

Tesis Doctoral

Reconocimiento del ADN bacteriano extracelular por neutrófilos humanos: su impacto en la respuesta a biofilms

Fuxman Bass, Juan Ignacio

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fuxman Bass, Juan Ignacio. (2010). Reconocimiento del ADN bacteriano extracelular por neutrófilos humanos: su impacto en la respuesta a biofilms. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fuxman Bass, Juan Ignacio. "Reconocimiento del ADN bacteriano extracelular por neutrófilos humanos: su impacto en la respuesta a biofilms". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**RECONOCIMIENTO DEL ADN BACTERIANO
EXTRACELULAR POR NEUTRÓFILOS
HUMANOS: SU IMPACTO EN LA RESPUESTA A
BIOFILMS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas

Lic. Juan Ignacio Fuxman Bass

Directora: Dra. Analía Trevani
Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

Laboratorio de Inmunología Oncológica. Instituto de Investigaciones
Hematológicas "Mariano R. Castex". Academia Nacional de Medicina.

Buenos Aires, 2010

RECONOCIMIENTO DEL ADN BACTERIANO EXTRACELULAR POR NEUTRÓFILOS HUMANOS: SU IMPACTO EN LA RESPUESTA A BIOFILMS

Previamente demostramos que el ADN bacteriano extracelular activa a los neutrófilos a través de un mecanismo diferente al canónico CpG-dependiente. El ADN extracelular es un componente central en la formación y estructura de los biofilms bacterianos, comunidades responsables de más del 60% de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos. La presente tesis tuvo como objetivos centrales determinar el impacto del ADN de la matriz de los biofilms en la activación de los neutrófilos humanos y la identificaron del receptor involucrado en el reconocimiento de ADN.

Los estudios realizados indicaron que la degradación con DNAsa I del ADN de la matriz extracelular de los biofilms de *P. aeruginosa* redujo marcadamente su capacidad de inducir la activación de los neutrófilos, determinada en función de su habilidad para producir citoquinas proinflamatorias, incrementar marcadores de activación fisiológicamente relevantes, de mediar la fagocitosis y de liberar trampas extracelulares de los neutrófilos (NET).

La aplicación de técnicas de MALDI-TOF nos permitió identificar, en el neutrófilo, 16 proteínas con capacidad de unir ADN bacteriano. A pesar de que ninguna de ellas resultó ser el receptor de la superficie celular para ADN, es posible que dos de las proteínas encontradas constituyan sensores intracelulares de ADN, cuya relevancia queda por ser explorada.

Los hallazgos realizados en la presente Tesis confirman la existencia de una proteína de la superficie del neutrófilo capaz de mediar el reconocimiento de ADN y la activación celular por esta molécula. Además, indican que el ADN de la matriz extracelular representa un componente proinflamatorio relevante de los biofilms de *P. aeruginosa*. Los mismos permiten especular que el reconocimiento del ADN de la matriz de biofilms podría representar un mecanismo seleccionado evolutivamente para permitir al huésped incrementar su capacidad de responder a este tipo de infecciones bacterianas persistentes.

Palabras clave: ADN bacteriano, biofilm, inflamación, neutrófilos, *P. aeruginosa*

EXTRACELLULAR BACTERIAL DNA RECOGNITION BY HUMAN NEUTROPHILS: IT'S IMPACT ON THE RESPONSE TO BIOFILMS

We have previously demonstrated that extracellular bacterial DNA activates neutrophils through a non-canonical mechanism. Extracellular DNA is a key component in the formation and composition of bacterial biofilms, that are communities responsible for more than 60% of the infections caused by these microorganisms. The aims of this Thesis were to determine the impact of DNA present in the biofilm matrix in triggering human neutrophil activation and to identify the receptor involved in DNA recognition.

We found that extracellular DNA degradation of *P. aeruginosa* biofilm matrix with DNase I markedly reduced its ability to induce neutrophil activation, determined by evaluating proinflammatory cytokines production, the increase of physiologically relevant activation markers, phagocytosis and neutrophil extracellular traps (NET) release.

By application of MALDI-TOF techniques we identified 16 neutrophil proteins that bind bacterial DNA. Although none of them proved to be the DNA surface receptor, it is possible that two of these proteins correspond to intracellular DNA sensors whose relevance remains to be explored.

The findings presented in this Thesis confirm the existence of a neutrophil surface protein capable of mediating DNA recognition and cell activation. Additionally, they indicate that extracellular matrix DNA represents a relevant proinflammatory component of *P. aeruginosa* biofilms. Thus, it is possible to speculate that recognition of extracellular DNA of the biofilm matrix represents an evolutionary selected mechanism that increases the ability of the host to respond to these types of persistent bacterial infections.

Key words: bacterial DNA, biofilm, inflammation, neutrophils, *P. aeruginosa*

A mi familia.

Agradecimientos

- A Analía por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio, a discutir ciencia y, por sobre todo, por su calidad humana.
- A Lau por haberme dado una mano y un oído todos estos años.
- A Ángeles, a Daniela y a Mariana sin cuya contribución no hubiera sido posible esta tesis.
- A todos los chicos y no tan chicos del laboratorio por su colaboración y su buena onda que hacen que sea un verdadero placer trabajar y compartir momentos fuera del laboratorio con ustedes.
- A mi familia por haberme apoyado siempre.
- Y muy, pero muy especialmente a mi hija Paulita por haberme acompañado durante toda la carrera y todo el doctorado.

Abreviaturas

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ADN-biot: ADN de *E. coli* simple cadena biotilado

CFP: proteína cian fluorescente

DHR-123: dihidrorodamina-123

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FQ: fibrosis quística

GFP: proteína verde fluorescente

IL-1 β : interleuquina 1 beta

IL-8: interleuquina 8

IMF: intensidad media de fluorescencia

IP: yoduro de propidio

MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)

MLC: microscopía láser confocal

MPO: mieloperoxidasa

NET: trampas extracelulares de los neutrófilos

PBS: Tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PE: ficoeritrina

SAH: Seroalbúmina humana

TOF: Tiempo de vuelo (*time of flight*)

UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia

Indice

Introducción	10
1. Rol de los neutrófilos en el contexto de la respuesta inmune.....	11
1.1 Ciclo de vida de los neutrófilos.....	11
1.2 Migración de los neutrófilos al foco inflamatorio.....	12
1.3 Mecanismos microbicidas de los neutrófilos.....	13
1.4 Producción de citoquinas por los neutrófilos.....	16
2. Mecanismos de reconocimiento inmune.....	17
3. Receptores de reconocimiento de patrones.....	18
3.1 Receptores de tipo Toll (TLR).....	19
3.2 Receptores como lectinas de tipo C (RLC).....	21
3.3 Receptores Scavenger.....	21
4. Reconocimiento inmune innato del ADN bacteriano.....	22
5. Activación de neutrófilos por ADN bacteriano.....	26
6. Moléculas de la superficie celular involucradas en la unión a ADN.....	27
7. Presencia de ADN bacteriano extracelular en microambientes inflamatorios.....	28
8. Biofilms bacterianos.....	29
9. Biofilms en enfermedades infecciosas.....	31
10. Respuesta inmune frente a biofilms.....	32
11. Infecciones mediadas por biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	33
12. Objetivos.....	36
Materiales y métodos	37
Purificación de neutrófilos humanos.....	38
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	38
Ácidos nucleicos empleados.....	39
Biotinilación del ADN.....	39
Ensayo de unión del ADN biotinilado a la superficie de neutrófilos humanos.....	41
Producción de IL-8 en respuesta a ADN bacteriano y otros agonistas.....	41
Microscopía Laser Confocal.....	41
Tratamiento de los biofilms con DNasa I.....	42
Medición de la producción de citoquinas por los neutrófilos en respuesta a biofilms....	43
Expresión de marcadores de superficie en neutrófilos co-cultivados con biofilms.....	44
Inmovilización de MPO al biofilm.....	44
Fagocitosis.....	45
Monitoreo del estallido respiratorio.....	45
Evaluación de la liberación de NET.....	45

Tratamiento de los neutrófilos con proteinasa K.....	46
Digestión del ADN de <i>E. coli</i>	46
Identificación del fragmento del plásmido Bluescript II KS+ que se une a la superficie de los neutrófilos.....	47
Purificación de membrana plasmática de neutrófilos.....	48
Detección de proteínas con capacidad de unir ADN en la fracción de membrana de neutrófilos humanos.....	49
Análisis bioinformático.....	51
Análisis de expresión en superficie de proteínas en los neutrófilos.....	51
Análisis de expresión intracelular de proteínas en los neutrófilos.....	52
Análisis estadístico.....	52
Resultados	53
Parte I: ADN extracelular: un componente proinflamatorio relevante de los biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	54
Los neutrófilos humanos unen y son activados por ADN de <i>P. aeruginosa</i>	55
El tratamiento con DNasa I elimina el ADN de la matriz expuesto a los neutrófilos sin afectar la biomasa de los biofilms ni la viabilidad bacteriana.....	56
El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms bacterianos de estimular la producción de IL-8 e IL-1 β por neutrófilos humanos.....	59
El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms bacterianos para estimular el aumento de expresión de marcadores de activación del neutrófilo.....	62
El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms de inmovilizar mieloperoxidasa (MPO).....	66
El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms de estimular la fagocitosis por neutrófilos pero no afecta su habilidad de mediar el estallido respiratorio.....	69
Los biofilms bacterianos estimulan fuertemente la liberación de NET. El tratamiento de los biofilms con DNasa I reduce la capacidad de los neutrófilos de liberar NETs.....	73
Impacto del tratamiento con DNasa I en la capacidad de los biofilms formados con cepas mucoides de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con fibrosis quística para estimular la liberación de citoquinas por los neutrófilos.....	75
Parte 2: Identificación de moléculas del neutrófilo con capacidad de unir ADN bacteriano.....	78
El ADN bacteriano activa a los neutrófilos humanos a través de un receptor proteico presente en la superficie celular.....	79
Protocolo diseñado para la identificación del receptor de ADN en neutrófilos humanos.....	81
Determinación de las condiciones óptimas para obtención de membrana plasmática del neutrófilo.....	82
Identificación de condiciones “ <i>in vitro</i> ” capaces de incrementar la expresión del receptor putativo para ADN.....	83

Identificación de la/s secuencia/s de ADN con mayor capacidad de unirse y activar a los neutrófilos.....	85
Identificación de polianiones incapaces de desplazar la unión del ADN bacteriano a la superficie del neutrófilo a ser empleados para reducir la unión inespecífica del ADN en los experimentos de purificación del receptor.....	93
Disociación de la unión del ADN-biot de la superficie de los neutrófilos.....	94
Identificación de proteínas de la superficie del neutrófilo con capacidad de unirse al ADN bacteriano.....	96
Evaluación de las proteínas identificadas como posibles receptores de superficie para ADN bacteriano.....	99
Discusión	107
El ADN extracelular es un componente proinflamatorio relevante de los biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	108
El ADN extracelular de la matriz de los biofilms de <i>P. aeruginosa</i> podría jugar un rol en la respuesta de los neutrófilos en pacientes con FQ.....	111
El receptor para ADN del neutrófilo es una proteína localizada en la membrana plasmática.....	113
Búsqueda del motivo del ADN bacteriano capaz de inducir la activación de los neutrófilos.....	114
Evaluación de la capacidad de distintas proteínas del neutrófilo de reconocer ADN.....	117
Participación de proteínas granulares del neutrófilo identificadas por MALDI-TOF en el reconocimiento del ADN bacteriano.....	119
Participación de los TLR en el reconocimiento del ADN.....	121
Conclusiones.....	123
Referencias	124

Introducción

*"Nunca emprenderíamos nada si
quisiéramos asegurar por anticipado,
el éxito de nuestra empresa"*

Napoleón Bonaparte

Los seres vivos multicelulares habitan un ambiente poblado de agentes microbianos capaces de invadirlos, provocarles trastornos patológicos y eventualmente su muerte. Los vertebrados, como consecuencia de esta fuerte presión selectiva ocasionada por los microorganismos infectantes, evolucionaron desarrollando un sistema inmunológico altamente eficiente que involucra mecanismos innatos y adaptativos. La inmunidad adaptativa ejecuta respuestas dirigidas específicamente a entidades moleculares expresadas por cada patógeno (antígenos), que pueden ser de naturaleza humoral (dominadas por la producción de anticuerpos) o celular (con predominio de la acción de células como linfocitos T y macrófagos). La inmunidad innata, por otro lado, no sólo provee la primera línea de defensa del organismo, sino que además, controla la iniciación de las respuestas adaptativas y determina la naturaleza de respuesta efectora a motorizarse (1-2).

1. Rol de los neutrófilos en el contexto de la respuesta inmune

Los neutrófilos son células fagocíticas profesionales que conforman el sistema inmune innato. En los humanos adultos, estas células constituyen más de la mitad de los leucocitos circulantes y median las fases más tempranas de las respuestas inflamatorias. Ellos son actores claves en la defensa frente a infecciones causadas por bacterias y hongos, pero son también células inflamatorias cuya activación desmedida puede ocasionar un extenso daño de tejidos (3).

El rol crucial que juegan los neutrófilos en la inmunidad anti-infecciosa se evidencia en pacientes que sufren desórdenes tales como enfermedad granulomatosa crónica, deficiencia en la adhesión leucocitaria de tipo 1 (LAD1) o diversas formas de neutropenia, los cuales se caracterizan por padecer una severa susceptibilidad a infecciones de naturaleza bacteriana y fúngica que amenazan su sobrevivencia (4).

1.1 Ciclo de vida de los neutrófilos

El ciclo de vida de los neutrófilos y sus progenitores se lleva a cabo en tres compartimentos: médula ósea, sangre y tejidos periféricos, e involucra diferentes *pool/s* celulares vinculados dinámicamente. El *pool* más primitivo es el *pool* progenitor que se

encuentra localizado en la médula ósea, y contiene stem cells y diferentes progenitores relacionados con la producción de neutrófilos y otros tipos celulares: CFU-GEMM (unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos), CFU-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos) y CFU-G (unidades formadoras de colonias de granulocitos) (5-8).

Por otra parte, el *pool* proliferativo está integrado por mieloblastos, promielocitos y mielocitos. Los mieloblastos constituyen formas celulares inmaduras que carecen normalmente de gránulos. Éstos maduran a promielocitos, los cuales presentan gránulos azurófilos o primarios, peroxidasa-positivos; y posteriormente, a mielocitos, desarrollando gránulos específicos o secundarios, peroxidasa-negativos. La expansión en este *pool* proliferativo involucra, generalmente, cinco o seis divisiones celulares (5-8).

El *pool* no proliferativo está constituido por los neutrófilos maduros y sus precursores inmediatos: los metamielocitos y los neutrófilos en banda. Presentan en su citoplasma gránulos azurófilos y específicos, así como también gránulos terciarios, y constituyen un *pool* de maduración y reserva (5-8).

Los neutrófilos son liberados desde el *pool* de reserva de la médula ósea a la circulación en un número de $1-4 \times 10^9/\text{kg}$ peso/día. El período requerido para la diferenciación de mielocito a neutrófilo maduro circulante es de 5-7 días, pero este período puede reducirse a tan sólo 2 días ante la presencia de procesos infecciosos. Los neutrófilos en sangre se presentan integrando dos *pools* de tamaño similar, el circulante y el marginal adherido al endotelio vascular. Los neutrófilos circulantes pueden abandonar el lecho vascular, accediendo a tejidos periféricos en respuesta a la producción local de estímulos quimiotácticos (5-8).

1.2 Migración de los neutrófilos al foco inflamatorio

Ante la presencia de estímulos proinflamatorios producidos como consecuencia de infecciones bacterianas o fúngicas, o por injuria tisular, el endotelio de los vasos que irrigan al tejido inflamado, sufre modificaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión. Este cambio constituye una señal que desencadena la

adhesión de los neutrófilos al endotelio, los cuales posteriormente se extravasan en respuesta a sustancias quimiotácticas (3, 9). Estos acontecimientos ocurren en vasos donde el flujo sanguíneo es lento, como en las vénulas post-capilares o en los capilares pulmonares, y están favorecidos por la vasodilatación que acompaña a la inflamación. El proceso de extravasación comprende tres etapas muy bien definidas: (a) la etapa de adherencia transitoria o de *rolling* mediada por las selectinas, (b) la etapa de adherencia estable mediada por integrinas como LFA-1 (CD11a/CD18) y Mac-1 (CD11b/CD18), cuya activación es desencadenada por quimiocinas como la IL-8 o por el factor activador plaquetario (PAF) inmovilizados a la cara luminal del endotelio vascular; y (c) etapa de migración transendotelial (3). Durante la trans migración el neutrófilo se deforma de manera notable, remodela extensamente su citoesqueleto y se extiende en un pseudópodo para poder penetrar con movimientos ameboides entre los bordes de las células endoteliales. Durante este pasaje la célula recibe estímulos de las células endoteliales inflamadas que modularán su actividad en el foco de infección. Tras atravesar la membrana basal, el neutrófilo se abre paso en el espacio intersticial siguiendo gradientes de quimioattractantes, para llegar a su destino final, el foco infeccioso. Quimioattractantes como el C5a, el LTB₄, el PAF, los péptidos formilados y las quimiocinas, como la IL-8, cumplen un papel relevante en esta misión (10).

1.3 Mecanismos microbicidas de los neutrófilos

Una vez en el foco de infección, los neutrófilos reconocen a los organismos invasores a través de receptores de reconocimiento de patrones (los que serán descritos más adelante), o de receptores para componentes del complemento activado o para el Fc de la IgG cuando el agente invasor se encuentra opsonizado. Este reconocimiento usualmente desencadena la producción de moléculas pro-inflamatorias y la fagocitosis del microorganismo (3, 11-12).

En el interior del neutrófilo, los microorganismos son sometidos a dos sistemas microbicidas de distinta naturaleza: un sistema dependiente de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) y otro independiente del oxígeno molecular (3) (figura 1). Los IRO son generados por reducción parcial del oxígeno molecular mediante la activación del metabolismo oxidativo, a través de un proceso que se

denomina estallido respiratorio. Este proceso se inicia con la activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa, producto de la estimulación de ciertos receptores de reconocimiento por componentes del patógeno (13). La oxidasa media la producción de anión superóxido (O_2^-) el cual constituye el sustrato para todos los IRO producidos por el neutrófilo, incluyendo el peróxido de hidrógeno, los radicales libres, los halógenos oxidados, las cloraminas y el oxígeno singlete (14). El peróxido de hidrógeno es producido por la dismutación espontánea o enzimática del O_2^- , y es a su vez, sustrato de la enzima mieloperoxidasa (MPO), responsable de la síntesis de oxidantes halogenados. Como consecuencia de las altas concentraciones plasmáticas del ión cloruro, el principal producto de la MPO es el hipoclorito (14-15). Este compuesto, puede también reaccionar en forma espontánea con aminas primarias o secundarias dando origen a otras especies oxidantes de larga vida media conocidas como cloraminas. Todas estas especies contribuyen en mayor o menor medida a la destrucción del microorganismo.

Por otra parte, los microorganismos son también sometidos a la acción de enzimas y péptidos microbicidas que están empaquetados en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos (3). Cuando se produce el reconocimiento del patógeno a través de determinados receptores, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática o con la membrana de la vacuola fagocítica liberando su contenido (16). Según su morfología y contenido, estos gránulos pueden ser clasificados en 4 tipos: (a) gránulos azurófilos o primarios que contienen MPO, serinoproteasas y proteínas antibióticas; (b) gránulos específicos o secundarios que contienen lactoferrina y colagenasa entre otras enzimas y proteínas catiónicas; (c) gránulos terciarios que albergan gelatinasa, y (d) las denominadas vesículas secretorias, que poseen un gran número de receptores en su membrana y contienen únicamente proteínas plasmáticas como la albúmina (3). Generalmente, el contenido de los gránulos azurófilos y de los específicos suele liberarse al interior de los endosomas una vez que los microorganismos son fagocitados en el foco de infección. No obstante, la degranulación de los gránulos terciarios y de las vesículas secretorias suele ocurrir durante el tránsito del neutrófilo desde el lecho vascular al foco de injuria (3). De hecho, las vesículas secretorias son las estructuras más rápidamente movilizables. En general, se fusionan a la membrana plasmática cuando el neutrófilo interactúa con el endotelio vascular, lo que conduce al incremento de moléculas de adhesión y receptores de quimioattractantes que prestan funciones durante la

extravasación (16). Los gránulos de gelatinasa están también implicados en el desarrollo de mecanismos microbicidas debido a que, al igual que los gránulos secundarios, son depósitos de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18) y del citocromo b558 (un componente de la enzima NADPH oxidasa) (16).

