MDCK teñidas para gp135 (una glicoproteína presente sólo en membrana apical) o para p58 (exclusiva de la basolateral). Se muestran proyecciones de planos xy a lo largo del eje z (plano xy) y proyecciones del eje x a lo largo del eje z (plano xz). Se visualizan claramente los patrones distintivos de la superficie apical y basolateral marcadas por las proteínas gp135 y p58, respectivamente, lo que indica que las células están adecuadamente polarizadas.

Salvo que se aclare, los experimentos fueron realizados utilizando sistemas *transwell*.

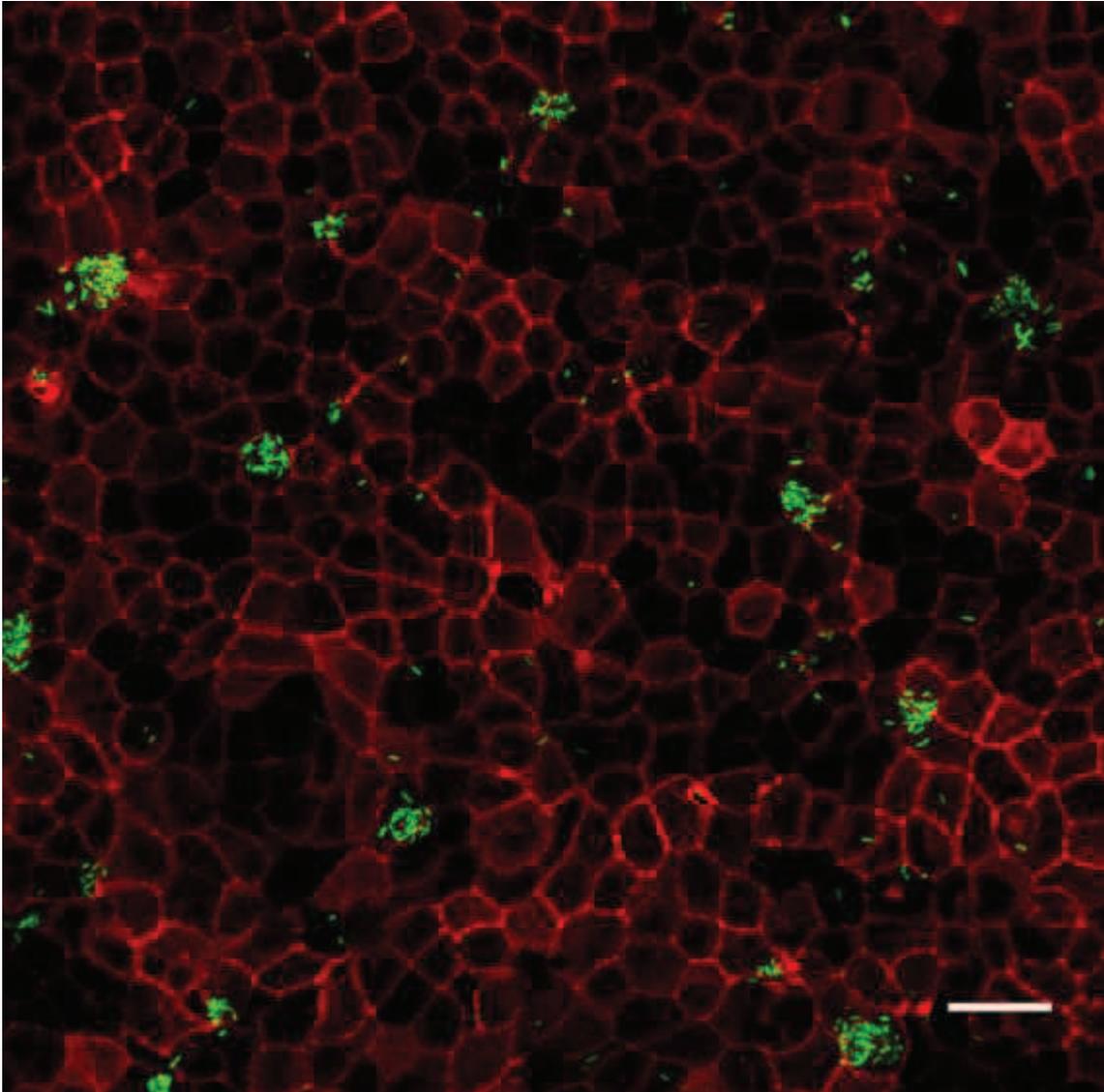


**Figura 8. Monocapas de células epiteliales MDCK. Se muestran proyecciones xy y xz. Las tinciones distintivas para gp135 (cara apical) y p58 (cara basolateral) denotan que las células están polarizadas. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .**

### **3.2. *P. aeruginosa* adhiere sobre la superficie epitelial en forma de agregados**

Estudios previos del grupo determinaron que *P. aeruginosa* interacciona con la barrera epitelial principalmente en forma de agregados<sup>77</sup>. Para adentrarnos en el estudio de este fenómeno, comenzamos reproduciendo dicho resultado. Así, se infectaron con *P. aeruginosa* cepa K (PAK) expresando GFP (PAK-GFP), (multiplicidad de infección=60) monocapas de células MDCK polarizadas crecidas en soportes *transwell* por 1 hora. Las muestras se fijaron, permeabilizaron y se tiñeron para F-actina con faloidina conjugada a rodamina. Observamos agregados de *P. aeruginosa* sobre la superficie epitelial (Fig. 9). Para cuantificar adhesión y agregación adquirimos imágenes de microscopía confocal de 10 campos al azar en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Cada campo incluye aproximadamente 300 células epiteliales. Encontramos, en promedio, 350 bacterias por campo adheridas a la superficie epitelial. El  $94\pm 3\%$  de las mismas formaban parte de agregados. Consideramos como agregados aquellas agrupaciones de bacterias formadas por 6 o más bacterias. El número promedio de bacterias individuales adheridas por campo fue  $7\pm 2$ , mientras que el número promedio de agregados por campo fue  $5\pm 0,4$ . El tamaño de los agregados es variable, pueden contener entre 6 y

300 bacterias. Estos resultados reproducen muy cercanamente a aquellos previamente reportados por nuestro grupo <sup>77</sup>.



**Figura 9.** *P. aeruginosa* adhiere sobre la superficie epitelial principalmente en forma de agregados. Se muestra un campo (proyección xy) con distintos agregados de *P. aeruginosa* sobre la superficie epitelial. *P. aeruginosa* (verde). F-actina (rojo). Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Una vez adherida sobre la superficie epitelial y si se incuba tiempos más largos *P. aeruginosa* puede ser parcialmente internalizada por las células del epitelio. Es ingresada dentro de las células epiteliales en vesículas que luego adquieren características lisosomales siendo eliminada completamente del interior celular después de 24 horas <sup>80</sup>. La internalización de esta bacteria es también objeto

de estudio del laboratorio. En este trabajo de tesis nos focalizamos en el fenómeno de adhesión de *P. aeruginosa* sobre células epiteliales.

### 3.3. Los agregados se forman sobre sitios de multiuniones

Una observación que realizamos consistentemente fue que los agregados se formaban mayormente sobre las uniones célula-célula. Decidimos entonces hacer un estudio cuantitativo del fenómeno, diferenciando además entre los distintos tipos de unión célula-célula.

Las uniones entre células se pueden clasificar de acuerdo al número de células que las conforman. Vista desde la superficie la unión de dos células dibuja una línea, mientras que tres o más células comparten un vértice común y dibujan una multiunión (Fig. 10A).

Para llevar a cabo el estudio planteado, se infectaron monocapas de células MDCK polarizadas (crecidas sobre soportes *transwell*) con PAK-GFP, (multiplicidad de infección=60) por 1 hora y se fijaron. Las células epiteliales se tiñeron para F-actina con faloidina-rodamina.

Se evaluaron 10 campos por experimento y se realizaron tres experimentos independientes.

Para realizar el análisis primero se cuantificó la frecuencia de cada tipo de multiunión en la superficie epitelial. La frecuencia de las multiuniones se cuantificó en monocapas no infectadas. De todos modos, la frecuencia de las multiuniones resultó similar cuando se compararon monocapas infectadas y no infectadas. Posteriormente cuantificamos el número de agregados sobre cada tipo de multiunión. El análisis llevado a cabo fue similar a otro desarrollado para caracterizar la adhesión de *Listeria monocytogenes* a superficie epitelial <sup>25</sup>.

En la Figura 10B las barras grises muestran la frecuencia de cada tipo de multiunión (número de multiuniones de ese tipo cada 1000 células en la superficie epitelial). Cabe destacar que la frecuencia de las multiuniones es inversamente proporcional al número de células que las conforman.

El número de agregados asociados a cada tipo de unión se muestra también en la Figura 10B. Está representado por los círculos negros, expresado como preferencia por tipo de unión. Ejemplificaremos como se calculó esta preferencia para el caso de las uniones de 5 células. El número de agregados sobre uniones de 5 células se multiplicó por la frecuencia de uniones de 2 células y a dicho resultado se lo dividió por la frecuencia de las uniones de 5 células. Se repitió esta operación para cada tipo unión en cada uno de los tres experimentos independientes. Con cada uno de esos valores se calculó un

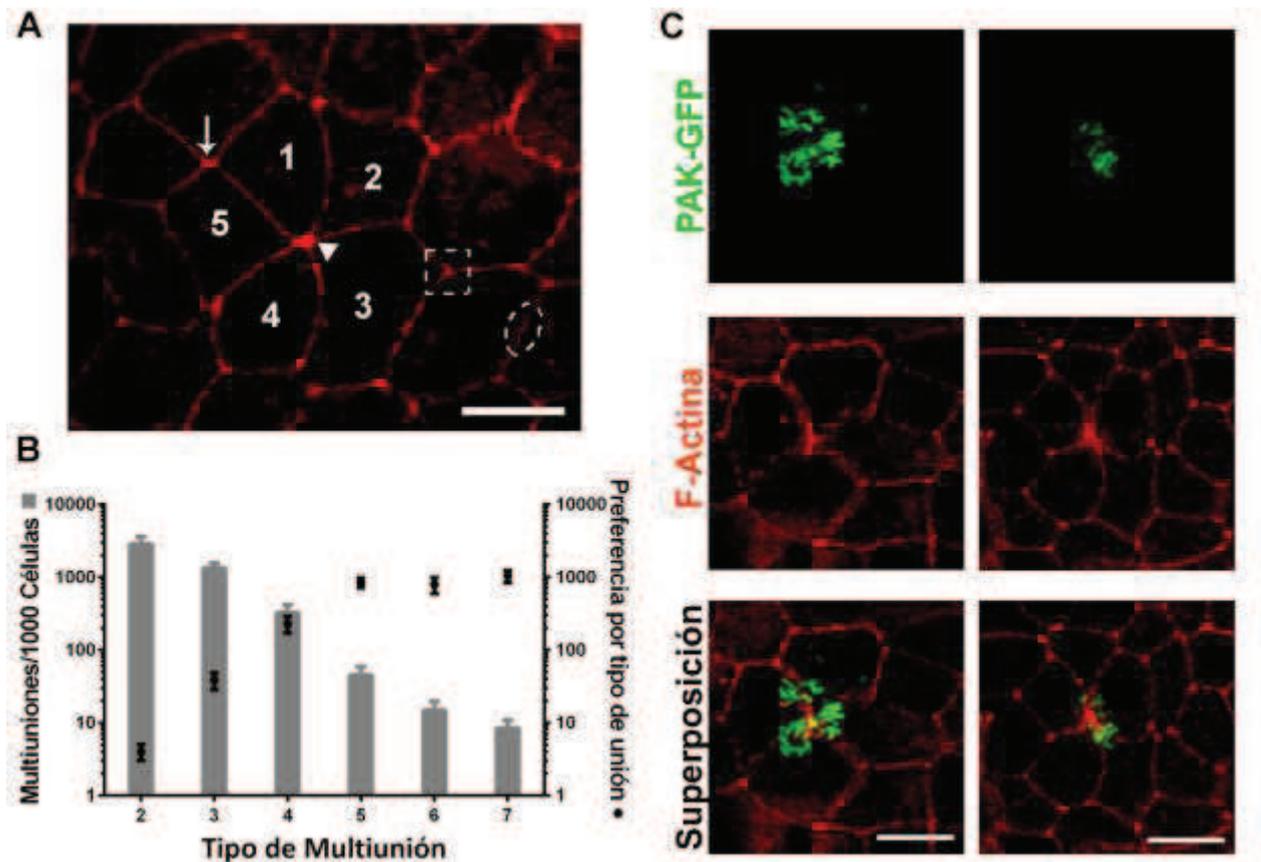
promedio, el cual se graficó como puntos negros en la Figura 10B. Es decir, la preferencia por tipo de unión indica el número de agregados que encontraríamos sobre uniones de 5 células (para este ejemplo) si dichas uniones estuvieran representadas con una frecuencia igual a la de las uniones de 2 células.

En la figura 10C se muestran dos ejemplos de agregados sobre una multiunión de cuatro (izquierda) y una multiunión de cinco células (derecha). Podemos observar que el epicentro de formación de los agregados es el vértice de la multiunión.

Concluimos que *P. aeruginosa* agrega preferencialmente sobre multiuniones celulares formadas por cuatro o más células.

Habiendo observado que los agregados de *P. aeruginosa* se forman preferencialmente sobre los sitios de multiunión, indagamos en cómo dichos sitios pueden originarse. Las multiuniones pueden formarse como consecuencia de algunos procesos celulares que alteran la arquitectura epitelial. Dentro de estos procesos se encuentran: la migración celular, la división celular, la diferenciación celular, la extrusión celular y procesos patológicos como la extrusión de células tumorales. En el caso de la extrusión celular las multiuniones se forman como producto de la remoción de las células del epitelio que mueren y el reacomodamiento de las células vecinas que rodean a la célula muerta en cuestión. Entonces, nos preguntamos si *P. aeruginosa* adheriría sobre las células muertas que se encuentran por encima de los sitios de multiunión.

En la siguiente sección veremos que el fenómeno de adhesión de *P. aeruginosa* sobre los sitios de multiuniones guarda relación con la presencia de células muertas removidas de la monocapa.



**Figura 10. *P. aeruginosa* forma agregados en las multiuniones celulares.** (A) Imagen confocal (plano xy de la superficie) de células MDCK teñidas con faloidina en la que se muestran los distintos tipos de multiuniones: unión de 5 células (triángulo), unión de 4 células (flecha), unión de 3 células (cuadrado punteado) y unión de 2 células (elipse punteada). Los números indican las células que forman la unión de 5. (B) Las barras grises (eje Y, izquierdo) representa la frecuencia de los tipos de multiuniones, calculadas a partir de cuatro campos al azar (aproximadamente 300 células/campo), de una monocapa de células MDCK polarizadas. Los círculos negros (eje Y, derecho) representan el número de agregados de *P. aeruginosa* por tipo de multiunión relativizado a la frecuencia de la unión de 2 células. Datos presentados Media  $\pm$  Error estándar. Los ejes del gráfico se encuentran en escala logarítmica. Coeficiente de correlación de Pearson  $r=0,95$ ;  $p<0,05$ . N=3 (C) Proyecciones de planos xy a lo largo del eje z, muestran agregados de *P. aeruginosa* sobre multiuniones celulares formadas por cuatro (izquierda) y cinco células (derecha). PAK-GFP: verde y F-Actina: rojo. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

### 3.4. Los agregados se forman sobre células apoptóticas extruídas

Los epitelios son estructuras dinámicas cuyas células están conectadas por uniones intercelulares que contactan el citoesqueleto de actina de unas con otras. Así, frente a una perturbación los epitelios pueden responder de manera coordinada.

Los epitelios se encuentran en constante recambio mediante división celular y muerte. Cuando una célula muere por apoptosis es removida del epitelio por constricción generada por las células que la rodean. Como se describió en la introducción, este proceso se conoce como extrusión celular. Una vez que la célula apoptótica es extruída, las células del epitelio que la rodean se reacomodan, formándose una nueva unión multicelular. Dichas multiuniones están típicamente conformadas por un número de cuatro, cinco o más células. Como hemos visto *P. aeruginosa* agrega sobre la superficie epitelial, preferentemente sobre multiuniones de 4 o más células. Entonces, una posibilidad que nos planteamos fue que el sitio de adhesión no fuera la multiunión *per se* o un sitio que la formación de la multiunión dejara expuesto, sino la célula apoptótica extruída. Para responder esta pregunta, se infectaron monocapas de células MDCK polarizadas con PAK-GFP, se utilizó anexina V conjugada a alexa 647 para teñir células apoptóticas, se fijó, se permeabilizó y se tiñó la monocapa con faloidina-rodamina. La anexina V se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se expone en la cara externa de la membrana plasmática en células apoptóticas<sup>27</sup>. La tinción con anexina V mostró la presencia de células y cuerpos apoptóticos en los sitios de agregación de *P. aeruginosa*. En la figura 11A se muestran un grupo de bacterias unidas a una célula apoptótica extruída (izquierda) y a lo que sería un cuerpo apoptótico (derecha). Se observaron muy pocas bacterias adheridas a las células vivas de la monocapa.

Es importante aclarar que las células apoptóticas no muestran tinción con faloidina<sup>81</sup>. Esto podría deberse a la degradación de la F-actina por caspasas que se activan durante el proceso de apoptosis.

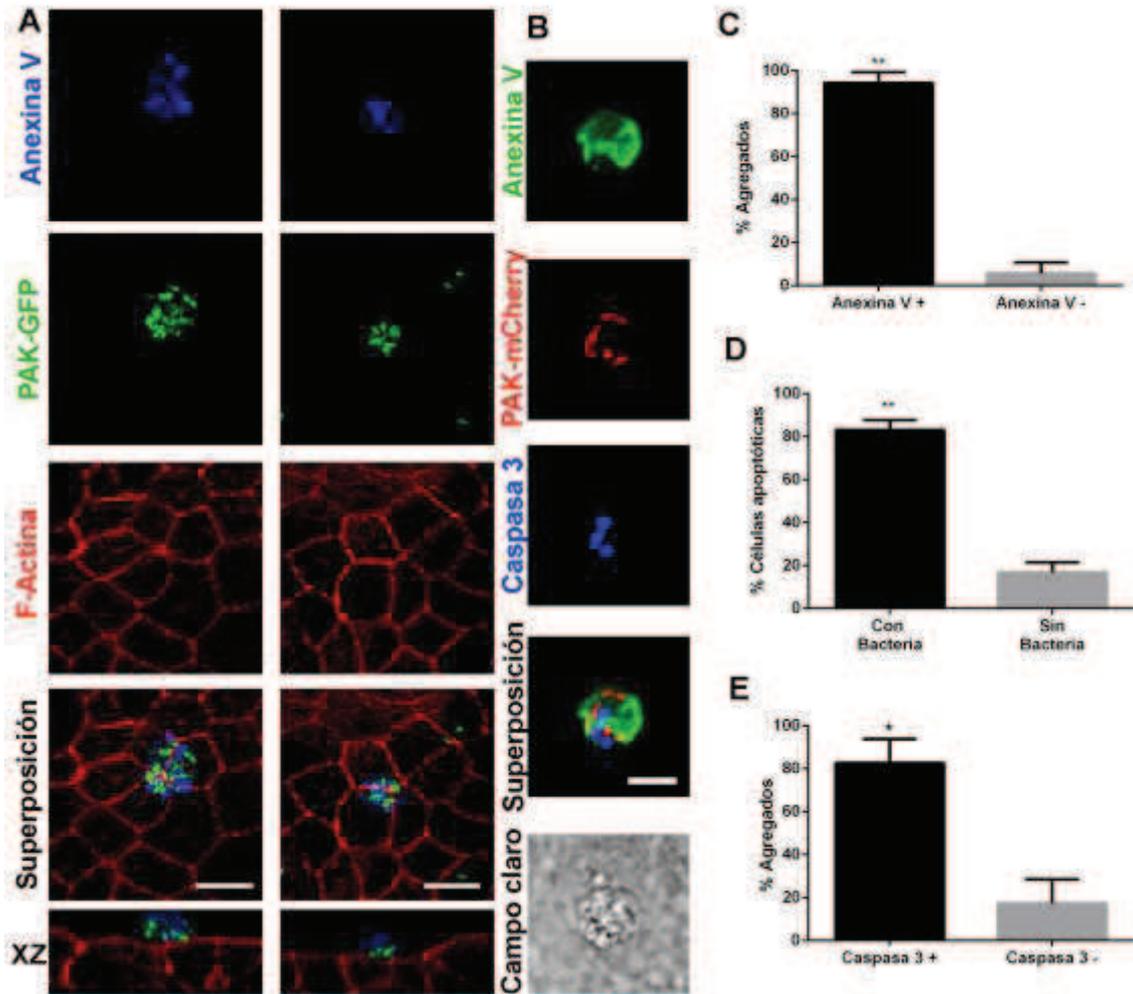
Para confirmar que se trataba de células apoptóticas, se realizó una tinción con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa. Las caspasas son una familia de proteasas que se sintetizan como precursores y algunos miembros de la familia se activan durante el proceso de apoptosis. Cabe aclarar que, en este experimento, crecimos células MDCK polarizadas sobre un cubreobjetos de vidrio. Para ello cultivamos las células MDCK por 4 días sin cambios de medio en estufa gaseada (37°C 5% CO<sub>2</sub>). Cultivar las células sobre un cubreobjeto de vidrio nos permitió observar la célula apoptótica en campo claro. En los filtros *transwell* que nosotros usamos la membrana de soporte no permite el paso de luz, por lo tanto no es posible observar la muestra por campo claro.

En la figura 11B, se observa que *P. aeruginosa* adhiere sobre células apoptóticas extruídas positivas para caspasa 3 activa y anexina V, confirmando de este modo que *P. aeruginosa* se adhiere sobre células apoptóticas extruídas.

Para cuantificar el fenómeno observado, se adquirieron imágenes de 10 campos al azar por cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Se recorrieron los preparados de manera sistemática y cada agregado de *P. aeruginosa* se clasificó como unido a un sitio anexina V positivo o negativo. En otro grupo de tres experimentos, se llevó a cabo el mismo análisis sobre sitios positivos o negativos para caspasa 3 activa.

Encontramos que  $94,3 \pm 2,5\%$  de los agregados se formaron sobre sitios anexina V positivos (Fig. 11C). Además el  $83,1 \pm 2,7\%$  de los sitios anexina V positivos tenían al menos una bacteria adherida (Fig. 11D).

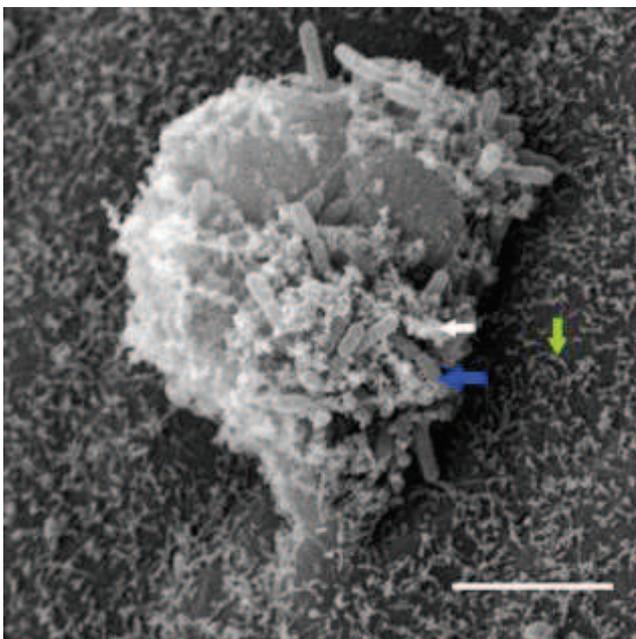
También, encontramos que  $82,7 \pm 11,2\%$  de los agregados estaban formados sobre sitios caspasa 3 positivos (Fig. 11E). Podemos concluir que *P. aeruginosa* adhiere y se agrega sobre células apoptóticas extruídas del epitelio, localizadas por encima de las multiuniones celulares. La adhesión sobre otras zonas de la superficie epitelial implica a muchas menos bacterias y ocurre mayormente en forma individual.



**Figura 11. *P. aeruginosa* se adhiere a las células apoptóticas extruídas.** (A) Proyecciones de planos XY en el eje Z y planos ortogonales (pie de imagen) que muestran agregados de *P. aeruginosa* adheridos a célula apoptótica extruída (izquierda) y a un cuerpo apoptótico (derecha). PAK-GFP: verde, F-Actina: rojo y Anexina V: azul. (B) Las células a las cuales *P. aeruginosa* se adhiere tienen Caspasa 3 activa. PAK-mCherry: rojo, Anexina V: verde y Caspasa 3 activa: azul. El campo claro muestra la célula apoptótica extruída y la monocapa debajo. (C) Porcentaje de agregados formados en sitios positivos para Anexina V. (D) Porcentaje de sitios positivos para Anexina V con al menos una bacteria adherida (E) Porcentaje de agregados formados sobre sitios positivos para caspasa 3 activa. Datos presentados como Media  $\pm$  Error estándar. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ . Prueba t de Student. Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Para observar el fenómeno de adhesión a células apoptóticas con más detalle, se procesaron muestras de monocapas de células MDCK infectadas para ser analizadas por microscopía electrónica de barrido. En la figura 12 se observa una célula extruída con bacterias adheridas. Algo interesante que se pudo apreciar es que en la zona donde están adheridas las bacterias la membrana de la célula apoptótica está lobulizada.

Especulamos que esos lóbulos o microlóbulos podrían contener componentes (ausentes o menos concentrados en el resto de la membrana plasmática) por los que *P. aeruginosa* tiene afinidad. En el laboratorio estamos actualmente estudiando este fenómeno en mayor profundidad.



**Figura 12. *P. aeruginosa* se adhiere sobre zonas lobulizadas de las células apoptóticas extruídas.** Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se ve *P. aeruginosa* agregada sobre una célula apoptótica. La flecha verde indica una microvellosidad en el epitelio. La flecha blanca indica un microlóbulo. La flecha azul indica una bacteria. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

### **3.5. Las células a las que *P. aeruginosa* se une eran apoptóticas antes de la infección**

Está reportado que *P. aeruginosa* es capaz de inducir apoptosis, interactuando directamente con las células hospedadoras a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) o a través de factores solubles, en forma independiente del T3SS. El T3SS es una maquinaria tipo jeringa que permite la inyección de toxinas (efectores) directamente desde el citosol de la bacteria hacia el citosol del hospedador<sup>82</sup>. En 2008 Shafikhani et al mostraron que la cepa PA103 de *P. aeruginosa* es capaz de inducir apoptosis en células HeLa por medio de la inyección de la toxina ExoT a través del T3SS<sup>83</sup>.

Dentro de los factores solubles secretados por *P. aeruginosa* capaces de inducir apoptosis que han sido reportados se encuentran: piocianina, exotoxina A, elastasa, proteasas, etc <sup>82</sup>.

Si bien los tiempos de nuestros experimentos son mucho más cortos que aquellos en los cuales se reporta inducción de apoptosis por *P. aeruginosa* (que van desde 5 hasta 24 h post-infección), nos propusimos evaluar si las células a las que se unía *P. aeruginosa* eran previamente apoptóticas o la apoptosis fue inducida por la bacteria. Para abordar esta pregunta, decidimos, en primer lugar, comparar el número de células apoptóticas entre monocapas infectadas y no infectadas.

Monocapas de células MDCK polarizadas fueron infectadas o no con PAK-GFP. Luego se tiñeron las células apoptóticas extruídas con anexina V conjugada a alexa 647, se fijó, permeabilizó y se tiñó con faloidina-rodamina. Se determinó el número de células apoptóticas en ambas condiciones. Adquirimos imágenes de 10 campos al azar por condición y se realizaron tres experimentos independientes. No encontramos diferencias significativas comparando el número promedio de células apoptóticas extruídas por campo entre monocapas infectadas y no infectadas ( $7,4 \pm 1,1$  y  $7,2 \pm 0,9$  respectivamente). Este resultado indica que *P. aeruginosa* se adhiere a células que eran apoptóticas antes de la infección.

### **3.6. Los agregados también se forman sobre células apoptóticas en una línea epitelial de origen bronquial**

Luego nos preguntamos si el fenómeno de adhesión/agregación sobre células apoptóticas extruídas ocurriría también en una línea epitelial de origen distinto a las MDCK. Como las infecciones pulmonares por *P. aeruginosa* son la principal causa de muerte en pacientes con fibrosis quística, decidimos testear células polarizadas de la línea bronquial humana 16HBE14o-. Para llevar a cabo este experimento se sembraron células 16HBE14o- en soportes *transwell* y se incubaron por 7 días en estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub> 37°C).