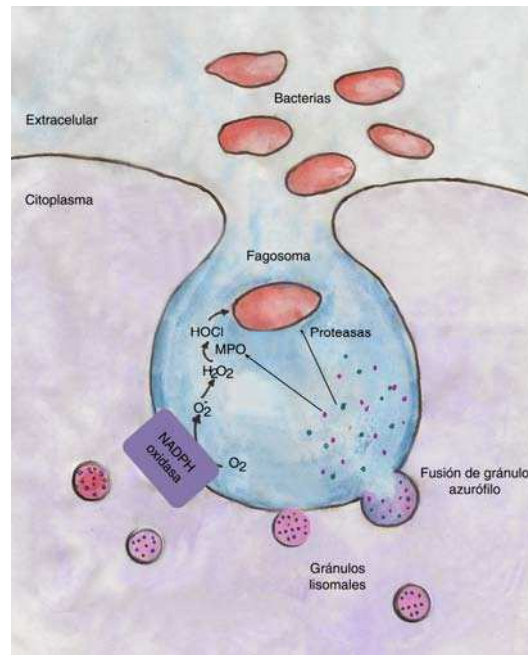


Figura 1: Mecanismos microbicidas ejecutados por los neutrófilos. Como consecuencia del reconocimiento de los microorganismos, los neutrófilos montan una respuesta basada en la fagocitosis de los microbios y su eliminación a través de mecanismos dependientes e independientes de IRO. También Los neutrófilos pueden también liberar NET (no indicado en la figura), las cuales permiten contener y matar a bacterias y hongos en el medio extracelular,

Estudios realizados en los últimos años demostraron que los neutrófilos pueden también eliminar microorganismos extracelulares al capturarlos en estructuras formadas por cromatina y proteínas granulares que reciben el nombre de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (17-18). Las NET se forman y liberan por estimulación de los neutrófilos con agonistas como LPS, IL-8, C5a, PMA y por microorganismos, factores que finalmente conducen a la disrupción de la membrana celular como último paso de una nueva forma de muerte a la cual se denominó NETosis. Durante este proceso, el núcleo pierde su forma lobulada, la eu- y heterocromatina se homogenizan, y luego, la envoltura nuclear y las membranas granulares se desintegran y el material nuclear toma contacto directo con los componentes de los gránulos. Finalmente, la membrana celular se rompe y las NET son liberadas concomitantemente con la muerte celular (19). Diversos patógenos como *Shigella*

flexneri, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y el hongo *Candida albicans* inducen la formación de NET y son atrapados por ellas (18). Las NET degradan factores de virulencia y matan a bacterias Gram positivas y negativas así como también hongos unicelulares, posiblemente debido a que exponen a los patógenos a altas concentraciones locales de proteínas anti-microbianas como la elastasa, la BPI y las histonas.

1.4 Producción de citoquinas por los neutrófilos

El reconocimiento de los patógenos también conduce a la producción de mediadores pro-inflamatorios, cuya misión no consiste únicamente en controlar o contener la infección sino también en condicionar la ulterior respuesta adaptativa. De hecho, los neutrófilos, debido al masivo reclutamiento en los focos de infección, constituyen una fuente relevante de citoquinas y quimiocinas capaces de modelar el reclutamiento de ésta y otras poblaciones inmunes (20). Más aún, estudios recientes llevados a cabo empleando neutrófilos murinos reportaron que los mismos podrían presentar un rol inmunoregulatorio durante infecciones agudas y crónicas mediante la producción de IL-10; y exhibir, en forma similar a lo definido para los macrófagos, polarización tipo N1 y N2, dependiente de señales del microambiente (21).

Una de las quimiocinas de mayor relevancia en los procesos inflamatorios desencadenados por infecciones bacterianas es la IL-8. Esta molécula es producida por una amplia variedad de células (monocitos, macrófagos, neutrófilos, queratinocitos y células endoteliales, entre otras) y tiene la capacidad de atraer quimiotácticamente a los neutrófilos al foco de infección, permitiendo también, que los mismos alcancen un estado de mayor activación. A su vez, el neutrófilo activado es capaz de producir grandes cantidades de IL-8, hecho que posibilita, conjuntamente con la IL-8 producida por otros tipos celulares en el foco de infección, el reclutamiento masivo de neutrófilos y la perpetuación del proceso inflamatorio para la erradicación de la infección (20).

La IL-1 β es otra citoquina producida por los neutrófilos que juega un rol clave en la respuesta inflamatoria del huésped, siendo responsable de una parte relevante de los acontecimientos observados en esta respuesta. En otros tipos celulares se ha demostrado que diversos productos bacterianos y mediadores inflamatorios

endógenos inducen la síntesis de una pro-forma biológicamente inactiva de la IL-1 β . Ésta permanece en el citosol hasta que un segundo estímulo gatilla su procesamiento por el inflamasoma y la liberación de la forma activa (22). La IL-1 β liberada causa la acumulación de metabolitos del ácido araquidónico, incrementa los niveles de la NO sintasa inducible y mantiene la producción de NO. Asimismo, incrementa la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, promueve la extravasación de leucocitos, modula el metabolismo muscular e induce fiebre (23).

2. Mecanismos de reconocimiento inmune

El sistema inmune ha evolucionado bajo una enorme presión de selección impuesta por los patógenos, resultando en una eficiente capacidad de los organismos multicelulares para reconocer microorganismos invasores y eliminarlos con las menores consecuencias nocivas para el huésped. En este contexto, es importante comprender el inmenso desafío que plantea el reconocimiento de los patógenos, pues no sólo involucra una enorme variabilidad y heterogeneidad molecular, sino también una tasa alta de mutación característica de los microorganismos. Este desafío fue superado en forma distinta a través de la evolución de mecanismos de reconocimiento inmune innatos y adaptativos. De este modo, los genes que codifican para los receptores de las células T y B son generados somáticamente durante la ontogenia de estas células, dotando a cada linfocito con un receptor estructuralmente único, predestinado a reconocer un antígeno en particular y por ende dando origen a un amplio repertorio de reconocimiento (24).

Por el contrario, el sistema inmune innato reconoce a una vasta variedad de estructuras moleculares asociadas con los patógenos, a través de un número limitado de moléculas conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (RRP) (25-26). Los ligandos de los RRP, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), se caracterizan por ser estructuras moleculares compartidas por grandes grupos de patógenos y por ser esenciales para la supervivencia o patogenicidad de los microorganismos. En consecuencia, los PMAP están muy conservados evolutivamente. Entre los PMAP mejor estudiados se destacan el LPS bacteriano, el peptidoglicano, los ácidos lipoteicoicos, ciertos arreglos de manosa presentes en las glicoproteínas microbianas, el lipoarabinomano de la pared celular de micobacterias, la

flagelina, el ARN doble cadena y el ADN bacteriano (25). Debido a que los PMAP están presentes en los patógenos pero ausentes en sus huéspedes, son determinantes para la discriminación entre lo propio y lo extraño (1).

Las células de la inmunidad innata también pueden reconocer a los microorganismos de manera indirecta, sin la participación de los RRP. Esto ocurre a través de receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (Ig) o de receptores para componentes del complemento. Los dos últimos tipos de receptores reconocen moléculas depositadas sobre el microorganismo como consecuencia de su interacción con el sistema inmune del huésped, denominadas colectivamente opsoninas (12).

3. Receptores de reconocimiento de patrones

Los RRP cumplen un papel fundamental en el reconocimiento de agentes patógenos. Estos receptores se expresan estratégicamente, aunque no exclusivamente, en las células que primero contactan con los patógenos durante los procesos infecciosos, como ser células epiteliales y células efectoras de la inmunidad innata. Se han descrito distintos RRP, algunos de los cuales se expresan en la superficie celular, otros lo hacen en compartimentos intracelulares, mientras que otros son secretados al torrente sanguíneo y a los fluidos tisulares. Ellos desempeñan funciones tales como la opsonización, la activación de las cascadas del complemento y de la coagulación, la activación de vías de señalización pro-inflamatorias y la inducción o prevención de la apoptosis (3, 12). En esta tesis nos limitaremos a describir aquellos RRP que se expresan en la superficie celular (tabla 1).

Familia de receptores	Miembros	Ligandos reconocidos	Localización subcelular
TLR	TLR 1-11	Péptidoglicano (TLR 2) Porinas (TLR 2) ARN viral dc (TLR3) LPS (TLR 4) Manano (TLR 4) Flagelina (TLR 5) ARN viral sc (TLR 7/8) ADN CpG (TLR 9)	Membrana celular: TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11. Endosomas: TLR 3, 7, 8 y 9.
RLC	Receptor de manosa DC-SIGN DEC-205 BCDA-2 Dectin-1 DCIR DCAL-1 C-LEC Langerina	Diferentes motivos glucosídicos presentes principalmente en microorganismos.	Membrana celular
Scavenger	CD36 SR-A1 SR-A2 Marco LOX-1	LPS Ácido teicoico ADN CpG Lipoproteínas de baja densidad. ARN dc viral	Membrana celular

Tabla 1: Principales características de los receptores de reconocimiento de patrones que se expresan en la superficie celular.

3.1 Receptores de tipo Toll (TLR)

Son los RRP mejor caracterizados hasta el momento y activan vías de señalización que desencadenan respuestas pro-inflamatorias (27). Los TLR comprenden una familia de receptores transmembrana de tipo I, que se encuentran evolutivamente conservados entre insectos y vertebrados. En mamíferos, se describieron trece TLR homólogos al receptor Toll de *Drosophila* (el primero en ser identificado), sin embargo, sólo diez se expresan en humanos (28). Sus ligandos son bastante diversos en cuanto a origen y estructura; no obstante, la mayoría de ellos, son PMAP que alertan sobre la presencia de una infección (tabla 1) (29-30). Por ejemplo, el LPS es detectado por el TLR4; las lipoproteínas bacterianas y ácidos lipoteicoicos son detectadas por el TLR2; la flagelina es detectada por el TLR5; los motivos CpG del ADN bacteriano y viral son detectados por el TLR9; el ARN doble cadena es detectado por el TLR3 y el simple cadena por el TLR7. Existen evidencias

de que el TLR4 es también capaz de reconocer moléculas propias producidas en situaciones de stress celular, por ejemplo, liberadas por células necróticas (31-33). Estas moléculas mimetizarían las acciones de los PAMP permitiendo al huésped responder ante señales de daño.

La mayoría de los TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11) se expresan en la superficie celular, mientras que aquellos que reconocen ácidos nucleicos (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) se alojan en compartimentos intracelulares y reconocen a sus ligandos en los endosomas (27, 34). Estos receptores se caracterizan por contener un ectodominio compuesto de repeticiones ricas en leucina, que es responsable del reconocimiento de los PAMP, y un dominio citoplasmático conocido como dominio TIR, homólogo a la región citoplasmática del receptor para IL-1, requerido para la transducción de la señal (35).

El reconocimiento de los PAMP por los TLR conduce a un aumento en la transcripción de diferentes genes, dependiendo del TLR activado y del tipo celular involucrado. La diferencia en las cascadas de señalización activadas por cada TLR puede ser, en parte, explicada por las distintas moléculas adaptadoras que contienen dominio TIR y son reclutadas al receptor. Hasta la fecha, se conocen cinco de estos adaptadores incluyendo MyD88, TRIF, TIRAP/Mal, moléculas adaptadoras relacionadas con TRIF (TRAM) y SARM.

La señalización de los TLR se realiza principalmente a través de dos vías distintas en base a si involucran la participación de MyD88 o de TRIF (35). La vía dependiente de MyD88 es requerida por la mayoría de los TLR, excepto TLR3, e involucra la participación de las quinasas IRAK-4 e IRAK 1. Esta vía conduce a la activación de las MAPK y a la fosforilación de la I κ B quinasa resultando en la activación del factor de transcripción NF- κ B responsable de la inducción de genes proinflamatorios. En el caso de TLR7 y TLR9, esta vía también conduce a la activación de IRF7 e IRF1 que median la producción de interferones de tipo I (35). Por otra parte, la vía dependiente de TRIF empleada por TLR3 y TLR4, conduce a la activación de NF- κ B e IRF3 resultando en la inducción de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I (35).

Los neutrófilos humanos expresan todos los TLR descritos excepto el TLR3 (11, 36). La activación de estos receptores dispara la producción de citoquinas, el *shedding* de L-selectina, prima a los neutrófilos para la producción de anión superóxido en respuesta a FMLP, incrementa la tasa de fagocitosis e inhibe la quimiotaxis inducida por IL-8 (11, 37).

3.2 Receptores como lectinas de tipo C (RLC)

Constituyen una extensa familia de receptores especializada en el reconocimiento de hidratos de carbono presentes en la superficie de los microorganismos. Dependiendo del tipo de receptor, reconocen arreglos espaciales de residuos manosa, galactosa o fructosa. Entre los RLC mejor caracterizados se encuentran: receptor de manosa (MR), DC-SIGN, DEC-205, dectina-1, BCDA-2, DCIR, DCAL-1, C-LEC y Langerin (tabla 1). Existen evidencias de que el neutrófilo humano expresa dectina-1 (receptor principal de β -glucanos) y dectina-2 (11, 38-39).

A diferencia de los TLR, los RLC, al reconocer a sus ligandos, pueden mediar la internalización de los microorganismos que los expresan. Esta internalización es seguida por la degradación, procesamiento y presentación de los péptidos antigénicos derivados a través de moléculas del CMH de clases I y II. De manera similar a lo descrito para los TLR, la activación de los RLC conduce también a la secreción de numerosas quimiocinas y citoquinas (12).

3.3 Receptores Scavenger

Estos RRP fueron originalmente identificados como receptores de lipoproteínas modificadas y como tales, involucradas en el desarrollo de la aterogénesis. No obstante, hoy sabemos que además median el reconocimiento de microorganismos a través de su interacción con diversos PAMP tales como lipoproteínas bacterianas, polirribonucleótidos y ADN microbiano (tabla 1). El receptor scavenger del macrófago (MSR) pertenece a la familia de receptores de tipo A (SR-A) y posee especificidad por una variedad de ligandos polianiónicos, incluyendo ARN doble cadena, LPS y ácido lipoteicoico. Otro miembro de la familia SR-A llamado MARCO, es un receptor

expresado por los macrófagos que une pared bacteriana y LPS, mediando la fagocitosis de bacterias (40-41). La expresión de receptores scavenger aún no ha sido investigada en neutrófilos.

4. Reconocimiento inmune innato del ADN bacteriano

Desde hace ya varios años se reconoce la capacidad del ADN bacteriano de inducir la activación de diferentes poblaciones leucocitarias humanas y murinas como células B, células dendríticas plasmacitoides, células NK, monocitos y macrófagos, así como también la de células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos y queratinocitos (42-44).

Un extenso número de trabajos demostró que el TLR9 cumple un rol relevante en la activación celular por ADN (figura 2). Este receptor se localiza en el retículo endoplásmico en células en reposo y es translocado a los endosomas luego de la estimulación con ADN, donde el mismo puede inducir su activación bajo el ambiente ácido del endosoma (34, 45-46). En la membrana endosomal, el TLR9 se expresa como un heterodímero preformado, que tras la unión de su ligando sufre un cambio conformacional induciendo señales de activación que disparan la proliferación de células B, la maduración de células dendríticas, la activación de las funciones microbicidas de macrófagos, y la producción de interferones de tipo I (47).

La capacidad del ADN microbiano de inducir la activación del TLR9 ha sido adjudicada a su contenido de dinucleótidos CpG no metilados presentes en un contexto de bases particular, denominados motivos CpG, en los cuales el dinucleótido CpG está flanqueado hacia 5' por dos purinas y hacia 3' por dos pirimidinas. Dado que los genomas de vertebrados exhiben un fenómeno conocido como supresión CpG, en virtud de la cual, la frecuencia de dinucleótidos CpG se encuentra reducida a un 25% de la esperada respecto a la utilización de bases al azar (48), y estos motivos además se encuentran en general metilados (49), se confirió a los motivos CpG el rótulo de PAMP, al representar la entidad molecular que permitiría al sistema inmune diferenciar al ADN microbiano del ADN propio. El resultado de numerosos estudios fue modelando este paradigma, que en años recientes ha sido cuestionado por diversos hallazgos experimentales. Como describiré a continuación, desde la perspectiva actual, la activación inmune por ADN microbiano no parece estar determinada por su

contenido de motivos CpG. Los estudios más recientes sustentan la posibilidad de que los vertebrados hayan desarrollado a través de la evolución, sofisticados mecanismos para responder exclusivamente a ácidos nucleicos foráneos.

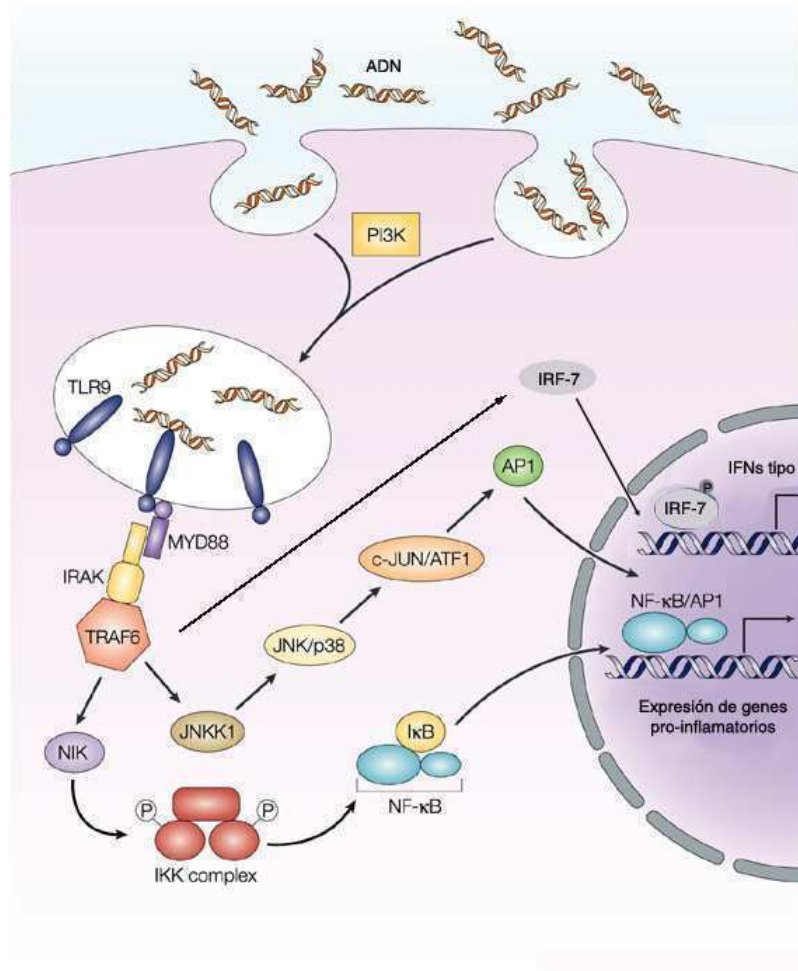


Figura 2: Mecanismo de reconocimiento de ADN foráneo dependiente de TLR9 por células del sistema inmune.

A continuación realizaré una breve reseña cronológica de los hallazgos que condujeron al estado actual del conocimiento de los mecanismos que regulan el reconocimiento inmune del ADN microbiano.

En 1984 Yamamoto y colaboradores reportaron que el ADN derivado de BCG es capaz de estimular a células inmunes a producir citoquinas (50-51). Años más tarde, Pisetsky y colaboradores determinaron que el ADN bacteriano es mitogénico

para células B (52). Con el fin de determinar cuál era la secuencia del ADN microbiano responsable de esta respuesta, Arthur Krieg empleó oligodeoxinucleótidos (ODN) sintéticos como miméticos de los ADN microbianos. Sin embargo, debido a la alta susceptibilidad a nucleasas en cultivo de los ODN conteniendo uniones fosfodiésteres “naturales” (F-ODN), se desarrollaron ODN estabilizados por una modificación del esqueleto mediante el reemplazo de uno de los oxígeno no puenteantes del grupo fosfato de la unión fosfodiéster por un átomo de azufre, los cuales son conocidos como ODN fosforotioato (S-ODN). Fue a través del empleo de estos S-ODN que se identificaron a los motivos CpG como responsables de la mitogenicidad del ADN sobre células B, y a partir de entonces, un cúmulo de trabajos realizados con este tipo de ODN dio sustento al “paradigma CpG”. Diversas observaciones, sin embargo, demostraron que los S-ODN no reflejan fielmente la inmunobiología del ADN “natural”. De hecho, los S-ODN ejercen efectos que son independientes de su secuencia (53), y además, su capacidad estimuladora ha sido testada en su forma simple cadena, mientras que el ADN microbiano al cual se enfrenta el TLR9 endosomal es doble cadena, debido a que es muy improbable que las condiciones del endosoma conduzcan a su desnaturalización.

Por otra parte, cuando el ADN del huésped (que recordamos posee una frecuencia reducida de motivos CpG, los cuales a su vez se encuentran en su mayoría metilados) es translocado forzosamente a endosomas, es capaz de inducir la activación celular (54), sugiriendo la prescindencia de los motivos CpG para este fin. Un evidencia más contundente fue aportada por estudios recientes realizados por el grupo de Hermann Wagner, que demostraron que en su forma fosfodiéster (forma natural del ADN), un esqueleto 2'-desoxirribosa carente de bases nitrogenadas, es capaz de unirse al TLR9 (55). Este esqueleto sería el responsable de proveer una activación basal para ADN translocados forzosamente a los endosomas y explicaría los resultados que indican que el ADN de vertebrados translocado a endosomas es capaz de inducir la activación celular (54, 56-59). La presencia de bases nitrogenadas en dicho esqueleto, y en especial los motivos CpG, incrementan la afinidad por el TLR9 y su activación. Por el contrario, los esqueletos 2'-deoxirribosa fosforotioato, unen al TLR9 con 100 veces mayor afinidad que los esqueletos fosfodiéster, sin embargo se comportan, al igual que los S-ODN sin secuencia específica, como antagonistas del TLR9. La presencia de motivos CpG en los S-ODN revierte el antagonismo ejercido por el esqueleto y transforma a dicho ODN en fuertemente

estimuladorio. En conjunto, estos hallazgos sugirieron que el TLR9 sensa ADN fosfodiéster en los endosomas de modo CpG-independiente sobre la base de la capacidad estimuladora intrínseca del esqueleto 2'-deoxirribosa, y que la secuencia puede modular la fuerza de la respuesta. Sin embargo, para los S-ODN, la presencia de motivos CpG es un requerimiento estricto para ejercer efectos inmunoestimuladorios (55). Es decir, que la dependencia de motivos CpG para la estimulación del TLR9 parece estar restringida a ligandos farmacológicos como los S-ODN pero no al ADN natural.

Estos hallazgos dan sustento a una nueva hipótesis según la cual la discriminación entre el ADN propio y el foráneo no estaría mediada por la naturaleza del ligando sino por su accesibilidad al TLR9. De modo que, en condiciones homeostáticas, el mismo no reconocería ADN propio porque éste no tendría posibilidad de acceder al compartimiento endosomal. De hecho, los vertebrados han desarrollado mecanismos que aseguran que el ADN de células apoptóticas que han sido fagocitadas, sea degradado por la DNasa II, mientras que el ADN liberado en procesos de injuria o necrosis tisular al medio extracelular, sería degradado por la DNasa I sérica para evitar una activación inadecuada del TLR9. Esto es, en parte, sustentado por la asociación observada entre mutaciones en el gen de la DNasa I y el desarrollo de lupus en humanos (60), y por experimentos llevados a cabo en ratones deficientes en esta nucleasa, donde se ha demostrado el desarrollo de una enfermedad autoinmune parecida al lupus eritematoso sistémico (61).

En el año 2003, nuestro grupo demostró que los neutrófilos humanos pueden ser activados por ADN bacteriano a través de un mecanismo independiente de motivos CpG (62). Trabajos realizados por otros grupos también sustentaron la existencia de vías no relacionadas con la presencia de motivos CpG, a través de los cuales el ADN sería capaz de inducir la activación celular por mecanismos TLR9-dependientes o independientes que involucran la translocación endosómica del ADN o su ingreso al citoplasma (63-74). De hecho, tres mecanismos citosólicos de reconocimiento de ADN han sido recientemente reportados. Uno de ellos involucra a la proteína de unión a ADN-Z (actualmente conocida como DAI) y a STING que median la activación de IRF3 e IRF7 induciendo la producción de interferones de tipo I (75-78). Otro mecanismo involucra la participación AIM2 que activa un complejo molecular conocido como inflamasoma a través de ASC y caspasa I, induciendo la liberación de IL-1 β (79-80).

Un tercer mecanismo descrito involucra la transcripción de ADN en el citosol por la RNA polimerasa III, el reconocimiento por RIG-I y la participación de la quinasa TBK1, y permitiría explicar, en parte, el efecto adyuvante de las vacunas a ADN (75, 81).

5. Activación de neutrófilos por ADN bacteriano

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la activación de neutrófilos por ADN de bacterias Gram positivas y Gram negativas ocurre a través de un mecanismo independiente de motivos CpG (62). Esta conclusión se basó en resultados de experimentos que demostraron:

- (1) que el ADN de *E. coli* metilado en citosina presenta la misma capacidad para inducir la activación del neutrófilo que el ADN no metilado;
- (2) la incapacidad de F-ODN CpG de reproducir los efectos mediados por el ADN bacteriano;
- (3) que los S-ODN tienen capacidad de inducir la activación del neutrófilo, pero en forma independiente de la secuencia ostentada y, aparentemente, dependiente de las características del esqueleto;
- (4) que la metilación en CpG de un S-ODN activo no reduce su capacidad de inducir la activación del neutrófilo (62).

Nuestros hallazgos también indicaron que el ADN de mamíferos es incapaz de inducir la activación de los neutrófilos, lo cual supone la existencia de un PMAP en el ADN bacteriano distinto de los motivos CpG. De hecho, diversos estudios demostraron, tanto en el ADN natural como en ODN sintéticos, que motivos moleculares distintos a los CpG tienen capacidad de inducir la activación inmune (64, 71, 82-83). Es importante destacar, sin embargo, que en los tipos celulares analizados, el ADN CpG también tiene capacidad de ejercer efectos estimulatorios. Por el contrario, los hallazgos previos de nuestro grupo indicaron, no sólo que el ADN bacteriano induce la activación de neutrófilos humanos a través de un mecanismo CpG-independiente, sino además, que los mismos son incapaces de responder a motivos CpG (62). Resultados adicionales también indicaron que tanto el ADN simple cadena como el doble cadena inducen la activación de neutrófilos humanos, aunque la eficiencia de cada uno depende de la función analizada (62).

Por otra parte, hemos comprobado que el ADN bacteriano tiene la capacidad de unirse a la superficie de los neutrófilos con una cinética saturable. Hallazgos adicionales de nuestro grupo sugieren que el ADN bacteriano activa a los neutrófilos a través de una vía que no involucra al TLR9 endosomal. Esta afirmación está sustentada en experimentos que demostraron que el ADN bacteriano inmovilizado en placas de polipropileno, conserva su capacidad de inducir la activación de los neutrófilos, indicando que no se requiere la internalización del ADN para gatillar la activación (62). Además, tanto la cloroquina (inhibidor de la acidificación del endosoma) como la wortmanina (inhibidor específico de la PI3K que impide la colocalización del ADN con el TLR9), dos compuestos con reconocida capacidad de impedir la activación celular mediada por ADN-CpG (62, 84-87), no inhibieron la activación del neutrófilo inducida por ADN bacteriano. Por otra parte, recientemente, comprobamos que el ADN bacteriano tiene la capacidad de inducir la activación de los neutrófilos provenientes de ratones deficientes en TLR9 de un modo similar a la observada en neutrófilos de ratones salvajes (88). En conjunto estos hallazgos sugieren que, a través de una molécula de la superficie celular, los neutrófilos podrían reconocer ADN extracelular presente en microambientes bacterianos y activarse en consecuencia.

6. Moléculas de la superficie celular involucradas en la unión a ADN

Debido a la localización endosómica del TLR9 se asume que, ante una infección bacteriana, las células se enfrentarían al ADN microbiano una vez que el microorganismo ha sido endocitado y parcialmente digerido. Sin embargo, los hallazgos realizados hasta el presente no han podido establecer de qué manera el ADN bacteriano u ODN sintéticos adicionados a células en cultivo o empleados *in vivo* como agentes inmunoestimuladores, son dirigidos al compartimiento endosómico (43). En este sentido, diversos trabajos demostraron que la incorporación de ODN a las células, ocurre con una cinética saturable, dependiente de la temperatura y de la concentración, compatible con un mecanismo de endocitosis mediado por receptor (89-91). La característica más destacada de este receptor parecería ser la carencia de especificidad en la secuencia de nucleótidos del oligómero (43).

A pesar de que en los últimos veinte años se ha reportado la existencia de diversas proteínas con capacidad de unir ADN, con escasas excepciones, la identidad de estas moléculas no ha sido dilucidada. Por ejemplo, en la línea celular mieloide HL-60, se describió la existencia de una proteína membrana de 80 kDa con capacidad de unir ODN (92) y en leucocitos de sangre periférica la de otra proteína de 30 kDa con capacidad de unir ADN de alto peso molecular (93). También en la línea de fibroblastos de ratón L929 se encontraron dos proteínas de unión a ODN de 79 y 90 kDa (91) y en las células K562 se reportaron cinco proteínas de unión a ODN con pesos moleculares que oscilaron en 137-147 kDa, 79-85 kDa, 43-46 kDa, 29-32 kDa y 20-22 kDa (89). Sin embargo, ninguno de estos estudios logró una completa identificación del receptor para ADN. Trabajos más recientes también adjudicaron la capacidad de unir ácidos nucleicos a la integrina Mac-1 (CD11b/CD18) y al receptor scavenger del macrófago (SRA) (94-97). Sin embargo, estudios realizados con animales SRA-knockout y células CHO transfectadas con el SRA, demostraron que este receptor no está involucrado en la unión a ADN plasmídico ni a ODN (98-99). Los estudios previos realizados por nuestro grupo, sugieren que la integrina Mac-1 no se encuentra involucrada en el reconocimiento de ADN por neutrófilos humanos ya que la activación por ADN de *E. coli* no se vio inhibida por fibrinógeno soluble ni por concentraciones saturantes de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD18 (62). Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de que el ADN se una a un dominio de Mac-1 no involucrado en la unión a fibrinógeno o no bloqueado por el anticuerpo específico, o que tenga más afinidad por el receptor que los competidores empleados.

7. Presencia de ADN bacteriano extracelular en microambientes inflamatorios

Numerosos trabajos han documentado la presencia de ADN extracelular en virtualmente todos los ambientes habitados por bacterias (100-105). Las bacterias naturalmente transformables liberan ADN cromosómico al medio de cultivo (102, 106-109). Se ha propuesto que además de ser un sustrato para la transformación genética, el ADN bacteriano liberado podría servir en mecanismos de reparación del ADN y eventualmente como fuente de nutrientes durante situaciones de competencia nutricional. De hecho, trabajos previos han demostrado que cepas de *E. coli* que consumen ADN son más aptas que las mutantes incapaces de metabolizarlo (102).

Por otra parte, el ADN extracelular bacteriano juega un rol importante en la formación y composición de los biofilms, que son comunidades estructuradas de bacterias inmersas en una matriz polimérica hidratada adheridas a una superficie viva o inerte (110-111). La importancia de estas comunidades es claramente ilustrada por observaciones que sugieren que más del 60% de las infecciones bacterianas parecen involucrarlas (112).

Estudios realizados con la cepa PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria extensamente empleada como modelo de formación de biofilm, indicaron que el ADN extracelular presente en la matriz de los biofilms representa su componente principal, tiene la misma secuencia primaria y es 50% más abundante que el ADN intracelular. La presencia de ADN extracelular formando parte de la matriz no se restringe a biofilms formados por esta cepa de referencia, dado que también se halló abundante cantidad de ADN extracelular en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (111, 113-115). Se ha demostrado que el ADN extracelular juega también un rol durante la formación de biofilms en *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (110, 116-118), y ha sido propuesto como un componente importante de los biofilms formados por *Streptococcus pneumoniae* (119), así como también en biofilms no saturados de múltiples especies (108). Resulta importante destacar que se han encontrado cantidades significativas de ADN doble cadena en biofilms formados *in vivo* por *Haemophilus influenzae* (120).

8. Biofilms bacterianos

A mediados del siglo pasado, Claude Zobell y otros investigadores notaron que las bacterias acuáticas eran más numerosas sobre superficies sólidas en contenedores que como células individuales en suspensión. En base a estas observaciones se concluyó que las bacterias prefieren un estilo de vida comunitario asociado a superficies a una existencia nómada (121). Hoy sabemos que ese estilo de vida en comunidad conocido como biofilm, representa un modo de crecimiento de resistencia que permite a las bacterias sobrevivir en ambientes hostiles y también dispersarse y colonizar nuevos nichos (121-122).

Los biofilms han sido descritos como comunidades microbianas adheridas a superficies bióticas o abióticas. Sin embargo, ellos no son simplemente un ensamblaje de células adheridas a una superficie, sino que son sistemas biológicos estructural y dinámicamente complejos donde abunda la comunicación química célula-célula (123). Las bacterias, por sí mismas, comprenden una fracción variable del volumen del biofilm (generalmente entre el 5 y el 35%). El resto del volumen está compuesto por una matriz extracelular formada por un complejo polianiónico hidratado compuesto por exopolisacáridos de origen bacteriano, ADN y proteínas (111, 123).

Observaciones *in situ* de la estructura de los biofilms empleando microscopía laser confocal (MLC) mostraron bacterias sésiles creciendo en microcolonias heterogéneas inmersas en una matriz, surcadas por canales abiertos por el que circula fluido (figura 3). Esta arquitectura compleja fue uno de los primeros indicadores de que el desarrollo de los biofilms no es simple ni uniforme, sino más bien complejo y diferenciado. La capacidad de los canales de facilitar la eficiente provisión de nutrientes y eliminación de desechos, proporcionó el primer vínculo entre estructura y función (121).

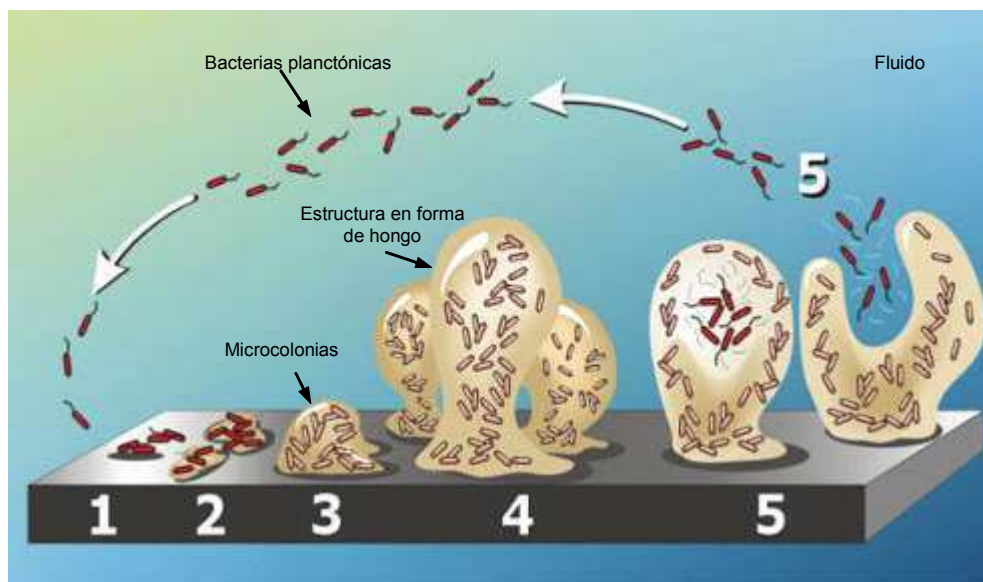


Figura 3: Etapas del ciclo de vida del biofilm. 1: células individuales colonizan la superficie. 2: se producen sustancias poliméricas extracelulares y la adhesión se torna irreversible. 3 y 4: se desarrolla la arquitectura del biofilm y madura. 5: células individuales son liberadas del biofilm, las cuales pueden colonizar nuevos nichos.

Recientemente, utilizando *P. aeruginosa* como modelo, se ha comprobado que la formación de los biofilms ocurre como una secuencia regulada de desarrollo que puede dividirse en cinco etapas (figura 3). Las dos primeras etapas están caracterizadas por una asociación transitoria con la superficie seguida por una adhesión robusta. Las etapas 3 y 4 involucran la agregación de las células en microcolonias y su posterior crecimiento y maduración, adquiriendo una estructura plana o una con forma de hongos dependiendo de la fuente de nutrientes disponible. Finalmente, la quinta etapa se caracteriza por la recuperación de la movilidad transitoria de parte de las células que integran el biofilm, las cuales son liberadas para colonizar nuevos nichos (121).

¿Qué ventaja adaptativa presenta la formación de biofilms que lo hace un fenómeno tan extendido en la naturaleza? En primer lugar, las superficies proveen cierto grado de estabilidad en el medio y pueden presentar funciones catalíticas al localizar a las células próximas unas de otras. Por otra parte, la formación de biofilms provee protección frente a múltiples desafíos ambientales como la exposición a rayos UV, la toxicidad por metales, la deshidratación y la salinidad, la fagocitosis, los antibióticos y los agentes antimicrobianos (121). Finalmente, la matriz extracelular podría ayudar a captar y concentrar minerales esenciales y nutrientes del medio circundante (123).

9. Biofilms en enfermedades infecciosas

Además de estar presentes en ambientes acuáticos naturales, los biofilms son cruciales en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas crónicas subagudas, como infecciones por *Pseudomonas* en los pulmones de pacientes con Fibrosis Quística (FQ), en los cálculos renales infecciosos, en endocarditis bacterianas, así como también en infecciones en dispositivos médicos (124). Recientemente, se ha comprobado que los biofilms también están involucrados en las infecciones crónicas de quemaduras (125). Las infecciones mediadas por biofilms comprometen la calidad de vida y pueden estar asociadas a una mayor mortalidad (123).

La importancia de estas comunidades es ilustrada claramente por observaciones que sugieren que los biofilms están presentes en más del 60% de todas

las infecciones bacterianas (112). Sin embargo, el impacto de los biofilms en enfermedades infecciosas puede aún estar siendo subestimado debido a la dificultad para diagnosticar su presencia como resultado de la diversidad de microorganismos involucrados y de los distintos nichos que pueden infectar en el huésped. En este sentido Parsek y Singh propusieron el siguiente criterio para definir a las infecciones causadas por biofilms (122, 124):

1) Las bacterias patogénicas están asociadas a una superficie o formando agregados.

2) La examinación directa del tejido infectado indica la presencia de agregados bacterianos o microcolonias, recubiertos por una matriz que puede ser de origen microbiano o del huésped.

3) La infección se encuentra confinada a localizaciones particulares del huésped.

4) La infección es resistente al tratamiento con antibióticos a pesar de haberse demostrado la susceptibilidad de las bacterias en su estado planctónico.

Los biofilms son difíciles de erradicar porque son resistentes a biocidas, antibióticos y a la respuesta inmune innata del huésped. Particularmente, las bacterias asociadas a los biofilms exhiben un tipo de tolerancia a antibióticos que es distinta a la resistencia a antibióticos convencional ya que no es debida a mecanismos genéticos básicos (mutación génica o transferencia horizontal) sino que está determinada por este modo particular de crecimiento (121, 123-124). Es por estos motivos, que las estrategias tradicionales de combate frente a infecciones bacterianas resultan ineficientes cuando éstas son mediadas por biofilms. Actualmente se están evaluando diversas estrategias terapéuticas alternativas que incluyen: moléculas que afecten la comunicación célula-célula (*quorum-sensing*), sustancias que despolimericen la matriz extracelular, tratamientos empleando bacteriófagos, métodos físicos y el empleo de combinaciones de antibióticos que sean eficientes frente a esta forma de crecimiento bacteriano (123).

10. Respuesta inmune frente a biofilms

Los biofilms, además de ser poco susceptibles a los antibióticos, exhiben resistencia a los mecanismos de defensa del huésped. Las primeras evidencias de

esta resistencia proviene de especímenes clínicos analizados por microscopía electrónica en los que se observaron que los fagocitos y los anticuerpos del huésped rodean al biofilm pero no logran penetrarlo (126). Estudios más recientes, indicaron que los leucocitos penetran en los canales, pero logran un escaso acceso a las bacterias que están inmersas en la matriz de exopolisacáridos en biofilms de *S. aureus*. Asimismo, los leucocitos mostraron una morfología compatible con la de células no estimuladas y escasa movilidad y fagocitosis (127). Por otra parte, se observó que los neutrófilos en contacto con biofilms de *P. aeruginosa* quedan inmovilizados en la matriz extracelular y, aunque existe fagocitosis de las bacterias, los neutrófilos muestran una capacidad disminuida para generar intermediarios reactivos del oxígeno (128). A su vez, el alginato (exopolisacárido de la matriz), protegió a los biofilms de *P. aeruginosa* de la fagocitosis por macrófagos activados por INF- γ (129). Es interesante notar que la presencia de neutrófilos no solo resulta ineficiente para eliminar los biofilms de *P. aeruginosa* sino que además puede incrementar su desarrollo. De hecho, estudios realizados por Walker y colaboradores demostraron que la presencia de neutrófilos potencia la formación de biofilms a través de un mecanismo que involucra la participación del ADN celular y de filamentos de actina liberados de los neutrófilos que mueren por necrosis, los cuales favorecen la unión y la cohesión de la matriz (130).

Recientemente se ha demostrado en *E. coli* que el antígeno 43, una proteína que media la agregación bacteriana, favorece la fagocitosis por los neutrófilos pero las bacterias internalizadas se mantienen viables por largos períodos de tiempo (131). Por otra parte, Jensen y colaboradores han comprobado que *P. aeruginosa* produce una sustancia que mata a los neutrófilos, llamada rhamnolípido B, sugiriendo la existencia de mecanismos activos de evasión del sistema inmune (132).