Células 16HBE14o- se infectaron por 1h con *P. aeruginosa* cepa K (multiplicidad de infección=60) expresando la proteína roja fluorescente mCherry (PAK-mCherry). Se tiñó con anexina V, se fijó, se permeabilizó y se tiñó con faloidina conjugada a alexa 647. Adquirimos imágenes de 20 campos al azar y se realizaron dos experimentos independientes.

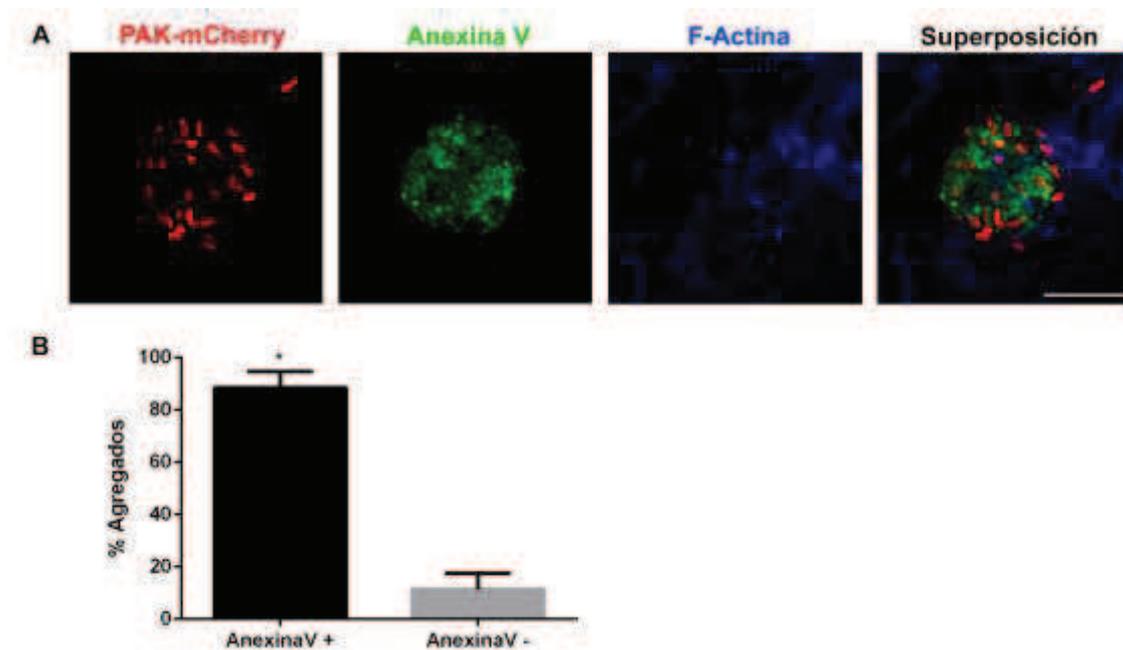
Observamos que *P. aeruginosa* forma agregados sobre células apoptóticas extruídas, también en esta línea celular (Fig. 13). Podemos concluir que el

fenómeno de agregación de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas no depende de la línea celular empleada.

En el laboratorio también se ha observado que *P. aeruginosa* adhiere en forma de agregados sobre células apoptóticas de origen distinto al epitelial. En particular se ha observado adhesión de *P. aeruginosa* sobre macrófagos apoptóticos de la línea celular J774 y derivados de médula ósea de ratón. Este resultado sugiere que *P. aeruginosa* adheriría a células apoptóticas en general sin importar el linaje del cual provengan.

El hecho que *P. aeruginosa* tenga afinidad por la superficie de las células apoptóticas y que la presencia de éstas induzca su agregación, cobra relevancia clínica si pensamos en el contexto de la fibrosis quística. Dicha patología se caracteriza por presentar un número exacerbado de células apoptóticas en las vías respiratorias<sup>84 85</sup>.

El hallazgo es también relevante para el estudio de la infección de heridas y/o quemaduras, contextos también caracterizados por la presencia de un alto número de células muertas, tanto necróticas como apoptóticas.



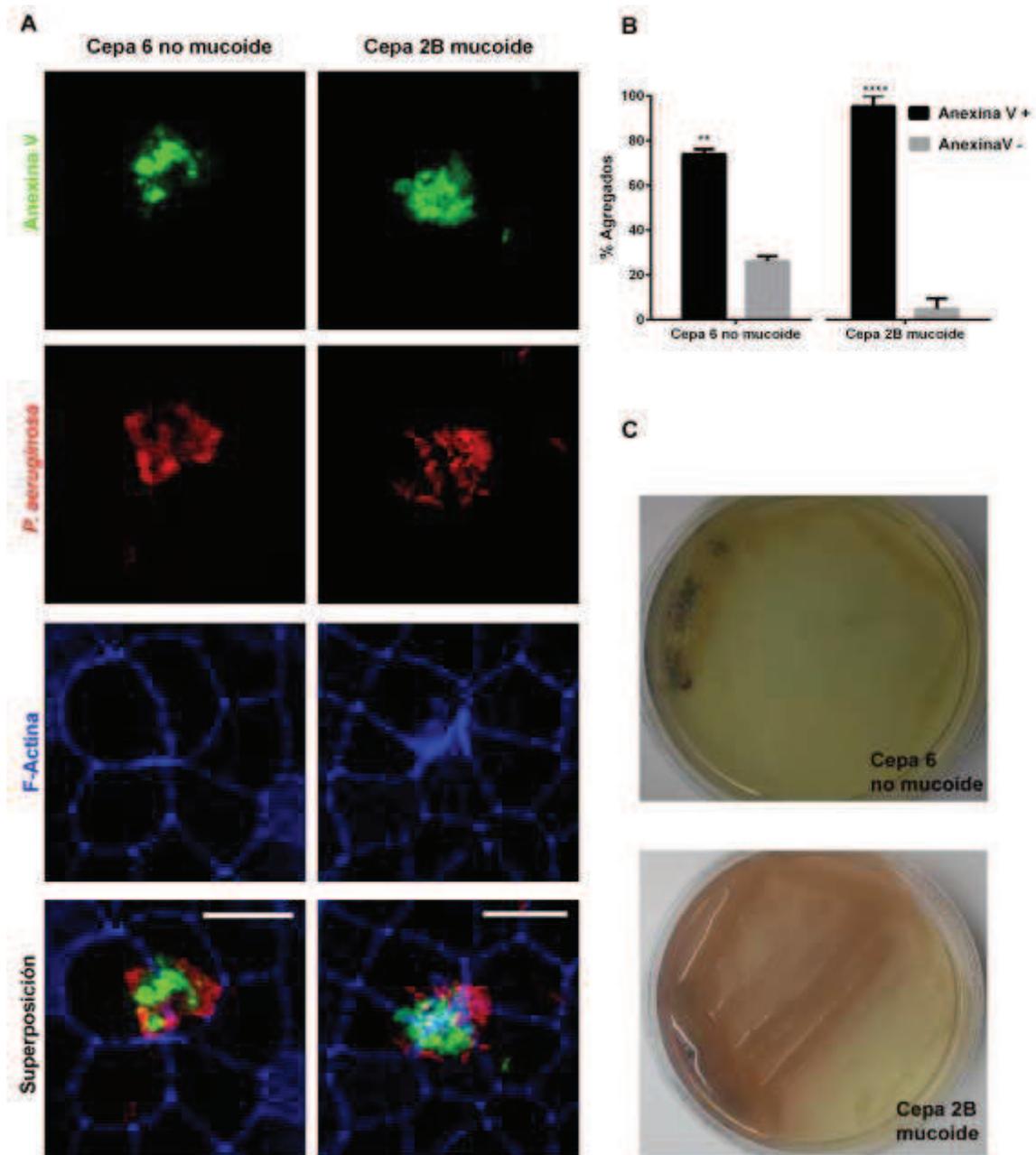
**Figura 13. *P. aeruginosa* agrega sobre células 16HBE14o- apoptóticas extruídas.** (A) Proyección de planos en el eje Z mostrando un agregado de *P. aeruginosa* adherido sobre una célula apoptótica extruída de la línea bronquial humana 16HBE14o-. PAK-mCherry (rojo), Anexina V (verde), F-Actina (azul). Barra de escala: 10  $\mu$ m. (B) Porcentaje de agregados de *P. aeruginosa* formados sobre sitios Anexina V positivos y negativos. Prueba t de Student. \*  $p < 0,05$ , N=2.

### **3.7. Aislamientos clínicos provenientes de pacientes con fibrosis quística forman agregados sobre células apoptóticas extruídas**

Las infecciones por *P. aeruginosa* son la principal causa de muerte en pacientes con fibrosis quística. En el nicho del pulmón fibroquístico solo una determinada proporción de las cepas de *P. aeruginosa* que infectan es capaz de prosperar y establecer una infección crónica. Dentro de las variantes fenotípicas se encuentran las cepas mucoides y las cepas no mucoides. Las cepas mucoides se caracterizan por sintetizar el exopolisacárido alginato. En la figura 14C se puede observar estrías en agar LB de dos aislamientos clínicos provenientes de pacientes con fibrosis quística, la cepa mucoide 2B y la no mucoide 6<sup>86</sup> (gentilmente cedidas por la Dra. Andrea Smania). Podemos observar el aspecto mucilaginoso de la cepa mucoide 2B, producto del alginato secretado.

Hasta aquí, el fenómeno de adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas había sido observado con la cepa de laboratorio PAK. Nos preguntamos si ocurriría también con cepas provenientes de aislamientos clínicos. Para ello, en cultivos de células MDCK polarizadas realizamos infecciones con las cepas 2B y 6. Adquirimos imágenes de 20 campos al azar y se realizaron dos experimentos independientes con cada una de las cepas. Observamos adhesión y agregación de estas cepas de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas extruídas (Fig.14A). Para cuantificar el fenómeno observado, cada agregado de *P. aeruginosa* se clasificó como unido a un sitio anexina V positivo o negativo. Para la cepa cepa 2B encontramos que el 95,2±4,7 % de los agregados se formaron sobre sitios anexina V positivos, mientras que para la cepa 6 el 73,9±2,9 % de los agregados se formaron sobre sitios anexina V positivos (Fig. 14B).

Concluimos que aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística también forman agregados sobre células apoptóticas.



**Figura 14. Aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística agregan sobre células apoptóticas extruídas.** (A) Proyecciones de planos xy en el eje Z de células MDCK polarizadas crecidas en filtros transwell infectadas con las cepas 6 y 2B. Las células apoptóticas extruídas se tiñeron con Anexina V-Alexa 488 (verde). La cepa 6 se marcó con un anticuerpo anti-*Pseudomonas* (rojo) y la cepa 2B expresa la proteína fluorescente mCherry (rojo). Barra de escala: 10  $\mu$ m. (B) Porcentaje de agregados formados sobre sitios anexina V positivos. (C) Cepa 2B y cepa6 en placas de LB-agar. Datos presentados como Media  $\pm$  Error estándar. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Prueba t de Student. N=2.

### 3.8. *P. aeruginosa* adhiere preferentemente a células apoptóticas tardías

Como explicamos en la introducción, cuando una célula epitelial entra en apoptosis, a la vez que transita las distintas etapas de la misma, se va extruyendo de la monocapa. Decidimos entonces evaluar si *P. aeruginosa* tenía preferencia por alguna etapa de este proceso conjunto. Para ello definimos cuatro estadios y evaluamos adhesión.

En cultivos de células MDCK polarizadas se tiñeron las células apoptóticas con anexina V, se fijó, se permeabilizó y se tiñó la F-actina cortical con faloidina-rodamina y el ADN con TO-PRO3. Adquirimos imágenes de las células apoptóticas por microscopía confocal y las clasificamos en cuatro estadios según la etapa en los procesos conjuntos de extrusión y apoptosis, abarcando desde una etapa temprana hasta una tardía.

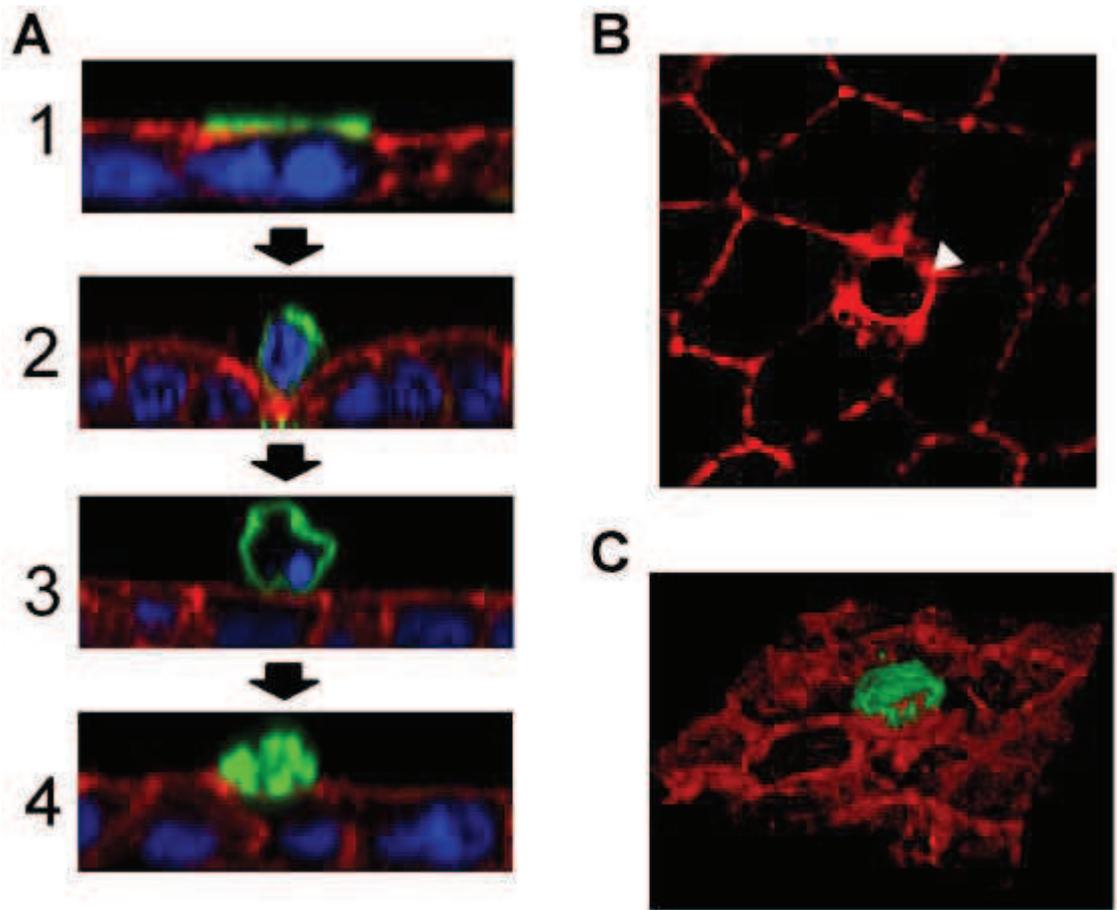
En la figura 15 se muestran imágenes representativas de los distintos estadios. Las células en estadio 1 se encuentran insertas en la monocapa, alineadas junto a las demás células que componen el epitelio. Pero tiñen para anexina V en su membrana apical, la actina cortical, que tiñe para faloidina, permite visualizar el resto de la célula (Fig. 15A-1).

La célula epitelial que entra en apoptosis envía señales a las células que la rodean, éstas se reordenan alrededor de la célula apoptótica formando un anillo de actina y miosina II, el cual la estrangula con la fuerza de contracción necesaria para remover a dicha célula del epitelio. En la figura 15B se muestra un plano xy de una monocapa teñida para F-actina, en la cual podemos observar el anillo de actina.

En las células en estadio 2 se observa un estrangulamiento en su base, permaneciendo en contacto aún con el epitelio. En la figura 15C observamos una reconstrucción 3D de una célula apoptótica en estadio 2. Las células en estadio 2 tiñen para anexina V en toda la extensión de su membrana plasmática (Fig.15A-2).

Las células en estadio 3 ya se encuentran completamente extruídas sobre la superficie del epitelio, aunque pueden seguir conectadas al mismo. Tiñen para anexina V en toda la extensión de su membrana y presentan núcleo picnótico y muchas veces fragmentado, observable mediante tinción del ADN con TOPRO3 (Fig.15A-3).

Las células en estadio 4 tiñen más fuertemente anexina V y muchas veces no se observa presencia de ADN. Su volumen se ha reducido y están aparentemente escindidas en cuerpos apoptóticos (Fig. 15A-4).



**Figura 15. Estadios de apoptosis.** (A) Planos xz de los distintos estadios de apoptosis. Los números a la izquierda indican el estadio. (B) Plano xy de una monocapa teñida para F-actina (rojo). Se indica con un triángulo blanco el anillo de actina que estrangula a la célula apoptótica. (C) Reconstrucción 3D de una célula apoptótica en estadio 2. Verde: AnexinaV. Azul: TO-PRO3. Rojo: Faloidina.

Determinamos entonces el número de células apoptóticas en los distintos estadios y el número de bacterias adheridas a las células en cada uno de los mismos.

La preferencia de adhesión por cada estadio se calculó en un análisis similar al expuesto anteriormente para la preferencia de los agregados por el tipo de multiunión. En este análisis se normalizó con respecto al número de células en estadio 2. Finalmente la preferencia de adhesión se expresó como porcentaje de la preferencia total de *P. aeruginosa* por las células apoptóticas (sin discriminar por estadio) (Fig. 16 derecha).

Podemos concluir que *P. aeruginosa* adhiere preferentemente sobre células apoptóticas en estadio 4.

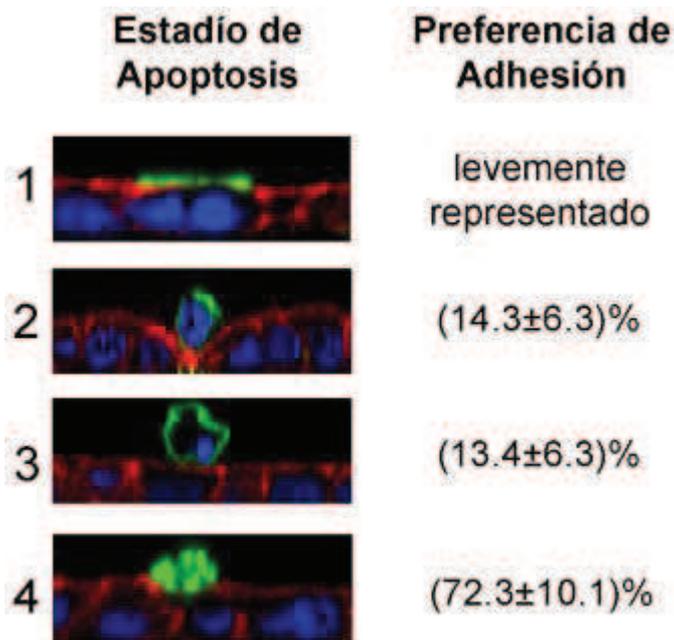


Figura 16. *P. aeruginosa* adhiere preferencialmente sobre células apoptóticas extruídas en estadio 4. Planos ortogonales en los que se muestra los distintos estadios de apoptosis y el porcentaje de bacterias adheridas a cada estadio. Se analizaron 10 campos al azar para cada uno de tres experimentos independientes. Verde: AnexinaV, Rojo: Faloidina, Azul: TO-PRO.

### 3.9. *P. aeruginosa* adhiere también sobre células apoptóticas generadas *in vitro*

Luego nos preguntamos si *P. aeruginosa* adheriría sobre células apoptóticas generadas *in vitro*, fuera del contexto del epitelio.

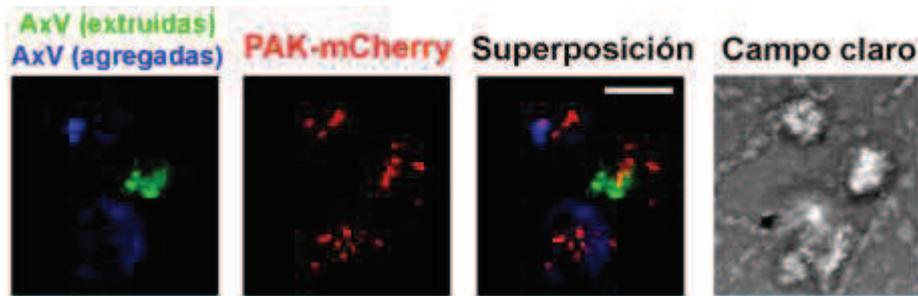
Para ello, expusimos células MDCK previamente tripsinizadas a luz ultravioleta y las incubamos durante 12 hs. Estas células apoptóticas se marcaron con anexina V conjugada a alexa 647 y se añadieron sobre una monocapa de células MDCK polarizadas crecidas sobre cubreobjetos de vidrio, la cual fue previamente teñida con anexina V-alexa 488 (para marcar las células apoptóticas extruídas).

Inmediatamente después se infectó la monocapa con PAK-mCherry y 1 h después se fijó. Observamos que *P. aeruginosa* se adhiere tanto a las células apoptóticas extruídas como a las células apoptóticas generadas *in vitro* por exposición a luz UV (Fig. 17).

Este resultado confirma que *P. aeruginosa* adhiere sobre células que eran previamente apoptóticas y demuestra que el proceso de extrusión *per se* no es necesario para que ocurra la adhesión.

La razón por la que evaluamos adhesión a células apoptóticas generadas por UV sobre una monocapa y no directamente sobre vidrio, es porque *P. aeruginosa* adhiere considerablemente sobre este material, lo que dificulta la observación. Ensayos posteriores en el laboratorio nos mostraron que pueden

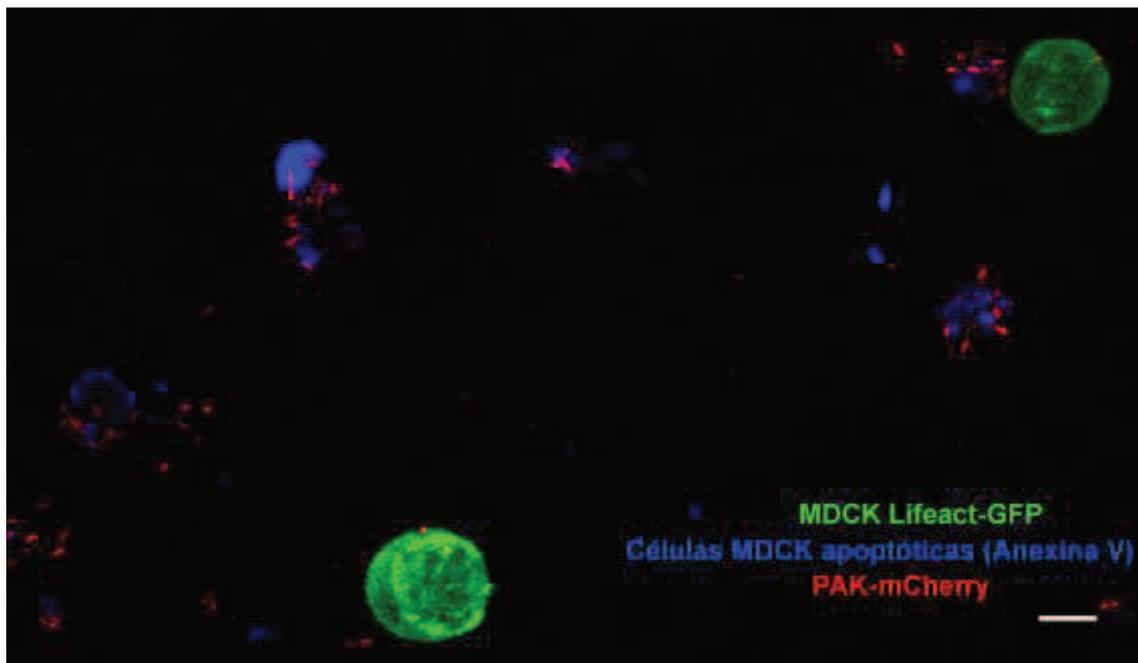
obtenerse preparados más limpios sobre vidrio al co-incubar las bacterias con las células apoptóticas en un tubo, lavar y colocar la muestra sobre vidrio.



**Figura 17. *P. aeruginosa* adhiere sobre células apoptóticas generadas *in vitro*.** Células apoptóticas extruídas de una monocapa de células MDCK crecidas sobre un cubreobjeto de vidrio se marcaron con AnexinaV-Alexa 488 (verde). Células apoptóticas generadas *in vitro* por exposición a luz UV se marcaron con AnexinaV-Alexa 647 (azul) y se agregaron a la monocapa previo a infectar con PAK-mCherry (rojo). En campo claro puede observarse la monocapa debajo. Barra de escala 10  $\mu$ m.

En el protocolo de generación de células apoptóticas por UV, las células son inicialmente tripsinizadas. Nos preguntamos si la tripsinización podría generar algún cambio en la membrana que favorezca la adhesión de *P. aeruginosa*. Está reportado que el tratamiento de las células con tripsina genera alteraciones en la forma de la célula y en la topografía de su superficie<sup>87 88</sup>.

Para evaluar esto se utilizaron dos poblaciones de células MDCK, las wt y las Lifeact-GFP. Sobre las wt se aplicó el protocolo de inducción de apoptosis descrito. Las Lifeact-GFP sólo se tripsinizaron, ambas poblaciones se mezclaron, se agregaron a una monocapa de células MDCK polarizadas y la muestra se tiñó con anexina V-alexa 647. *P. aeruginosa* prácticamente no adhirió sobre las células vivas y tripsinizadas (Lifeact-GFP) (Fig. 18). Descartamos entonces que la adhesión de *P. aeruginosa* a células apoptóticas generadas por UV se debiera a alteraciones causadas por la tripsinización.



**Figura 18. *P. aeruginosa* no se adhiere a células vivas tripsinizadas.** Células MDCK apoptóticas generadas por exposición a luz UV se mezclaron con células MDCK Lifeact-GFP despegadas con tripsina y se agregaron a una monocapa de células MDCK polarizadas crecidas sobre un cubreobjetos de vidrio. Se tiñeron con Anexina V- Alexa 647 y se infectaron con PAK-mCherry por 1h. Se muestra una proyección de planos confocales en el eje Z. Barra de escala 20  $\mu$ m.

### 3.10. La adhesión sobre células muertas es independiente del tipo de muerte celular

Nauta et al, entre otros, reportaron que las células apoptóticas tardías comparten características con las células necróticas. Dentro de estas características se encuentran la exposición de azúcares como la manosa, fucosa y N-acetilglucosamina en la membrana plasmática<sup>33 34 89 90</sup>. Nos preguntamos si *P. aeruginosa* adheriría también sobre células necróticas.

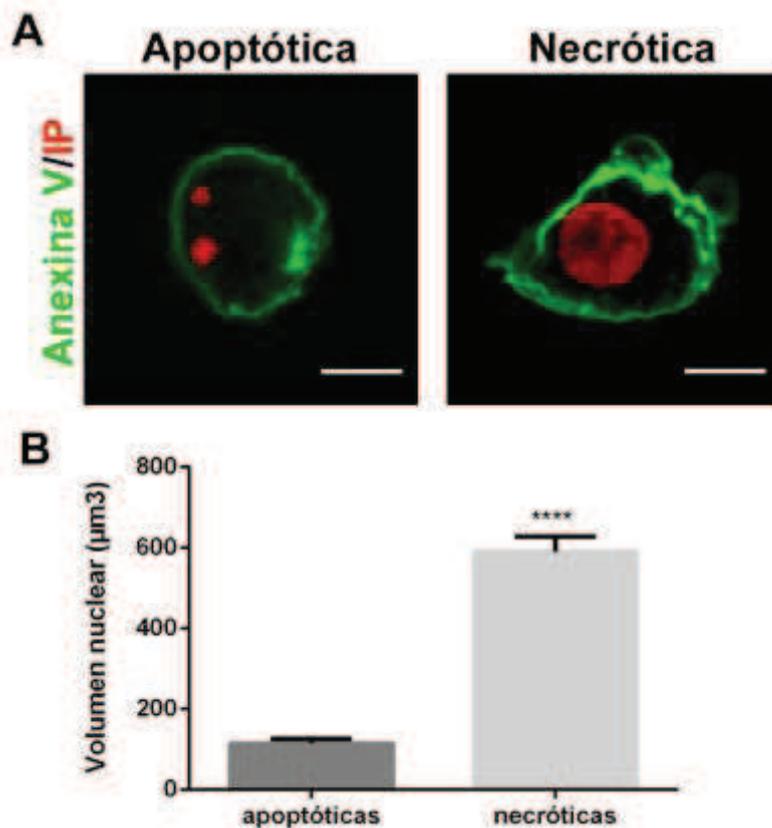
Para responder esta pregunta, generamos células necróticas *in vitro* tratando células MDCK con peróxido de hidrógeno e incubándolas por 20 hs.

Para corroborar que fueran efectivos los protocolos de generación de células apoptóticas (sección anterior) y necróticas, las muestras se tiñeron con AnexinaV/Ioduro de Propidio, luego se fijaron y se observaron al microscopio. Se determinó que en ambos casos la mayoría de las células se marcaba con AnexinaV, indicando la efectividad de los tratamientos.

Luego comparamos el volumen nuclear de células apoptóticas y necróticas. Es característico de las células necróticas un aumento del volumen nuclear. Por el

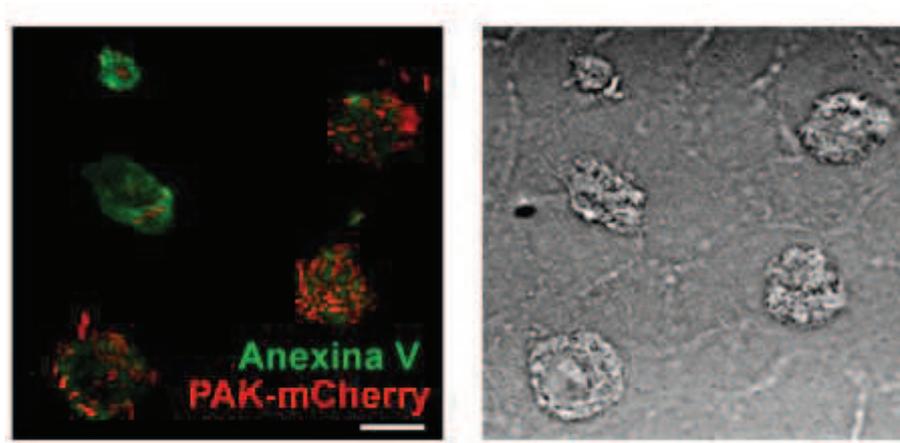
contrario las células apoptóticas sufren una reducción del mismo. Así en el caso de las células apoptóticas la reducción de volumen que ocurre en el proceso está ligado al eflujo de potasio y cloruro<sup>91</sup>. En cambio el aumento de volumen que ocurre durante el proceso de necrosis se debe al ingreso de sodio a través de carriers de membrana y de canales catiónicos no selectivos activados por estrés<sup>91</sup>.

Utilizando el plugin *voxel counter* de ImageJ (ver materiales y métodos) evaluamos volumen del núcleo y encontramos que, en promedio, el de las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue aproximadamente 5 veces mayor que el de las células tratadas con UV (Fig. 19B). Además, en muchos casos, las células tratadas con UV mostraron un núcleo fragmentado (Fig. 19A). Confirmamos así el tipo de muerte celular en cada caso.



**Figura 19. Generación de células apoptóticas y necróticas *in vitro*.** (A) Célula MDCK apoptótica tardía (izquierda) y necrótica (derecha), generadas por exposición a luz UV y tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. Las células se tiñeron con Anexina V-Alexa 488 (verde) y los núcleos con yoduro de propidio (rojo). Barra de escala 5 µm. (B) Volumen nuclear en micrómetros cúbicos (µm<sup>3</sup>) de células apoptóticas y necróticas (N=3). Se evaluaron 70 células totales. Prueba t de Student. \*\*\*\*p < 0,0001.

Para evaluar entonces, adhesión a células necróticas, se utilizó el protocolo descrito y luego las células, se tiñeron con anexina V-alexa 488 y se agregaron, justo antes de la infección, a una monocapa de células MDCK polarizada crecida sobre un cubreobjetos de vidrio. Como podemos observar en la figura 20, *P. aeruginosa* adhiere también sobre estas células. Concluimos que *P. aeruginosa* adhiere sobre células muertas independientemente del mecanismo por el cual dichas células murieron.



**Figura 20. *P. aeruginosa* adhiere también sobre células necróticas.** Células necróticas generadas *in vitro* por tratamiento con  $H_2O_2$  se tiñeron con Anexina V-Alexa 488 (verde) y se agregaron a una monocapa de células MDCK previo a infectar con PAK-mCherry (rojo). Barra de escala: 10  $\mu m$ .

## 4. Resultados. Segunda parte

Como se explicó en la introducción, trabajo previo de nuestro grupo determinó que la formación de los agregados sobre la superficie epitelial ocurría en el orden de minutos por el reclutamiento de bacterias que nadaban impulsadas por el flagelo. Es decir que el fenómeno en estudio representa una transición del estado planctónico al multicelular sumamente rápida e inducida, de alguna manera, por la presencia de las células hospedadoras. Por lo reportado en la primer parte de esta tesis, sabemos que es específicamente sobre la superficie de las células muertas donde se produce el reclutamiento de las bacterias.

A partir de estas observaciones, nos planteamos dos preguntas:

- ¿Cómo localiza *P. aeruginosa* a las células apoptóticas?
- ¿Qué moléculas median la adhesión de *P. aeruginosa* a las células apoptóticas?

### ¿Cómo localiza *P. aeruginosa* a las células apoptóticas?

Para tratar de responder esta pregunta, nos planteamos dos escenarios posibles. Un escenario estocástico en el cual las bacterias que están nadando chocan aleatoriamente con una célula apoptótica y se adhieren. O un escenario quimiotáctico, en el cual las células apoptóticas liberan alguna sustancia atractante, formándose un gradiente que direcciona hacia ellas a las bacterias.

#### 4.1. *P. aeruginosa* localiza las células apoptóticas propulsada por el flagelo

En una primera instancia quisimos corroborar que fuera efectivamente el flagelo quien provee la motilidad que acerca las bacterias a las células apoptóticas extruídas. El flagelo es un apéndice que funciona como un propulsor helicoidal, el cual rota y le provee motilidad a la bacteria generando un movimiento conocido como *swimming*<sup>92</sup>. Además, como se describió anteriormente, el proceso de quimiotaxis es dependiente del nado propulsado por flagelo.

Realizamos entonces infecciones con PAK wt y con la cepa mutante de flagelo PAK FliC<sup>-</sup> (multiplicidad de infección=20, 1 hora) sobre monocapas de células MDCK polarizadas. La mutante Flic<sup>-</sup> es una cepa no mótil, ya que no tiene flagelo funcional. El gen *flic* codifica para la proteína flagelina, la cual es el principal componente del flagelo bacteriano.

Adquirimos imágenes de 10 campos por condición y realizamos tres experimentos independientes.

Cuantificamos el número de bacterias adheridas a células apoptóticas. Encontramos una disminución de aproximadamente un 98% en la adhesión de PAK Flic- a células apoptóticas con respecto a la adhesión de PAK wt (Fig 21B). Prácticamente no se observó adhesión a las células apoptóticas con la mutante PAK Flic- (Fig. 21A). Podemos concluir que el flagelo provee la motilidad necesaria para que las bacterias puedan llegar a las células apoptóticas. No podemos descartar sin embargo, que el flagelo actúe además como adhesina, y que esta función contribuya al fenotipo observado.

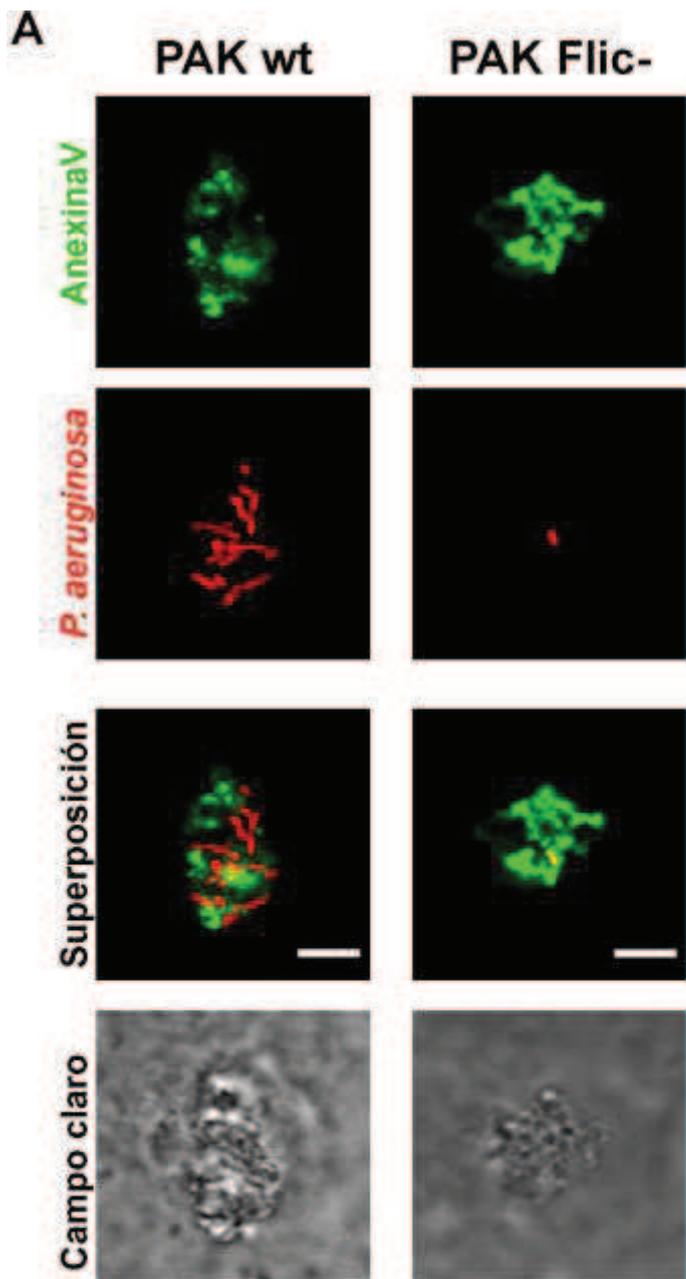
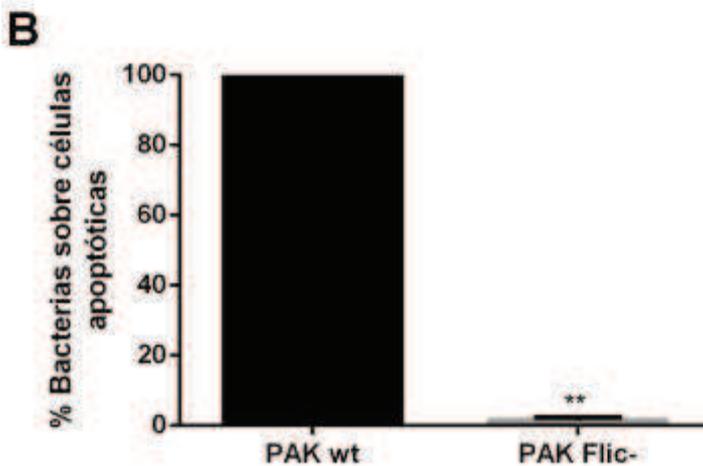


Figura 21. El flagelo propulsa a *P. aeruginosa* hacia las células apoptóticas extruídas. (A) Proyecciones de planos en el eje Z que muestran bacterias adheridas a células apoptóticas extruídas. (B) Porcentaje de bacterias sobre células apoptóticas para las cepas PAK wt y PAK Flic-. Datos presentados como Media±Error estándar. N=3. \*\*  $p < 0,01$ . Prueba t de Student. Barras de escala: 5  $\mu$ m.



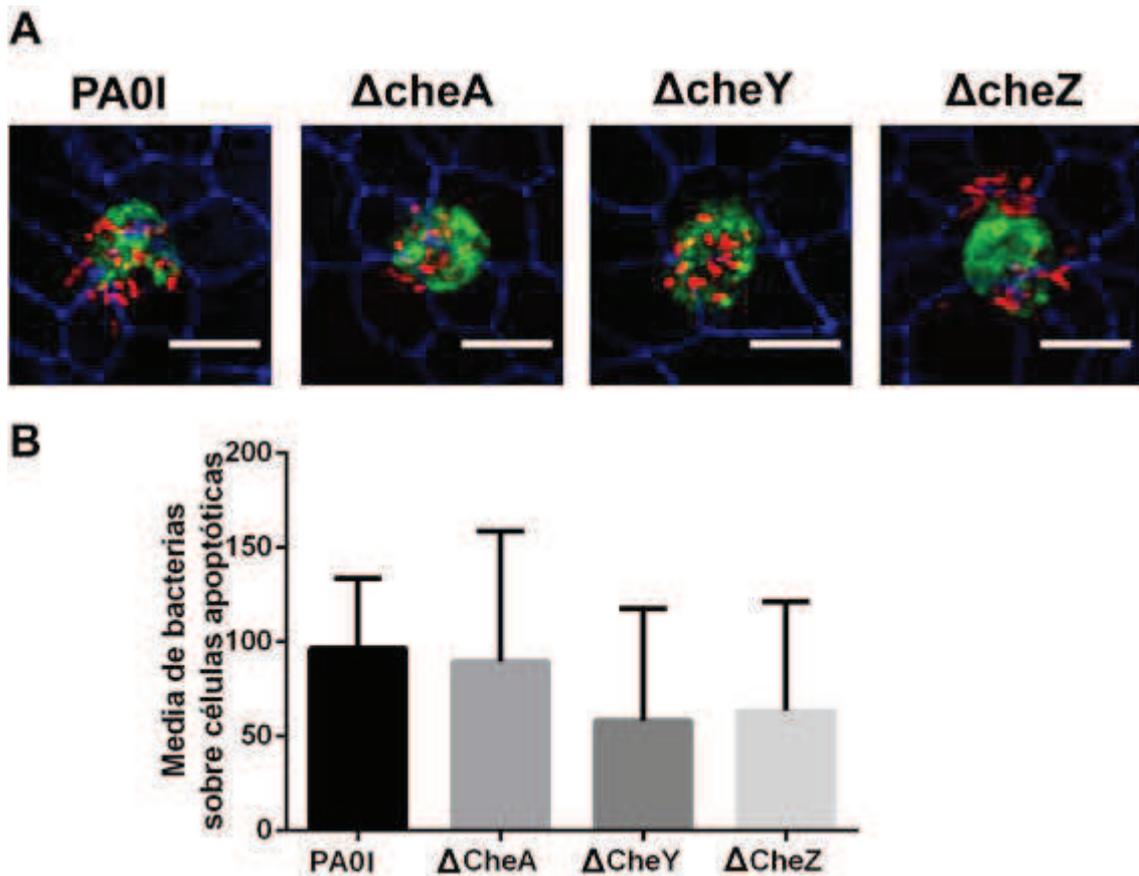
## 4.2. Mutantes de quimiotaxis forman agregados sobre células apoptóticas extruídas

La primera aproximación que utilizamos para testear si la quimiotaxis estaba involucrada, fue evaluar formación de agregados en cepas mutantes. Estas mutantes, cedidas gentilmente por la Dra. Caroline S. Harwood, están construídas en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 01 (PA01). En particular se testearon las mutantes de delección:  $\Delta$ cheA,  $\Delta$ cheY o  $\Delta$ cheZ. Los genes deletados codifican para proteínas de la vía de quimiotaxis dependiente de flagelo.

Como se explicó en la introducción, a través de una cascada de señalización, estas proteínas che transmiten la respuesta sensada por los quimiorreceptores en el exterior celular hacia el interior modificando o no el sentido de rotación del flagelo, lo que conduce a un movimiento exploratorio (“random walk”) o, por ej., a un acercamiento hacia sustancias quimioattractantes (“biased random walk”). Todas las señales quimiotácticas sensadas por los quimiorreceptores convergen en una misma vía de señalización.

Infectamos monocapas de células MDCK polarizadas con PA01 mCherry, PA01  $\Delta$ cheA mCherry, PA01  $\Delta$ cheY mCherry y PA01  $\Delta$ cheZ mCherry (multiplicidad de infección=20, 1 hora). Se adquirieron imágenes de 10 campos por condición y se realizaron tres experimentos independientes. Aclaración: Habíamos corroborado previamente que la cepa *wt* (PA01 mCherry) formaba agregados sobre células apoptóticas extruídas.

No se observaron diferencias significativas entre las cepas mutantes ( $\Delta$ cheA,  $\Delta$ cheY y  $\Delta$ cheZ) y la cepa *wt* (PA01) (Fig. 22).



**Figura 22. Mutantes de quimiotaxis agregan sobre células apoptóticas extruídas.** (A) Planos mostrando agregados de las distintas cepas. AnexinaV (verde), bacterias (rojo), faloidina (azul). Barra de escala 10  $\mu$ m. (B) Número promedio de bacterias por célula apoptótica. Se analizaron 10 campos por cepa y se realizaron 3 experimentos independientes. Datos presentados como Media  $\pm$  Error estándar. N=3. No se encontraron diferencias significativas. Análisis de la varianza de un factor.

Medir quimiotaxis en general conlleva cierta dificultad. Más complejo aún resulta evidenciar la necesidad de quimiotaxis para un proceso infeccioso. Decidimos entonces utilizar otra aproximación. Nos propusimos ensayar, en condiciones más controladas, si el medio de cultivo condicionado por células apoptóticas era quimioattractante.

### 4.3. Evaluación del medio condicionado por células apoptóticas como quimioattractante

El método que elegimos para medir quimiotaxis es similar al ensayo del capilar descrito por Adler. Este ensayo del capilar modificado consiste en lo siguiente: se ponen en contacto jeringas cargadas con la solución quimioattractante con un tip que contiene una suspensión de bacterias. Se forma un gradiente de concentración a lo largo del sistema tip-jeringa, así, en el tip se localiza la zona de menor concentración y en el interior de la jeringa la zona de mayor concentración del gradiente. Si la solución ensayada resulta quimioattractante, las bacterias nadan desde el tip hacia la jeringa siguiendo el camino del gradiente. Luego de un tiempo de incubación se desarma el sistema, se realizan diluciones seriadas del contenido de las jeringas y se determina el número de bacterias por recuento en placa de agar.

Una de las ventajas de este método es la posibilidad de ensayar varias muestras simultáneamente. Los tips pueden ser colocados formando una fila sobre un soporte permitiendo insertar fácilmente las jeringas una tras otra. El ensayo con jeringas es sencillo de realizar y utiliza materiales no costosos.

Para comenzar decidimos ajustar las condiciones del ensayo de quimiotaxis con jeringas usando una solución de un quimioattractante ya probado. En este caso usamos una solución de succinato. *P. aeruginosa* usa preferencialmente ácidos orgánicos dicarboxilados de 4 carbonos, tales como malato, fumarato y en particular succinato como fuente de carbono y energía<sup>93 54 94</sup>. En *P. aeruginosa* se han identificado dos sistemas Dct sensores y transportadores de ácidos orgánicos dicarboxilados de 4 carbonos, un sistema de baja afinidad (DctA) que funciona en concentraciones del orden mM y un sistema de alta afinidad (DctPQM) que es efectivo en el orden  $\mu\text{M}$ <sup>95</sup>.

Se cargaron jeringas de 1 ml con una solución de succinato 10 mM en caldo M9. Las jeringas cargadas se enfrentaron a una suspensión de *P. aeruginosa* en caldo M9 contenida en un tip ( $10^5$  bacterias).

Los datos de los recuentos de colonias mostraron mucha dispersión. Tratando de disminuir dicha dispersión, cada ensayo se repitió tres veces y cada condición dentro de cada ensayo se realizó por quintuplicado.

Los datos de recuentos de colonias se analizaron mediante un análisis de la varianza. Elegimos este modelo estadístico por algunas razones que veremos a continuación. Los datos de recuento de colonias representan una variable cuantitativa. El análisis de la varianza se puede aplicar a esta clase de datos, cuando buscamos detectar diferencias entre más de dos tratamientos. El análisis de la varianza es una prueba estadística paramétrica. Estas pruebas estadísticas a diferencia de las no paramétricas suponen una distribución de

probabilidad para la variable respuesta. Las pruebas paramétricas poseen más potencia que su equivalente prueba no paramétrica, es decir, a más potencia mayor capacidad tiene la prueba estadística para detectar diferencias entre tratamientos.

Observamos que los datos tenían mucha variabilidad. Esto representa un problema, porque para aplicar un análisis de la varianza los tratamientos deben tener similar dispersión. Para ello transformamos los datos aplicando raíz cúbica. El análisis de la varianza se realizó mediante el software R. Se consideró un solo factor fijo, un factor aleatorio y una variable respuesta. De acuerdo al ensayo el factor fijo es la cepa de *P. aeruginosa* (PAK wt, PA01 wt, PA01  $\Delta$ cheA, PA01  $\Delta$ cheZ, PAK Flic-) o el medio (MEM sin suero, medio condicionado o medio no condicionado). El factor aleatorio representa la cantidad de experimentos independientes (tres experimentos independientes). Incluir el factor experimento como un factor aleatorio permite poner a prueba si réplicas de experimentos independientes difieren entre sí, y si así fuese se podría determinar cuánto contribuye dicho factor a la variabilidad total del ensayo. La variable respuesta es el dato de recuento de colonias transformado con raíz cúbica. En el planteo de este análisis estadístico consultamos al Lic. Ricardo Bello, quien nos sugirió como plantear el modelo de análisis de la varianza.

En todos los ensayos las réplicas independientes de los experimentos no resultaron significativamente diferentes entre sí.

Los datos transformados se representaron en gráficos de caja y bigote. En este tipo de gráficos, la caja representa el rango intercuartílico. El rango intercuartílico comprende el 50% de los datos. El extremo superior de la caja representa el valor del tercer cuartil que corresponde con el valor que acumula el 75% de los datos, mientras que el extremo inferior de la caja representa el primer cuartil que corresponde con el valor que acumula el 25% de los datos. Dentro de la caja la línea representa el valor de la mediana, mientras que el punto cuadrado representa el valor de la media. El extremo del bigote superior representa el valor máximo del conjunto de datos, mientras que el extremo del bigote inferior representa el valor mínimo del conjunto de datos.

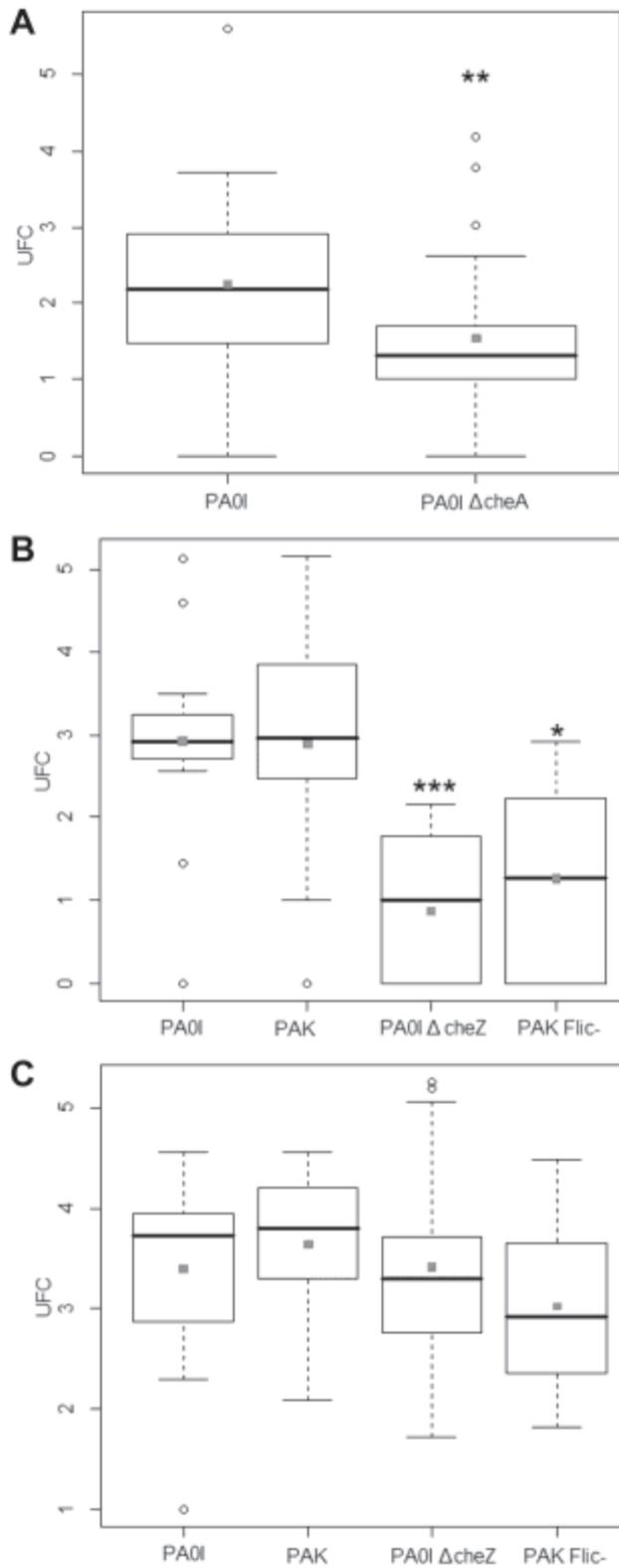
Como se esperaba, tanto la cepa  $\Delta$ cheA como la  $\Delta$ cheZ mostraron incapacidad de responder al gradiente del attractante (Fig.23A y 23B respectivamente), aunque  $\Delta$ cheA mostró un fenotipo menos contundente.

La cepa PAK Flic- se incluyó como control negativo. Así, la cepa Flic- es incapaz de nadar y seguir un gradiente de concentración. Se obtuvo un recuento significativamente menor para la cepa Flic- comparada con PAK (Fig. 23B). La cepa mutante Flic- fue hecha a partir de PAK, mientras que las mutantes de quimiotaxis ( $\Delta$ cheA y  $\Delta$ cheZ) fueron hechas a partir de PA01, por eso incluimos las dos cepas wt.

Para corroborar que las diferencias que observamos entre las cepas mutantes de quimiotaxis y la cepa wt se debían específicamente a la capacidad de sensar gradientes, estudiamos el comportamiento de la cepa mutante de quimiotaxis  $\Delta$ cheZ, la mutante Flic- y las cepas wt (PAK y PA01) bajo una condición en la que no hubiese gradiente. Para ello, las jeringas y los tips con bacterias se cargaron con la solución de succinato 10 mM. Bajo estas condiciones no se observaron diferencias entre las cepas (Fig. 23C).

La cepa Flic- en la condición sin gradiente muestra un recuento similar a las cepas motiles ( $\Delta$ cheZ y cepas wt). En estas condiciones podría ocurrir desplazamiento de bacterias por difusión desde una zona de mayor concentración de bacterias (tip) hacia una zona de menor concentración de bacterias (interior de la jeringa). Así podríamos pensar que si el tiempo es suficiente tanto las bacterias motiles como no motiles podrían desplazarse desde el tip hacia la jeringa.

Concluimos que la utilización del sistema jeringa-tip acompañado de un tratamiento estadístico adecuado, posibilita medir la respuesta quimiotáctica de *P. aeruginosa* en respuesta a un gradiente de atractante.



**Figura 23. *P. aeruginosa* muestra respuesta quimiotáctica en un gradiente de succinato.** (A) UFC (unidades formadoras de colonias) para la cepas PA01  $\Delta$ cheA y PA01, enfrentadas a succinato 10 mM como quimioattractante (N=4). (B) UFC para la cepa PA01  $\Delta$ cheZ, PA01, PAK Flic<sup>-</sup> y PAK, enfrentadas a succinato 10mM como quimioattractante (N=3). (C) UFC para la cepas PA01-Ig  $\Delta$ cheZ, PA01-Ig, PAK Flic<sup>-</sup> y PAK, en ausencia de gradiente de quimioattractante (N=3). Análisis de la varianza de dos factores (ver detalles en texto). En el gráfico B los contrastes a posteriori se llevaron a cabo con la prueba de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

En este punto retomamos el experimento para testear nuestra hipótesis original: *P. aeruginosa* localiza las células apoptóticas a través del sensado de sustancias atrayentes liberadas por estas últimas.

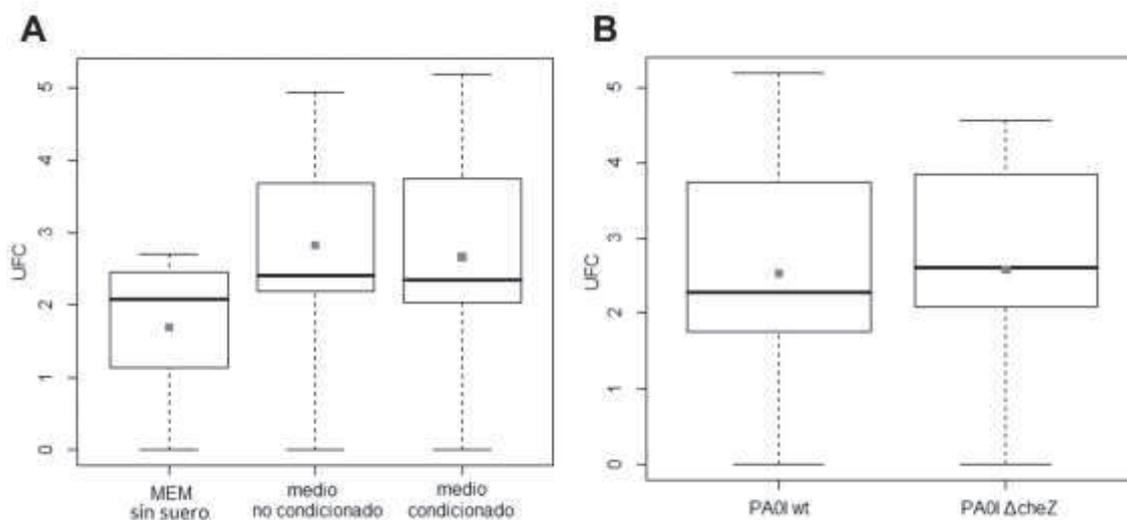
Repetimos entonces el ensayo usando medio condicionado por las células apoptóticas. Generamos células apoptóticas *in vitro* y mediante centrifugación separamos las células apoptóticas del medio. Para ello células MDCK tripsinizadas fueron suspendidas en medio MEM sin suero, expuestas a luz UV e incubadas en estufa gaseada por 12h. Cosechamos el medio y separamos las células apoptóticas del medio por centrifugación.