La respuesta inmune adaptativa frente a biofilms también resulta ser poco eficiente. En particular se ha comprobado que las IgG se unen a la periferia de las microcolonias, tienen baja capacidad para penetrar la matriz de exopolisacáridos y fallan en inducir la fagocitosis mediada por opsoninas y la muerte de las células del biofilm (133-134). Sin embargo, se ha demostrado que algunos anticuerpos que interfieren con la adhesión de las bacterias a las superficies logran inhibir la formación de los biofilms, sugiriendo que la respuesta mediada por anticuerpos podría jugar un rol en prevenir su establecimiento y desarrollo (135).

11. Infecciones mediadas por biofilms de *P. aeruginosa*

Considerando el papel crítico que juegan los biofilms en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas bacterianas, trabajos previos han caracterizado la interacción neutrófilo-biofilm y se han enfocado en la acción ejercida por señales de *quorum-sensing* y por la matriz de exopolisacáridos en la función de los neutrófilos (128, 136-137). Sin embargo, ningún trabajo previo de nuestro conocimiento ha analizado si el ADN bacteriano extracelular, además de tener un rol en la formación y composición de los biofilms, juega también un papel en la modulación de la respuesta inmune mediada por los neutrófilos.

En la presente tesis empleamos a *P. aeruginosa* como organismo modelo de la formación de biofilms bacterianos para estudiar el impacto del ADN extracelular en la respuesta anti-microbiana mediada por neutrófilos. La elección de *P. aeruginosa* se basó, en primer lugar, en el vasto conocimiento disponible sobre el crecimiento, la estructura, la fisiología de los biofilms de esta especie; en la disponibilidad de herramientas para su estudio; y en el conocimiento sobre la presencia, abundancia y distribución del ADN extracelular en los mismos. Por otra parte, *P. aeruginosa* es una especie bacteriana de gran relevancia clínica por ser un importante agente infeccioso causante de variadas infecciones agudas y crónicas, incluyendo infecciones en quemaduras así como también infecciones en las vías respiratorias, urinarias, en ojos y oídos (138).

Esta especie bacteriana, está bien adaptada a los ambientes hospitalarios debido a su versatilidad nutricional, mínimos requerimientos para su crecimiento y la extensa adquisición de resistencia a antibióticos (128). Por estos motivos, *P. aeruginosa* es causante de un importante número de infecciones intrahospitalarias al afectar catéteres empleados en diálisis peritoneales y en el tracto urinario. A su vez, las infecciones pulmonares crónicas de *P. aeruginosa* son responsables de la alta morbilidad y mortalidad que afectan a la gran mayoría de los pacientes con fibrosis quística (FQ) (139). Una característica común de las infecciones mediadas por *P. aeruginosa* es que son causadas por la asociación de bacterias con superficies, ya sea tejidos vivos o implantes, y por ende pueden ser consideradas como enfermedades asociadas a biofilms (140).

La FQ es la enfermedad hereditaria fatal más común en la población caucásica, afectando a 1 de cada 2500 nacimientos. La FQ es causada por mutaciones recesivas en el gen CFTR que codifica para un canal de cloro transmembrana expresado en el epitelio de múltiples órganos. Los pacientes con esta patología desarrollan una enfermedad multiorgánica que afecta principalmente a los pulmones dando lugar a una falla respiratoria que conduce a la muerte (141). La enfermedad pulmonar en estos pacientes se debe a infecciones recurrentes que resultan en una inflamación crónica, presencia de un moco espeso en las vías respiratorias, bronquiectasia y neumonía. Las recurrentes inflamaciones exacerbadas en los pulmones son la causa de las hospitalizaciones frecuentes y de la declinación en la función pulmonar que conduce, en última instancia, a la falla respiratoria (141).

Durante la infancia estos pacientes se infectan principalmente con *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae*, pero en pacientes de mayor edad la infección predominante es mediada por *P. aeruginosa* (141). Las infecciones con estos patógenos producen un infiltrado de neutrófilos que, en huéspedes no comprometidos eliminarían la infección. Sin embargo, en los pacientes con FQ, la falla para erradicar de la infección conduce a un infiltrado persistente de neutrófilos que lleva a la bronquiectasia y la fibrosis (141).

P. aeruginosa posee una enorme flexibilidad genética y metabólica que le permite adaptarse al entorno y persistir dentro de las vías respiratorias de pacientes con FQ. Los genotipos y fenotipos de las cepas presentes en estadios tardíos de la enfermedad difieren sustancialmente de aquellos que inicialmente colonizan los pulmones (142). De hecho, la conversión de *P. aeruginosa* de un fenotipo no mucoide a uno mucoide, caracterizado por una sobreproducción del exopolisacárido alginato, marca la transición a un estadio más persistente, caracterizado por resistencia a antibióticos y una declinación pulmonar acelerada (143-145). Un tratamiento exitoso para pacientes con FQ requerirá cortar el ciclo de infecciones recurrentes, evitar la formación de biofilms o favorecer la eliminación de aquellos que estén establecidos, y reducir la inflamación y reclutamiento excesivo de neutrófilos a las vías respiratorias.

12. Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis fueron:

1. Determinar el impacto del ADN extracelular de los biofilms de *P. aeruginosa* en la respuesta proinflamatoria mediada por los neutrófilos.
2. Identificar al receptor de los neutrófilos responsable de la unión al ADN bacteriano extracelular y de la activación ejercida por este agonista.

Objetivos particulares:

- 1.1. Determinar la capacidad del ADN de la matriz extracelular de biofilms formados por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* de referencia PAO-1, de inducir: (1) la secreción de citoquinas proinflamatorias por neutrófilos; (2) su degranulación; (3) la fagocitosis de bacterias; (4) el estallido respiratorio; y (5) la liberación de NETs.
- 1.2. Determinar la capacidad del ADN presente en la matriz extracelular de biofilms formados por cepas con fenotipo mucóide aisladas de pacientes con fibrosis quística que padecen infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa*, de inducir la activación de los neutrófilos.
- 2.1. Completar la caracterización de la unión del ADN bacteriano a los neutrófilos.
- 2.2. Identificar una secuencia en el ADN con mayor capacidad de unirse y activar a los neutrófilos.
- 2.3. Establecer condiciones óptimas para el aislamiento de proteínas de la superficie del neutrófilo con capacidad de unir ADN.
- 2.4. Identificar por MALDI-TOF las proteínas del neutrófilo con capacidad de unir ADN.
- 2.5. Evaluar a las proteínas identificadas por MALDI-TOF como posibles receptores.

Materiales y métodos

*“El mundo no progresaría si
después de cada falta nos
pusiéramos a llorar sin fin”*

Cicerón, Marco Tulio

Los estudios llevados a cabo en este trabajo han sido evaluados y aprobados por los comités de ética y de docencia institucionales.

Purificación de neutrófilos humanos

Las muestras de sangre fueron obtenidas de dadores sanos, o de un donante deficiente en la molécula CD18 (LAD1), mediante punción de la vena del antebrazo. Los neutrófilos fueron aislados a partir de sangre humana heparinizada mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll Pharmacia, Suecia; Hypaque, Winthrop Products, Argentina) y sedimentación en dextrán de acuerdo a lo previamente descrito (88). Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica. Luego de un lavado con solución fisiológica, las células (>97% de neutrófilos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas en medio completo: RPMI 1640 sin rojo fenol (HyClone Laboratories Inc; EEUU) suplementado con 5 mg/ml de albúmina sérica humana libre de endotoxinas (Laboratorio de Hemoderivados; Argentina).

Todas las preparaciones de neutrófilos fueron analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que sus parámetros FSC/SSC fueran compatibles con los de células no activadas. Con el fin de minimizar la activación espontánea de los neutrófilos, las células fueron utilizadas inmediatamente luego de la purificación. Todos los materiales empleados fueron estériles y libres de endotoxinas.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* como organismo modelo de formación de biofilms. Las cepas PAO-1 (salvaje) y PAO-JP2 (*lasI rhII* doble mutante) fueron gentilmente provistas por la profesora Bárbara Iglewski (Departamento de Microbiología e Inmunología, University of Rochester, USA); y las cepas PAO-1 expresando CFP o GFP fueron provistas por el profesor Tim Tolker-Nielsen (Centro para la Biociencia y la Tecnología, Technical University of Denmark, Dinamarca). Las bacterias fueron cultivadas rutinariamente a 37°C en medio de Luria-Bertani (LB) o LB agar. Para el desarrollo de biofilms, las bacterias fueron crecidas en medio LB a 37°C durante 18 hs

(densidad óptica a 600 nm ≈ 1), y luego un inóculo de dicho cultivo fue diluido 1:1000 en medio mínimo AB suplementado con 10 mM de glucosa. Las bacterias así suspendidas fueron sembradas en placas de cultivo de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Greiner; Alemania) o en cámaras con base de borosilicato de 170 μm (Lab-Tek Nunc, Dinamarca) para estudios de MLC, y cultivadas durante 48 hs a 37°C. El medio fue reemplazado por medio fresco luego de 24 hs de cultivo.

Ácidos nucleicos empleados

En los experimentos realizados en esta tesis se empleó ADN genómico de *E. coli* adquirido a Worthington (EEUU); ADN de placenta humana, poli-deoxiadenosina-timidina, poli-deoxiguanosina-citosina, ácido poliadenílico y ARNt de levaduras adquiridos a Sigma-Aldrich (EEUU). Los oligonucleótidos indicados en la tabla 2 fueron sintetizados por IDT-DNA (EEUU). También se empleó ADN genómico de *P. aeruginosa* y el plásmido Bluescript II KS+.

El ADN genómico de *P. aeruginosa* se obtuvo mediante purificación con CTAB a partir de la cepa PAO-1 de acuerdo a protocolos previamente descritos (146). El plásmido Bluescript II KS+ se obtuvo a partir de la cepa de *E. coli* DH5 α empleando el kit de Maxi Prep de Qiagen (Alemania). Para los ensayos de activación de neutrófilos, los ADN obtenidos a partir de bacterias fueron purificados por pasaje a través de columna de polimixina B-agarosa (Sigma-Aldrich; EEUU) para eliminar las trazas de endotoxinas contaminantes de la preparación.

Biotinilación del ADN

La biotinilación de los ADN se realizó utilizando el reactivo *Photoprobe (long arm) biotin* adquirido en Vector Laboratories (EEUU) de acuerdo a indicaciones del fabricante. En el caso del ADN de *E. coli* (0,8 mg/ml) éste fue incubado con el reactivo photoprobe long arm (0,2 mg/ml) durante 30 minutos en bloque térmico a 95° C. Por otra parte, la biotinilación del plásmido Bluescript II KS+ y la del ADN genómico de la cepa PAO-1 de *P. aeruginosa* fue realizada mediante irradiación de las muestras ubicadas a 2 cm de una lámpara de mercurio de 365 nm en baño de hielo. En todos

los casos, luego de la reacción, el exceso de reactivo de biotilación fue eliminado mediante dos extracciones sucesivas con un volumen de 2-butanol, previo incremento en el pH de la fase acuosa a 9,5 para favorecer la extracción. Finalmente el ADN biotilado fue precipitado con ¼ de volumen de acetato de amonio 10 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. El pellet fue lavado con etanol 70% y resuspendido en agua destilada.

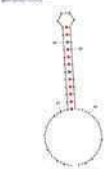
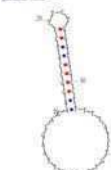
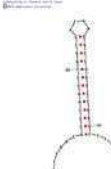
Nombre	Secuencia	Características
Caja -10 A	AACTATAATGCC TATAAT TAC	Caja -10 de promotores bacteriano (antisense)
Caja -10 S	GTAATTATAGGCATTATAGTT	Caja -10 de promotores bacteriano (sense)
Caja -35 A	AATTG TTGAC ACCTGGT TTGACA TTA	Caja -35 de promotores bacteriano (antisense)
Caja -35 S	TAATGTCAACACCAGGTGTCAACAATT	Caja -35 de promotores bacteriano (sense)
S-D S	TA AGGAGG ATGTA AGGAGG AT	Secuencia de Shine-Dalgarno (sense)
S-D A	CATCCTCCTTACATCCTCCTT	Secuencia de Shine-Dalgarno (antisense)
Rho 1	AATATTTTAGAGGCCAGGCTGGGAAACCAGCCTGGC CTTTTTTATTGGT	Terminador rho indep. con stem de 12 pb 
Rho 2	ATTAAGCAGAAGGCCATCCTTCTGGATGGCCTTTTTA TCTGTTC	Terminador rho indep. con stem de 10 pb 
Rho 3	AATATTTTAGCGCCAGCCTGGCCGTAAGGCCAGGC TGGGCTTTTTTATTAAG	Terminador rho indep. con stem de 13 pb 
F6	TCGTCG TTTTGT CG TTTTGT CG TT	ODN CpG
F6K	TGCTGC TTTTGT GC TTTTGT GC TT	ODN GpC

Tabla 2: Oligonucleótidos adquiridos a IDT-DNA. En todos los casos las uniones son fosfodiéster. Las secuencias de interés están resaltadas en rojo.

Ensayo de unión del ADN biotinilado a la superficie de neutrófilos humanos

Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados con las concentraciones indicadas de ADN de *E. coli* biotinilado (ADN-biot), el ADN biotinilado de la cepa PAO-1 o el plásmido Bluescript II KS+ biotinilado en PBS con SAH (5 mg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Luego fueron lavados con solución fisiológica fría e incubados durante 10 minutos adicionales con avidina-FITC (10 µg/ml) en PBS con SAH (5 mg/ml) a 4°C. Luego, las células fueron lavadas con PBS frío, fijadas en frío con paraformaldehído 0,25% y la fluorescencia determinada mediante citometría de flujo o MLC.

Producción de IL-8 en respuesta al ADN bacteriano y otros agonistas

Los neutrófilos resuspendidos en medio completo (5×10^6 / ml) fueron incubados en placas de 96-pocillos durante 3 horas a 37°C bajo una atmósfera compuesta por 5% de CO₂ y 95% aire húmedo, en presencia de la preparación de ADN de *E. coli*, de *P. aeruginosa* (soluble o inmovilizado a la placa), el plásmido Bluescript II KS+, poli(dA-dT)*poli(dT-dA), poli(dG-dC)*poli(dC-dG), los oligonucleótidos indicados, Pam3CSK4 (Invivogen; EEUU), FMLP, LPS o PMA (Sigma-Aldrich; EEUU). En el caso de la evaluación de la respuesta al LPS se empleó medio con suero fetal bovino al 10%. Luego los sobrenadantes fueron colectados y la concentración de IL-8 liberada al medio determinada a través de un ensayo de ELISA de captura standard, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D; EEUU).

Microscopía Laser Confocal

Se utilizó un microscopio laser confocal Carl Zeiss LSM510- Axiovert 100M equipado con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Neofluar 100 x/1.3, un objetivo C-Apochromat 63x/1.2 W corr y un objetivo C-Apochromat 40x/1.2 W corr. Algunas imágenes fueron adquiridas utilizando el MLC Fluo View FV1000 (Olympus; Japón) equipado con un objetivo de inmersión en aceite Plapon 60X/1.42. Los biofilms y su interacción con los neutrófilos fue observada en cámaras con base de borosilicato. Las imágenes de diferentes colores fueron adquiridas mediante un escaneo secuencial con condiciones óptimas para GFP, FITC o 123-rodamina: excitación a 488 nm con línea

de láser de argón y detección de la luz emitida con un filtro de emisión pasa altos de 505 nm o con un filtro de emisión pasa banda de 505-530 nm cuando fue combinado con ficoeritrina; CFP: excitación a 488 nm y detección de la luz emitida entre 475 y 525 nm; SYTO9: excitación a 488nm y detección de la luz emitida entre 505 y 530 nm; IP: excitación a 543 nm con laser HeNe y detección de la luz emitida con filtro pasa altos de 560 nm; ficoeritrina: excitación a 488 nm y detección de la luz emitida con filtro pasa altos de 560 nm. Las imágenes fueron adquiridas escaneando diferentes secciones ópticas y las imágenes tridimensionales fueron reconstruidas utilizando el programa Zeiss LSM Image Browser versión 4.0.0.157 o el programa de Olympus FV10-ASW. El análisis cuantitativo de las secciones ópticas se realizó con el programa ImageJ (NIH; EEUU).

Tratamiento de los biofilms con DNasa I

Con el fin de remover las bacterias no adheridas, los biofilms de 2 días fueron suavemente lavados, primero con NaCl 0,9%, y luego con medio RPMI 1640 sin rojo fenol. Los biofilms en RPMI 1640 fueron incubados en presencia de 90 Kunitz unidades de DNasa I (Invitrogen; EEUU) por ml, DNasa inactivada por calor, o medio (vehículo) durante 60 min a 37°C (figura 4). Finalmente, fueron lavados dos veces con RPMI 1640, excepto indicación contraria. La biomasa de los biofilms, luego del tratamiento con DNasa, fue cuantificada por tinción con cristal violeta (0,1% peso/volumen) de acuerdo a lo previamente descrito (100). La viabilidad de las bacterias, luego del tratamiento con DNasa I, fue evaluada en biofilms de la cepa PAO-1 crecidos en cámaras de borosilicato empleando el kit de viabilidad LIVE/DEAD Bac Light (Invitrogen; EEUU) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La estructura de los biofilms y su contenido de ADN extracelular, luego del tratamiento con DNasa I, fueron monitoreados en biofilms de la cepa PAO-1 expresando CFP cultivados en cámara de base de borosilicato. El exopolisacárido fue revelado con concanavalina A-FITC (5 µg/ml) y el ADN con IP (3 µM; Sigma). Las imágenes de MLC fueron adquiridas como se mencionó arriba.

Medición de la producción de citoquinas por los neutrófilos en respuesta a biofilms

Los neutrófilos ($100 \mu\text{l}$, $2 \times 10^6/\text{ml}$) resuspendidos en medio completo fueron sembrados por goteo en el centro de pocillos conteniendo biofilms de las cepas PAO-1, JP2, F1432 o 1208, tratados o no con DNasa I, y fueron co-cultivados durante 3 hs a 37°C . Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y en ellos se determinó la concentración de IL-8 (R&D; EEUU) e IL-1 β (eBioscience; EEUU) mediante ELISA (figura 4).

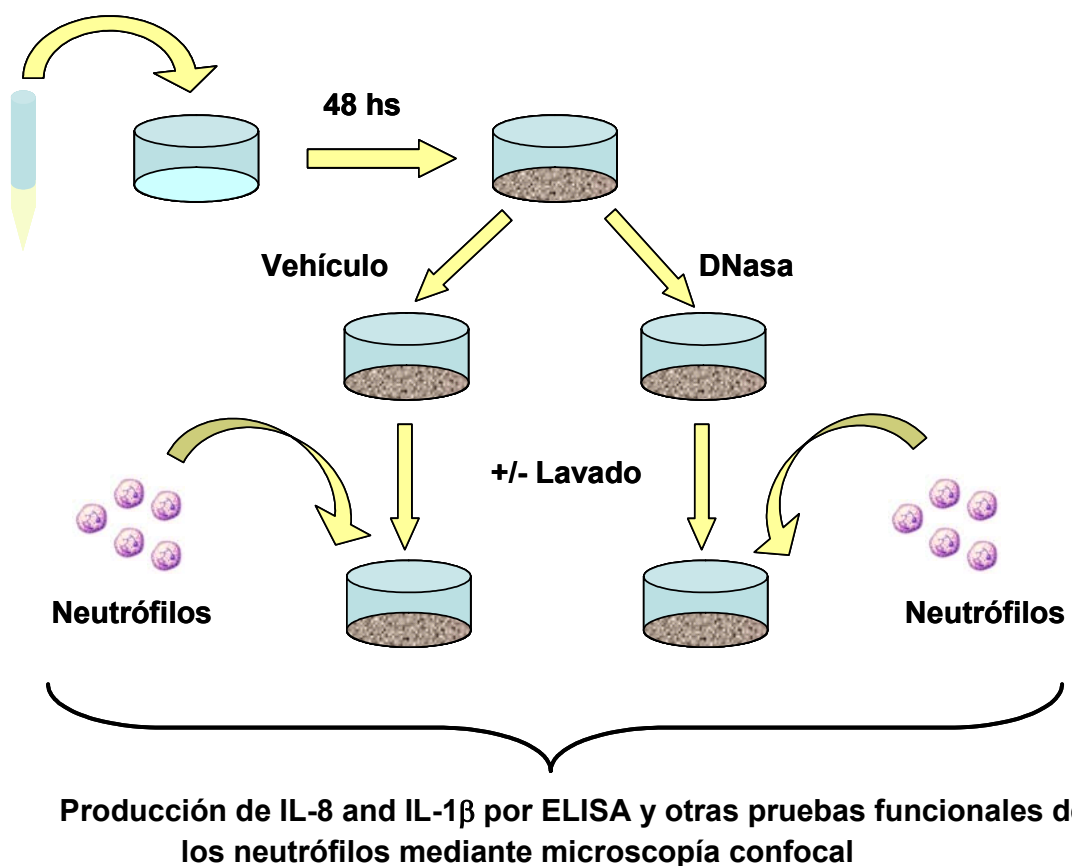


Figura 4: Esquema del protocolo experimental indicando el tratamiento al que fueron sometidos los biofilms con DNasa I y su co-cultivo con neutrófilos humanos.