Cabe aclarar que todas las infecciones con *P. aeruginosa* sobre monocapas de células epiteliales que hemos visto hasta aquí las hicimos en medio MEM sin suero y es exactamente bajo dicha condición que vemos formación de agregados en nuestros experimentos. El sobrenadante obtenido, el cual llamaremos medio condicionado contendría el o los posibles atrayentes liberados por las células apoptóticas.

Como soluciones control utilizamos MEM sin suero y medio de cultivo proveniente de células vivas tripsinizadas. Para ello se crecieron células MDCK, se tripsinizaron y se separaron las células del medio por centrifugación (medio no condicionado).

Se suspendieron  $10^5$  bacterias en medio MEM sin suero y se lo colocó en un tip. Las jeringas se cargaron con MEM sin suero, medio no condicionado o medio condicionado.

En un primer ensayo expusimos a la cepa wt a MEM sin suero, medio no condicionado y condicionado. No observamos diferencias en el recuento de bacterias provenientes de la jeringa entre estos tres grupos (Fig. 24A). Además, cuando expusimos a la cepa wt y a la cepa  $\Delta$ cheZ a medio condicionado, tampoco observamos diferencias entre ellas (Fig. 24B).



**Figura 24. *P. aeruginosa* enfrentada a un gradiente de medio condicionado por células apoptóticas.** (A) UFC para la cepa PA01 wt enfrentada a MEM sin suero, medio no condicionado (medio que contenía células vivas) y medio condicionado (medio que contenía células apoptóticas) (N=3). (B) UFC para las cepas PA01 wt y PA01  $\Delta$ cheZ enfrentadas a medio condicionado por células apoptóticas (N=3). Análisis de la varianza de dos factores (ver explicación en texto). No se encontraron diferencias significativas.

Al encontrarnos con un resultado negativo, y dado que el planteo experimental implicaba varias asunciones, fue difícil sacar conclusiones. La hipótesis que queríamos testear era si las células apoptóticas generaban un gradiente al cual las bacterias respondían quimiotácticamente. Pero aún si éste fuera el caso, no era claro si en este planteo experimental ese gradiente se reproduciría. Y aún si así fuera, tampoco era claro si la sensibilidad del sistema era suficiente para sensorlo. De hecho, habíamos visto que aún realizando el ensayo con una sustancia atractante bien probada como el succinato, y con un gradiente de concentración de valores establecidos, medir respuesta quimiotáctica no había sido sencillo.

Podría ser que el método de aislar el medio condicionado y trasladar dicho gradiente al ensayo de las jeringas altere la composición del mismo. Si las sustancias atractantes liberadas por las células apoptóticas fuesen lábiles podrían degradarse durante el procedimiento. También podría ser que el gradiente de sustancias atractantes generado sea mantenido como tal, de manera activa *in vivo* por las células apoptóticas que liberan las posibles sustancias atractantes de manera sostenida en el tiempo. Decidimos entonces emplear una aproximación diferente que se detalla en la próxima sección.

## 4.4. Dinámica de la formación de los agregados

Como hemos visto, el intento de aislar el posible gradiente de sustancias atrayentes y medir quimiotaxis en un sistema controlado, aproximación que ha resultado exitosa en otros casos <sup>57 61</sup> no arrojó resultados concluyentes en el nuestro. Como mencionamos en la introducción, la complementación de datos empíricos con modelos teóricos, ha permitido en ocasiones sortear dificultades experimentales y avanzar en el estudio de fenómenos quimiotácticos.

Decidimos entonces, abordar una aproximación teórico-experimental. Pero para esto decidimos estudiar la dinámica de formación de los agregados. Sabíamos que el proceso implicaba el reclutamiento sumamente rápido de un alto número de bacterias planctónicas (en el orden de cientos) que se inmovilizaban a medida que se adherían a la superficie de la célula blanco. Consideramos entonces que tal vez, el análisis de parámetros tales como la cinética de la incorporación de bacterias sobre la célula blanco, o la forma que va tomando el agregado, podían dar información sobre el mecanismo mediante el cual las bacterias localizan dicha célula.

Esta etapa del trabajo fue co-conducida por el Dr. Fernando Peruani (co-director de este trabajo de tesis) quien dirige el grupo de Física de Sistemas Biológicos, en Niza, Francia (<https://math.unice.fr/~peruani/research.html>). Este grupo utiliza herramientas de la física teórica para entender sistemas biológicos complejos. Una de sus temáticas de estudio es la quimiotaxis bacteriana en el contexto de interacción con las células hospedadoras.

La idea fue entonces generar modelos que simularan la formación de agregados en presencia o ausencia de quimiotaxis y medir *in silico* ciertos parámetros de manera de evaluar si los mismos resultaban sensibles a los distintos mecanismos de encuentro de la célula blanco. Luego estos parámetros serían evaluados en datos experimentales.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la evolución temporal de la masa del agregado así como la forma del mismo serían diferentes si las bacterias localizaran a la célula apoptótica usando una estrategia quimiotáctica de si la localizaran siguiendo un recorrido aleatorio (“random walk”).

### 4.4.1. Obtención de la data *in silico*

#### 4.4.1.1. Generación del modelo

Para simplificar se planteó un modelo en dos dimensiones. Y se establecieron una serie de condiciones: las bacterias se adhieren a una célula apoptótica de

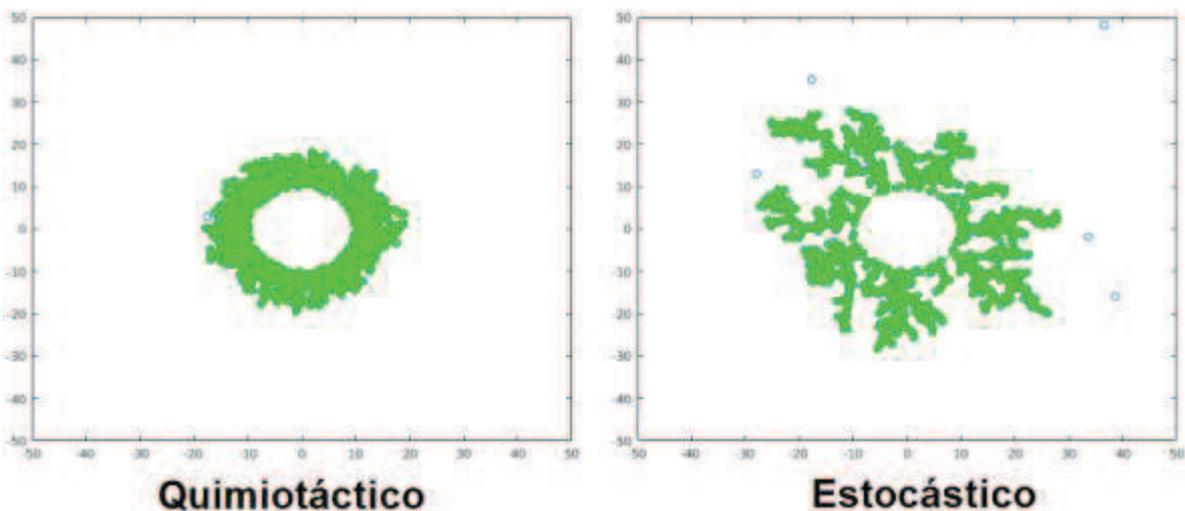
10  $\mu\text{m}$  de diámetro, localizada en el centro de la ventana de observación. Las bacterias son liberadas a 30  $\mu\text{m}$  de la célula. Además aquellas bacterias que contactan otra bacteria ya adherida a la célula apoptótica, quedan adheridas también. Se adoptó un modelo de motilidad en el cual la bacteria nada cierto tiempo y cambia de dirección. Además la bacteria se la considera una partícula autopropulsada que puede desplazarse a velocidad constante.

Las bacterias no quimiotácticas sólo presentan fluctuaciones en su movimiento debido al ruido térmico y biológico intrínseco del sistema. Las trayectorias que describen no son rectas y sólo se mueven en línea recta por distancias cortas que comprenden entre 0,5 hasta 2  $\mu\text{m}$ . El encuentro de las bacterias no quimiotácticas con la célula apoptótica es un evento aleatorio.

Las bacterias quimiotácticas presentan las mismas fluctuaciones intrínsecas del sistema, pero además son capaces de seguir un camino sesgado hacia las células apoptóticas. Modelamos a estas bacterias como partículas autopropulsadas equipadas con un tipo de brújula que les permite dirigir su dirección de movimiento hacia la célula apoptótica. En la figura 25 podemos observar el resultado de ambas simulaciones. En los siguientes links se muestran las animaciones del modelo:

Quimiotáctico: <https://youtu.be/-6Hbdggdqhk>

Estocástico: <https://youtu.be/CjYXQTm9IYE>



**Figura 25. El mecanismo mediante el cual las bacterias localizan a la célula apoptótica afecta a la forma del agregado.**

#### 4.4.1.2. Forma de los agregados

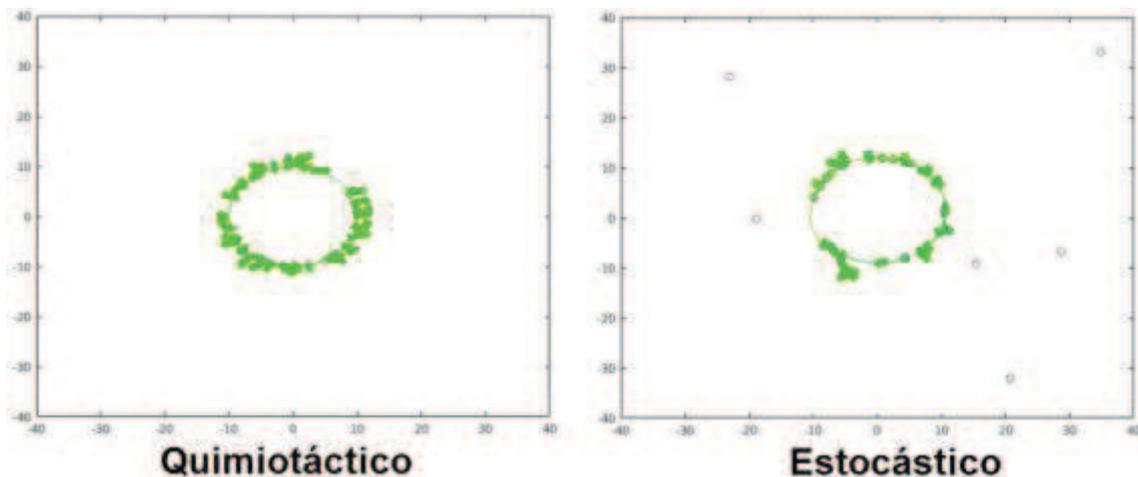
Los resultados de las simulaciones muestran que los agregados formados bajo el modelo quimiotáctico adquieren forma circular y compacta, mientras que las bacterias bajo el modelo estocástico forman agregados que tienen una estructura arborizada.

Pero en realidad, el crecimiento de los agregados reales es limitado, es decir, no crecen indefinidamente sino que en un punto dejan de incorporar bacterias. Decidimos entonces emular en el modelo esta limitación del crecimiento limitando el número inicial de bacterias, de manera que sólo formen una o dos capas rodeando la célula apoptótica. En estas condiciones ya no se aprecian diferencias en la forma de los agregados formados por bacterias quimiotácticas y no quimiotácticas (Fig. 26). Es decir, que para que pueda usarse este parámetro para distinguir entre un mecanismo y otro, es necesario que los agregados estén conformados por múltiples capas.

En el siguiente link se muestran las animaciones donde se limitó el número de bacterias iniciales:

Quimiotáctico: <https://youtu.be/izPa8DoxW1g>

Estocástico: <https://youtu.be/tNintVgRJIQ>



**Figura 26.** La forma del agregado formado por bacterias quimiotácticas y no quimiotácticas no difiere si se limita el número inicial de bacterias.

#### 4.4.1.3. Evolución de la masa del agregado

Luego, utilizando nuevamente el modelo sin limitación inicial del número de bacterias, evaluamos la evolución de la masa del agregado. Es decir, el número de bacterias que se incorporan al agregado en función del tiempo. La forma funcional de la curva promedio resultó diferente según se trate de bacterias quimiotácticas o no quimiotácticas (Fig. 27A). Cabe aclarar que este parámetro presenta mayores fluctuaciones para el caso de bacterias no quimiotácticas (Fig. 27B). Esto se hizo evidente al comparar 100 simulaciones para cada caso.

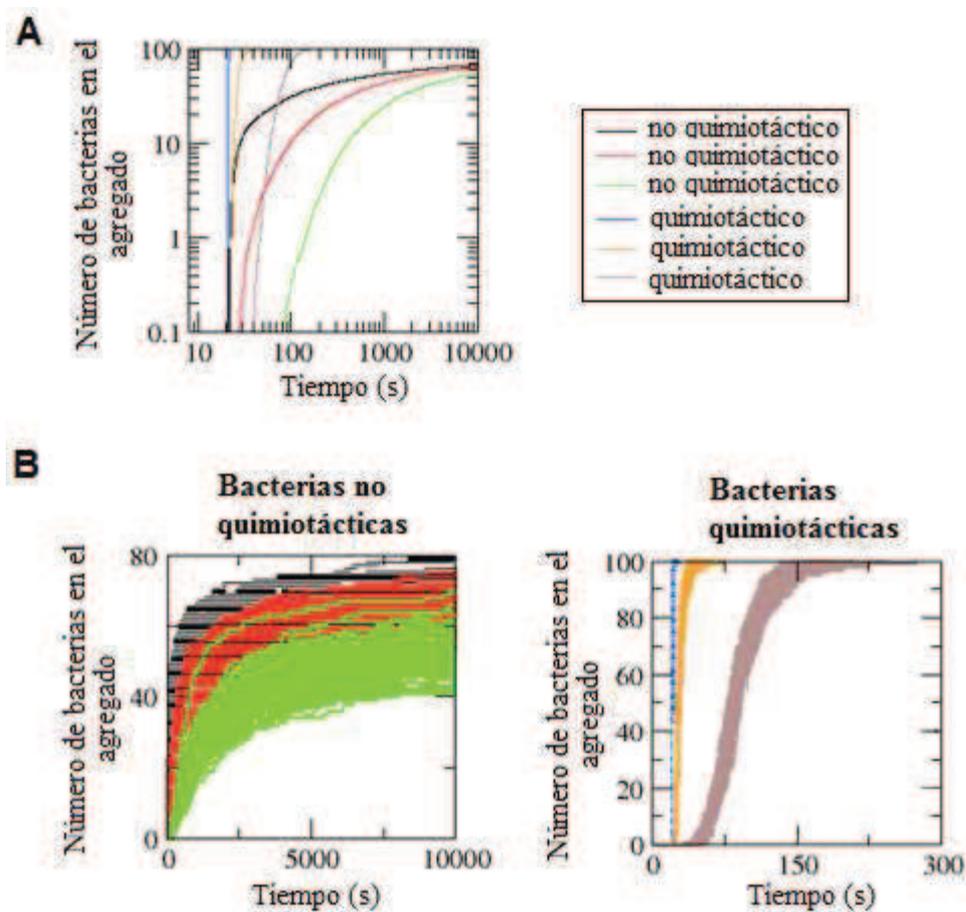
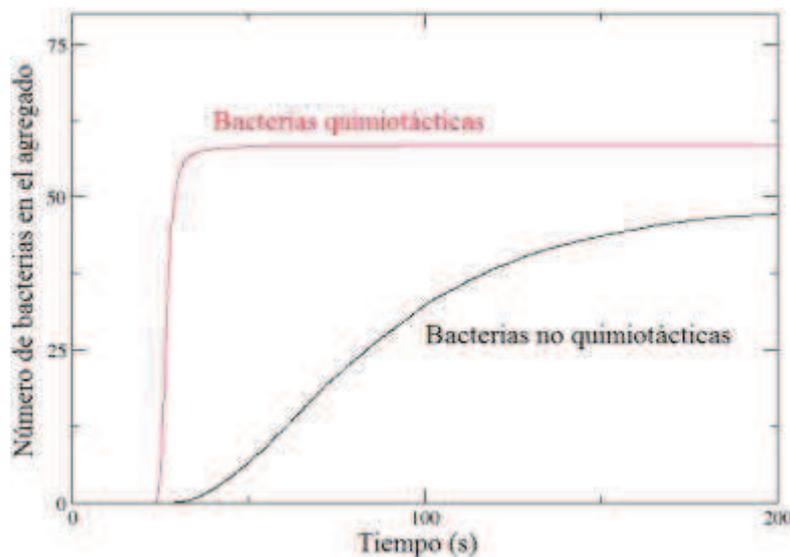


Figura 27. Evolución temporal de la masa del agregado para bacterias quimiotácticas y no quimiotácticas sin limitación en el número inicial de bacterias. A) Curvas promedio para ambos tipos de bacterias obtenidas a partir de 100 experimentos *in silico*. B) Curvas que muestran las 100 simulaciones para ambos tipos de bacterias.

En una siguiente etapa, repetimos nuevamente estos experimentos *in silico*, pero emulando la limitación del crecimiento del agregado. Sólo que esta vez, lo hicimos estableciendo como condición inicial que sólo quedaran adheridas aquellas bacterias que contacten la célula apoptótica. Volvimos a realizar 100 simulaciones para cada condición y graficamos la evolución de la masa del agregado (Fig. 28).

Confirmamos que las curvas tienen diferente cinética. Algo interesante que se observa (y que no se apreciaba tanto cuando no se limitó el crecimiento, Fig. 27) es que el número total de bacterias incorporadas por agregado, es algo más bajo en el caso del proceso no quimiotáctico (Fig. 28).

Esto parece deberse a que el acomodamiento de las bacterias sobre la superficie celular, resulta más ordenado y compacto en condiciones de quimiotaxis.



**Figura 28. Evolución temporal de la masa del agregado para bacterias quimiotácticas y no quimiotácticas emulando limitación en el crecimiento del agregado.** Curvas promedio para bacterias quimiotácticas (curva roja) y para bacterias no quimiotácticas (curva negra) obtenidas a partir de 100 experimentos *in silico*.

Proponemos entonces que la forma y la evolución de la masa del agregado en función del tiempo son parámetros que se diferencian según opere un mecanismo quimiotáctico o uno estocástico y por lo tanto podrían ser utilizados para indagar si *P. aeruginosa* localiza a las células apoptóticas siguiendo uno u otro mecanismo.

#### 4.4.2. Obtención de la data experimental

Para obtener los datos experimentales realizamos un seguimiento *in vivo* de la formación de los agregados por microscopía confocal. Este tipo de seguimiento permite evaluar la forma tridimensional que va adquiriendo el agregado y observar el posicionamiento de las bacterias individuales de forma muy detallada. Además permite estudiar de manera precisa cómo cambia el tamaño del agregado en el tiempo.

Usamos células MDCK polarizadas crecidas en placas de 35 mm con un cubreobjetos de vidrio en el fondo. Para visualizar fácilmente las células apoptóticas teñimos con Anexina V- Alexa 647. Una vez bajo el microscopio elegimos un sitio donde hubiera una (o de ser posible más) célula apoptótica extruída. Se estableció el principio del *stack* en la parte apical de la célula apoptótica y el final en la parte basal de la misma (cercana al epitelio). Se muestra un esquema en la figura 29.

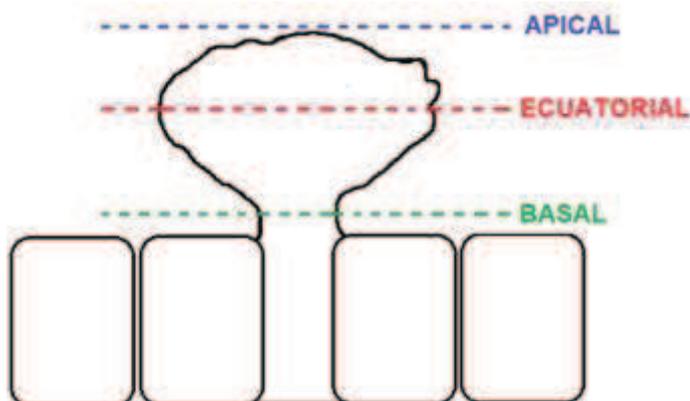


Figura 29. Nomenclatura para definir la ubicación de los planos xy a lo largo del eje z.

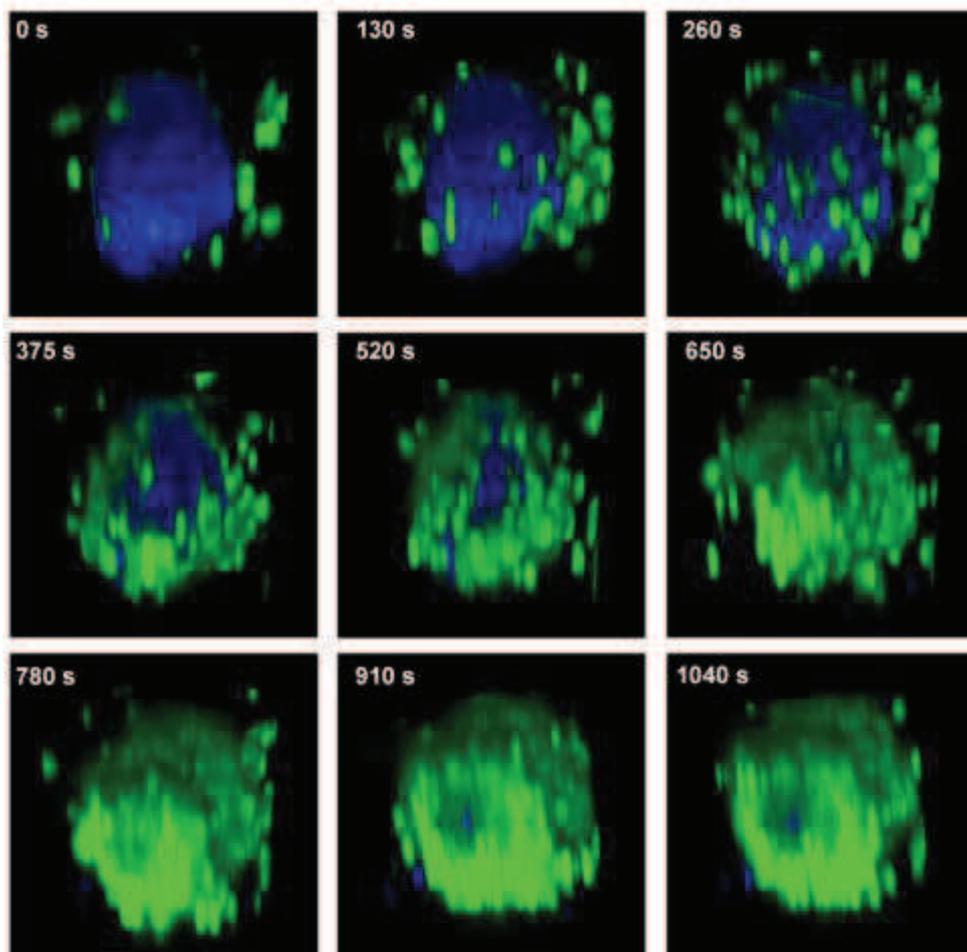
Una vez definidas las dimensiones del *stack*, infectamos con PA01 wt o PA01  $\Delta$ cheA expresando GFP (multiplicidad de infección=20) e inmediatamente después comenzamos la adquisición de imágenes esperando que sobre la célula elegida se formase un agregado. El tiempo de adquisición de cada *stack* fue de aproximadamente 26 segundos. Cada *stack* está compuesto por 10 planos xy. Se estableció un tiempo total de adquisición de 17 minutos, es decir que cada video terminó conteniendo 40 *stacks* de imágenes.

En un principio intentamos realizar los experimentos *in vivo* con un microscopio de epifluorescencia que tiene una cámara con control de temperatura. Frecuentemente durante la adquisición el agregado salía del plano focal. Además, los datos obtenidos con el microscopio de epifluorescencia no tenían una buena relación señal ruido. Determinamos una relación señal ruido

promedio para videos adquiridos por microscopia confocal de fluorescencia (aproximadamente 4,5) y para microscopía de epifluorescencia (aproximadamente 2,1). Así obtuvimos que la relación señal ruido es aproximadamente un 53% mejor trabajando con microscopía confocal. Así decidimos trabajar con microscopía confocal no solo porque ofrece una mejor relación señal ruido, sino que también permite evaluar la forma tridimensional del agregado y como cambia su tamaño en función del tiempo.

El microscopio confocal de fluorescencia no posee cámara de control de temperatura, pero previamente corroboramos que los agregados se forman a temperatura ambiente (22°C).

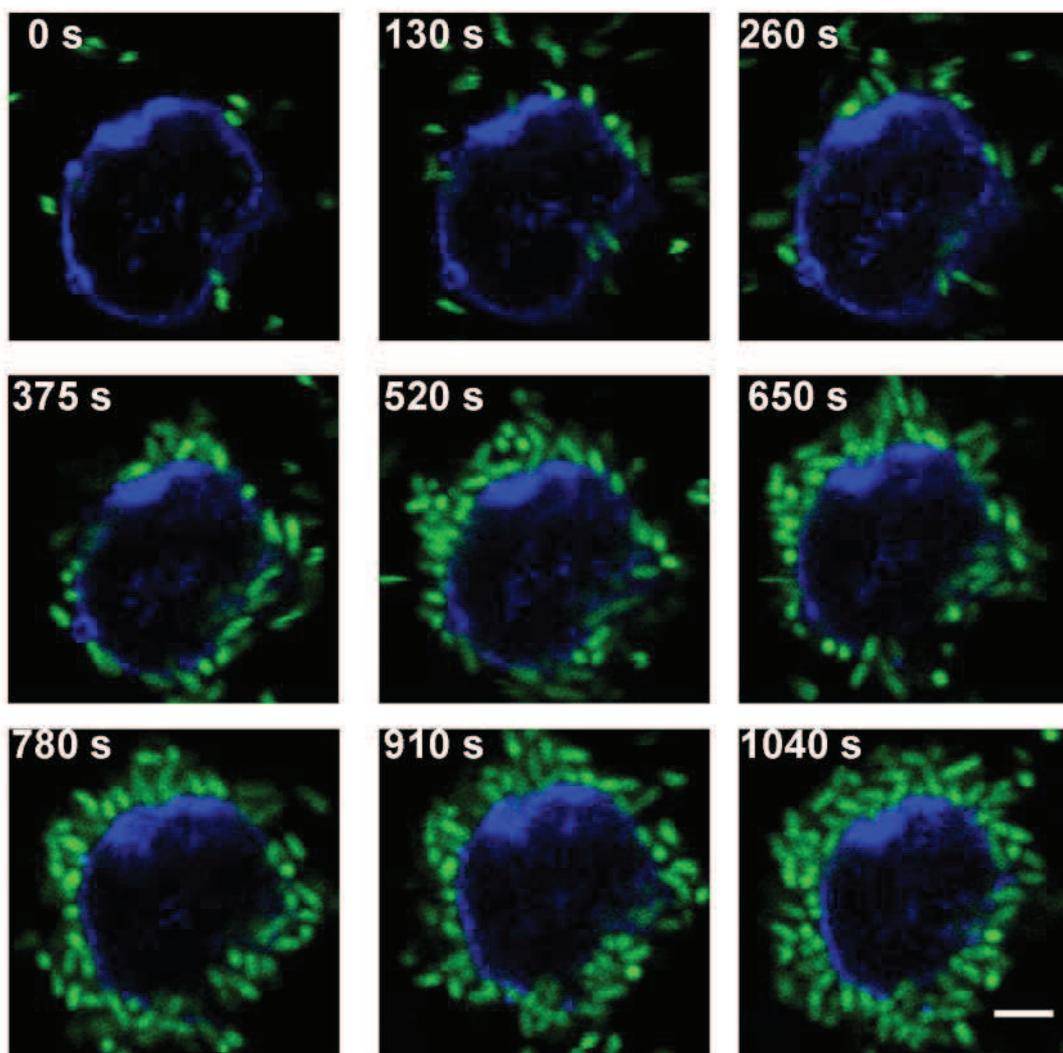
En la figura 30 se muestra una serie de reconstrucciones 3D que ilustran distintas etapas en la formación de un agregado. Cada reconstrucción 3D se generó a partir de los 10 planos xy correspondientes al stack de ese tiempo particular



**Figura 30. Reconstrucciones 3D de distintos momentos en la formación de un agregado.** En el margen superior izquierdo se indica el tiempo en segundos. PAOI wt (verde). Célula apoptótica (azul).