En algunos experimentos, células planctónicas de la cepa PAO-1 correspondientes a cultivos en fase media de crecimiento exponencial, crecidas en medio mínimo AB suplementado con glucosa 10 mM y agitación continua, fueron

incubadas en presencia de 90 Kunitz unidades de DNasa I (Invitrogen) por ml o medio (vehículo) durante 60 min a 37°C. Luego, las bacterias fueron lavadas dos veces y co-cultivadas con los neutrófilos (100 μ l, 2×10^6 /ml) resuspendidos en medio completo, durante 3 hs a 37°C. Finalmente, los co-cultivos fueron centrifugados, los sobrenadantes fueron recolectados y en ellos se determinó la concentración de IL-8 e IL-1 β .

Expresión de marcadores de superficie en neutrófilos co-cultivados con biofilms

Se sembraron neutrófilos (300 μ l, 2×10^6 /ml), resuspendidos en medio completo, en el centro de biofilms crecidos en cámaras de base de borosilicato formados por las cepas PAO-1 expresando GFP o CFP tratados o no con DNasa I y se incubaron durante 40 min a 37°C. Posteriormente, se removió cuidadosamente el sobrenadante y los neutrófilos asentados sobre el biofilm fueron teñidos con anti-CD18-FITC (BD Pharmingen; EEUU), anti-CD11b-PE (immunotech; Francia) o anti-CD66b-FITC (BD Pharmingen; EEUU) por 20 min a 4°C. Luego de un lavado suave, se agregó IP (3 μ M) para visualizar el ADN extracelular en los casos indicados e inmediatamente se obtuvieron imágenes mediante MLC.

Inmovilización de MPO al biofilm

Se sembraron neutrófilos (300 μ l, 2×10^6 /ml) resuspendidos en medio completo en el centro de biofilms crecidos en cámaras de base de borosilicato formados por la cepa PAO-1 expresando CFP y se incubaron durante 60 min a 28°C. Posteriormente, se removió cuidadosamente el sobrenadante, y se tiñeron los biofilms con anti-MPO conjugada a FITC (immunotech; Francia) por 20 min a 4°C. Luego de un lavado suave, se agregó IP (3 μ M) para visualizar el ADN extracelular e inmediatamente se obtuvieron imágenes mediante MLC.

Alternativamente, se evaluó la adherencia de la MPO a ADN inmovilizado a placas de 96 pocillos y se cuantificó la actividad enzimática empleando el sustrato TMB (eBioscience; EEUU).

Fagocitosis

Se sembraron neutrófilos (300 μ l, 2×10^6 /ml), resuspendidos en medio completo, en el centro de biofilms crecidos en cámaras de base de borosilicato formados por la cepa PAO-1 expresando GFP tratados o no con DNasa I y se incubaron durante 40 min a 37°C. Las membranas de los neutrófilos fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD11b conjugado a PE por 20 min a 4°C. Luego, se fijaron las células con paraformaldehído 4%, y se evaluó la fagocitosis en co-cultivos intactos mediante MLC determinando el número de bacterias dentro de cada neutrófilo en, al menos, 5 campos por tratamiento por donante.

En un conjunto diferente de experimentos, se incubaron a los co-cultivos de neutrófilos con biofilms de PAO-1 tratados o no con DNasa I con microesferas de poliestireno conjugadas a FITC por 40 min a 37°C, para evaluar la internalización de un sustrato inerte. La visualización se realizó del mismo modo al descrito para la fagocitosis de bacterias.

Monitoreo del estallido respiratorio

Los neutrófilos fueron incubados en medio completo con 10 μ M dihidrorodamina 123 (DHR 123, Invitrogen, EEUU) durante 15 min. Luego de dos lavados, fueron resuspendidos en medio completo y sembrados (300 μ l, 2×10^6 /ml) en el centro de biofilms crecidos en cámaras de base de borosilicato formados por la cepa PAO-1 tratados o no con DNasa I, e incubados durante 30 min a 28°C. Finalmente, se adquirieron imágenes mediante MLC como se mencionó anteriormente.

Evaluación de la liberación de NET

Se sembraron neutrófilos (300 μ l, 2×10^6 /ml), resuspendidos en medio completo, en el centro de biofilms crecidos en cámaras de base de borosilicato formados por la cepa PAO-1 tratados o no con DNasa I y se incubaron durante 150 min a 37°C. Posteriormente, 220 μ l de sobrenadante fueron removidos cuidadosamente y se agregó al co-cultivo un anticuerpo anti-nucleosoma hecho en

ratón o su correspondiente control de isotipo (BD Pharmingen; EEUU). Luego de una incubación de 20 min a 4°C, la unión del anticuerpo primario fue revelada con un anti-anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a FITC (BD Pharmingen; EEUU). Luego de remover cuidadosamente el sobrenadante para evitar la desintegración de las NET, se agregaron 200 µl de medio completo por goteo en el centro del pocillo y 3 µM de IP inmediatamente antes de adquirir las imágenes por MLC.

Con el fin de descartar la posibilidad de que, a pesar de los lavados, hubiera quedado DNasa I residual en el cultivo que fuese capaz de digerir las NET que se fueran formando, luego del co-cultivo de los neutrófilos con los biofilms pre-tratados o no con DNasa I, se removieron los sobrenadante y en ellos se evaluó la actividad de DNasa I. Para ello, los sobrenadantes no diluidos fueron incubados con 50 µg/ml de ADN de timo bovino por 150 min a 37°C y luego se analizaron los productos de reacción en un gel de agarosa 1%. En estos ensayos no se detectó una actividad de DNasa I significativa (datos no mostrados).

Tratamiento de los neutrófilos con proteinasa K

Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron tratados con 100 µg/ml de proteinasa K (Promega; en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Luego fueron lavados 3 veces con PBS con SAH (10 mg/ml) y posteriormente su capacidad de unir ADN y de producir IL-8 en respuesta al ADN de *E. coli* fue determinada como se describió previamente. Las células tratadas con esta enzima fueron también sometidas a inmunomarcación indirecta con un anticuerpo monoclonal anti-CD16 (molécula expresada en altas concentraciones por el neutrófilo y sensible a la digestión por esta proteasa).

Digestión del ADN de *E. coli*

El ADN de *E. coli* fue parcialmente digerido utilizando 2 unidades de DNasa RQ1 (Promega; EEUU) por cada mg de ADN. Los reactivos fueron incubados a 37°C por 0, 2, 5, 20, 80 y 1000 minutos y la DNasa fue inactivada por calentamiento a 95°C

durante 10 minutos. Los productos de reacción fueron luego dializados frente a solución fisiológica y EDTA 1mM durante 3 horas a temperatura ambiente y cuantificados evaluando la absorbancia a 260 nm. Los mismos fueron visualizados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 0,8% conteniendo 50 mM de NaOH (para los fragmentos obtenidos luego de 0, 2 o 5 min de digestión) y en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% conteniendo urea 7 M (para los fragmentos obtenidos luego de más de 20 min de degradación). Finalmente, el tamaño de los fragmentos fue determinado por comparación con marcadores de ADN de tamaño conocido analizando el perfil de concentración en cada calle en base a imágenes del gel analizadas con el programa ImageJ (NIH; EEUU). El rango de tamaño de las moléculas de ADN obtenidas en cada digestión se determinó excluyendo el 10% de la masa de fragmentos de mayor y menor peso molecular.

Identificación del fragmento del plásmido Bluescript II KS+ que se une a la superficie de los neutrófilos

Se digirieron 10 µg de plásmido Bluescript KS+ empleando 10 U de HpaII y/o 30 U de HinP1I (New England Biolabs; EEUU) en 50 µl buffer NEB1 durante 1 h a 37°C, y luego se inactivaron las enzimas mediante calentamiento por 20 min a 65°C. Posteriormente, se ligaron 5 pmoles de fragmentos con 25 pmoles adaptadores fosforilados con extremos compatibles con las enzimas empleadas, empleando 1 U de ligasa T4 e incubando durante 3 h a 20°C y posterior inactivación por calentamiento a 65°C durante 15 min. Luego, se amplificaron los productos de ligación por PCR empleando el primer ACAGGTGAATTCTGAGGCAAC complementario a los adaptadores, realizando 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, annealing a 56°C por 30 s y extensión a 72°C por 90 s de modo de no favorecer la amplificación de los fragmentos de menor tamaño.

Luego, se incubaron 10 µl de estos productos de PCR durante 30 min a 4°C en presencia de 3×10^5 neutrófilos que previamente habían sido incubados con 1 mg/ml de ARNt de levaduras a 4°C durante 5 min. Posteriormente, los neutrófilos fueron lavados dos veces con PBS, y el ADN unido fue eluído con NaCl 1M. El producto de elución fue amplificado por PCR y sometido a una segunda ronda de unión, elución y PCR. El producto de esta segunda ronda fue sometido a electroforesis en geles de agarosa

2%, la banda identificada fue eluída del gel y clonada en el vector pGEM-T (Invitrogen; EEUU) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Luego, se aislaron colonias de cada ensayo y se verificó por digestión con enzimas de restricción el tamaño de los fragmentos obtenidos, los cuales fueron luego secuenciados empleando el primer SP6 complementario al vector.

Purificación de membrana plasmática de neutrófilos

Se incubaron 5×10^8 neutrófilos en 20 ml de medio con SAH en presencia o ausencia de FMLP 5×10^{-9} M durante 15 min a 37°C. Luego, se resuspendieron en 10 ml de buffer de ruptura (100 mM KCl, 3 mM NaCl, 1 mM ATP, 3,5 mM MgCl₂, PMSF 1 mM, 10 mM de Piperazine N,N -bis(2 ethan-sulfonic acid, pH 7,2)). Se presurizaron las células en nitrógeno gaseoso durante 7 min a 380 psi en una bomba de nitrógeno. El cavitado fue recolectado gota a gota sobre EGTA de modo de alcanzar una concentración final de 1,5 mM. Los núcleos y las células intactas fueron precipitados por centrifugación a 400 g durante 15 min. El sobrenadante fue luego sembrado sobre un gradiente discontinuo de Percoll (preparado en buffer de ruptura + EGTA 1,5 mM) formado por dos capas: una de 20 ml de una densidad de 1,065 g/ml y otra de 2 ml de una densidad de 1,12 g/ml. Este gradiente fue centrifugado a 37.000 g durante 30 min a 4°C empleando el rotor Sorvall SS-34. Luego, se recolectaron las fracciones conteniendo membrana plasmática y vesículas secretorias de la interfase entre el buffer de siembra y la capa de Percoll de 1,065 g/ml de densidad, y la ubicada en la interfase entre las capas de 1,065 y 1,12 g/ml conteniendo los demás gránulos del neutrófilos. Estas fracciones fueron ultracentrifugadas a 150.000 g durante 90 min a 4°C empleando el rotor SW40Ti. Para evaluar la pureza de las fracciones se determinó la actividad de la mieloperoxidasa empleando el sustrato cromogénico TMB (eBioscience; EEUU) y la fosfatasa alcalina mediante el empleo de un kit comercial (Biosystems; Argentina). Los resultados obtenidos están detallados en la tabla 3.

	Fosfatasa alcalina (AU/h)	MPO (Abs 450 nm)	Fosfatasa/MPO
Fración de membrana	6,77	0,109	62,1
Fración de gránulos	0,1	2,469	0,04

Tabla 3: Evaluación de actividad de fosfatasa alcalina y MPO en las fracciones de membrana o de gránulos purificadas a partir de neutrófilos humanos.

Detección de proteínas con capacidad de unir ADN en la fracción de membrana de neutrófilos humanos

Estrategia 1:

En primer lugar, se biotinilaron fragmentos de ADN de *E coli* de 1-2 kb tal como se describió previamente. Luego, se inmovilizaron 50 µg del ADN-biot a 1 mg de perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina especialmente diseñadas para la unión de ADN de alto peso molecular (KilobaseBinder kit Dynabeads, Dynal, EEUU), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante.

Posteriormente, las perlas magnéticas fueron incubadas durante 20 minutos con 1 mg de la fracción de membrana de neutrófilos obtenida como se describió en el ítem anterior, en un volumen de 1 ml. La unión de naturaleza inespecífica entre las proteínas y el ADN unido a las perlas magnéticas fue reducida mediante una preincubación de la fracción de membrana con 0,5 mg de poliadenosina y 0,5 mg de ARN de transferencia de levaduras en buffer de ruptura con EDTA 2 mM. Luego, se provocó la disrupción de las membranas mediante agregado de Tritón X-100 a una concentración final del 0,5% durante 20 min a 4°C. A continuación, las perlas magnéticas (que mantenían unidas a las proteínas con capacidad de unir ADN-biot) fueron lavadas 3 veces con PBS, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM. El primer lavado contuvo, además, 0,5 mg/ml de poliadenosina, 0,5 mg/ml de ARNt de levaduras y tritón X-100 0,5%.

Las proteínas unidas al ADN-biot asociado a las perlas magnéticas fueron disociadas con NaCl 1 M y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE), los cuales fueron teñidos con plata. Las bandas correspondientes a las distintas proteínas fueron escindidas de los geles y enviadas al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI TOF de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA para su análisis por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF.

Estrategia 2:

En primer lugar, se unió el ADN biotinilado a las perlas magnéticas de acuerdo a lo descrito para la estrategia 1. Luego se incubaron las perlas magnéticas en presencia de 5×10^8 neutrófilos resuspendidos en 1 ml de buffer Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, 0,5 mg/ml de poliadenosina y 0,5 mg/ml de ARN de transferencia de levaduras, pH 8 durante 20 min a 4°C. Posteriormente se agregaron 9 ml de un buffer conteniendo Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, azul de metileno 20 μ M, pH 8 y la muestra fue incubada durante 30 min adicionales a 3 cm de una fuente de luz fluorescente para producir la unión covalente entre el ADN y las proteínas de la superficie de los neutrófilos. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 500 g durante 10 min, resuspendida en buffer de ruptura y cavitada por nitrógeno de acuerdo a lo descrito anteriormente. Nosotros preveíamos que este procedimiento dejaría perlas magnéticas unidas a ADN, el cual a su vez se encontraría asociado a las proteínas de unión a ADN que estarían inmersas en la membrana plasmática. Por tal motivo, las perlas con las membranas unidas al ADN fueron separadas magnéticamente y las membranas fueron solubilizadas por incubación en presencia de tritón X-100 1% durante 20 min a 4°C. Manteniendo a las perlas inmovilizadas al magneto, se realizaron 3 lavados exhaustivos con NaCl 1M y tritón X-100 1% para disociar las proteínas que no estuvieran unidas covalentemente al ADN unido a las perlas magnéticas. Luego, las mismas fueron lavadas 2 veces adicionales con PBS y posteriormente incubadas con 30 μ l de PBS conteniendo $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM y 200 U/ml de DNasa I (Invitrogen; EEUU) durante 30 min a 37°C para liberar las proteínas unidas covalentemente al ADN. Finalmente se analizaron las muestras empleando la misma metodología que en la estrategia 1.

Estrategia 3:

En primer lugar, se solubilizaron las membranas de los neutrófilos mediante incubación con NP-40 0,5%, deoxicolato de sodio 0,5%, EDTA 2 mM, PMSF 1mM y DTT 1 mM durante 30 min a 4°C. Luego se centrifugaron a 20.000 g durante 30 min. El sobrenadante fue incubado con poliadenosina 0,5 mg/ml y ARNt de levaduras 0,5 mg/ml durante 10 minutos a 4°C y, luego, se le adicionaron microesferas de agarosa conjugadas a estreptavidina (Pierce; EEUU) conteniendo al ADN

inmovilizado. La muestra fue incubada durante 2 hs a 4°C con agitación vaivén. Luego, las microesferas fueron lavadas 3 veces con PBS, NP-40 0,5%, EDTA 2mM, PMSF 1 mM y DTT 1 mM. El primero de los lavados contuvo, además, poliadenosina 0,5%. Finalmente las proteínas unidas fueron eluidas empleando NaCl 1M y analizadas por espectrometría de masas.

Análisis bioinformático

Las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas fueron analizadas empleando programas de bioinformática sobre la base de:

- Su localización subcelular: empleando el programa Wolf PSORT (147).
- Sus dominios proteicos: empleando la base de datos InterPro (148) y el programa PSORT II (147).
- Su expresión en distintos tipos celulares: empleando la base de datos ArrayExpress (149).
- Su interacción con otras proteínas: empleando la base de datos STRING (150)
- Su función y otras características: Uniprot

Análisis de expresión en superficie de proteínas en los neutrófilos

Se incubaron 5×10^5 neutrófilos en 20 μ l de medio RPMI con 5 mg/ml de SAH en presencia de los siguientes anticuerpos: anti-CD11b conjugado a PE (Immunotech; Francia), anti-CD18 conjugado a FITC (BD Pharmingen), anti-MPO conjugado a FITC (BD Pharmingen; EEUU), control de isotipo conjugado a PE (Immunotech; Francia) o control de isotipo conjugado a FITC (BD Pharmingen; EEUU) durante 20 min a 4°C. Luego de lavadas, las células fueron fijadas con paraformaldehído 0,5% y la expresión de los marcadores mencionados determinada por citometría de flujo.

Alternativamente, se incubaron 5×10^5 neutrófilos en presencia de los anticuerpos: anti-elastasa hecho en conejo (Calbiochem; EEUU), anti-MNDA hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology; EEUU), anti-moesina hecho en ratón (Sigma-Aldrich), IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch; EEUU), IgG de cabra (Santa Cruz

Biotechnology; EEUU) o IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch; EEUU) durante 20 min a 4°C. Luego, fueron lavados y la unión de los anticuerpos primarios fue revelada empleando anticuerpos anti-IgG de conejo, anti-IgG de cabra o anti-IgG de ratón según correspondiera, conjugados a FITC (Jackson ImmunoResearch; EEUU). Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído 0,5% y la expresión de los marcadores fue determinada por citometría de flujo.

Análisis de la expresión intracelular de proteínas en los neutrófilos

Se fijaron 5×10^5 neutrófilos empleando paraformaldehído 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se permeabilizaron utilizando buffer saponina (saponina 0,05% y BSA 0,5% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon los grupos libres que pudieran haber quedado del paraformaldehído con glicina 0,1 M durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las células en 20 μ l de buffer saponina en presencia de los anticuerpos: anti-MPO conjugado a FITC, control de isotipo conjugado a FITC, anti-elastasa hecho en conejo, anti-MNDA hecho en cabra, anti-moesina hecho en ratón, IgG de conejo, IgG de cabra o IgG de ratón durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer saponina, e incubadas con su correspondiente anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, anti-IgG de cabra o anti-IgG de ratón) conjugado a FITC. Finalmente, fueron lavadas dos veces con buffer saponina, fijadas con paraformaldehído 0,5% y la expresión de los marcadores determinada por citometría de flujo.

Análisis estadístico

La significación estadística de los resultados obtenidos en los estudios de esta tesis fue determinada utilizando la prueba no paramétrica de Friedman para múltiples comparaciones con el post-test de Dunns o el test de rangos pareados de Wilcoxon. Se definió la significación estadística como $p < 0,05$.

Resultados

“Es mi trabajo no estar nunca satisfecho”

Wernher von Braun

Parte 1

ADN extracelular: un componente proinflamatorio relevante de los biofilms de *P. aeruginosa*

Los neutrófilos humanos unen y son activados por ADN de *P. aeruginosa*

Como mencionamos en “Introducción”, el ADN bacteriano es un componente clave en la formación y composición de biofilms de *P. aeruginosa*. Por esta razón, y considerando que nuestros estudios previos indicaron que los neutrófilos son activados por ADN inmovilizado a superficies, decidimos evaluar si el ADN de la matriz extracelular de biofilms bacterianos podría comportarse como un agonista de los neutrófilos. Para ello, dado que nuestros estudios previos fueron realizados con ADN de otras especies bacterianas determinamos, en primer lugar, si el ADN doble cadena purificado a partir de la cepa PAO-1 de *P. aeruginosa*, empleado a concentraciones compatibles con las que podría encontrar un neutrófilo en el contexto de un biofilm formado por esta especie, era capaz de unirse a la superficie de los neutrófilos humanos. Como puede observarse en la figura 5, los neutrófilos humanos unen ADN de *P. aeruginosa* en una forma dependiente de su concentración.

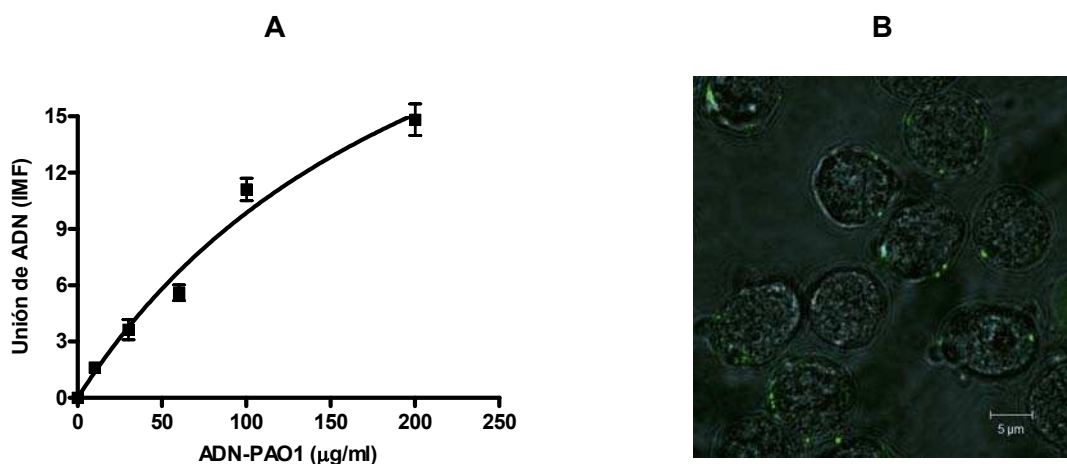


Figura 5: El ADN de PAO-1 se une a la superficie de los neutrófilos humanos. (A) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia de 0, 10, 30, 60, 100 y 200 µg/ml de ADN doble cadena biotinilado de PAO-1 por 30 min a 4°C. Luego fueron lavados y la unión fue revelada mediante el agregado de avidina-FITC por citometría de flujo (A) o por MLC utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan-Neofluar 100X/1,3, magnificación 2000X (B).

Luego, determinamos que el ADN doble cadena de PAO-1 es capaz de inducir la producción de IL-8 por neutrófilos humanos (figura 6). Cabe mencionar, que el ADN de PAO-1 inmovilizado indujo una liberación de IL-8 dos veces superior a la estimulada por ADN soluble, sugiriendo que el ADN de la matriz extracelular de un

biofilm podría ser más eficiente para gatillar la activación de los neutrófilos que el ADN bacteriano libre.

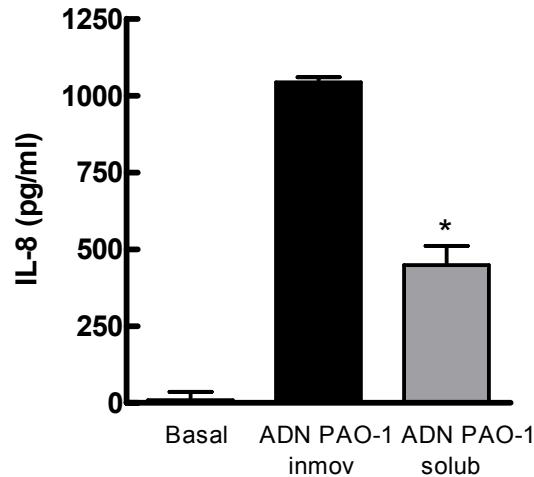


Figura 6: El ADN doble cadena de PAO-1 induce la activación de los neutrófilos. Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia o ausencia de 50 μ g/ml ADN doble cadena de PAO-1 soluble o previamente inmovilizado durante 3 hs a 37°C. Luego, la IL-8 liberada fue evaluada en los sobrenadantes mediante ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 4 experimentos; * $p < 0,05$ vs. la producción de IL-8 en células estimuladas con ADN de PAO-1 inmovilizado.

El tratamiento con DNasa I eliminó el ADN de la matriz expuesto a los neutrófilos sin afectar la biomasa de los biofilms ni la viabilidad bacteriana

Luego, con el fin de evaluar la contribución del ADN extracelular de la matriz de los biofilms a la activación de los neutrófilos, empleamos ensayos de biofilms estáticos. A pesar de que ningún modelo *in vitro* puede recrear las complejidades de un microambiente infeccioso por biofilms *in vivo*, nosotros consideramos, al igual que otros investigadores (130), que un modelo de desarrollo de biofilm estático se aproxima más adecuadamente al tipo de microambiente que caracteriza a infecciones por biofilms donde un tratamiento con DNasa I podría eventualmente ser aplicado. Por ello, empleamos biofilms de *P. aeruginosa* cultivada durante 48 hs a 37°C en placas de cultivo. En el segundo día, los biofilms establecidos fueron tratados con distintas concentraciones de DNasa I o vehículo por diferentes tiempos a 37°C, luego fueron lavados dos veces y la biomasa fue cuantificada mediante tinción con cristal violeta o evaluación del contenido proteico total. De todas las concentraciones y tiempos

ensayados, el tratamiento de los biofilms con 90 U/ml de DNasa I por 60 min a 37 °C fue el óptimo, no modificando significativamente la biomasa total del biofilm. Por simplicidad sólo se muestran los resultados obtenidos con 90 U/ml de DNasa I por 60 min (figura 7A y 7B).

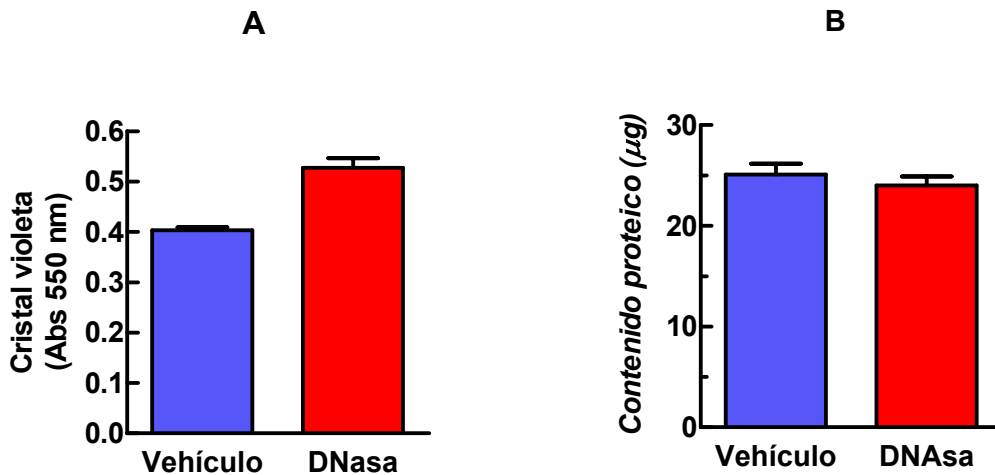


Figura 7: El tratamiento de los biofilms con DNasa I no modifica significativamente su biomasa. Los biofilms de 2 días fueron incubados en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C, luego fueron lavados 2 veces e incubado durante 3 hs adicionales en medio RPMI. Posteriormente, se cuantificó la biomasa total mediante tinción con cristal violeta (A) y por el contenido proteico (B). Los datos representan la media \pm ES de 2 experimentos realizados por triplicado (A) y un experimento por cuadruplicado (B).

Ensayos adicionales empleando MLC y el colorante LIVE/DEAD BacLight indicaron que el tratamiento del biofilm con 90 U/ml de DNasa no afecta visiblemente la viabilidad de las bacterias (figura 8).

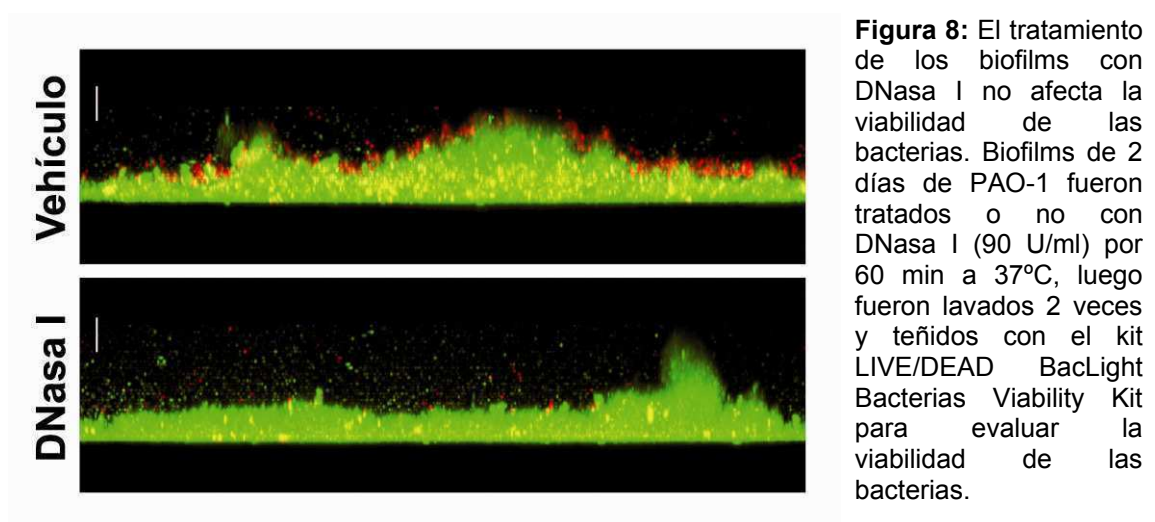


Figura 8: El tratamiento de los biofilms con DNasa I no afecta la viabilidad de las bacterias. Biofilms de 2 días de PAO-1 fueron tratados o no con DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C, luego fueron lavados 2 veces y teñidos con el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterias Viability Kit para evaluar la viabilidad de las bacterias.

Luego, necesitábamos verificar que el tratamiento de los biofilms con 90 U/ml de DNasa I fuese capaz de eliminar el ADN de la matriz que sería expuesto a los neutrófilos en experimentos de co-cultivo, pero que a su vez dicho tratamiento no modificara visiblemente la arquitectura del biofilm. Con este objetivo, se trataron biofilms de dos días de una cepa PAO-1 que expresa CFP (azul) con 90 U/ml de DNasa I durante 60 min, luego de los cuales los exopolisacáridos de la matriz fueron teñidos con Concanavalina A-FITC (verde) y el ADN extracelular del biofilm con yoduro de propidio (IP; rojo), un agente intercalante que no penetra la membrana de bacterias vivas. A continuación se tomaron imágenes mediante MLC. El análisis de las mismas demostró que la distribución espacial del ADN extracelular en los biofilms de la cepa PAO-1 de *P. aeruginosa* concordaba con la descrita previamente, con el ADN localizado sobre el sustrato y en la microcolonias, con las mayores concentraciones en el contorno de las mismas (100). Las proyecciones verticales de las imágenes de MLC adquiridas de biofilms control y tratados con DNasa I, mostradas en las figuras 9, indican que el tratamiento enzimático eliminó el ADN extracelular presente en la parte superficial de la estructura del biofilm sin afectar la arquitectura del mismo.

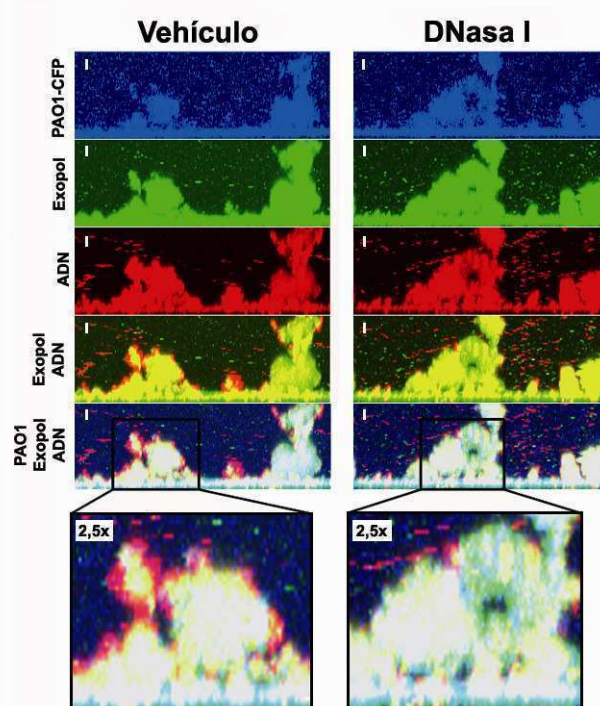


Figura 9: El tratamiento con DNasa I degrada el ADN de la matriz extracelular expuesto a los neutrófilos sin afectar la estructura del biofilm. Los biofilms de 2 días de la cepa PAO-1 expresando CFP (azul) fueron incubadas con medio (paneles izquierdos) o 90 U/ml de DNasa I (paneles derechos) durante 60 min a 37°C. Luego, el exopolisacárido fue revelado empleando concanavalina A-FITC (5 µg/ml; verde) y el ADN con IP (3 µM; rojo), y la arquitectura de los biofilms fue reconstruida proyectando verticalmente imágenes obtenidas con una lente objetivo

C-Apochromat 40X / 1,2 W corr mediante MLC. Magnificación original paneles superiores 400X. Las barras verticales representan 5 μm .

El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms bacterianos de estimular la producción de IL-8 e IL-1 β por neutrófilos humanos

Con el fin de evaluar la influencia del ADN de la matriz en la capacidad de los neutrófilos de producir citoquinas proinflamatorias, se crecieron biofilms de PAO-1 por dos días en condiciones estáticas y luego se trataron con DNasa I, DNasa I inactivada por calor o vehículo por 60 min. Posteriormente, los biofilms fueron lavados y se co-cultivaron durante 3 hs a 37°C con neutrófilos obtenidos a partir de sangre periférica humana. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de IL-8 e IL-1 β mediada por los neutrófilos empleando la técnica de ELISA. Los resultados indicaron que la eliminación del ADN de la matriz extracelular de los biofilms redujo en más de un 75% la cantidad de IL-8 e IL-1 β liberada por los neutrófilos (figuras 10A y 10B).

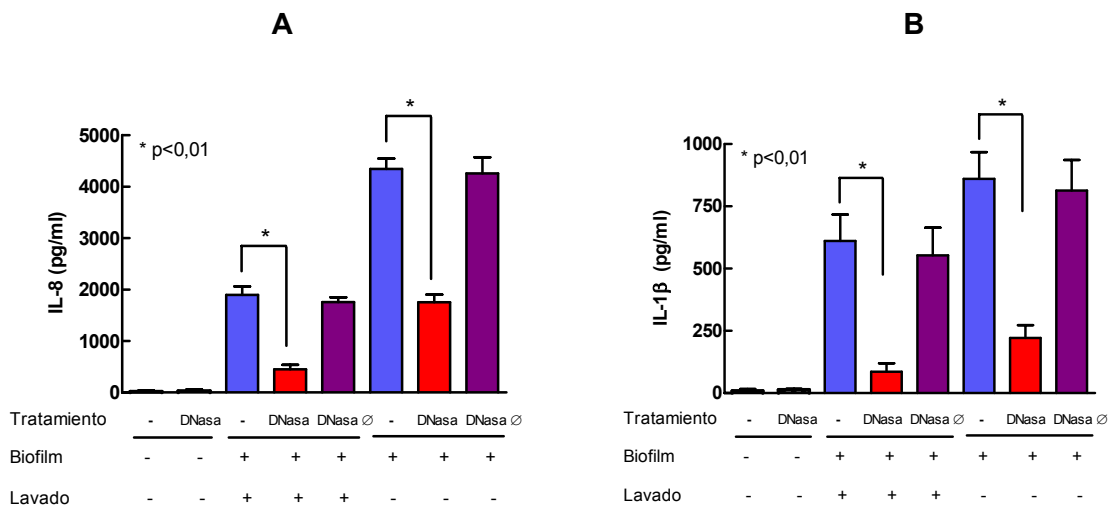


Figura 10: El tratamiento de los biofilms con DNasa I reduce marcadamente la producción citoquinas por los neutrófilos. Se incubaron biofilms de 2 días de PAO-1 en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) durante 60 min a 37°C, y luego fueron sometidos o no a dos lavados. Posteriormente, se sembraron por goteo los neutrófilos (2×10^6 /ml) resuspendidos en medio completo en el centro de los pocillos conteniendo los biofilms y se co-cultivaron durante 3 hs a 37°C. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificó la liberación de IL-8 (A) e IL-1 β (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 6-9 experimentos llevados a cabo por triplicado.

Se obtuvieron resultados similares cuando se omitió el paso de lavado posterior al tratamiento con DNasa I, descartando la posibilidad de que la inhibición observada en la producción de citoquinas pudiera estar relacionada con la eliminación de algún factor estimulante liberado del biofilm como consecuencia del tratamiento enzimático (figuras 10A y 10B). El tratamiento del biofilm con DNasa I inactivada por calor no afectó la producción de citoquinas por parte de los neutrófilos, indicando que los resultados obedecieron a la acción enzimática ejercida por la DNasa I sobre el biofilm.

Realizamos experimentos adicionales para descartar la posibilidad de que la inhibición de la producción de citoquinas observada al tratar a los biofilms con DNasa I se debiera a un efecto de esta enzima sobre las propias bacterias. Para ello, aprovechamos el hecho de que cultivos de la cepa PAO-1 de *P. aeruginosa* en la fase inicial o media de crecimiento exponencial presentan bajos niveles basales de ADN extracelular, los cuales pueden ser removidos por un paso de lavado (100). En base a esto, incubamos bacterias planctónicas de un cultivo de PAO-1 en fase media de crecimiento exponencial en presencia o ausencia de DNasa I, luego las lavamos, y posteriormente analizamos su capacidad de estimular la producción de citoquinas por los neutrófilos. De acuerdo a lo esperado, encontramos que el tratamiento con DNasa I de cultivos plantónicos de PAO-1 no modificó la producción de IL-8 ni la de IL-1 β por los neutrófilos co-cultivados con ellos (figura 11A y 11B). Estos resultados apoyan nuestra conclusión de que la eliminación del ADN de la matriz es la causante de la reducción en la producción de citoquinas por neutrófilos co-cultivados con biofilms tratados con DNasa I.

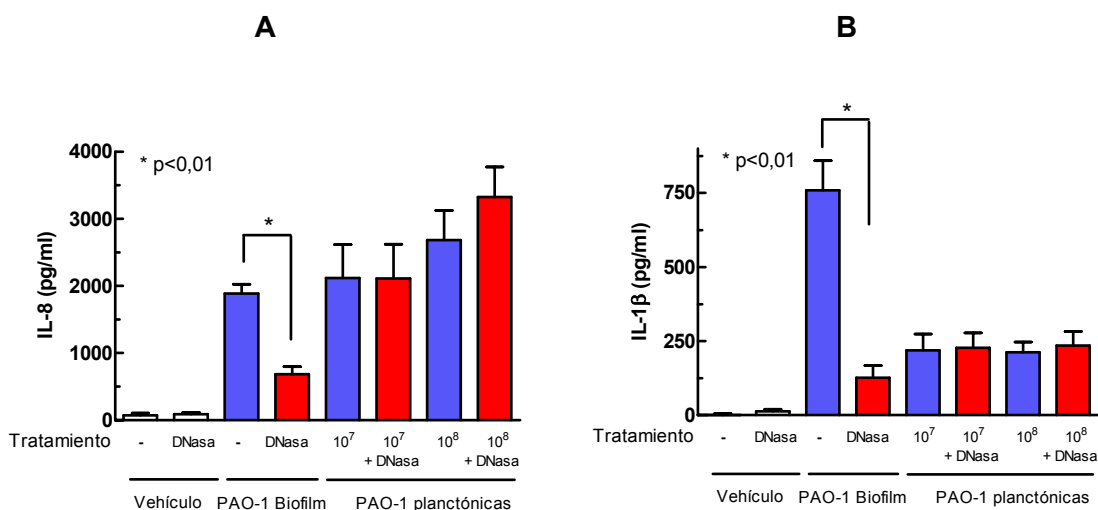


Figura 11: El tratamiento con DNasa I reduce la producción de citoquinas por neutrófilos co-cultivados con biofilms pero no con bacterias planctónicas. Se co-cultivaron neutrófilos (2×10^6 /ml) durante 3 hs a 37°C con bacterias planctónicas PAO-1 en etapa exponencial media de crecimiento, que previamente habían sido tratadas o no con DNasa I (90 U/ml) durante 60 min a 37°C. Luego se cuantificaron las concentraciones de IL-8 (A) e IL-1β (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 6 experimentos llevados a cabo por triplicado.

M Allesen-Holm y colaboradores reportaron que biofilms de la cepa la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhlI* exhiben una reducción significativa del ADN en la matriz extracelular en comparación con biofilms de la cepa salvaje (100). Acorde a los hallazgos de estos autores, determinamos que los biofilms salvajes (PAO-1) de dos días de formación contenían 8.7 ± 2.8 μ g ADN/mg proteína total, mientras que los biofilms de la mutante *lasI/rhlI* contenían solamente 0.46 ± 0.03 μ g ADN/mg proteína total. De este modo, cultivamos biofilms de 2 días en presencia o ausencia de DNasa I y, luego de lavarlos, los co-cultivamos con neutrófilos por 3 hs. Posteriormente, recolectamos los sobrenadantes de cultivo y cuantificamos las citoquinas liberadas. Aún cuando detectamos niveles similares de biomasa en los biofilms salvajes y *lasI/rhlI* mutantes, los últimos indujeron una menor producción de IL-8 e IL-1β por los neutrófilos en comparación con la inducida por los biofilms salvajes (figuras 12A y 12B). Pero más relevante aún fue la observación de que el tratamiento con DNasa I no disminuyó la capacidad de los biofilms de la cepa *lasI/rhlI* de inducir la producción de citoquinas por los neutrófilos. Estos hallazgos apoyan nuestra hipótesis que sostiene que el ADN extracelular de la matriz del biofilm es capaz de gatillar respuestas proinflamatorias en los neutrófilos.