A partir de estas reconstrucciones pudimos apreciar que las bacterias cubren casi por completo la superficie de la célula apoptótica y que esto parece ocurrir en forma homogénea, es decir, no pareciera que una parte de la superficie de la célula se cubra primero y luego se empiecen a cubrir otras. En estas reconstrucciones sin embargo, no es posible apreciar claramente el número de capas de bacterias que rodean a la célula apoptótica. Como veremos a continuación, eso se visualiza bien en los planos xy.

En la figura 31 se muestra un plano ecuatorial del mismo agregado a lo largo del tiempo.



**Figura 31. Montaje de imágenes para un agregado de PA01 wt.** Se muestra un plano xy ecuatorial en el tiempo. En el margen superior izquierdo se indica el tiempo en segundos. PA01 wt (verde). Célula apoptótica (azul). Barra de escala: 4  $\mu$ m.

En estas micrografías, puede apreciarse muy bien la disposición espacial que toman las bacterias al incorporarse al agregado. En los siguientes links:

Agregados PAOI wt video 1: <https://youtu.be/PEFaKQ4eVeM>

Agregado PAOI wt video 2: <https://youtu.be/9u4ITCRCFb8>

Agregados PAOI wt video3: <https://youtu.be/dAyThI-ZxYU>

Agregado  $\Delta$ cheA video 1: <https://youtu.be/OwokNF-L6sl>

Agregado  $\Delta$ cheA video 2: <https://youtu.be/phKc1gH1i6A>

se muestran ejemplos de algunos videos de la formación de agregados (se muestra siempre el plano ecuatorial) de PAOI wt y PAOI  $\Delta$ cheA. En el extremo superior izquierdo de los videos se indica el tiempo en segundos.

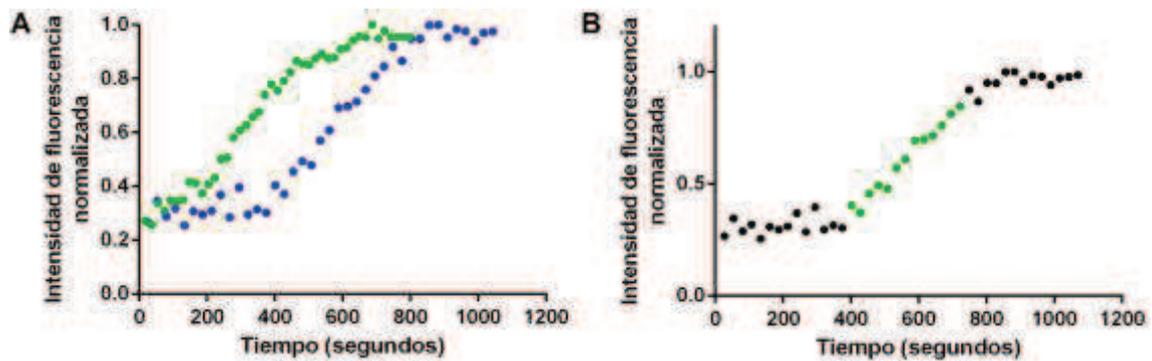
Una primera conclusión fue que no se observan diferencias obvias en la forma de los agregados formados por bacterias quimiotácticas (PAOI wt) y bacterias mutantes de quimiotaxis (PAOI  $\Delta$ cheA).

Pero según habíamos visto en el modelo matemático, con pocas capas no era posible apreciar esta diferencia. Experimentalmente observamos que las bacterias se adhieren sobre la célula apoptótica y también ocurre adhesión bacteria-bacteria, pero como máximo observamos hasta 3 capas de bacterias. Así descartamos el estudio de la forma del agregado como estrategia para discernir si las bacterias localizan a la célula apoptótica siguiendo una estrategia quimiotáctica o estocástica.

En total adquirimos 32 videos. Luego procedimos a seleccionarlos según ciertos parámetros de calidad. Se descartaron por ejemplo aquellos videos en los cuales la célula apoptótica se movió durante la adquisición, o aquellos en que el agregado ya estaba semi-formado cuando comenzó la adquisición, etc. Nos quedamos finalmente con 26 videos (13 wt y 13  $\Delta$ cheA) para los estudios subsiguientes.

A partir de estos videos cuantificamos la intensidad de fluorescencia para cada tiempo. Brevemente, trabajando con el ImageJ, nos quedamos con el canal de las bacterias y realizamos una proyección de suma de intensidad de fluorescencia. Esta función suma la intensidad de cada pixel en una determinada posición en el plano xy a lo largo del eje z. Una vez aplicada dicha función, cada tiempo estará representado por una sola imagen. Luego cuantificamos la intensidad de fluorescencia integrada de cada una de estas imágenes mediante un macro (ver materiales y métodos). Luego normalizamos los valores de intensidad de fluorescencia con respecto al valor máximo (intensidad de fluorescencia normalizada). En la figura 32 se muestran ejemplos de curvas de intensidad de fluorescencia normalizada en función del

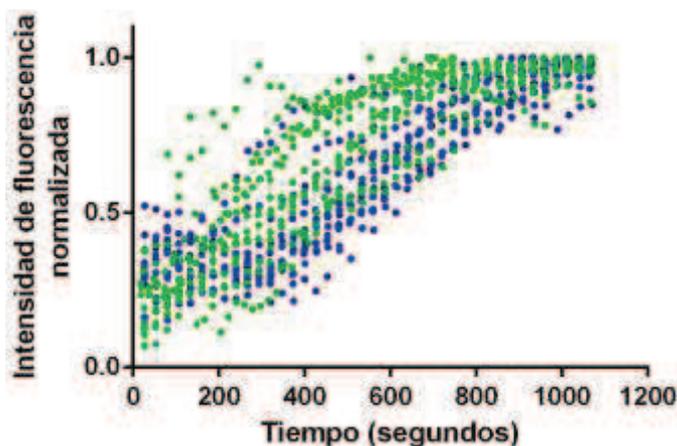
tiempo para PA0I wt y PA0I  $\Delta$ cheA (Fig. 32A). Típicamente las curvas muestran una fase lag, donde no hay crecimiento. La fluorescencia en esta etapa no es cero, y efectivamente vemos que hay unas pocas bacterias adheridas. Luego, a partir de un momento las bacterias empiezan a adherirse masivamente (fase de crecimiento Fig. 32B) y en un momento dejan de hacerlo y la intensidad se mantiene constante.



**Figura 32. Ejemplos de curvas de intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo.** A) Curvas para las cepas PA0I wt(verde) y PA0I  $\Delta$ cheA (azul). B) Curva de la formación de un agregado de PA0I  $\Delta$ cheA. Se representa con puntos verdes la fase de crecimiento de la curva.

Las razones por la que se genera la fase lag o por la que el agregado deja de crecer en un determinado punto no la sabemos, pero discutiremos más adelante algunas consideraciones al respecto.

Teniendo esta información, nos preguntamos si las fases de crecimiento de estas curvas serían distintas para bacterias wt y bacterias no quimiotácticas. En la figura 33 están representadas las 26 curvas obtenidas. Se muestran las curvas de los agregados formados por PA0I wt (verde) y por PA0I  $\Delta$ cheA (azul). Podemos observar que las curvas tienen forma similar. Sin embargo los agregados formados por PA0I wt entran más rápido en fase de crecimiento que los agregados formados por PA0I  $\Delta$ cheA. Pareciera que las bacterias wt se incorporarían más rápido al agregado que las bacterias mutantes de quimiotaxis.

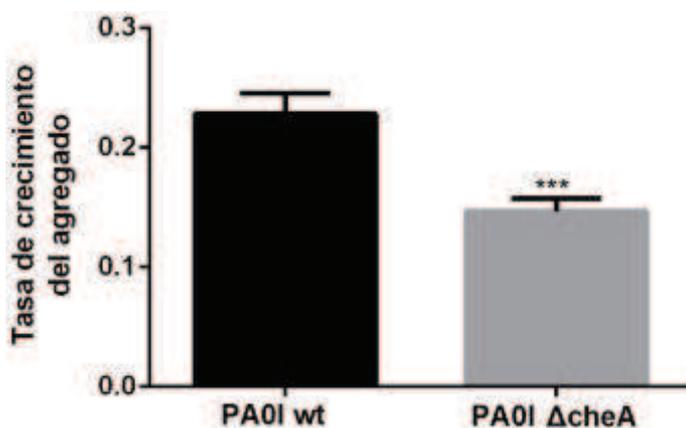


**Figura 33.** Curvas de intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo para las cepas PA01 wt (verde) y PA01  $\Delta$ cheA (azul). Se graficaron las curvas correspondientes a 13 videos para cada cepa.

En un principio estimamos la tasa de crecimiento promedio para los agregados de PA01 wt y de PA01  $\Delta$ cheA. La tasa de crecimiento del agregado indica la masa de bacterias que se incorporan al agregado en un determinado intervalo de tiempo. La expresamos como el cociente entre la variación en la intensidad de fluorescencia normalizada en un lapso de tiempo dado.

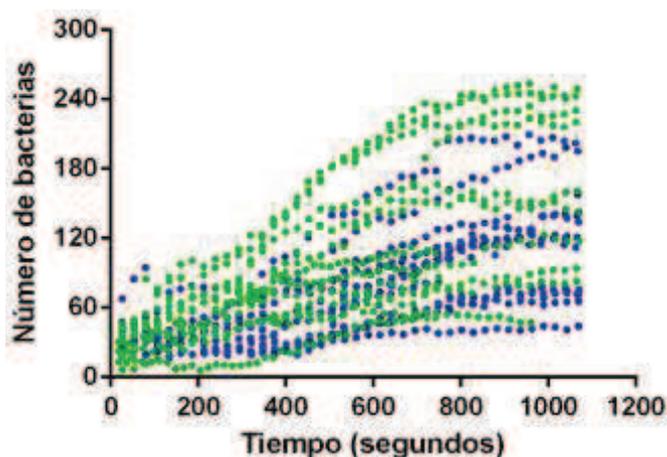
Para cada agregado graficamos la intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo. Tomamos la fase de crecimiento de cada una de esas curvas y realizamos una regresión lineal con esos datos. La tasa de crecimiento del agregado es la pendiente obtenida de esa regresión lineal.

Realizamos este proceso para las 26 curvas. Observamos que la tasa de crecimiento promedio para los agregados de PA01 wt es significativamente mayor (aproximadamente un 36 % mayor) que la tasa de crecimiento promedio para los agregados de PA01  $\Delta$ cheA (Fig. 34). Es decir, que las bacterias quimiotácticas se incorporan más rápido al agregado.



**Figura 34.** Tasa de crecimiento promedio del agregado para PA01 wt y PA01  $\Delta$ cheA. Se analizaron 13 videos para cada cepa. Datos presentados como Media  $\pm$  Error estándar. N=3. Prueba t de Student. \*\*\* $p < 0,001$ .

Luego convertimos las curvas de intensidad de fluorescencia en función del tiempo de los 26 agregados en curvas de número de bacterias en función del tiempo. Para ello realizamos el cociente entre los datos de intensidad de fluorescencia y la intensidad de fluorescencia promedio para una bacteria. En la figura 35 se muestran las curvas obtenidas para los agregados formados por PA01 wt (verde) y PA01  $\Delta$ cheA (azul). Observamos una tendencia que los agregados formados por las bacterias wt son más grandes que aquellos formados por bacterias  $\Delta$ cheA. Con el modelo matemático (limitando el crecimiento del agregado) habíamos observado que el número total de bacterias incorporadas por agregado, es algo más bajo en el caso del proceso no quimiotáctico. Determinamos el tamaño promedio final para los agregados formados por las bacterias wt ( $141,8 \pm 20,03$ ) y por bacterias mutantes ( $118,4 \pm 14,03$ ). Si bien estos valores no resultaron significativamente diferentes, es interesante que la tendencia que se observa sea coincidente con lo que se vio en el modelo.



**Figura 35. Curvas de número de bacterias en función del tiempo para las cepas PA01 wt (verde) y PA01  $\Delta$ cheA (azul).** Se graficaron las curvas correspondientes a 13 videos para cada cepa.

Luego comparamos las curvas de número de bacterias en función del tiempo para ambas cepas mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov (prueba KS). Se trata de una prueba estadística no paramétrica que permite comparar las funciones de distribución empíricas de dos muestras. La hipótesis nula de la prueba establece que ambas muestras pertenecen a la misma población, es decir que poseen la misma distribución.

Anteriormente comparamos solamente las fases de crecimiento de las curvas para PA01 wt y PA01  $\Delta$ cheA. Aplicando la prueba de KS comparamos las funciones de distribución en toda su extensión. Así las funciones de incorporación de bacterias en función del tiempo para PA01 wt y PA01  $\Delta$ cheA resultaron significativamente distintas ( $****p < 0,0001$ ).

Para corroborar que la diferencia observada en la cinética de formación de los agregados no se debiera a que las bacterias quimiotácticas nadan más rápido que las bacterias mutantes, medimos la velocidad de nado de PA0I wt y PA0I  $\Delta$ cheA.

Para ello sembramos  $10^4$  bacterias contenidas en 20  $\mu$ l de MEM suplementado con HEPES 20mM sobre un cubreobjetos de vidrio (placas de 35 mm con un cubreobjetos de vidrio en el fondo). Elegimos un plano focal cercano a la superficie del cubreobjetos de vidrio. Adquirimos 10 imágenes por segundo durante 100 segundos (1000 imágenes totales) para PA0I wt y para PA0I  $\Delta$ cheA.

A partir de dichos videos medimos la velocidad de nado de las bacterias. En los siguientes links:

PA0I wt: [https://youtu.be/uYRz83K\\_Wps](https://youtu.be/uYRz83K_Wps)

PA0I  $\Delta$ cheA: <https://youtu.be/7F3axezMWkw>

se muestra un video para PA0I wt y otro para PA0I  $\Delta$ cheA.

Trabajando con el plugin Manual Tracking de ImageJ seguimos individualmente a distintas bacterias. Así pudimos reconstruir la trayectoria descrita por las bacterias. El plugin calcula la velocidad de la bacteria ( $\mu$ m/s) como el cociente entre la distancia recorrida y lapso de tiempo que le tomo recorrer esa distancia.

Cabe aclarar que sólo es posible llevar a cabo este procedimiento si la bacteria que se sigue se mantiene en el plano focal. El proceso de seguimiento culmina cuando la bacteria se escapa del plano focal o cuando sale del campo.

Evaluamos 100 trayectorias para cada una de las cepas (PA0I wt y PA0I  $\Delta$ cheA). No encontramos diferencias significativas en la velocidad de nado para PA0I wt ( $43,1 \pm 1,1 \mu$ m/s) y PA0I  $\Delta$ cheA ( $43,1 \pm 1,3 \mu$ m/s). El valor de velocidad promedio que obtuvimos (aproximadamente  $43 \mu$ m/s) es similar al reportado para las cepas PA0I y PAK de *P. aeruginosa* (aproximadamente  $40 \mu$ m/s)<sup>96</sup>.

Podemos concluir que las bacterias wt nadan con la misma velocidad que las bacterias mutantes, es decir que la diferencia en la cinética de formación observada no se debía a una diferencia en la velocidad de nado.

A partir de estos resultados podemos decir, que si bien la quimiotaxis no es imprescindible para que los agregados se formen (tanto las bacterias wt como las mutantes forman agregados), en el proceso interviene algún componente quimiotáctico: la cinética de formación, un parámetro sensible a la presencia de quimiotaxis según vimos en el modelo teórico, es más lenta en la mutante que en la wt. A partir de estos resultados podemos pensar que *P. aeruginosa*

localiza a las células apoptóticas mediante una estrategia estocástica con algún componente quimiotáctico.

Hasta aquí hemos investigado cómo *P. aeruginosa* localiza las células apoptóticas. En la siguiente sección indagaremos la pregunta: **¿Qué moléculas median la adhesión de *P. aeruginosa* a las células apoptóticas?**

#### **4.5. El pilus tipo IV media la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas extruídas**

El pilus tipo IV no solo interviene en la motilidad de *P. aeruginosa* sino que también funciona como una adhesina.

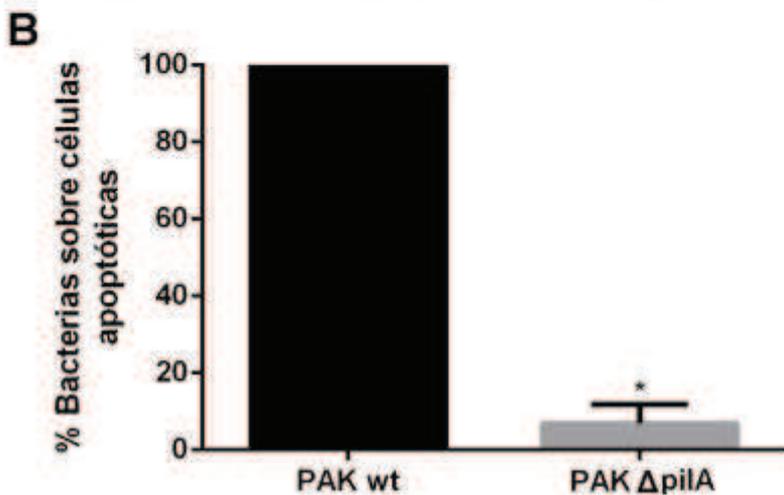
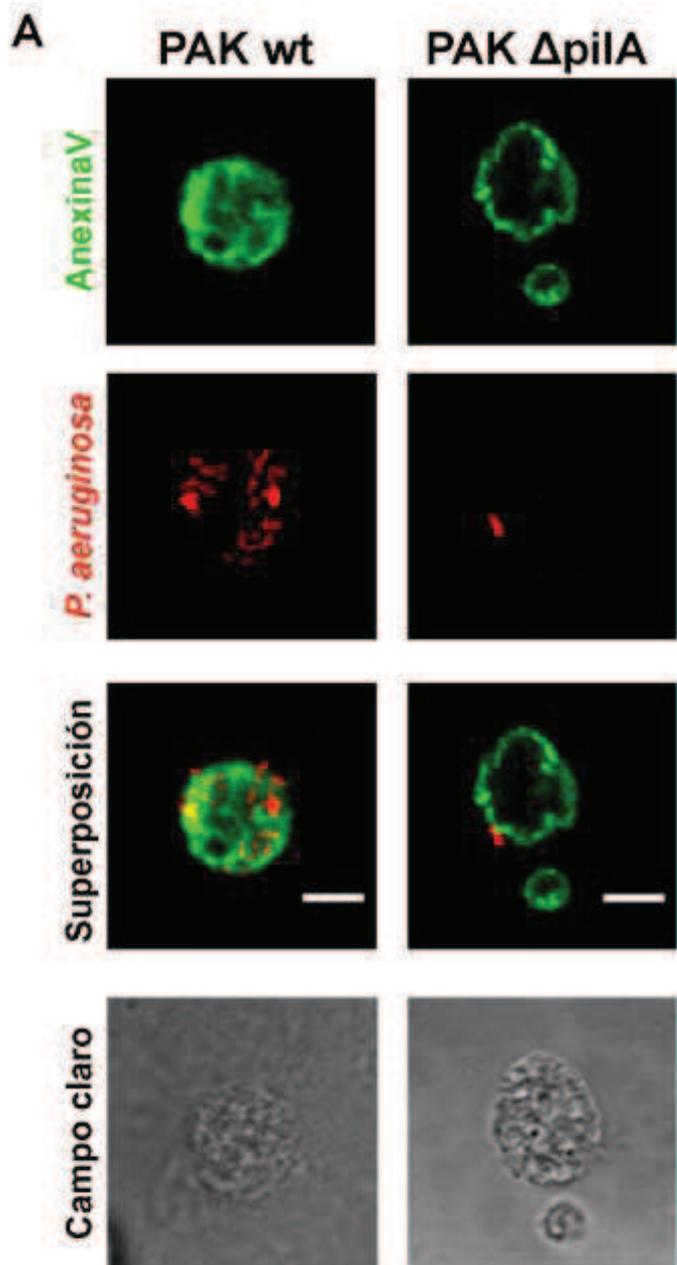
El T4P media diversas funciones en las bacterias como la locomoción sobre una superficie sólida y la adhesión a células hospedadoras. En *P. aeruginosa* el T4P es considerada la adhesina más importante, encontrándose localizada en el polo de la célula. Se trata de apéndices formados por polímeros de la proteína pilina (codificada por el gen *pilA*), los cuales son capaces de retraerse y extenderse sobre una superficie sólida generando un movimiento conocido como *twitching*.

Si bien se ha reportado que el pilus tipo IV está involucrado en la adhesión sobre superficies bióticas y sobre células hospedadoras<sup>97 98</sup>, no ha sido reportado un rol de este apéndice en la adhesión sobre células muertas. Entonces, nos preguntamos si el pilus tipo IV se encuentra involucrado en la adhesión de *P. aeruginosa* a células apoptóticas.

Para responder esta pregunta se infectaron monocapas de células MDCK con las cepas de *P. aeruginosa* (multiplicidad de infección=20) PAK  $\Delta$ *pilA* y PAK wt por 1 hora. Las células apoptóticas extruídas fueron teñidas con AnexinaV-Alexa488 previo a la infección. Se cuantificó el número de bacterias adheridas a células apoptóticas extruídas. Prácticamente no se observó adhesión en la mutante PAK  $\Delta$ *pilA* (Fig. 36A). Encontramos una disminución de aproximadamente un 93% en la adhesión de PAK  $\Delta$ *pilA* a células apoptóticas extruídas con respecto a la adhesión de PAK wt (Fig. 36B).

A partir de estos resultados podemos concluir que el pilus tipo IV funciona como una adhesina que interviene en la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas extruídas. Pero no podemos descartar la posibilidad que el pilus tipo IV esté funcionando también como un apéndice que provee locomoción. En una primera etapa, podría ocurrir que el T4P medie la adhesión de *P. aeruginosa* sobre la base de las células apoptóticas en una zona cercana a la superficie epitelial. Una vez adheridas las bacterias, el T4P podría proveer

de locomoción a las mismas haciendo que estas suban y se desplacen sobre la superficie de la célula apoptótica.



**Figura 36.** El pilus tipo IV interviene en la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas extruídas. (A) Proyecciones de planos en el eje Z que muestran bacterias adheridas a células apoptóticas extruídas. (B) Porcentaje de bacterias sobre células apoptóticas para las cepas PAK wt y PAK  $\Delta$ pilA. Datos presentados como Media $\pm$ Error estándar. N=3. \*  $p < 0,05$ . Prueba t de Student. Barras de escala: 5  $\mu$ m.

#### 4.6. El tratamiento de células apoptóticas con proteasa modifica la adhesión de *P. aeruginosa*

Para indagar sobre la naturaleza de la/s molécula/s que median la adhesión de *P. aeruginosa* a células apoptóticas, desde el lado de estas últimas decidimos tratar células apoptóticas generadas *in vitro* con DNAasal y proteasaK.

Empleando un enfoque similar, Guzik et al observaron que leucocitos polimorfonucleares apoptóticos tratados con tripsina no eran fagocitados por macrófagos<sup>99</sup>. También Cunin et al emplearon el mismo enfoque y trataron células T Jurkat apoptóticas con DNAasa, pronasa y glicosidasa para estudiar la naturaleza de la unión de la proteína Clu a células apoptóticas tardías<sup>100</sup>.

Para abordar el objetivo planteado, generamos células apoptóticas *in vitro* y las tratamos o no (control) con proteasaK o con DNAasal.

Para corroborar que la proteasaK funcionase *ex situ* se incubaron muestras de BSA con cantidades crecientes de enzima y dichas muestras se sembraron en un SDS-PAGE. Se observa la escalera de degradación de BSA para 0,006U de proteasaK (Fig. 37A). Para corroborar que la proteasa funcionase *in situ*, células MDCK apoptóticas generadas *in vitro* se trataron con proteasaK en las condiciones descritas y se tiñeron con anti gp135 y AnexinaV (Fig. 37B arriba). Gp135 es una proteína de membrana que permanece localizada allí durante todo el proceso de apoptosis. El anticuerpo anti gp135 reconoce la porción N-terminal de la proteína, la cual es extracelular. La marca de AnexinaV no se ve afectada por el tratamiento con proteasaK, ya que esta se une a fosfatidilserina, de naturaleza lipídica.

Mediante análisis de imágenes se cuantificó la intensidad de fluorescencia en membrana de gp135 y de anexina V (ver detalles en materiales y métodos).

Se graficó el cociente de la intensidad de gp135/intensidad de anexinaV. Observamos que el tratamiento con proteasaK (proK 0,03U) disminuye la intensidad de gp135 en membrana comparado con el control (proK 0U) (Fig. 37B abajo). Así pudimos determinar que la proteasaK actúa *in situ*.

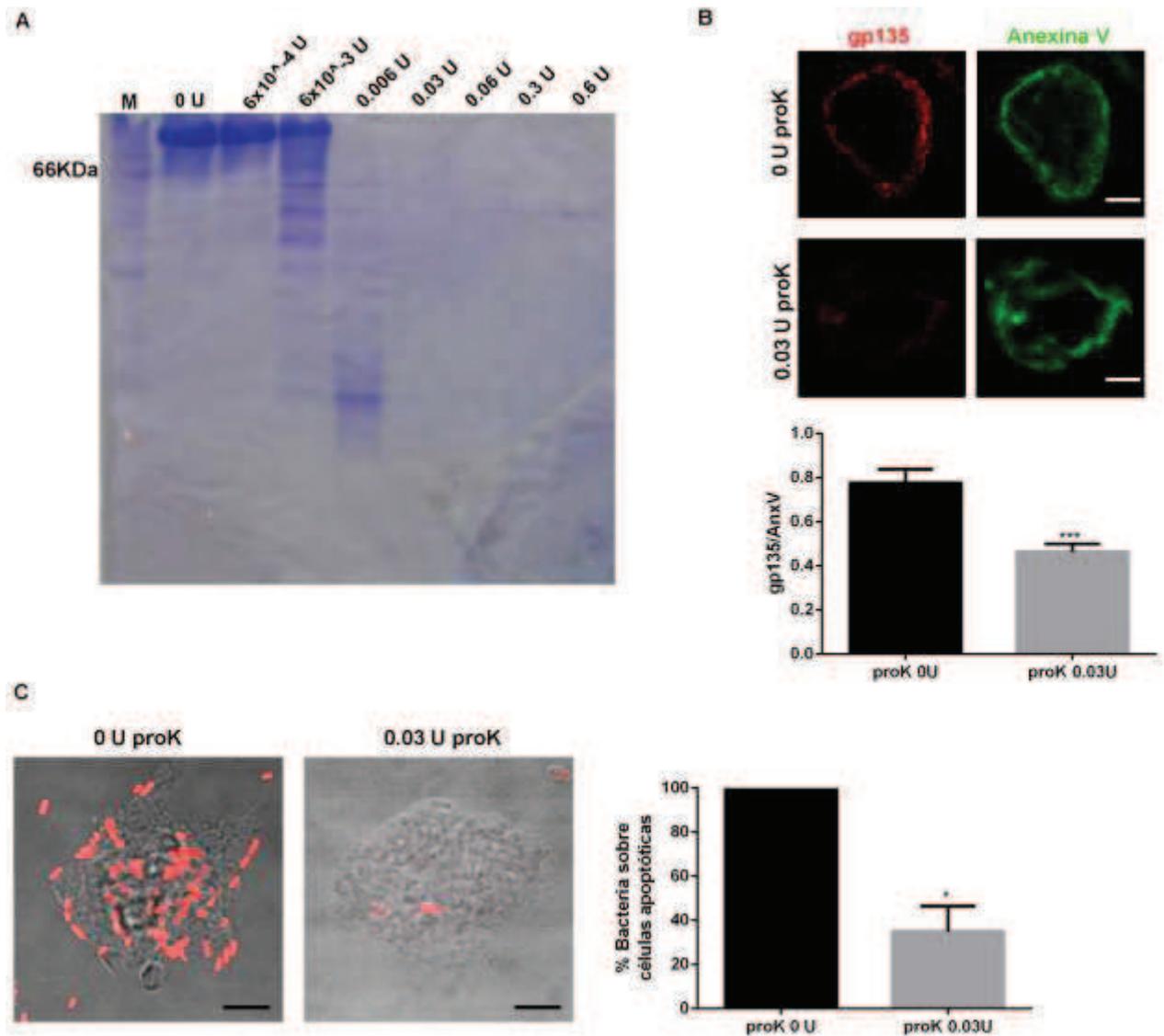
Para corroborar que la DNAasal funcionara *ex situ*, se incubaron muestras de DNA plasmídico con cantidades crecientes de enzima y se las sembró en un gel de agarosa. Se observó un chorreado de degradación en 0,005U (Fig. 38A).

Las células apoptóticas tratadas y no tratadas con proteasaK o con DNAasal se resuspendieron en medio MEM sin suero y se infectaron inmediatamente con PAK-mCherry en un tubo (multiplicidad de infección=10, 1hora). Luego se fijó, se centrifugó y se resuspendió la muestra. La misma se sembró directamente sobre un portaobjetos de vidrio. El ensayo se realizó con una multiplicidad de infección baja. También antes de sembrar la muestra sobre el vidrio se la

centrifugó con una fuerza tal que no permitió que las bacterias sueltas (no adheridas a células apoptóticas) sedimentaran. Realizando el ensayo bajo estas condiciones prácticamente no observamos bacterias adheridas sobre el vidrio.

Se cuantificó el número de bacterias adheridas a células apoptóticas. Encontramos una disminución de aproximadamente un 65% en la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas tratadas con proteasaK con respecto a la adhesión sobre células sin tratar (Fig. 37C).

Estos resultados indicarían que las moléculas expuestas en la superficie de células apoptóticas a las que se une *P. aeruginosa* tendrían naturaleza proteica o contendrían proteínas en su composición (como las glicoproteínas).



**Figura 37. El tratamiento de células apoptóticas con proteasaK modifica la adhesión de *P. aeruginosa*.** (A) SDS-PAGE en el cual se incubaron 10 µg de BSA en presencia de unidades crecientes de proteasaK a 37°C por 1 hora. (B) Células MDCK apoptóticas generadas *in vitro* por exposición a UV tratadas con proteasaK y teñidas con gp135(rojo) y AnexinaV (verde). Se grafica la intensidad de gp135 relativa a la intensidad de AnexinaV. Se analizaron 30 células totales. N=3. (C) Células MDCK apoptóticas generadas *in vitro* por exposición a UV tratadas o no tratadas con proteasaK e infectadas con PAK-mCherry. La célula apoptótica se muestra en campo claro. PAK-mCherry(rojo). N=3. Barra de escala 10 µm. Datos presentados como Media±Error estándar. \*  $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ . Prueba t-Student.

Como mencionamos en la introducción, en la apoptosis ocurre disminución del volumen celular y condensación de la cromatina. Como consecuencia de la disminución del volumen celular se forman brotes a partir de la membrana plasmática (*blebbing*), los cuales se separan como cuerpos apoptóticos. En su interior los cuerpos apoptóticos pueden contener o no fragmentos de

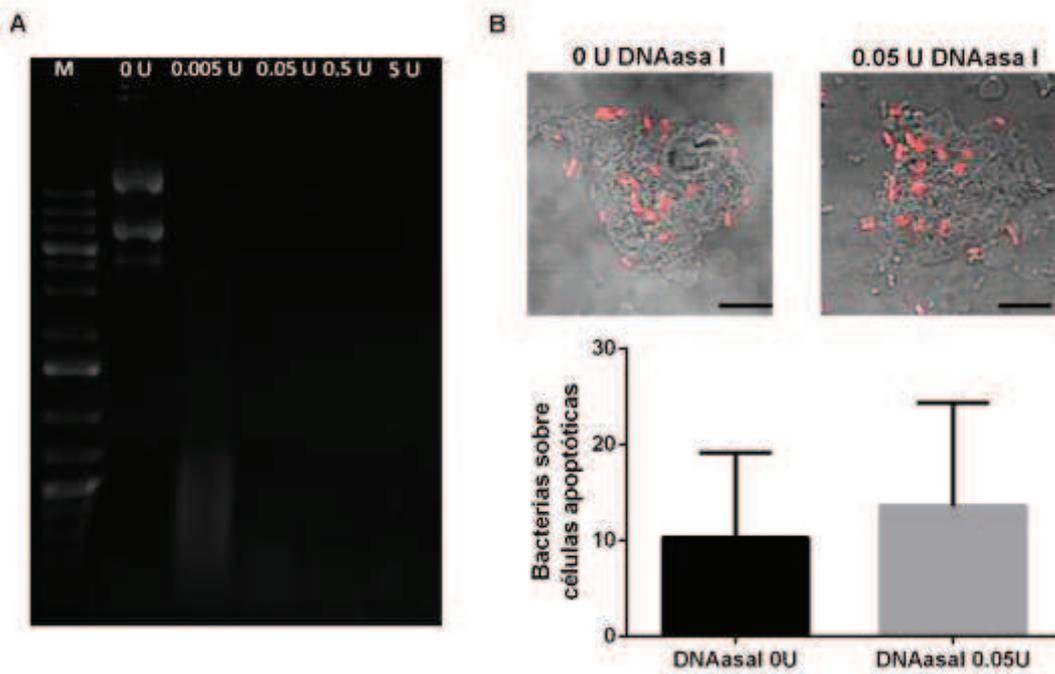
cromatina. Durante el *blebbing*, ocurren la fragmentación y condensación del núcleo y el desplazamiento de los fragmentos nucleares hacia la superficie celular<sup>31</sup>. Cocca et al observaron una disminución en la presencia de ADN asociado a la superficie de células apoptóticas tratadas con un inhibidor de blebbing y teñidas con un anticuerpo que reconoce cromatina<sup>36</sup>.

En experimentos en los cuales teñimos con TO-PRO3 el ADN de células apoptóticas extruídas fisiológicamente no detectamos ADN sobre la superficie de las células. Tampoco detectamos ADN en la superficie de células apoptóticas, cuando las generamos *in vitro* por inducción con luz UV y posterior tinción con yoduro de propidio.

Si bien en nuestros experimentos no observamos ADN expuesto y asociado a la superficie de células apoptóticas, aun así decidimos evaluar si el tratamiento de células apoptóticas con DNAasa modificaba la adhesión de *P. aeruginosa* a las mismas. Generamos células apoptóticas *in vitro* y las tratamos con DNAasa (0,05U) o se mantuvieron como control (0 U de DNAasa).

No observamos diferencias significativas comparando el número de bacterias adheridas a células apoptóticas tratadas con DNAasa y no tratadas (Fig. 38B).

A partir de este resultado podríamos concluir que el ADN no media la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas. Si bien debemos nuevamente aclarar que en nuestro sistema no habíamos observado ADN expuesto en la superficie de células apoptóticas. Tal vez sería posible detectarlo utilizando anticuerpos anti ADN doble cadena, y en ese caso también sería posible testear si efectivamente la DNAasa fue efectiva *in situ*.



**Figura 38. El tratamiento de células apoptóticas con DNAasal no altera la adhesión de *P. aeruginosa*.** (A) Electroforesis en gel de agarosa en el cual se incubaron 500 ng de DNA plasmídico en presencia de unidades crecientes de DNAasal a 37°C por 10min. (B) Células MDCK apoptóticas generadas *in vitro* por exposición a UV tratadas con DNAasal e infectadas con PAK-mCherry. La célula apoptótica se muestra en campo claro. PAK-mCherry(rojo). N=2. Barra de escala 10  $\mu$ m. Datos presentados como Media $\pm$ Error estándar. Prueba t-Student. No se encontraron diferencias significativas.

## 5. Conclusiones y Discusión

### ➤ ***P. aeruginosa* adhiere en forma de agregados sobre multiuniones celulares formadas por cuatro o más células**

La concentración de un gran número de bacterias en los sitios multiunión, posiciona a las mismas en un lugar donde, debido al proceso de extrusión, se produce una brecha que posibilita un acceso momentáneo a la superficie basolateral del epitelio. En este sentido, en paralelo a nuestro trabajo, Golovkine et al mostraron que *P. aeruginosa* transmigra la barrera epitelial en las uniones célula-célula a través de la vía paracelular. Ellos reportaron que tanto en los sitios de extrusión de células senescentes como en los de división celular, donde momentáneamente se forma una brecha que deja expuesta la vía paracelular, se observa migración de *P. aeruginosa* a través de esta vía. Los autores especulan que esto le posibilitaría a la bacteria acceder a tejidos profundos y así establecer una infección sistémica<sup>26</sup>. Cabe aclarar que nosotros no observamos transmigración paracelular en nuestros experimentos, probablemente debido a distintas condiciones del cultivo celular. Sin embargo, es interesante, integrando los resultados de ambos grupos, especular que la acumulación de bacterias en los sitios multiunión, producida por la presencia de células muertas, podría ayudar a las bacterias a localizar un acceso que les permita atravesar la barrera epitelial.

### ➤ **Es sobre la superficie de las células apoptóticas extruídas que *P. aeruginosa* se adhiere**

La adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas presenta características particulares si se la compara con la adhesión de esta bacteria a la superficie de células hospedadoras vivas, reportada en otros trabajos. El patrón de adhesión observado sobre células vivas es distinto a aquel observado sobre células apoptóticas. *P. aeruginosa* adhiere sobre las células apoptóticas principalmente en forma de agregados. Se trata de una estructura multicelular en la cual se observa no sólo adhesión bacteria-célula apoptótica, sino también adhesión bacteria-bacteria. Observamos que *P. aeruginosa* adhiere poco sobre la superficie de células vivas polarizadas y si lo hace se encuentra de forma individual. Sobre células vivas se observa mucha adhesión individual<sup>101</sup> de las bacterias, así como también formando capas de bacterias sobre la superficie<sup>102</sup>. También se observan capas de bacterias adheridas usando un modelo de cultivo 3D de células epiteliales<sup>103</sup>.

En la literatura está descrito que por el proceso de extrusión pueden ser expulsadas del epitelio células apoptóticas, como así también células vivas que una vez removidas del epitelio mueren por apoptosis. Este último tipo de muerte se denomina anoikis<sup>21</sup>. Con las tinciones llevadas a cabo en nuestros experimentos no podemos distinguir el origen del cual provienen las células apoptóticas. Las células que se encuentran en proceso de extrusión y tiñen para caspasa 3 activa, como así también tiñen para anexina V su membrana podemos asegurar que son apoptóticas. Sin embargo en las células extruídas que se encuentran sobre la monocapa, la tinción con anexina V y para caspasa 3 activa no permite discriminar si ya eran apoptóticas cuando estaban siendo extruídas o fueron extruídas vivas y murieron posteriormente por apoptosis.

Como ya mencionamos en la introducción, una de las principales causas de mortalidad en los pacientes con fibrosis quística son las infecciones crónicas por *P. aeruginosa*. La fibrosis quística se caracteriza por una alta inflamación, daño progresivo al tejido y colonización del tracto respiratorio por bacterias. Los pacientes fibroquísticos típicamente presentan un número exacerbado de células apoptóticas en las vías respiratorias<sup>84 85</sup>. Está reportado que células epiteliales deficientes en CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) parecen ser más susceptibles a la apoptosis que las células que expresan CFTR *wild type*<sup>104</sup>. De acuerdo a nuestros resultados entonces, una apoptosis exacerbada podría favorecer la infección, promoviendo la colonización por *P. aeruginosa*.

➤ **La afinidad de *P. aeruginosa* por células muertas no depende del tipo de muerte celular, ya que también adhiere a células necróticas**

Este hallazgo resulta relevante para el estudio de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en el contexto de heridas y quemaduras. Está reportado que en términos de área las heridas colonizadas por *P. aeruginosa* se muestran más extensas que aquellas que no lo están. La presencia de *P. aeruginosa* parece retrasar e incluso evitar el proceso de curado<sup>10</sup>. Es conocido que *P. aeruginosa* adhiere y coloniza preferencialmente epitelios dañados<sup>105 106</sup>. La adhesión en este contexto ha sido frecuentemente explicada en acuerdo con la tendencia que muestra *P. aeruginosa* a la adhesión sobre superficies con características de membrana basolateral o sobre las células no polarizadas migrantes en el borde de la herida. No obstante, las heridas y las quemaduras se caracterizan por la presencia tanto de células necróticas como apoptóticas. Cuando ocurre una herida, células inflamatorias son reclutadas a la misma. Estas células también liberan

citoquinas y factores de crecimiento que atraen fibroblastos, los cuales depositan colágeno y reparan el tejido dañado. Finalmente las células inflamatorias y los fibroblastos sufren apoptosis, contribuyendo al número de células apoptóticas en la herida<sup>107 108 109</sup>. Así, la capacidad de *P. aeruginosa* de adherir sobre células muertas es un factor importante que contribuiría a la colonización de los epitelios dañados.

Nuestros resultados indican que un contexto que favorezca la presencia de células muertas es un nicho susceptible de ser colonizado por *P. aeruginosa*.

➤ ***P. aeruginosa* adhiere preferentemente sobre células apoptóticas tardías**

En un individuo sano millones de células mueren por apoptosis cada día. Estas células muertas son rápidamente removidas lo que previene la liberación de componentes proinflamatorios al medio. Fagocitos profesionales y no profesionales, tales como las células epiteliales, engullen y eliminan células apoptóticas en distintos tejidos en un proceso llamado eferocitosis (del latín sepultar)<sup>110 111 112 113 114</sup>.

Es interesante destacar, en el contexto de nuestros resultados, que la fibrosis quística está asociada con una eferocitosis inefectiva ya sea que la efectúen fagocitos profesionales<sup>84</sup> como células epiteliales vecinas<sup>85</sup>. La producción excesiva de células apoptóticas (referida anteriormente) así como la eferocitosis defectiva, llevarían a que las células apoptóticas no sean removidas rápidamente y por lo tanto continúen su procesamiento alcanzando estadios tardíos que habitualmente no son alcanzados en individuos sanos. Esto favorecería la colonización por *P. aeruginosa*.

Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que las células apoptóticas cargadas de bacterias son internalizadas conjuntamente por las células epiteliales vecinas (y más recientemente hemos visto que también por macrófagos) mediante el proceso de eferocitosis. Una vez dentro de la célula, la bacteria es eliminada en lisosomas<sup>80</sup>. Es decir que el proceso eferocítico cumpliría aquí un rol en la eliminación de la bacteria. Una vez más, pensando en el contexto de la fibrosis quística, una eferocitosis defectiva, podría contribuir a la imposibilidad de eliminar a *P. aeruginosa*. En el laboratorio se está trabajando activamente para evaluar esta hipótesis.

➤ **El flagelo es necesario para la formación de los agregados**

Claramente, en este proceso la motilidad dependiente de flagelo es fundamental. Con lo cual no es sorprendente que una mutante aflagelada sea totalmente incapaz de formar agregados. Pero el flagelo no sólo cumple un rol en la motilidad en *P. aeruginosa*, sino que también puede funcionar como una adhesina, por lo tanto no podemos descartar que este rol contribuya al fenotipo encontrado. Para independizarse del rol en la motilidad, y poder determinar si el flagelo cumple un rol en la adhesión, se podrían realizar infecciones con la mutante Flic- y con una mutante que tenga flagelo pero que éste no sea funcional (por ejemplo  $\Delta$ motAB<sup>115</sup>, mutante para proteínas del motor flagelar), centrifugando inmediatamente después de infectar. Así podríamos acercar las bacterias no móviles a la monocapa y observar si ocurre formación de agregados.

En caso de que hubiera diferencias en la formación de agregados entre la mutante  $\Delta$ motAB y la Flic- podríamos sospechar que el flagelo también cumple una función como adhesina.

Sería además interesante observar, en caso de que se formaran, la estructura de esos agregados, es decir si aún con las mutantes el agregado cubre casi completamente la célula apoptótica, y la disposición de las bacterias.

➤ **Las cepas mutantes para proteínas de la vía de quimiotaxis dependiente de flagelo ( $\Delta$ cheA,  $\Delta$ cheY,  $\Delta$ cheZ) forman agregados similares a las bacterias wt**

Está reportado que distintas cepas de *P. aeruginosa* responden a moléculas presentes en heridas en animales tales como aminoácidos<sup>116</sup><sup>117</sup>, péptidos<sup>118</sup>, fosfato inorgánico<sup>119</sup>, glucosa<sup>120</sup> e intermediarios del ciclo de Krebs<sup>121</sup><sup>122</sup>.

Usando un modelo de herida en cultivo, Schwarzer et al reportaron que *P. aeruginosa* migra rápidamente hacia la zona de la herida, donde se acumula en forma transiente (2 ó 3 minutos). Vieron además que esta acumulación transiente es dependiente de quimiotaxis (ya que no ocurre con una mutante). La zona de la herida está enmarcada por células dañadas, cuya membrana plasmática está comprometida (como muestran por tinción con yoduro de propidio). Los autores plantean que estas células liberan parte de su contenido, y que las bacterias responden quimiotácticamente a moléculas tales como aminoácidos. Estos estudios se basan en experimentos *in vivo* donde siguen la intensidad de fluorescencia (portada por las bacterias) a lo largo del tiempo en las diferentes zonas de la monocapa. Si bien se trata de un

modelo diferente al nuestro, es interesante que hayan podido medir quimiotaxis hacia moléculas que serían liberadas por las células dañadas. Tal vez, el alto número de células dañadas (en el borde de la herida) atrajo un número suficiente de bacterias que permitió visualizar ese aumento transiente. Además, como dijimos, siguen el proceso a lo largo del tiempo. En este trabajo no miden adhesión. Por otro lado, estos autores utilizaron una mutante en la cual el sistema che1 está completamente deletado (PAO1 $\Delta$ cheYZA BW)<sup>11</sup>. Sería interesante probar esta mutante en nuestros experimentos, por si hubiera en las mutantes individuales utilizadas por nosotros, alguna compensación por las proteínas homólogas presentes en el cluster 2.

➤ **El sistema de jeringas nos permitió medir respuesta quimiotáctica con un gradiente de valores probados**

Luego de haber observado que las mutantes de quimiotaxis ensayadas forman agregados sobre células apoptóticas, estudiamos el fenómeno de quimiotaxis en un sistema controlado. Pudimos medir respuesta quimiotáctica bajo un gradiente de valores probados (succinato 10mM).

En nuestro intento de trasladar el posible gradiente generado por las células apoptóticas no observamos diferencias en la respuesta entre la cepa mutante de quimiotaxis y las bacterias wt. Sin embargo, este planteo experimental presenta algunas dificultades. Primero no sabemos si las células apoptóticas liberan sustancias atractantes, esto es parte de nuestra hipótesis. Pero, aún si este fuera el caso, y aún si el sistema permitiera el traslado de dicho gradiente, podríamos dudar de que la sensibilidad del ensayo sea suficiente. Huang et al determinaron que *H. pylori* sensa urea y así localiza el epitelio gástrico. Para determinar que la quimiotaxis era necesaria para localizar el epitelio gástrico, los autores colectaron el medio condicionado de organoides gástricos. Cargaron el medio condicionado en una micropipeta conectada a un sistema de microinyección. La micropipeta es descargada en un cultivo de *H. pylori*<sup>57</sup>. Así se genera un gradiente microscópico, en el cual la zona de mayor concentración es la punta de la micropipeta. Siguió la respuesta de las bacterias al gradiente en tiempo real por videomicroscopía de contraste de fases. Este ensayo difiere del nuestro, ya que nosotros no seguimos la respuesta de las bacterias durante el experimento. Este ensayo, al igual que el ensayo anterior donde medimos formación de agregados, es de punto final, porque medimos la respuesta sólo después de un tiempo de incubación. Es decir, que no estamos registrando la dinámica del proceso. También es posible que usando una micropipeta

conectada a un sistema de microinyección permita generar un gradiente que reproduciría mejor la situación que ocurriría *in vivo* en el sitio de infección.

Usando un enfoque similar al nuestro, O'Toole et al determinaron, por el método del capilar, respuesta quimiotáctica de *V. cholerae* hacia un extracto de mucus gástrico porcino y extractos de bilis porcinos y bovinos<sup>61</sup>.

En los tejidos, las células apoptóticas son removidas principalmente por fagocitos profesionales. Estas células fagocíticas encuentran a las células apoptóticas siguiendo un gradiente de sustancias atractantes liberadas por las mismas. Estas sustancias atractantes pueden ser solubles o estar contenidas en vesículas extracelulares. Muchos atractantes se encuentran en vesículas que son liberadas durante el *blebbing* de membrana de las células apoptóticas<sup>123</sup>.

Pero las células apoptóticas tardías tienen su membrana permeable. Si las sustancias atractantes fuesen solubles escaparían al medio circundante. Así el gradiente formado por dichas sustancias se formaría sólo por un tiempo acotado ya que las células apoptóticas no podrían regular la liberación de su contenido.

➤ **A partir de modelos matemáticos determinamos parámetros sensibles para indagar si la quimiotaxis juega un rol en la formación de los agregados**

Generamos modelos matemáticos que simulan el encuentro de las bacterias con las células apoptóticas bajo dos escenarios: uno estocástico y otro quimiotáctico. Realizando un alto número de simulaciones generamos curvas de número de bacterias en función del tiempo para bacterias quimiotácticas y no quimiotácticas. Observamos que los agregados formados por bacterias quimiotácticas tenían distinta forma y crecían más rápido que los agregados formados por bacterias no quimiotácticas. Es decir que la forma y la tasa de crecimiento de los agregados son parámetros sensibles a la presencia de quimiotaxis. Cabe aclarar que experimentalmente observamos que los agregados crecen hasta un determinado tamaño. Así experimentalmente no observamos diferencias entre la forma de los agregados formados por bacterias wt y por bacterias no quimiotácticas.

El uso de estos modelos teóricos moldeó nuestro diseño experimental y nos guió hacia el uso de parámetros adecuados para evaluar el rol de la quimiotaxis en la formación de agregados.

➤ **La incorporación de bacterias al agregado es más rápida en las bacterias wt que en las mutantes de quimiotaxis**

La presencia de células apoptóticas induce la formación, en el orden de minutos, de estructuras multicelulares que contienen uniones bacteria-célula apoptótica, como así también uniones bacteria-bacteria. Las uniones bacteria-bacteria sólo se dan en torno a la célula apoptótica, ya que las bacterias no se adhieren unas a otras cuando se contactan en el seno del líquido. Otra característica de los agregados es que su crecimiento es finito, llega un punto en el cual no se incorporan más bacterias al mismo. Si bien las bacterias planctónicas se encuentran en exceso, observamos que los agregados crecen hasta un determinado punto y luego su tamaño se mantiene constante. Podría ocurrir que cuando se produce el contacto de las primeras bacterias con la célula apoptótica, estas bacterias adheridas generen una/s señal/es difusible/s que reclutan bacterias planctónicas al agregado. Si solamente las bacterias que se encuentren directamente adheridas a la célula apoptótica fueran capaces de generar dicha señal, esta sería menos intensa en puntos del espacio alejados del agregado. Así los agregados crecerían hasta alcanzar un determinado tamaño.

Pero entonces ¿cómo llegarían las primeras bacterias a las células apoptóticas? Podría ocurrir que el encuentro de las primeras bacterias con la célula apoptótica sea estocástico. En cierto momento las bacterias que nadan cerca de una célula apoptótica podrían chocar con la misma y quedarse adheridas. Luego las bacterias que ya están adheridas liberarían sustancias atrayentes solubles que reclutan más bacterias al agregado.

Cuando estudiamos la cinética de formación de los agregados generamos curvas de número de bacterias en función del tiempo. Observamos tres fases: una fase *lag*, una fase de crecimiento y una fase estacionaria. Durante la fase *lag* la intensidad de fluorescencia se mantiene constante. La adquisición de los videos siempre comienza con unas pocas bacterias ya adheridas a la célula apoptótica. Luego durante la fase de crecimiento aumenta el número de bacterias adheridas a la célula apoptótica. Durante esta fase podría ocurrir que las primeras bacterias adheridas serían capaces de liberar señales que atraigan más bacterias. Así una vez que el número de bacterias adheridas supere cierto valor umbral la concentración local de la señal liberada sería mayor. Como consecuencia más bacterias son reclutadas al agregado y el proceso de formación del agregado se aceleraría.

Cuando la superficie de la célula apoptótica queda completamente cubierta, las bacterias adhieren unas a otras. Pero no observamos adhesión bacteria-bacteria más allá de dos o tres capas. Podría ocurrir que la estructura de los agregados no sea estable más allá de dos o tres capas y así su crecimiento se autolimitaría.

Como mencionamos a lo largo del trabajo, otra posibilidad sería que el gradiente de atrayente/s no fuera generado por las bacterias sino por las células apoptóticas. Podríamos pensar que las células apoptóticas, que al ser tardías tienen sus membranas permeables, liberarían componentes al medio circundante, formándose así un gradiente. Entonces las bacterias localizarían a las células apoptóticas recorriendo un camino sesgado a lo largo de un gradiente de atrayentes.

Es interesante mencionar un estudio llevado a cabo por Laganenka et al en el que estudiaron la cinética de formación de agregados en *E. coli* sobre una superficie abiótica (polímero) por videomicroscopía. Determinaron que la agregación en *E. coli* depende de la motilidad y la quimiotaxis. Observaron formación de agregados pequeños con la mutante de quimiotaxis  $\Delta$ cheY, pero no con la cepa no motil  $\Delta$ flic. Si bien dicen que la quimiotaxis no es absolutamente esencial para que ocurra agregación, proponen que fomentaría la agregación a bajas densidades celulares probablemente mediando la atracción de bacterias individuales motiles a los agregados. *E. coli* produce y secreta la molécula de quorum sensing AI-2 (autoinducer 2) durante la fase de crecimiento, la cual es similar a la fase de crecimiento de la autoagregación. Los autores determinaron que AI-2 actúa como un quimioattractante específico durante la autoagregación de *E. coli*<sup>124</sup>.

La quimiotaxis ha sido históricamente vista como un fenómeno inherente al estilo de vida planctónico de las bacterias, el cual les permite localizar fuentes de nutrientes y evitar sustancias tóxicas. Pero tanto el trabajo de Laganenka como el nuestro muestran un concepto novedoso que es que la quimiotaxis puede ser importante en comportamientos colectivos de las bacterias.

Otra pregunta que nos surge es si a tiempos largos, estos agregados podrían transformarse en biofilms.

En el laboratorio no hemos estudiado la evolución de los agregados por tiempos largos. El efecto citotóxico de las bacterias limita usualmente el estudio de la evolución de los biofilms formados sobre superficies bióticas por períodos de tiempo más prolongados. Una opción para poder hacerlo, sería profundizar el proceso de polarización de las células epiteliales, de manera que sean más resistentes a las bacterias. Esto podría hacerse utilizando filtros transwell con la membrana recubierta de

colágeno. Otra estrategia sería realizar la infección en una cámara de cultivo que cuente con un flujo que renueve continuamente el medio.

Para evitar los efectos citotóxicos de las bacterias Marks et al estudiaron la formación de biofilms de *Streptococcus pneumoniae* sobre células epiteliales polarizadas fijadas antes de la infección. Previamente los autores evaluaron la adhesión de *S. pneumoniae* (a 1 hora) sobre monocapas vivas y fijadas con paraformaldehído y no encontraron diferencias <sup>125</sup>. En nuestro caso, si la hipótesis correcta fuera que son las células apoptóticas extruídas quienes liberan sustancias atractantes al medio circundante, la utilización de un modelo con células epiteliales fijadas antes de la infección no sería adecuado. Por otro lado, habría que ver si las bacterias aún se adhieren a células fijadas. Si así fuera, tal vez esta aproximación podría resultar útil para indagar si son las células apoptóticas o las bacterias quienes liberan sustancias atractantes.

El proceso de formación de un biofilm se puede seguir mediante microscopía confocal de fluorescencia. Así se puede realizar una reconstrucción tridimensional del biofilm en función del tiempo. El análisis de un biofilm por microscopía confocal permite observar la estructura, la organización y el tamaño del mismo en sus diferentes estadios, desde la adhesión de las primeras bacterias a la superficie hasta que se forma un biofilm maduro. Las bacterias en un biofilm se encuentran embebidas en una matriz conformada por exopolisacáridos, proteínas, lípidos y ADN bacteriano. Se pueden reconocer estos componentes mediante la tinción con sondas o anticuerpos. Así por ejemplo se puede detectar ADN bacteriano a través de sondas fluorescentes específicas. Mediante lectinas conjugadas a fluoróforos es posible caracterizar el contenido de exopolisacáridos en un biofilm. En nuestro caso, dado que las bacterias se disponen en torno a una célula eucariota, sería importante asegurarse que tanto el ADN como los exopolisacáridos sean de origen bacteriano.