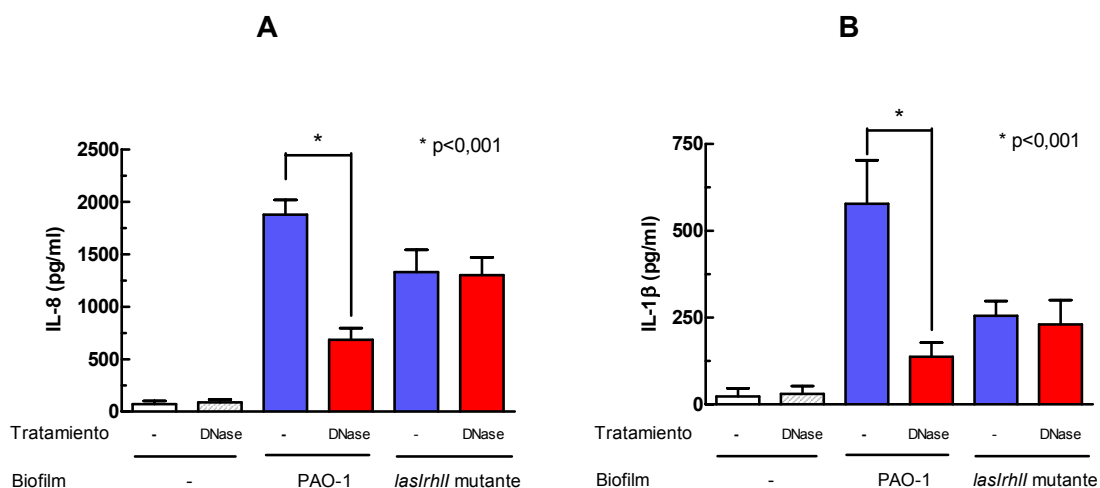


Figura 12: La cepa PAO1-JP2 (*lasI rhII* doble mutante) induce una menor producción de citoquinas por los neutrófilos y el tratamiento con DNasa I no afecta su capacidad de estimular dicha producción. Biofilms de dos días de la cepa salvaje PAO-1 y de la mutante PAO-JP2 fueron tratados o no DNasa I, lavados y co-cultivados con neutrófilos y luego, se determinó la producción de IL-8 (A) e IL-1β (B) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los datos representan la media ± ES de 6 experimentos llevados a cabo por triplicado.

El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms bacterianos para estimular el aumento de expresión de marcadores de activación del neutrófilo

Posteriormente evaluamos el impacto de la digestión del ADN de la matriz extracelular en la capacidad de los neutrófilos de incrementar la expresión de los componentes de la integrina Mac-1, las subunidades CD11b y CD18. Esta integrina se expresa en la membrana de vesículas secretorias, de gránulos específicos y de gránulos de gelatinasa, y pasa a formar parte de la membrana plasmática cuando, como consecuencia de la activación celular, los neutrófilos sufren degranulación. Por lo tanto, el nivel de expresión de esta integrina es un indicador del grado de activación del neutrófilo. Por ello, en primer lugar, se cultivaron a los neutrófilos sobre biofilms previamente tratados o no con DNasa I y luego se evaluó la expresión de CD18 por MLC. La figura 13 muestra que la expresión de CD18 fue marcadamente superior en los neutrófilos asentados sobre biofilms control comparada con la observada en neutrófilos estimulados por biofilms pre-tratados con DNasa I.

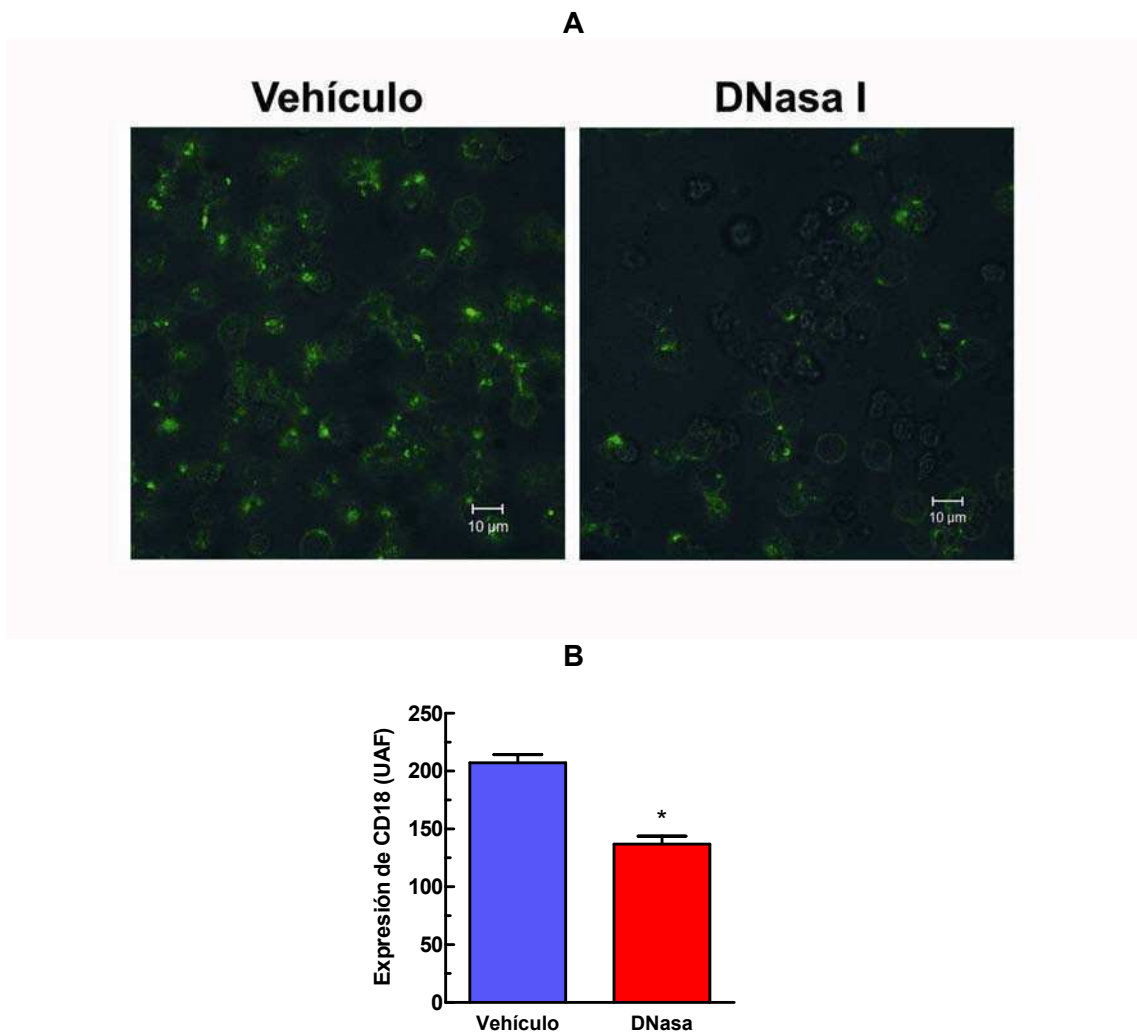
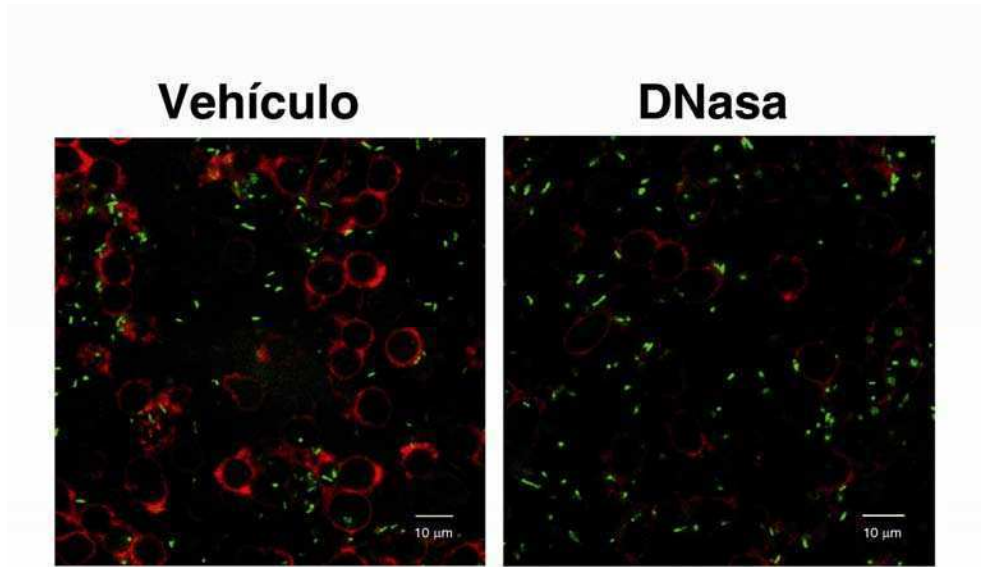


Figura 13: El tratamiento de los biofilms con DNasa I reduce significativamente su capacidad de estimular un incremento en la expresión de CD18. (A) Biofilms de 2 días de PAO-1 fueron tratados con vehículo o DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C. Luego, fueron lavados 2 veces, sobre ellos se sembraron los neutrófilos (2×10^6 /ml) y fueron co-cultivados durante 40 min a 37°C. Posteriormente, la expresión de CD18 fue evaluada con un anticuerpo específico conjugado a FITC mediante MLC. Se utilizó la lente C-Apochromat 63x/1.2 W corr. (B) Análisis cuantitativo de 7-10 secciones ópticas horizontales adquiridas a partir de al menos 2 experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). * $p < 0,001$.

Por otra parte, cuando co-cultivamos neutrófilos con biofilms de PAO-1 expresando GFP, tratados o no con DNasa I, la expresión de CD11b fue marcadamente mayor en los neutrófilos expuestos a biofilms no tratados con DNasa I (figura 14).

A



B

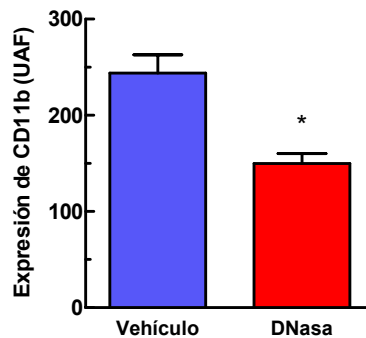


Figura 14: El tratamiento de los biofilms con DNasa I reduce significativamente su capacidad de inducir la expresión de CD11b. (A) Los experimentos fueron realizados como se describió para la figura 13, excepto que se emplearon biofilms de la cepa PAO-1 expresando GFP (verde) y la expresión de CD11b fue revelada empleando un anticuerpo específico conjugado a PE (rojo) mediante MLC. Se utilizó la lente C-Apochromat 63X/1.2 W corr. (B) Análisis cuantitativo de 7-9 secciones ópticas horizontales adquiridas a partir de al menos 3 experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). * $p < 0,001$.

Obtuvimos resultados similares cuando evaluamos la expresión de CD66b, un marcador de gránulos específicos (figura 15). En conjunto, estos resultados sustentan que la degradación del ADN extracelular disminuye la capacidad de los biofilms bacterianos de gatillar la activación de los neutrófilos.

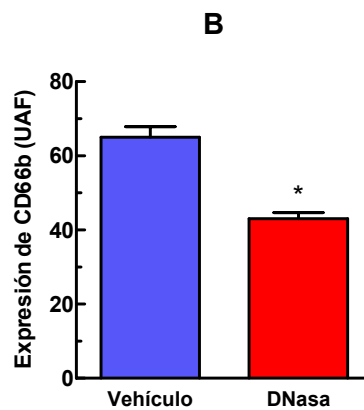
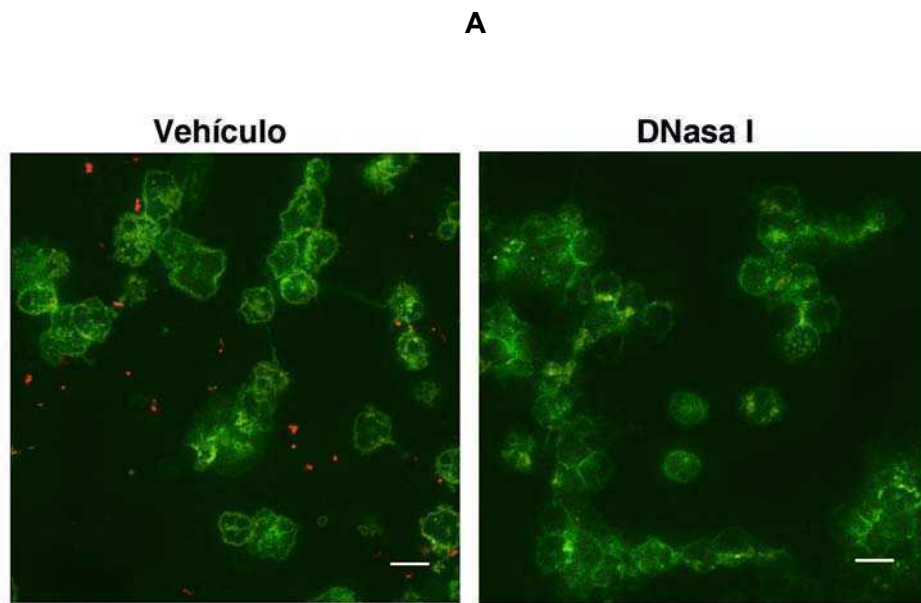


Figura 15: El tratamiento de los biofilms con DNasa reduce significativamente su capacidad de incrementar la expresión de CD66b. (A) Los experimentos fueron realizados como se describió para la figura 13, excepto que la expresión de CD66b fue revelada mediante un anticuerpo específico conjugado a FITC (verde) mediante MLC. Antes de la adquisición de imágenes por MLC se agregó IP (3 μ M; rojo) para visualizar el ADN extracelular. Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plapon 60X/1.42. (B) Análisis cuantitativo de 7-9 secciones ópticas horizontales adquiridas a partir de al menos 4 experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). * $p < 0,001$.

El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms de inmovilizar mieloperoxidasa (MPO)

Cuando los neutrófilos toman contacto con estímulos fagocitables, los gránulos se fusionan con el fagosoma naciente y liberan su contenido dentro de él, exponiendo al material ingerido a una serie de agentes tóxicos. Sin embargo, durante este proceso, como resultado de una "fagocitosis frustrada", el contenido de los gránulos también puede ser liberado al medio extracelular. Dado que estudios previos mostraron que los biofilms de *P. aeruginosa* inducen la liberación del contenido de los gránulos de los neutrófilos (128), analizamos el papel que podría ejercer el ADN de la matriz en la inducción de esta respuesta. Dado que Mac-1 (CD11b/CD18) y CD66b se expresan en la membrana de vesículas secretorias, de gránulos específicos y de gránulos de gelatinasa, los resultados detallados previamente sugirieron que la degradación del ADN de la matriz reduce la capacidad del biofilm de inducir la liberación de estos gránulos. Por ello, con el fin de determinar el efecto de la digestión del ADN de la matriz de biofilm en la liberación de gránulos de azurófilos, evaluamos la actividad de MPO en los sobrenadantes de co-cultivo. Inesperadamente, detectamos mayor actividad de MPO en los sobrenadantes de co-cultivo con biofilms tratados con DNasa I en comparación con co-cultivos con biofilms sin tratamiento (figura 16).

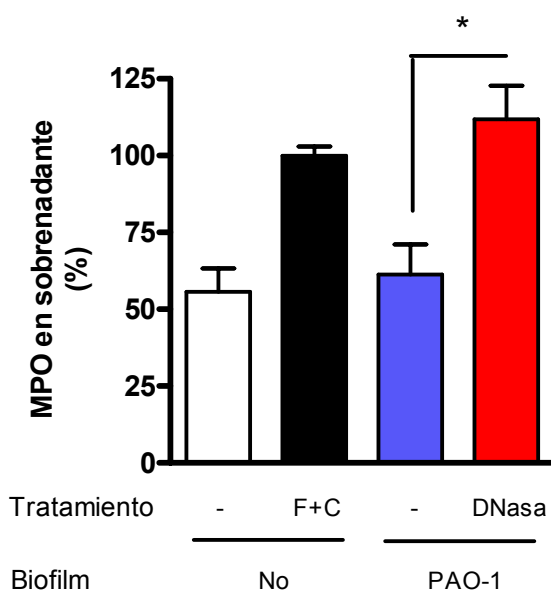


Figura 16: El tratamiento de los biofilms con DNasa I incrementa la actividad MPO en sobrenadantes de co-cultivos. Se trataron biofilms de dos días de PAO-1 en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C. Posteriormente, se lavaron 2 veces, sobre ellos se sembraron los neutrófilos (2×10^6 /ml) y se co-cultivaron durante 60 min a 28°C. Luego se evaluó la actividad de MPO en los sobrenadantes de los co-cultivos. Se consideró como 100% a la actividad de MPO liberada por neutrófilos estimulados con FMLP 10^{-7} M + citocalasina B 5 μ g/ml (F+C). Los datos representan la media \pm ES de 6 experimentos llevados a cabo por triplicado. * $p < 0,05$.

Este hallazgo parecía contradecir los resultados descriptos anteriormente que mostraban que los biofilms tratados con DNasa I exhibían una menor capacidad de gatillar la activación de los neutrófilos. Sin embargo, nosotros especulamos que podría deberse a que, por su naturaleza altamente catiónica, gran parte de la MPO liberada por los neutrófilos activados por el contacto con el biofilm se encontrase adherida electrostáticamente al ADN presente en la matriz de los biofilms no tratados con DNasa I. Por este motivo, la MPO no sería detectada en el sobrenadante de co-cultivo de biofilms y neutrófilos. Para testear esa posibilidad, realizamos dos tipos de ensayos. En primer lugar, determinamos la capacidad del ADN de PAO-1 inmovilizado a una placa, de unir y retener la MPO liberada de neutrófilos activados. Para ello, incubamos sobrenadantes de cultivo de neutrófilos estimulados con FMLP y citocalasina B (condición que favorece la liberación del contenido de los gránulos azurófilos) con ADN de PAO-1 inmovilizado y luego evaluamos la actividad de la MPO retenida en las placas después de realizar de tres lavados. Como puede observarse en la figura 17, los pocillos conteniendo ADN exhibieron una actividad MPO significativamente superior a la observada en los pocillos desprovistos de ADN, indicando la capacidad de esta molécula de inmovilizar MPO.

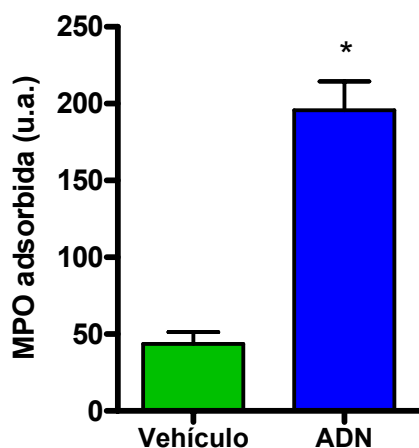


Figura 17: El ADN inmovilizado es capaz de unir MPO. El sobrenadantes de neutrófilos tratados con FMLP $10^{-7}M$ + citocalasina B ($5 \mu g/ml$) fue incubado en pocillos conteniendo o no ADN de PAO-1 inmovilizado. Luego de 30 min a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados 3 veces y la actividad de la MPO fue determinada. Los resultados son representativos de 3 experimentos realizados por quintuplicado. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (u.a.). * $p < 0,01$.

Posteriormente, determinamos la presencia de MPO adherida a los biofilms luego del co-cultivo de los neutrófilos con ellos. La figura 18A muestra que la MPO permaneció inmovilizada a la superficie de biofilms tratados con vehículo, co-localizando con el ADN de la matriz, mientras no pudo ser detectada en la superficie de biofilms cuya matriz se encontraba desprovista de ADN por el tratamiento con

DNasa I. En la figura 18B se muestra el análisis cuantitativo de imágenes de planos horizontales adquiridos en cuatro experimentos independientes.