➤ **El T4P (pilus tipo IV) media la adhesión de *P. aeruginosa* a células apoptóticas.**

No podemos descartar que el T4P también cumpla una función locomotora. Podría ocurrir que una vez adheridas mediante el T4P a la célula apoptótica, este apéndice también se encuentre involucrado en proveer motilidad a las bacterias sobre la superficie de la célula apoptótica (*twitching*), permitiéndoles acomodarse sobre la misma. En algunos de nuestros videos observamos que los agregados comienzan a formarse desde la parte basal de la célula apoptótica (zona más cercana al epitelio). Pero la resolución temporal de nuestros videos no nos

permite determinar si las bacterias que se adhirieron a la parte basal de la célula apoptótica se desplazaron sobre la superficie hacia la parte ecuatorial y apical de la misma.

Para poner a prueba si la función locomotora del T4P es necesaria para la formación de los agregados sobre células apoptóticas, podríamos usar una cepa de *P. aeruginosa* que tiene estructuralmente T4P, pero que el mismo no es funcional. La cepa hiperpiliada PilT presenta un T4P no retráctil (funciona sólo como adhesina). La proteína PilT tiene actividad ATPasa y está involucrada en la despolimerización del T4P generando así retracción del mismo<sup>39</sup>. Si se realizaran infecciones sobre monocapas con la cepa PilT, podríamos determinar si la motilidad generada por el T4P cumple un rol en la formación de los agregados.

En *P. aeruginosa* el flagelo y el pili se encuentran en el mismo polo de la bacteria<sup>126</sup>. En las microscopías *in vivo* observamos que en la primera capa de bacterias adheridas a la célula apoptótica (unión bacteria-célula apoptótica), las mismas se adhieren mayormente de manera perpendicular a la superficie de la célula apoptótica. Entonces sería de interés determinar a través de cuál de los polos (polo flagelar o polo opuesto al flagelo) lo hacen. Para ello hemos planeado un experimento utilizando *P. aeruginosa* con un plásmido que porta la secuencia de la proteína cheA fusionada a GFP. La proteína cheA es intracelular y localiza en el polo flagelar<sup>127</sup>. Realizando infecciones con bacterias expresando cheA-GFP planeamos evaluar en experimentos *in vivo* a través de cuál de los polos las bacterias adhieren a la célula apoptótica.

Además del T4P, en la adhesión de *P. aeruginosa* a células apoptóticas tardías podrían intervenir otras adhesinas bacterianas localizadas en la membrana externa que muestren afinidad por moléculas expuestas exclusivamente o enriquecidas en la superficie de dichas células blanco. Está reportado que células apoptóticas tardías y necróticas exponen en su superficie residuos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina<sup>33 128</sup>. La especificidad patógeno-célula hospedadora, está basada en muchos casos, en el reconocimiento de pares glúcido-lectina expuestos en una y otra superficie. *P. aeruginosa* produce dos lectinas denominada PA-IIL y PA-IL. PA-IIL, codificada por el gen LecB, tiene gran afinidad por L-fucosa y también, aunque en menor medida por D-manosa<sup>129</sup>. Esta lectina se localiza en el citoplasma y en la membrana externa de la bacteria<sup>130 131</sup>. Ha sido reportado que las lectinas de *P. aeruginosa* cumplen un rol en la adhesión sobre células epiteliales<sup>132</sup>. Así sería de interés evaluar la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas en presencia de concentraciones crecientes de L-fucosa para competir

con la adhesión de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas. Si dicha competencia resultara efectiva, las lectinas podrían ser empleadas como blancos terapéuticos en heridas y quemaduras para evitar y/o disminuir la adhesión de *P. aeruginosa* a células muertas. Otra estrategia experimental que permitiría evaluar si las lectinas cumplen un rol en la adhesión de las bacterias a las células apoptóticas extruídas implicaría realizar infecciones sobre monocapas de células epiteliales con cepas mutantes para la lectina B y ver si adhieren menos comparadas con bacterias wt.

➤ **La adhesión de *P. aeruginosa* a células apoptóticas tratadas con proteasaK es menor con respecto a la adhesión a células apoptóticas no tratadas**

De aquí se desprende que moléculas de naturaleza proteica o que tengan una porción proteica (por ejemplo glicoproteínas), expuestas o enriquecidas en la superficie de células apoptóticas serían las responsables de mediar la adhesión de *P. aeruginosa* a las mismas.

Para identificar específicamente la/s molécula/s encargadas de mediar la adhesión de *P. aeruginosa* a las células apoptóticas, se podría realizar una búsqueda *in silico* de aquellas más expresadas o exclusivamente expuestas en células apoptóticas tardías. Así con estas moléculas se confeccionaría una lista (lista células apoptóticas).

También se podría realizar una búsqueda de aquellas moléculas expresadas en la superficie de células inmunes que se encuentran involucradas en la unión a células apoptóticas. Una vez terminada esta búsqueda se generaría una lista de posibles moléculas candidato. Luego habría que buscar proteínas homólogas presentes en *P. aeruginosa*. De este segundo filtro surge una nueva lista de proteínas candidato (lista *P. aeruginosa*). Luego se tendrían que generar cepas mutantes para cada una de esas proteínas y entonces con cada una de estas cepas se realizarían infecciones sobre monocapas.

A partir de la búsqueda de candidatos podrían surgir posibles glicoproteínas. Habría que determinar si la unión ocurre a través de la porción proteica o a través del carbohidrato. Para determinar por donde ocurre la unión habría que realizar un análisis estructural y de unión entre las glicoproteínas presentes en la lista de células apoptóticas y las proteínas en la lista de *P. aeruginosa*. Otra estrategia para determinar si la unión de las bacterias a las células apoptóticas ocurre a través de azúcares implicaría tratar células apoptóticas generadas *in vitro* con

glicosidasas. Así podríamos recortar los glúcidos expuestos en la superficie de las células apoptóticas.

## 5.1. Conclusión final

En este trabajo de tesis describimos el novedoso fenómeno de agregación de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas. Este hallazgo evidencia un fenómeno de adhesión a la barrera epitelial que involucra una acción colectiva de las bacterias. La formación de agregados de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas es un ejemplo de transición desde un estado planctónico a un estado sésil, multicelular y adherido a superficie. A diferencia de otros fenómenos en los que ocurre este tipo de transición, el fenómeno por nosotros descrito ocurre muy rápidamente, en el orden de minutos y no involucra multiplicación bacteriana.

A través de una complementación entre aproximaciones *in silico* y experimentales, determinamos que las bacterias localizan a las células apoptóticas estocásticamente con la contribución de algún componente quimiotáctico, ya que la incorporación de bacterias al agregado es más rápida en las bacterias wt que en una mutante de quimiotaxis.

La localización y adhesión a células muertas, permitiría a las bacterias la obtención de nutrientes y el establecimiento de una infección crónica. Como ya mencionamos nuestros hallazgos cobran relevancia en el contexto de heridas y quemaduras donde se encuentra gran cantidad de células apoptóticas y necróticas. Y también en el contexto de la fibrosis quística, caracterizada por un número exacerbado de células apoptóticas en las vías respiratorias. En todas estas patologías la infección por *P. aeruginosa* representa un problema de salud humana de suma gravedad.

Sería interesante estudiar si el fenómeno de adhesión a células apoptóticas que observamos con *P. aeruginosa* ocurre con otras especies de bacterias presentes en el contexto de heridas, quemaduras y en el pulmón fibroquístico. Así podríamos determinar si el fenómeno hallado es particular de una especie o es una estrategia bacteriana más general.

Por otro lado demostramos que en este modelo es posible seguir el posicionamiento individual de cada bacteria en tiempo real a medida que se adhieren a la célula blanco. Esto posibilitará en el futuro estudiar cómo influye la interacción de bacterias individuales con el epitelio y con otras bacterias en la emergencia de la estructura multicelular.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Cepas bacterianas

Las cepa *P. aeruginosa* K (PAK) proviene de un aislamiento humano y ha sido extensivamente estudiada por muchos laboratorios. Es virulenta en modelos animales. Las cepas 2B y 6<sup>86</sup> provienen de aislamientos clínicos de dos pacientes distintos con fibrosis quística y fueron generosamente cedidas por la Dra. Andrea Smania, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. La cepa PAOI es otra cepa ampliamente utilizada por laboratorios y cuyo genoma fue el primero de la especie en ser secuenciado. Las cepas mutantes de quimiotaxis derivadas de PAOI ( $\Delta$ cheA  $\Delta$ cheY y  $\Delta$ cheZ) fueron cedidas por Caroline S. Harwood<sup>54</sup>.

En la siguiente tabla se detallan las cepas utilizadas en esta tesis:

CEPA	PLÁSMIDO	RESISTENCIA
PAK		
PAK	pMP7605-mCherry	Gentamicina
PAK	pNPT-GFP	Carbenicilina
PAK $\Delta$ pilA	pMP7605-mCherry	Gentamicina
PAK Flic <sup>-</sup>		
PAK Flic <sup>-</sup>	pMP7605-mCherry	Gentamicina
2B mucoide	pMP7605-mCherry	Gentamicina
6 no mucoide		
PAOI		
PAOI	pMP7605-mCherry	
PAOI	pNPT-GFP	Carbenicilina
PAOI $\Delta$ cheA		
PAOI $\Delta$ cheY		
PAOI $\Delta$ cheZ		
PAOI $\Delta$ cheA	pNPT-GFP	Carbenicilina
PAOI $\Delta$ cheA	pMP7605-mCherry	Gentamicina
PAOI $\Delta$ cheY	pMP7605-mCherry	Gentamicina
PAOI $\Delta$ cheZ	pMP7605-mCherry	Gentamicina

### 6.2. Crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* se creció en caldo Luria-Bertani a 37°C 220 rpm de agitación hasta alcanzar fase estacionaria. En medio sólido las cepas se crecieron en LB-agar 1,6%. Las cepas que lo requerían, se agregó gentamicina (100  $\mu$ g/ml) o carbenicilina (250  $\mu$ g/ml) al medio.

### 6.3. Líneas celulares

Se usó la línea celular MDCK wt (clon II, generosamente cedida por el Dr. Keith Mostov), MDCK Lifeact-GFP (generosamente cedida por los Dres. Liang Cai y Keith Mostov). La línea MDCK Lifeact-GFP expresa la construcción Lifeact-GFP. Lifeact es una proteína que se une a F-actina. Así en las células que expresan la construcción Lifeact-GFP, se observa la F-actina en verde.

La línea celular MDCK proviene del epitelio de túbulo renal de perro adulto. Usamos también la línea epitelial bronquial humana 16HBE14o- (generosamente cedida por el Dr. Alan Verkman).

### 6.4. Cultivo de las células

Las células MDCK y 16HBE14o- se cultivaron en medio MEM (Sigma Aldrich) suplementado con 5% y 10% de suero fetal bovino (Natocor, Argentina), respectivamente. Se agregó al medio penicilina-estreptomicina (ThermoFisher Scientific) a una concentración final de 10 U/ml.

Se cultivaron las células en placas de cultivo de 100 mm con los medios correspondientes. Para realizar los pasajes las células se levantaron con 1 ml de tripsina-EDTA (0,025 g de tripsina cada 100 ml ThermoFisher Scientific) y se resuspendieron en MEM con suero.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se sembraron en filtros permeables transwells 12 mm de diámetro (Corning Fisher, NY, USA)  $4,5 \times 10^5$  células MDCK y se incubaron por 48h a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. También se cultivaron células MDCK sobre cubreobjetos de vidrio en placas de cultivo de 24 pocillos  $0,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron por 4 días a 37°C 5% CO<sub>2</sub> sin cambios de medio.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se sembraron  $1 \times 10^5$  células 16HBE14o- por cada transwell de 12 mm y se usaron después de 7 días en cultivo. El medio de cultivo se renueva cada 48 horas.

Para los experimentos de video microscopía se cultivaron  $1 \times 10^6$  células MDCK en placas de cultivo de 35 mm con cubreobjetos de vidrio en el fondo (P35G-1.5-14-C MatTek corporation) y se incubaron por 4 días a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> sin cambios de medio.

## 6.5. Anticuerpos y reactivos

Anticuerpo Anti-*P.aeruginosa* (ab68538) adquirido en AbCam. Anexina V conjugada a Alexa 488 o 647, faloidina conjugada a rodamina o Alexa 647, TO-PRO3 e yoduro de propidio fueron adquiridos en ThermoFisher Scientific. Anti caspasa3 activa (9661S) fue adquirido en Cell Signaling Technology. Anti gp135 (monoclonal hecho en ratón) fue cedido generosamente por G. Ojakian<sup>133</sup>. Anti p58 (monoclonal hecho en ratón) fue cedido por K. Matlin (Universidad de Cincinnati).

ProteasaK (PB0451) fue adquirida en Bio Basic Inc. DNAasal (11 284 932 001) fue adquirida en Roche.

## 6.6. Generación de células apoptóticas y necróticas *in vitro*

Para generar células apoptóticas, células MDCK confluentes se tripsinizaron y resuspendieron en medio MEM sin suero, se sembraron en una placa de cultivo de 100mm y se las expuso a un pulso de UV de onda corta (6 mJ/cm<sup>2</sup>) por 2 min en un CL-100 Ultraviolet Crosslinker. Las células luego se incubaron por 12h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub><sup>22</sup>.

Para generar células necróticas, células MDCK confluentes se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM en PBS por 30 min y se incubaron a 37°C 5% CO<sub>2</sub> por 20 h en medio MEM sin suero<sup>134</sup>.

## 6.7. Adición de células apoptóticas y necróticas

Células apoptóticas ó necróticas se tiñeron con Anexina V conjugada a Alexa (Alexa 488 ó 647) en *binding buffer* por 15 min, lavadas y resuspendidas en medio MEM sin suero. Las células apoptóticas/necróticas teñidas se agregaron a monocapas de células MDCK polarizadas en relación de 5 células apoptóticas/necróticas cada 100 células de la monocapa, se infectó con PAK-mCherry (multiplicidad de infección=60, es decir 60 bacterias por célula viva de la monocapa) y se incubó por 1h a 37°C 5% de CO<sub>2</sub>.

## 6.8. Adición de células MDCK Lifeact-GFP tripsinizadas y células apoptóticas

Células MDCK Lifeact-GFP se adicionaron a monocapas de células MDCK polarizadas en relación de 40 células MDCK Lifeact-GFP cada 100 células de la monocapa. Conjuntamente se adicionaron células MDCK apoptóticas en relación de 5 células apoptóticas cada 100 células de la monocapa. Se

adicionaron más células vivas que apoptóticas, porque las células vivas se perdían con los lavados (protocolo de inmunofluorescencia) luego de la infección. Inmediatamente se infectó con PAK-mCherry (multiplicidad de infección=60) y se incubó por 1h a 37°C 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.9. Incubación de monocapas con *P. aeruginosa***

Monocapas de células MDCK y 16HBE14o- se infectaron con *P. aeruginosa* (multiplicidad de infección=60, salvo indicación contraria) en medio MEM sin suero por 1h (salvo indicación contraria) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.10. Incubación de células apoptóticas con *P. aeruginosa* en un tubo**

Células MDCK apoptóticas fueron centrifugadas 3 min a 220g, contadas con cámara de Neubauer, resuspendidas y sometidas al tratamiento correspondiente. Luego se centrifugaron 3 min a 220g, se resuspendieron en BB, se tiñeron con Anexina V-Alexa488, se centrifugaron nuevamente (3 min 220g) y se resuspendieron en MEM sin suero.

En un volumen de 200 µl (en un tubo de microcentrifuga de 2ml), 5 x 10<sup>4</sup> células MDCK apoptóticas se infectaron con PAK-mCherry (multiplicidad de infección=10) en medio MEM sin suero por 1h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se fijó con 1ml de paraformaldehído 4%, se lavó, se centrifugó (3min 220g) y se resuspendió en 1ml de BB. Se sembraron 15 µl de suspensión en un portaobjetos previamente tratado con polilisina.

### **6.11. Preparación de muestras para inmunofluorescencia**

Las muestras se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS por 15 min a temperatura ambiente, se bloquearon con gelatina de piel de pescado 0,7%, se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% y se incubaron toda una noche a 4°C con el anticuerpo primario Anti-*P. aeruginosa* (dilución 1/100) y por 1h 37°C con el anticuerpo secundario (dilución 1/1000) en cámara húmeda. Las muestras se tiñeron con faloidina (dilución 1/1000) por 60 min.

Para la tinción con anexina V, las muestras se lavaron con binding buffer (BB): 10 mM HEPES, 140 mM NaCl y 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=7,4 y se incubaron con Anexina V conjugada a Alexa488 u Alexa 647 (dilución 1/20) por 15 min a temperatura ambiente. Las muestras luego son lavadas con BB y fijadas en paraformaldehído 4% en BB por 15 min a temperatura ambiente<sup>27</sup>. Luego son permeabilizadas con saponina 0,025% en BB (buffer de permeabilización) por 15 min y bloqueadas con BSA 1% en buffer de permeabilización por 60 min.

Para la tinción con anti caspasa 3 activa las muestras se tiñeron previamente con anexina V por el protocolo descrito. Una vez fijadas y permeabilizadas las muestras se incubaron con anti caspasa3 activa (dilución 1/100) toda una noche a 4°C y con anticuerpo secundario (dilución 1/1000) por 1h a 37°C, en cámara húmeda.

Para la tinción de núcleos las muestras se tiñeron previamente con anexina V por el protocolo anteriormente descrito. Una vez fijadas y permeabilizadas, las muestras se incubaron con TO-PRO3 (dilución 1/200) por 15 min a temperatura ambiente y finalmente con faloidina (dilución 1/1000) por 60 min, en cámara húmeda.

La tinción con anexina e ioduro de propidio se llevó a cabo en las muestras vivas previamente a ser fijadas. Se partió de células MDCK apoptóticas/necróticas resuspendidas en BB. Se contó el número de células en cámara de Neubauer, se agregaron  $1 \times 10^6$  células a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó 2 min a 200g. Se sacó el sobrenadante y se resuspendió a las células en 400  $\mu$ l de binding buffer. Las muestras se tiñeron con AnexinaV-Alexa 488 (dilución 1/20) e ioduro de propidio (250 ng/ml) por 15 min a temperatura ambiente en BB. Luego se centrifugó (2 min 200g), se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído 4% y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron con 1 ml de BB y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de BB. Se sembraron 15  $\mu$ l de la suspensión sobre un portaobjetos previamente tratado con polilisina.

Todas las muestras fueron montadas con 10  $\mu$ l de medio de montaje ProLong Antifade (ThermoFisher Scientific) que se dejó curar toda una noche. Los preparados fueron luego sellados con esmalte de uñas.

## **6.12. Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia**

Se eligieron campos al azar recorriendo el preparado de manera sistemática. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV1000. Se usó un objetivo PlanApo N de inmersión (Magnificación=60X; Apertura Numérica=1,42), una velocidad de adquisición de 4  $\mu$ segundos/pixel y una resolución de 1024x1024 píxeles. Se usó una separación de 0,3  $\mu$ m entre planos focales. El canal 488 y 647 se adquirieron en simultáneo en el mismo grupo, separados del canal 568.

### **6.13. Preparación de muestras y adquisición de imágenes por microscopía electrónica de barrido**

Células MDCK polarizadas crecidas en soportes transwell de 6,5 mm de diámetro ( $1,6 \times 10^5$  células/transwell). Se infectó con PAK wt por 1 hora a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Luego de la infección se lavó dos veces con buffer Sorensen 0,15M (pH=7,2) y se fijó con glutaraldehído 2,5% en buffer Sorensen 0,1M (pH=7,2) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó nuevamente 2 veces con buffer Sorensen 0,15M y se realizó una deshidratación progresiva, incubando la muestra por 5 min a temperatura ambiente en distintas soluciones de concentración creciente de etanol en agua destilada (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%). Se incubó toda una noche en etanol absoluto (100%) a 4°C. Se realizó el secado de punto crítico, se llevó la muestra a metalizar con oro y las mismas se analizaron con un microscopio Jeol (JSM-5900LX).

Para 1000 ml de buffer Sorensen 0,2M pH=7,2 mezclar 280 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M con 720 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

### **6.14. Estudio de la formación de agregados por microscopía confocal de fluorescencia**

Los videos se adquirieron con un microscopio confocal láser de fluorescencia Olympus FV1000. Se usó un objetivo PlanApoN de inmersión (Magnificación 60X Apertura numérica 1,42). Se tiñeron con Anexina V-Alexa 647 las células apoptóticas extruídas en monocapas de células MDCK cultivadas en placas de 35 mm con un cubreobjetos de vidrio en el fondo. Se agregó 0,5 ml de medio de infección (MEM con 20mM de HEPES, se ajustó el pH final a 7,4 con NaOH 1M) a cada placa. Se ajustaron los parámetros de adquisición en el microscopio: una velocidad de adquisición de 2  $\mu$ segundos/píxel, una resolución de 800x800 píxeles y un zoom de 3X. Después se buscó un campo al azar con células apoptóticas extruídas y se definió el inicio (extremo superior de la célula apoptótica) y el final (extremo inferior de la célula apoptótica, lindante al epitelio) del *stack*. Se usó una separación 2  $\mu$ m entre planos focales, adquiriéndose 10 planos por cada tiempo (aproximadamente 26 segundos) para un total de 40 tiempos (aproximadamente 17 minutos). El canal 488 (bacterias) y el canal 647 (células apoptóticas extruídas) se adquirieron en simultáneo.

Se infectó con PA0I-GFP ó PA0I  $\Delta$ cheA-GFP (multiplicidad de infección=20) e inmediatamente comenzó la adquisición.

### 6.15. Seguimiento (*Tracking*) de bacterias por videomicroscopía

Se trabajó con placas de 35 mm con un cubreobjetos de vidrio en el fondo. Se sembraron directamente sobre el cubreobjeto  $10^4$  bacterias (PA01 wt ó PA01  $\Delta$ cheA) en 30  $\mu$ l de medio de infección (MEM con 20mM de HEPES, se ajustó el pH final a 7,4 con NaOH 1M). Los videos se adquirieron con el microscopio confocal en campo claro. Se adquirieron imágenes en el tiempo de un mismo plano focal. Se usó un objetivo PlanApoN de inmersión (Magnificación 60X Apertura numérica 1,42), una velocidad de adquisición de 2  $\mu$ segundos/píxel, una resolución de 64x64 píxeles. Se adquirieron 10 imágenes por segundo para un tiempo total de 100 segundos.

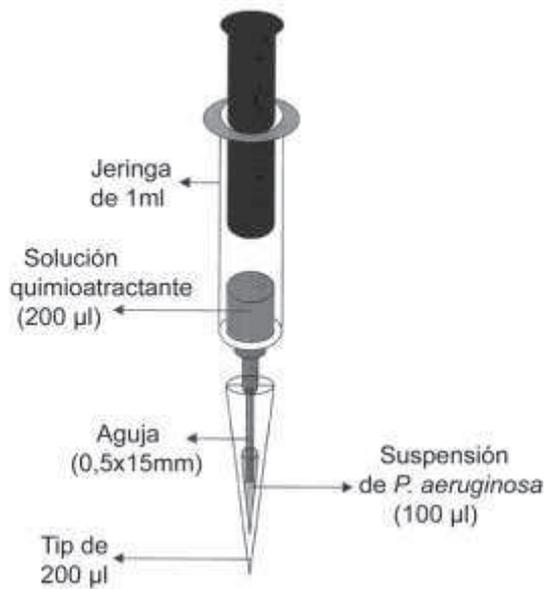
### 6.16. Ensayo de quimiotaxis

Tips de 200  $\mu$ l con la punta sellada fueron usados como cámaras que contenían 100  $\mu$ l de una suspensión de *P. aeruginosa* en caldo M9 con  $1 \times 10^5$  bacterias. En este ensayo se usaron las cepas: PAK *wild type*, PA01 *wild type*, PAK Flic<sup>-</sup>, PA01  $\Delta$ cheA y PA01  $\Delta$ cheZ.

Una aguja de 15 mm de largo y 0,5 mm de diámetro interno se unió a una jeringa tuberculina de 1 ml. Se cargó las jeringas con 200  $\mu$ l de solución quimioattractante (succinato 10mM en caldo M9).

Para asegurarnos de que la aguja estaba completamente llena con la solución a ensayar se cargó un exceso de volumen hasta 400  $\mu$ l y luego lentamente fue expelido hasta alcanzar el volumen de 200  $\mu$ l. El exceso de solución se secó de la punta de la aguja con un algodón estéril y se insertó la aguja-jeringa en el tip (conteniendo la suspensión de bacterias) hasta que el cuello de la aguja quedara sellado contra la base del tip. Así la aguja quedó insertada aproximadamente 3 mm dentro de la suspensión en el tip<sup>65</sup>.

Se incubó por 10 min a 37°C en posición vertical (Fig. 39). Luego el sistema aguja-jeringa se separó del tip con la suspensión de bacterias. Se limpió con un algodón embebido en etanol 96% las agujas, luego se separó cada aguja de su jeringa y se recuperó el contenido de estas últimas. Se realizaron diluciones seriadas al décimo del contenido de cada jeringa, se sembraron en LB-agar 1,6%, se incubaron a 37°C toda una noche y se realizó recuento de unidades formadoras de colonias.



**Figura 39. Sistema de aguja-jeringa-tip para medir quimiotaxis.** Detalles en el texto. Figura adaptada de Mazumder (1999)<sup>65</sup>.

Elegimos este método porque cuenta con una serie de ventajas: a) el uso de un tip descartable elimina la necesidad de armar un tubo de vidrio en U como el que se necesita en el ensayo clásico de Adler; b) no se necesita esterilizar previamente el sistema, ya que la aguja, la jeringa y el tip son adquiridos estériles; c) el llenado de la jeringa con el attractante elimina la necesidad de calentar el capilar antes de insertarlo en la solución attractante para que el fluido ingrese al capilar a medida que se enfría; d) las burbujas de aire que se forman en el tip son fáciles de remover; e) expulsar el contenido de la jeringa para luego diluir y sembrar en placa de agar es sencillo y elimina el uso de un bulbo de goma, el cual es necesario para remover el contenido del capilar f) el método de la jeringa, así como también el método del capilar permiten ensayar sustratos no metabolizables.

### **6.17. Obtención de medio condicionado por células apoptóticas generadas *in vitro*. Ensayo de quimiotaxis**

Se generaron células MDCK apoptóticas *in vitro* por el protocolo previamente descrito. Luego cosechamos el medio y separamos las células apoptóticas del medio por centrifugación (220 g 5 min). Luego llevamos a cabo el ensayo de quimiotaxis en jeringas por el protocolo anteriormente descrito. Como controles usamos medio MEM sin suero y medio de cultivo proveniente de células vivas tripsinizadas. El medio condicionado y los medios controles se cargaron en las jeringas (200 µl). Las bacterias en el tip se suspendieron en MEM sin suero.

## 6.18. Tratamiento de células apoptóticas con DNAasal y proteasaK

Para el tratamiento con DNAasal se incubaron  $2 \times 10^6$  células MDCK apoptóticas en suspensión con 0,05U por 10 min a 37°C en 100 µl de buffer de incubación (Tris-HCl 10 mM; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH=7,6). Como control se incubaron  $2 \times 10^6$  células MDCK apoptóticas en 100 µl de buffer de incubación sin DNAasal. Para verificar el funcionamiento de la DNAasal, se incubaron en las condiciones descritas 500 ng de DNA plasmídico con unidades crecientes de DNAasal (0,005U;0,05U;0,5U;5U). Como control se incubó una muestra de ADN plasmídico en las mismas condiciones sin DNAasal (0 U). Las muestras se sembraron en un gel de agarosa 1%. Como marcador de peso molecular se usó GeneRuler 1Kb plus (SM1331 ThermoFisher Scientific).

Para el tratamiento con proteasaK se incubaron  $2 \times 10^6$  células MDCK apoptóticas en suspensión con 0,03U por 1h a 37°C en 100 µl de buffer de incubación (50 mM Tris-HCl; 7,5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH=8,8). Como control se incubaron células apoptóticas en 100 µl de buffer de incubación sin proteasa.

Para verificar el funcionamiento de la proteasaK, se incubaron muestras de 10 µg de BSA con unidades crecientes de proteasaK ( $6 \times 10^{-4}$ U;  $6 \times 10^{-3}$ U; 0,006U; 0,03U; 0,06U; 0,3U; 0,6U). Como control se incubó una muestra de BSA en las mismas condiciones sin proteasaK (0 U). Las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida 15%. Como marcador de peso molecular se usó Page Ruler unstained protein ladder (26614 ThermoFisher Scientific).

## 6.19. Análisis de imágenes

Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH, USA), salvo indicación contraria.

Cuando está indicado los *stacks* de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia fueron proyectados a lo largo del eje z, dando como resultado una imagen en la cual cada píxel representa el valor máximo de intensidad de los píxeles para esa posición x-y.

Para la medición del volumen nuclear en células apoptóticas y necróticas se separaron los canales (*Image/Color/Split Channels*) y se trabajó con el canal de los núcleos. Se generó una máscara binaria definiendo un valor umbral de intensidad (*Threshold*) manualmente (*Image/Adjust/Threshold*). Con la herramienta *Free-Hand selection* se delineó cada uno de los núcleos. Luego aplicamos el plugin *Voxel Counter* de ImageJ. Provee una lista de las medidas realizadas con los respectivos volúmenes de los núcleos en micrómetros cúbicos.

Para la medición de intensidad de fluorescencia de gp135 en membrana se generaron planos ortogonales a los planos adquiridos x-y (a lo largo del eje z) para el canal rojo (anticuerpo secundario anti gp135 conjugado a Alexa568) y para el canal verde (AnexinaV-Alexa 488) usando la función “Reslice” (*Image/Stacks/Reslice*). Para delinear la región de interés se aplicó un valor umbral (*threshold*) a ambos canales. Se usó el método de Otsu como algoritmo de binarización, el cual se aplicó a cada plano. La máscara de gp135 se multiplicó con el canal de gp135 usando la operación *multiply*, dando como resultado “gp135 total”. La máscara de AnexinaV se multiplicó con el canal “gp135 total” usando la operación *multiply*, dando como resultado “gp135 en membrana” para cada plano. La máscara de AnexinaV se multiplicó con el canal de AnexinaV usando la operación *multiply*, dando como resultado “AnexinaV en membrana”. Los resultados obtenidos de esta operación se le aplicó la función “Sum Slices” (*Image/Stacks/Z Project Sum Slices*). Esta función suma todos los píxeles a lo largo del eje z para cada posición x-y. El resultado “SUM” projected stacks se usó para medir la intensidad de fluorescencia de gp135 y de AnexinaV en membrana (*Analyze/Measure integrated density*). Se graficó el cociente intensidad de gp135/intensidad de AnexinaV.

Para la medición de intensidad en las microscopías *in vivo* (monitoreo de la formación de los agregados) se recortó la imagen (secuencia de imágenes) en la zona que se encontraba la célula apoptótica sobre la cual se formaba el agregado, usando la función “Crop” (*Image/Crop*). Se separaron los canales (*Image/Color/Split Channels*) y se trabajó con el canal de las bacterias (canal verde). Al canal de las bacterias se le aplicó la función “Sum Slices” (*Image/Stacks/Z Project Sum Slices*) y al resultado se lo duplicó (*Image/Duplicate*) y se lo pasó a 16 bits (*Image/Type/16-bits*). A este duplicado (en 16 bits) se le aplicó el algoritmo de binarización Li (*Image/Adjust/Auto threshold- Li*). La imagen resultante, la máscara (en 8 bits), se la dividió por 255 (*Process/Math/Divide value255*). Se multiplicaron el canal “stack” y la máscara (*Process/Image Calculator operation multiply*). A partir de la imagen resultante de la multiplicación se cuantificó la intensidad de fluorescencia para cada frame. Para ello se escribió el siguiente macro que permite medir de manera iterativa la intensidad de fluorescencia (*Integrated Density*):

```
for (i=1; i<41; i++) {run("Measure");run("Next Slice [>]");}
```

Previamente se seleccionó “Integrated Density” y “0 (cero) decimal places” (*Analyze/Set Measurements/Integrated Density*).

Estos valores de intensidad de fluorescencia se utilizaron para construir curvas de intensidad de fluorescencia en función del tiempo. El tiempo entre cada frame se obtuvo al abrir el video original y pedir el “frame interval” (*Image/Show Info- Frame interval*).

Para graficar las curvas de número de bacterias en función del tiempo se transformaron los datos de intensidad de fluorescencia en número de bacterias. Para ello se determinó la intensidad de fluorescencia promedio de una bacteria. En los videos se seleccionó una bacteria con la herramienta de selección y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de esa bacteria. Este proceso se realizó para 20 bacterias y se calculó una intensidad de fluorescencia promedio para una bacteria. Luego se realizó el cociente entre los valores de intensidad de fluorescencia y la intensidad de fluorescencia promedio para una bacteria.

Para realizar la representación 3D del agregado en el tiempo se trabajó con el programa *icy* (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). Se abrió el video y en el menú se seleccionó 3D-VTK. La imagen se representa en 3D para cada tiempo del video. Se seleccionaron los siguientes parámetros: *interpolation (cubic/slow)*, *blending (composite)* y *sample (1/slow)*.

Para medir la velocidad de las bacterias se usó el plugin *Manual Tracking* de ImageJ (*Plugins/Tracking/Manual Tracking*). En el menú se calibra la imagen. En *x/y calibration* se coloca el tamaño de píxel en micrones (0,828  $\mu\text{m}$ ) y en *time interval* se coloca el tiempo entre una imagen y la siguiente en segundos (0,1 segundos). En el menú seleccionamos *Add Track*. Sobre la imagen seleccionamos una bacteria con la cruz del cursor quedando un punto sobre la bacteria. Luego pasamos a la siguiente imagen y seleccionamos nuevamente con la cruz del cursor donde se encuentra la misma bacteria. Así queda trazado un segmento entre ambos puntos que representa el camino recorrido por la bacteria. Repetimos el proceso hasta que observamos que la bacteria sale del plano focal o de la imagen. El plugin registra todos los segmentos que representan el recorrido total hecho por la bacteria. Para cada segmento calcula la distancia que representa. Automáticamente divide el valor de la distancia (en micrones) calculada por el intervalo de tiempo entre imágenes (en segundos), calculado así la velocidad ( $\mu\text{m/s}$ ). El plugin muestra en una tabla las velocidades para cada segmento que forma parte del recorrido.

## 6.20. Análisis estadístico

Los datos se muestran como Media  $\pm$  Error estándar de la media (SEM) de “N” experimentos independientes. Test de Student para dos muestras, Correlación de Pearson, ANOVA y la prueba de Kolmogorov-Smirnov fueron llevadas a cabo usando el programa GraphPad Prism versión 6.01, salvo indicación contraria.

Para el análisis de los ensayos de quimiotaxis con el sistema de jeringas, los datos de UFC (unidades formadoras de colonias) se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Este análisis fue realizado con el programa R versión 3.4.1.

Dentro de los supuestos de la prueba de ANOVA se encuentran el de homocedasticidad y distribución normal de los datos. La homocedasticidad hace referencia a que los tratamientos deben tener similar dispersión. De ambos supuestos el más importante es el de homocedasticidad, ya que la prueba es bastante robusta a la falta de normalidad. Sin embargo, es importante corroborar ambos supuestos siempre, ya que el no cumplimiento de los mismos puede llevar a conclusiones erróneas.

Para empezar decidimos representar los datos en un gráfico de residuos/predichos. Este tipo de gráfico permite detectar anomalías en el comportamiento de los datos. El residuo es el valor que toma la variable sin el efecto del tratamiento. Se obtienen al restarle el valor de la media del tratamiento a cada dato obtenido bajo ese tratamiento. Así se obtiene un valor que representa la variabilidad intrínseca del sistema. Los predichos son los valores que toma la variable, sin el efecto del tratamiento, estimados por el modelo de análisis de la varianza. En particular, observamos a partir de gráficos de residuos/predichos que la variabilidad incrementaba a medida que incrementaba el valor de la variable, es decir que datos de recuentos más grandes tenían mayor dispersión que datos de cuantos más chicos. Esto representa un problema para analizar los datos mediante el modelo de análisis de la varianza, por que conlleva al incumplimiento de los supuestos de la prueba. Una manera de solucionarlo es transformando los datos. Se transformaron los datos aplicando la transformación raíz cúbica. Se repitió el gráfico de residuos/predichos con los datos transformados. No observamos anomalías, la distribución de los residuos fue al azar. También se llevaron a cabo pruebas analíticas para corroborar homocedasticidad (prueba de Levene) y prueba de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) no observando diferencias significativas.

Luego se procedió a realizar la prueba de análisis de la varianza. Se escribió el modelo estadístico en el software R. Para ello se consideró un solo factor fijo, un factor aleatorio y una variable respuesta. De acuerdo al ensayo el factor fijo puede ser la cepa de *P. aeruginosa* (PAK wt, PA0I wt, PA0I  $\Delta$ cheA, PA0I  $\Delta$ cheZ, PAK Flic-). El factor aleatorio representa la cantidad de experimentos independientes, el número de veces que se repitió el ensayo. Incluir el factor experimento como un factor aleatorio permite poner a prueba si réplicas de experimentos independientes difieren entre sí y si así fuese se podría determinar cuánto contribuye dicho factor a la variabilidad del ensayo. La variable respuesta es el dato de recuento de colonias transformado con raíz cúbica. En el planteo de este análisis estadístico consultamos al Lic. Ricardo Bello, quien nos sugirió el tipo de transformación a aplicar a los datos y la posibilidad de incluir el factor aleatorio experimento en el modelo de análisis de la varianza.

En todos los ensayos las réplicas independientes de los experimentos no resultaron significativamente diferentes entre sí. Por lo tanto, se analizó sólo el factor cepa. Para realizar las comparaciones a posteriori entre las distintas cepas aplicamos el método de Tukey.

Los datos transformados se representaron en gráficos de caja y bigote. En este tipo de gráficos, la caja representa el rango intercuartílico. El rango intercuartílico comprende el 50% de los datos. El extremo superior de la caja representa el valor del tercer cuartil que corresponde con el valor que acumula el 75% de los datos, mientras que el extremo inferior de la caja representa el primer cuartil que corresponde con el valor que acumula el 25% de los datos. Dentro de la caja la línea representa el valor de la mediana, mientras que el punto cuadrado representa el valor de la media. El extremo del bigote superior representa el valor máximo del conjunto de datos, mientras que el extremo del bigote inferior representa el valor mínimo del conjunto de datos.

Las curvas de número de bacterias en función del tiempo obtenidas con las microscopías *in vivo* para la cepa PA01 wt y PA01  $\Delta$ cheA se compararon aplicando la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov (prueba KS). Se trata de una prueba estadística no paramétrica que permite comparar las funciones de distribución empíricas de dos muestras. La hipótesis nula de la prueba establece que ambas muestras pertenecen a la misma población, es decir que poseen la misma distribución.

En todos los ensayos se consideró un nivel de significancia del 5% ( $\alpha=0,05$ ).

## 7. Bibliografía

1. Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B. & Jackson, R. W. *Pseudomonas* genomes : diverse and adaptable. **35**, 652–680 (2011).
2. Jensen, P. Ø. Physiological levels of nitrate support anoxic growth by denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* at growth rates reported in cystic fibrosis lungs and sputum. **5**, 1–11 (2014).
3. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 , an opportunistic pathogen. **406**, 959–964 (2000).
4. Sun, J., Deng, Z. & Yan, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 254–267 (2014).
5. Driscoll, J. A., Brody, S. L. & Kollef, M. H. The Epidemiology , Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **67**, 351–368 (2007).
6. Giantsou, E. & Manolas, K. I. Superinfections in. 964–970 (2011).
7. Bhagirath, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 1–22 (2016). doi:10.1186/s12890-016-0339-5
8. Church, Elsayed, Reid, Winston & Lindsay. Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 403–434 (2006).
9. Brandenburg, K. S. *et al.* Development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in partial-thickness burn wounds using a Sprague-Dawley rat model. *J. Burn Care Res.* **40**, 44–57 (2019).
10. Bjarnsholt, T. *et al.* Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* **16**, 2–10 (2008).
11. Schwarzer, C., Fischer, H. & Machen, T. E. Chemotaxis and Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. 1–21 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0150109
12. Sosnay, P. R. *et al.* Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat. Publ. Gr.* **45**, 1160–1167 (2013).
13. Parkins, M. D., Somayaji, R. & Waters, J. Epidemiology , Biology , and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. **31**, 1–38 (2018).
14. Elborn, J. S. Cystic fi brosis. (2016). doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6
15. Hogardt, M. & Heesemann, J. International Journal of Medical Microbiology Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 557–562 (2010).

16. Rau, M. H. *et al.* Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. **12**, 1643–1658 (2010).
17. Bragonzi, A. *et al.* Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Expresses Alginate in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis and in a Mouse Model. **192**, (2005).
18. Chang, W. *et al.* Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions □. **189**, 8290–8299 (2007).
19. Li, Z. *et al.* Longitudinal Development of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Lung Disease Progression in Children With Cystic Fibrosis. *Am. Med. Assoc.* **293**, 581–588 (2005).
20. Katoh, H. & Fujita, Y. Epithelial Homeostasis: Elimination by Live Cell Extrusion. *Curr. Biol.* **22**, R453–R455 (2007).
21. Gudipaty, S. A. & Rosenblatt, J. Seminars in Cell & Developmental Biology Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 132–140 (2017).
22. Rosenblatt, J., Raff, M. C. & Cramer, L. P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. 1847–1857 (2001).
23. Andrade, D. & Rosenblatt, J. Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion. **16**, 491–501 (2015).
24. Harding, M. J., Mcgraw, H. F. & Nechiporuk, A. The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis. 2549–2558 (2014). doi:10.1242/dev.101444
25. Pentecost, M., Otto, G., Theriot, J. A. & Amieva, M. R. *Listeria monocytogenes* Invades the Epithelial Junctions at Sites of Cell Extrusion. *PLOS Pathog.* **2**, e3 (2006).
26. Golovkine, G. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLoS Pathog.* **12**, 1–22 (2016).
27. Genderen, H. Van *et al.* In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. **1**, 363–367 (2006).
28. Ida, M., Satoh, A., Matsumoto, I. & Kojima-Aikawa, K. Human annexin V binds to sulfatide: Contribution of regulation of blood coagulation. *J. Biochem.* **135**, 583–588 (2004).
29. Elmore, S. NIH Public Access. **35**, 495–516 (2007).
30. Franz, S. *et al.* After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-

- derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ.* **14**, 733–742 (2007).
31. Lane, J. D. Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4059–4071 (2005).
  32. Morris, Hargreaves, Duvall & Wyllie. Hormone-Induced Cell Death Surface Changes in Thymocytes Undergoing Apoptosis. *Am J Pathol* (1984).
  33. Nauta, A. J. *et al.* Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2853–2863 (2003).
  34. Franz, S. *et al.* Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytom. Part A* **69**, 230–239 (2006).
  35. Radic, M., Marion, T. & Monestier, M. Nucleosomes Are Exposed at the Cell Surface in Apoptosis. *J. Immunol.* **172**, 6692–6700 (2004).
  36. Cocca, B. A., Cline, A. M. & Radic, M. Z. Blebs and Apoptotic Bodies Are B Cell Autoantigens. *J. Immunol.* **169**, 159–166 (2002).
  37. Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D. & Waksman, G. REVIEWS A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev.* **15**, (2017).
  38. Skerker, J. M. & Berg, H. C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **98**, (2001).
  39. Burrows, L. L. Twitching Motility: Type IV Pili in Action. (2012). doi:10.1146/annurev-micro-092611-150055
  40. JC, C. *et al.* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Pseudomonas aeruginosa* **67**, 3625 (1999).
  41. Bucior, I., Pielage, J. F. & Engel, J. N. Pseudomonas aeruginosa Pili and Flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
  42. Chiang, P. & Burrows, L. L. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* **185**, 2374–2378 (2003).
  43. Conrad, J. C. *et al.* Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in P. aeruginosa. *Biophys. J.* **100**, 1608–1616 (2011).
  44. Haiko, J. & Westerlund-wikström, B. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. 1242–1267 (2013). doi:10.3390/biology2041242
  45. Bruzaud, J. *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of Pseudomonas

- aeruginosa PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **131**, 59–66 (2015).
46. Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**, 1000–1007 (1998).
  47. Scharfman, A. *et al.* Recognition of lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **69**, 5243–5248 (2001).
  48. Lillehoj, E. P., Kim, B. T. & Kim, K. C. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **282**, L751–L756 (2002).
  49. Feldman, M. *et al.* Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* **66**, 43–51 (1998).
  50. Comolli, J. C., Waite, L. L., Mostov, K. E. & Engel, J. N. Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **67**, 3207–3214 (1999).
  51. Schroeder. Lack of Adherence of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to Asialo-GM1 on Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **69**, 719–729 (2001).
  52. Minamino, T. & Imada, K. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol.* **23**, 267–274 (2015).
  53. Bi, S., Sourjik, V. & Cher, C. H. Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 22–29 (2018).
  54. Ferrández, A. *et al.* Cluster II che Genes from *Pseudomonas aeruginosa* Are Required for an Optimal Chemotactic Response Cluster II che Genes from *Pseudomonas aeruginosa* Are Required for an Optimal Chemotactic Response. *J. Bacteriol.* **184**, 4374–4383 (2002).
  55. Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T. & Hill, J. E. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 17–46 (2015).
  56. Qian, C., Wong, C., Swarup, S. & Chiam, K. Bacterial Tethering Analysis Reveals a “ Run-Reverse-Turn ” Mechanism for *Pseudomonas* Species Motility. **79**, 4734–4743 (2013).
  57. Huang, J. Y. *et al.* Chemodetection and Destruction of Host Urea Allows *Helicobacter pylori* to Locate the Epithelium Article Chemodetection and Destruction of Host Urea Allows *Helicobacter pylori* to Locate the Epithelium. *Cell Host Microbe* **18**, 147–156 (2015).
  58. Huang, J. Y., Sweeney, E. G., Guillemin, K. & Amieva, M. R. Multiple Acid Sensors Control *Helicobacter pylori* Colonization of the Stomach. 1–28 (2017). doi:10.1371/journal.ppat.1006118

59. Winter, S. E. *et al.* Salmonella Uses Energy Taxits to Benefit from Intestinal Inflammation. **9**, (2013).
60. Almagro-Moreno, S., Pruss, K. & Taylor, R. K. Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* **11**, 1–11 (2015).
61. O'Toole, R. *et al.* The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *J. Bacteriol.* **181**, 4308–4317 (1999).
62. Nishiyama, S. I. *et al.* Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
63. Schmidt, J. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PLoS One* **6**, 1–11 (2011).
64. Adler, J. Chemotaxis in Bacteria Motile *Escherichia coli* migrate in bands that are influenced by oxygen and organic nutrients. *Science (80- )*. **153**, (1966).
65. Mazumder, R., Phelps, T. J., Krieg, N. R. & Benoit, R. E. Methods Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. **37**, 255–263 (1999).
66. Tindall, M. J., Gaffney, E. A., Maini, P. K. & Armitage, J. P. Theoretical insights into bacterial chemotaxis. **4**, (2012).
67. Bray, D., Levin, M. D. & Lipkow, K. Article The Chemotactic Behavior of Computer-Based Surrogate Bacteria. 12–19 (2007). doi:10.1016/j.cub.2006.11.027
68. Kollmann, M. & Sourjik, V. In *Silico Biology: From Simulation to Understanding*. **17**, 132–134 (2005).
69. Clausen, C. R., Ph, D. & Christie, D. L. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. **100**, 358–361 (1982).
70. Menozzi, F. D., Boucher, P. E., Riveau, G., Gantiez, C. & Locht, C. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **62**, 4261–4269 (1994).
71. Hassett, D. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 117–130 (2010).
72. Melican, K. & Dumenil, G. Vascular colonization by *Neisseria meningitidis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 50–56 (2012).
73. Mikaty, G. *et al.* Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
74. Higashi, D. L. *et al.* Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment:

- Microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. *Infect. Immun.* **75**, 4743–4753 (2007).
75. Taktikos, J., Lin, Y. T., Stark, H., Biais, N. & Zaburdaev, V. Pili-induced clustering of *N. Gonorrhoeae* Bacteria. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
  76. Wang, L.-C., Litwin, M., Sahiholnasab, Z., Song, W. & Stein, D. *Neisseria gonorrhoeae* Aggregation Reduces Its Ceftriaxone Susceptibility. *Antibiotics* **7**, 48 (2018).
  77. Lepanto, P. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a Lyn-dependent mechanism. *Cell. Microbiol.* **13**, 1212–1222 (2011).
  78. Hartmann, R. *et al.* Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms. *Nat. Phys.* (2018). doi:10.1038/s41567-018-0356-9
  79. Yan, J., Sharo, A. G., Stone, H. A., Wingreen, N. S. & Bassler, B. L. *Vibrio cholerae* biofilm growth program and architecture revealed by single-cell live imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E5337–E5343 (2016).
  80. Capasso, D. *et al.* Elimination of *Pseudomonas aeruginosa* through Efferocytosis upon Binding to Apoptotic Cells. 1–22 (2016). doi:10.1371/journal.ppat.1006068
  81. Endresen, P. C., Prytz, P. S. & Aarbakke, J. A New Flow Cytometric Method for Discrimination of Apoptotic Cells and Detection of Their Cell Cycle Specificity Through Staining of F-Actin and DNA. **171**, 162–171 (1995).
  82. Broquet, A. & Asehnoune, K. Opinion Apoptosis induced by *Pseudomonas aeruginosa* : a lonely killer ? 1–3 (2014). doi:10.1111/1751-7915.12144
  83. Shafikhani, S. H., Morales, C. & Engel, J. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. **10**, 994–1007 (2008).
  84. Vandivier, R. W. *et al.* Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis Find the latest version: Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibro. **109**, 661–670 (2002).
  85. Vandivier, R. W. *et al.* Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences. 677–686 (2009). doi:10.1152/ajplung.00030.2009.
  86. Feliziani, S. *et al.* Mucoidy , Quorum Sensing , Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections. **5**, (2010).
  87. Huang, H. L. *et al.* Trypsin-induced proteome alteration during cell

- subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* **17**, 1–10 (2010).
88. Furcht & Wendelschafer. TRYPSIN-INDUCED COORDINATE ALTERATIONS IN CELL SHAPE, CYTOSKELETON, AND INTRINSIC MEMBRANE STRUCTURE OF CONTACT-INHIBITED CELLS. *Exp. Cell Res.* (1978).
  89. Nauta, A. J. *et al.* Opsonization with C1q and Mannose-Binding Lectin Targets Apoptotic Cells to Dendritic Cells. (2004). doi:10.4049/jimmunol.173.5.3044
  90. Ogden, C. A. *et al.* C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and CD91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. **194**, (2001).
  91. Barros, L. F., Hermosilla, T. & Castro, J. Necrotic volume increase and early physiology of necrosis. **i**, 401–409 (2001).
  92. Chaban, B., Hughes, H. V. & Beeby, M. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. **46**, 40 (2015).
  93. Moulton, R. C. & Montie, T. C. Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **137**, 274–280 (1979).
  94. Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S. H., Hassett, D. J. & Sauer, K. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7335–7343 (2006).
  95. Valentini, M., Storelli, N. & Lapouge, K. Identification of C4-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **193**, 4307–4316 (2011).
  96. Doyle, T. B., Hawkins, A. C. & Mccarter, L. L. The Complex Flagellar Torque Generator of *Pseudomonas aeruginosa*. **186**, 6341–6350 (2004).
  97. Barken, K. B. *et al.* Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**, 2331–2343 (2008).
  98. Lorenz, A. *et al.* Importance of flagella in acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Environ. Microbiol.* **00**, 1–15 (2018).
  99. Guzik, K. *et al.* A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: Proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell Death Differ.* **14**, 171–182 (2007).
  100. Cunin, P. *et al.* Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death Dis.* **7**, e2215-11 (2016).
  101. Metruccio, M. M. E., Evans, D. J., Gabriel, M. M., Kadurugamuwa, J. L. & Fleiszig, S. M. J. *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles

- Triggered by Human Mucosal Fluid and Lysozyme Can Prime Host Tissue Surfaces for Bacterial Adhesion. **7**, 1–19 (2016).
102. Kiedrowski, R., Horswill, A. R., Apicella, M. A. & Reinhardt, J. M. Quantification of confocal images of biofilms grown on irregular surfaces. *J Microbiol Methods* **111–120** (2015). doi:10.1016/j.mimet.2014.02.020.Quantification
  103. Crabbé, A. *et al.* Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. 1–13 (2017). doi:10.1038/srep43321
  104. Soleti, R., Porro, C. & Marti, M. C. Apoptotic process in cystic fibrosis cells. (2013). doi:10.1007/s10495-013-0874-y
  105. Engel, J. Subversion of mucosal barrier polarity by *Pseudomonas aeruginosa*. **2**, 1–7 (2011).
  106. Roger, P., Puchelle, E., Tournier, J., Debordeaux, C. & Plotkowski, M. Fibronectin and  $\alpha 5\beta 1$  integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. 1301–1309 (1999).
  107. Greenhalgh, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **30**, (1998).
  108. Wu, Y. & Chen, S. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. *Front. Pharmacol.* **5**, 1–6 (2014).
  109. Rai, N. K., Tripathi, K. & Sharma, D. Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. *Low. Extrem. wounds* **4**, 138–144 (2005).
  110. Henson, P. M., Bratton, D. L. & Fadok, V. A. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.* 795–805 (2001).
  111. Grimsley, C. & Ravichandran, K. S. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol.* **13**, 648–656 (2003).
  112. Sandahl, M., Hunter, D. M., Strunk, K. E., Earp, H. S. & Cook, R. S. Epithelial cell-directed efferocytosis in the post-partum mammary gland is necessary for tissue homeostasis and future lactation. *BMC Dev. Biol.* (2010).
  113. Elliott, M. R., Koster, K. M. & Murphy, P. S. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* **198**, 1387–1394 (2017).
  114. Davies, S., Reynolds, G. & Stamataki, Z. Clearance of Apoptotic Cells by Tissue epithelia: A Putative Role for Hepatocytes in Liver Efferocytosis. *Front. Immunol.* **9**, 1–15 (2018).
  115. Tran, V. B., Fleiszig, S. M. J., Evans, D. J. & Radke, C. J. Dynamics of Flagellum- and Pilus-Mediated Association of *Pseudomonas aeruginosa* with Contact Lens Surfaces □. **77**, 3644–3652 (2011).

116. Kuroda, A. *et al.* Molecular Cloning and Characterization of a Chemotactic Transducer Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **177**, 7019–7025 (1995).
117. Taguchi, K., Fukutomi, H., Kuroda, A., Kato, J. & Ohtake, H. Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. 3223–3229 (1997).
118. Kelly-wintenberg, K. & Montie, T. C. Chemotaxis to Oligopeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. **60**, 363–367 (1994).
119. Kato, J., Ito, A., Nikata, T. & Ohtake, H. Phosphate Taxis in *Pseudomonas aeruginosa*. **174**, 5149–5151 (1992).
120. Sly, M. & Phibbs, V. Reconstitution of glucose uptake and chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa* glucose transport defective mutants. (1993).
121. Alvarez-ortega, C. & Harwood, C. S. Identification of a Malate Chemoreceptor in *Pseudomonas aeruginosa* by Screening for Chemotaxis Defects in an Energy Taxis-Deficient Mutant □. **73**, 7793–7795 (2007).
122. Alfonso, C., Liu, X., Parales, R. E., Morel, B. & Conejero-lara, F. Identification of a Chemoreceptor for Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates. **285**, 23126–23136 (2010).
123. Hawkins, L. A. & Devitt, A. Current Understanding of the Mechanisms for Clearance of Apoptotic Cells-A Fine Balance. *J. Cell Death* 57–68 (2013). doi:10.4137/JCD.S11037.TYPE
124. Laganenka, L., Colin, R. & Sourjik, V. Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2016).
125. Marks, L. R., Parameswaran, G. I. & Hakansson, A. P. Pneumococcal Interactions with Epithelial Cells Are Crucial for Optimal Biofilm Formation and Colonization In Vitro and In Vivo. *Infect. Immun.* **80**, 2744–2760 (2012).
126. Berne, C. & Ellison, C. K. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat. Rev. Microbiol.* (2018). doi:10.1038/s41579-018-0057-5
127. Cowles, K. N. *et al.* The putative Poc complex controls two distinct *Pseudomonas aeruginosa* polar motility mechanisms. **90**, 923–938 (2013).
128. Franz, S. *et al.* Lectins Detect Changes of the Glycosylation Status of Plasma Membrane Constituents During Late Apoptosis. *Cytom. Part A* (2006). doi:10.1002/cyto.a.20206
129. Imberty, A., Wimmerová, M., Mitchell, E. P. & Gilboa-garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **6**, 221–228 (2004).

130. Loris, R., Tielker, D., Jaeger, K. & Wyns, L. Structural Basis of Carbohydrate Recognition by the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2836**, 861–870 (2003).
131. Tielker, D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**, 1313–1323 (2005).
132. Chemani, C. *et al.* Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect. Immun.* **77**, 2065–2075 (2009).
133. Ojakian & Schwimmer. The Polarized Distribution of an Apical Cell Surface Glycoprotein Is Maintained by Interactions With the Cytoskeleton of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Biol. Cell* **107**, 2377–2387 (1988).
134. Matteucci, C., Grelli, S., Smaele, E. De, Fontana, C. & Mastino, A. Identification of Nuclei From Apoptotic , Necrotic , and Viable Lymphoid Cells by Using Multiparameter Flow Cytometry. **153**, 145–153 (1999).