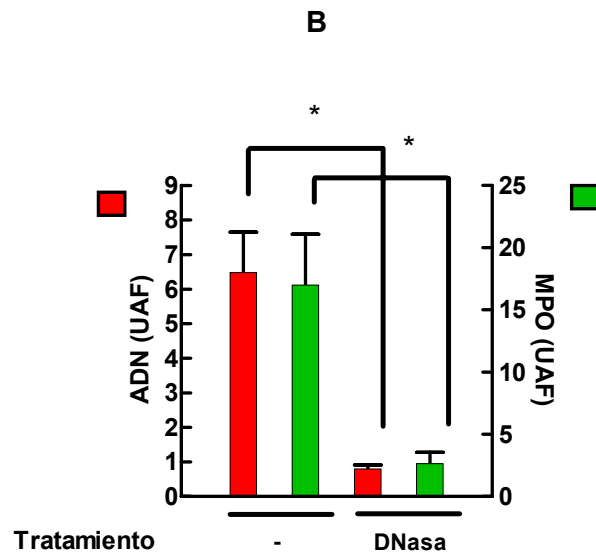
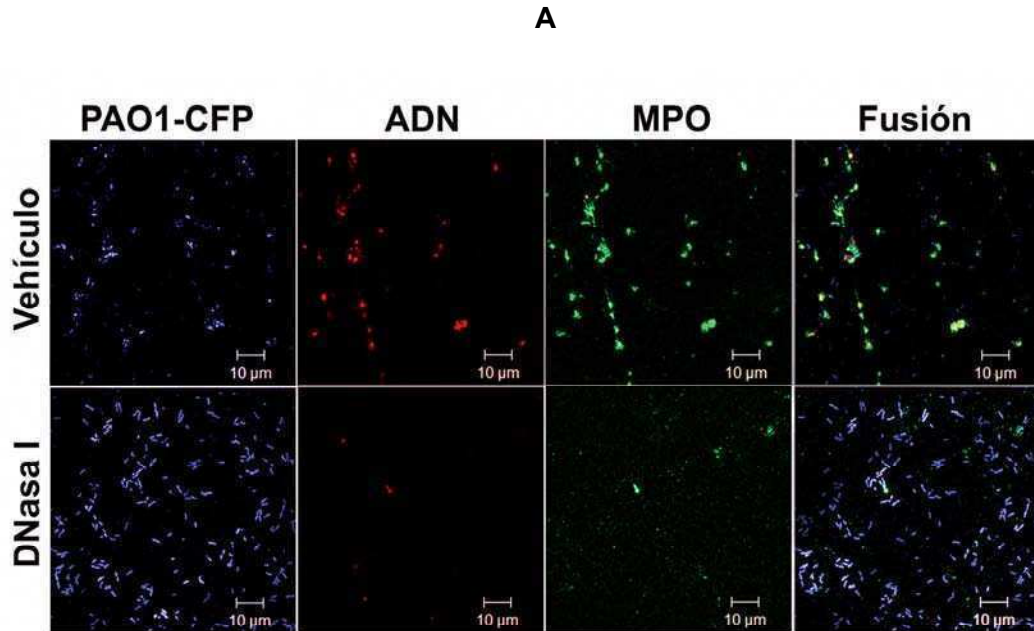


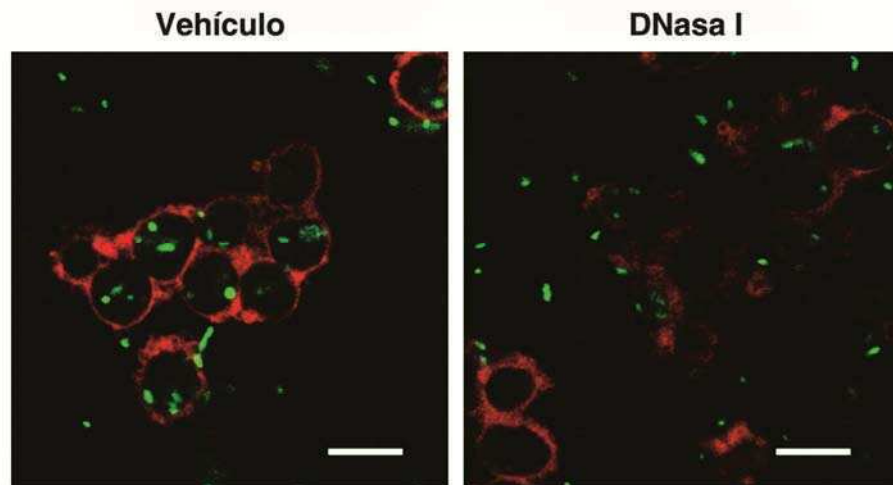
Figura 18: El tratamiento de los biofilms con DNasa I impide que la MPO liberada por los neutrófilos quede inmovilizada al biofilm. (A) Biofilms de dos días de PAO-1 expresando CFP (azul) fueron incubados en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C. Posteriormente, fueron lavados 2 veces y sobre ellos se sembraron los neutrófilos (2×10^6 /ml) y se co-cultivaron durante 60 min a 28°C. Luego de removerse el sobrenadante de cultivo cuidadosamente, la MPO inmovilizada a la superficie del biofilm fue revelada con un anticuerpo anti-MPO conjugado a FITC (verde). Se agregó IP (3 µM) previo a la adquisición de las imágenes por MLC para visualizar el ADN extracelular (rojo). Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plan-Neofluar 100 x/1.3. (B) Análisis cuantitativo de 8 planos horizontales adquiridos de 4 experimentos independientes. * $p < 0,001$.

El tratamiento con DNasa I reduce marcadamente la capacidad de los biofilms de estimular la fagocitosis por neutrófilos pero no afecta su habilidad de mediar el estallido respiratorio

La fagocitosis es un proceso crucial en la defensa del huésped que caracteriza la función de los neutrófilos y a su capacidad de matar microorganismos. Jesaitis y colaboradores mostraron, mediante microscopía electrónica de transmisión, en secciones transversales de biofilms expuestos a neutrófilos, que estas células fagocitan bacterias en las superficies adyacentes al biofilm (128). Por este motivo, decidimos evaluar si la eliminación del ADN extracelular de la matriz del biofilm afectaba esta respuesta. Para ello, se determinó mediante MLC la capacidad fagocítica de neutrófilos que fueron co-cultivados con biofilms pre-tratados o no con DNasa I. En la figura 19 se observa que los neutrófilos en contacto con biofilms tratados con DNasa evidenciaron una reducción del 35% en el número de bacterias ingeridas, en relación a los neutrófilos expuestos a biofilms no tratados.

Estudios recientes llevados a cabo por el grupo de William Nauseef mostraron un desvanecimiento de la fluorescencia de *Staphylococcus aureus* que expresaban GFP, luego de ser fagocitados por neutrófilos, como consecuencia del HOCl producido por la activación de la NADPH oxidasa, a pesar de la presencia intacta de estas bacterias en el interior celular (151). Teniendo en cuenta este antecedente, realizamos experimentos adicionales evaluando la fagocitosis de bacterias mediada por neutrófilos pretratados con diphenylene iodonium (DPI), un potente inhibidor de flavoproteínas, incluyendo la NADPH oxidasa (152), para evitar el desvanecimiento de la fluorescencia debido a la acción de esta enzima. El número de bacterias observadas en el interior de los neutrófilos pretratados con DPI fue mayor al presente en neutrófilos no pre-tratados, sugiriendo un desvanecimiento de la fluorescencia dentro de los fagosomas. Pero, más relevante aún, fue que bajo estas condiciones, se evidenció más claramente la mayor capacidad fagocítica de neutrófilos co-cultivados con biofilms no tratados (bacteria/PMN $2,7 \pm 0,4$ vs $1,5 \pm 0,3$; biofilm no tratado vs tratado con DNasa).

A



B

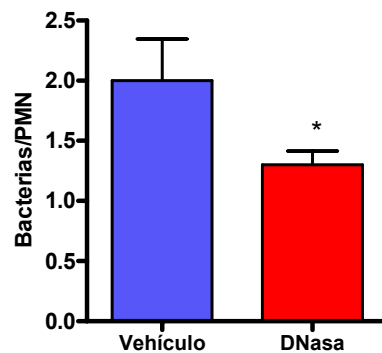
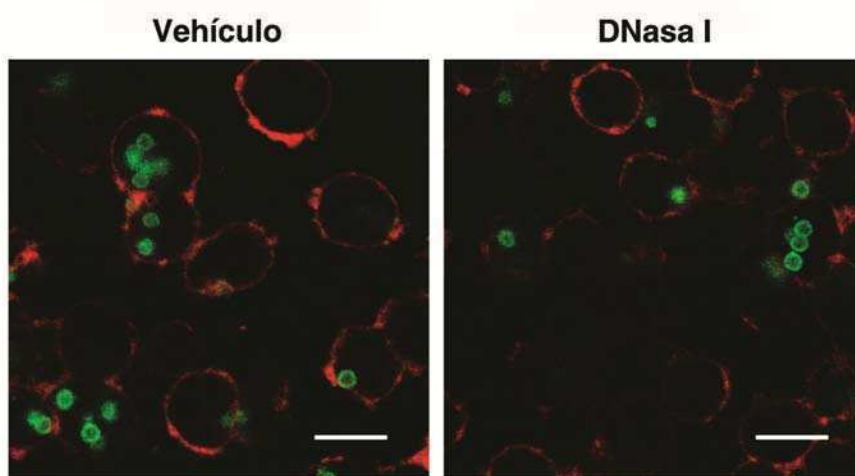


Figura 19: El tratamiento del biofilm con DNasa I reduce la fagocitosis de bacterias por neutrófilos co-cultivados con ellos. (A) Biofilms de dos días de PAO-1 expresando GFP (verde) fueron incubados en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C. Posteriormente fueron lavados 2 veces y sobre ellos se sembraron los neutrófilos (2×10^6 /ml), y se co-cultivaron durante 40 min a 37°C. Luego de remover los sobrenadantes de cultivo cuidadosamente, se reveló la expresión de CD11b mediante un anticuerpo específico conjugado a PE (rojo) con el objeto de delimitar la superficie celular para confirmar la localización intracelular de las bacterias observadas en cada plano microscópico. Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plapon 60X /1.42. (B) Análisis cuantitativo de 5 planos horizontales adquiridos en 6 experimentos independientes. * $p < 0,001$.

Realizamos experimentos adicionales incorporando microesferas de poliestireno conjugadas a FITC en los co-cultivos de neutrófilos y biofilms y evaluamos

su internalización mediante MLC. Los neutrófilos en contacto con biofilms tratados con vehículo fagocitaron un mayor número de microesferas fluorescentes que aquellos co-cultivados con biofilms tratados con DNasa I (figura 20), descartando la posibilidad de que el menor número de bacterias observado dentro de los neutrófilos en contacto con biofilms tratados con DNasa mostrado en la figura 19 se debiera a diferencias en los niveles de muerte bacteriana intracelular.

A



B

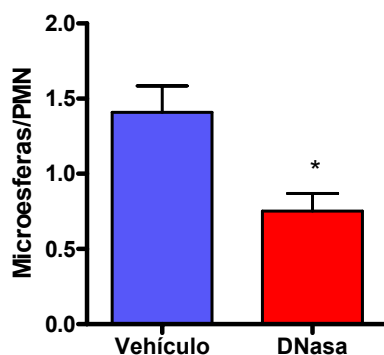


Figura 20: El tratamiento con DNasa I reduce la fagocitosis microesferas por neutrófilos en contacto con biofilms de *P. aeruginosa*. (A) Biofilms de dos días de PAO-1 fueron incubados en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C. Posteriormente, fueron lavados 2 veces y sobre ellos se sembraron los neutrófilos (2×10^6 /ml) conjuntamente con

microesferas de látex marcadas con FITC (verde) y se co-cultivaron durante 40 min a 37°C. Luego de removerse los sobrenadantes de cultivo cuidadosamente, se reveló la expresión de CD11b mediante un anticuerpo específico conjugado a PE (rojo) con el objeto de delimitar la superficie celular para confirmar la localización intracelular de las microesferas observadas en cada plano microscópico. Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plapon 60x/1.42. (B) Análisis cuantitativo de 5 planos horizontales adquiridos en 6 experimentos independientes. * $p < 0,001$.

El análisis del estallido respiratorio fue realizado utilizando neutrófilos cargados con Dihidrorodamina 123 (123-DHR). Se permitió que las células se asentaran sobre biofilms tratados o no con DNasa I y se monitoreó mediante MLC la fluorescencia emitida por la 123-rodamina producida por la oxidación de la 123-DHR por el peróxido de hidrógeno. En contraste con nuestros resultados en relación a la influencia del ADN del biofilm en otros parámetros de activación del neutrófilo, no hallamos diferencias entre el estallido respiratorio mediado por neutrófilos expuestos tanto a los biofilms tratados con DNasa I como a los no tratados (figura 21).

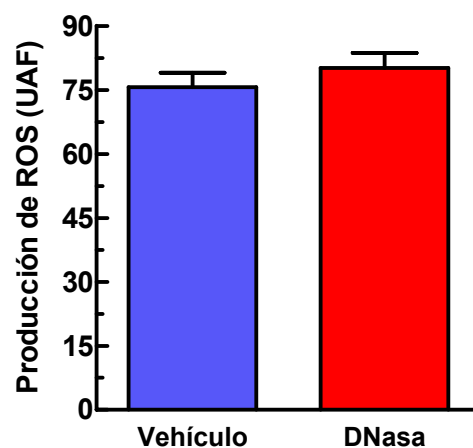


Figura 21: El tratamiento del biofilm con DNasa I no afecta su capacidad de estimular el estallido respiratorio de los neutrófilos. La activación del estallido respiratorio fue revelada mediante la detección de la fluorescencia emitida por la DHR-123 generada por acción del peróxido de hidrógeno producido por los neutrófilos activados por el biofilm. Los datos representan la media \pm ES de la fluorescencia cuantificada a partir de 8 imágenes de planos horizontales adquiridas de un experimento representativo de 6.

Los biofilms bacterianos estimulan fuertemente la liberación de NET. El tratamiento de los biofilms con DNasa I reduce la capacidad de los neutrófilos de liberar NET

Cuando realizamos co-cultivos de neutrófilos con biofilms por períodos mayores a las 2 horas observamos en la superficie del biofilm, por MLC, la presencia una red extracelular densa de un material filamentososo que se teñía con yoduro de propidio, sugiriendo su identidad como ADN, y que además estaba presente en mayores cantidades en los biofilms no tratados con DNasa I (figura 22). Dado que la apariencia de estas fibras de ADN era diferente a la del ADN propio del biofilm, sospechamos que podría tratarse de NET liberadas por los neutrófilos estimulados por el biofilm.

Las NET son estructuras extracelulares compuestas de cromatina y proteínas granulares específicas adheridas, que bajo determinadas condiciones liberan los neutrófilos al ser estimulados. Para confirmar nuestra presunción, biofilms 2 días de PAO-1 fueron tratados o no con DNasa I, lavados dos veces y expuestos a neutrófilos humanos durante 150 minutos. Luego, las supuestas NET fueron marcadas cuidadosamente con un anticuerpo anti-nucleosoma y con yoduro de propidio y visualizadas por MLC. Las imágenes adquiridas mostraron a los nucleosomas colocalizando con el ADN (amarillo en el panel correspondiente a la superposición de imágenes) indicando el origen humano de esta red (figura 22).

Como muestra la figura 22, los neutrófilos expuestos a biofilms tratados con DNasa I liberaron menos NET que los estimulados por biofilms tratados con vehículo, aunque en ambos casos se observó la formación de NET. Con el fin de descartar la posibilidad que hubiera quedado DNasa I residual en el cultivo, que pudiese ser la responsable de los resultados observados, el sobrenadante de los co-cultivos fue recolectado al final de cada ensayo. En ellos no se detectó una actividad enzimática significativa (datos no mostrados).

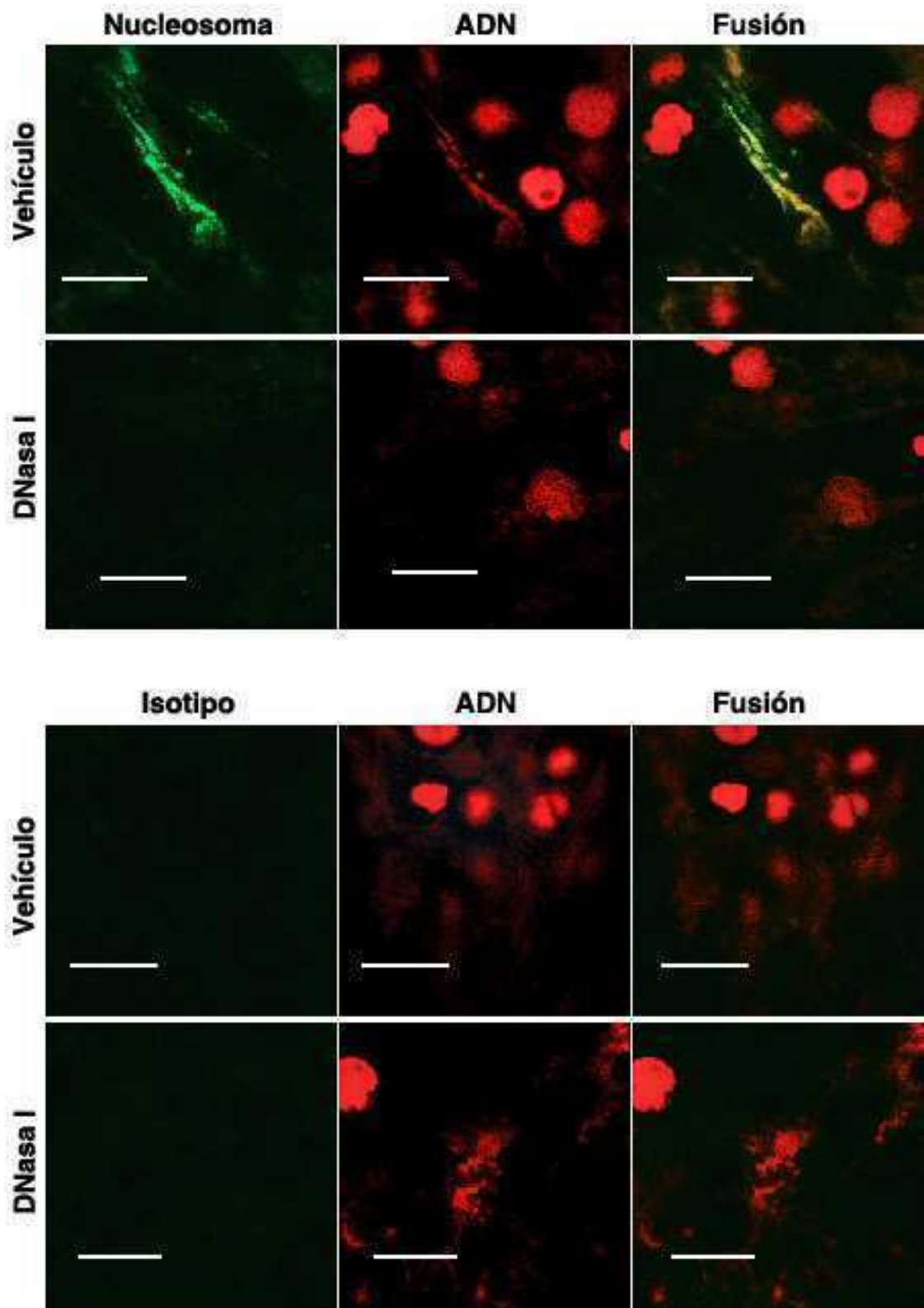


Figura 22: El tratamiento de los biofilms con DNasa I reduce la formación de NET por los neutrófilos. Biofilms de dos días de la cepa PAO-1 fueron incubados en presencia o ausencia de DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37°C). Posteriormente, fueron lavados 2 veces, se

sembraron sobre ellos los neutrófilos (2×10^6 /ml) y se co-cultivaron durante 150 min a 37°C. Luego de remover cuidadosamente los sobrenadantes de cultivo, se tiñeron los nucleosomas con un anticuerpo específico y un anticuerpo secundario conjugado a FITC (verde) y el ADN fue visualizado mediante tinción con IP (3 μ M; rojo) previo a la adquisición de imágenes mediante MLC. Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plapon 60x/1.42. Las barras corresponden a 20 μ m.

Impacto del tratamiento con DNasa I en la capacidad de los biofilms formados con cepas mucoides de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística para estimular la liberación de citoquinas por los neutrófilos

P. aeruginosa posee una enorme flexibilidad genética y metabólica que le permite adaptarse al entorno y persistir dentro de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística (FQ). Los genotipos y fenotipos de las cepas presentes en estadios tardíos de la enfermedad difieren sustancialmente de aquellos que inicialmente colonizan los pulmones (142). De hecho, la conversión de *P. aeruginosa* de un fenotipo no mucoso a uno mucoso marca la transición a un estadio más persistente, caracterizado por resistencia a antibióticos y una declinación pulmonar acelerada (143-145). Por estos motivos, realizamos experimentos adicionales para determinar la relevancia del ADN de la matriz de los biofilms formados por dos cepas mucoides de *P. aeruginosa* aisladas de los pulmones de pacientes con FQ infectados crónicamente con *Pseudomonas*. Determinamos que los biofilms formados por estas cepas diferían en su contenido de ADN extracelular y en la eficiencia del tratamiento con DNasa I (figura 23A). En los biofilms formados por la cepa #1208, que exhibió mayor contenido de ADN extracelular, el tratamiento con DNasa I fue más eficiente para reducir la cantidad de ADN extracelular presente en el biofilm, y a la vez redujo significativamente la capacidad del biofilm de estimular la liberación de IL-8 e IL-1 β por los neutrófilos co-cultivados con ellos. Por el contrario, los biofilms formados por la cepa F1432 exhibieron un menor contenido de ADN extracelular y el tratamiento con DNasa I no redujo significativamente la cantidad de ADN extracelular en el biofilm ni la producción de citoquinas por los neutrófilos en contacto con estos biofilms (figura 23).

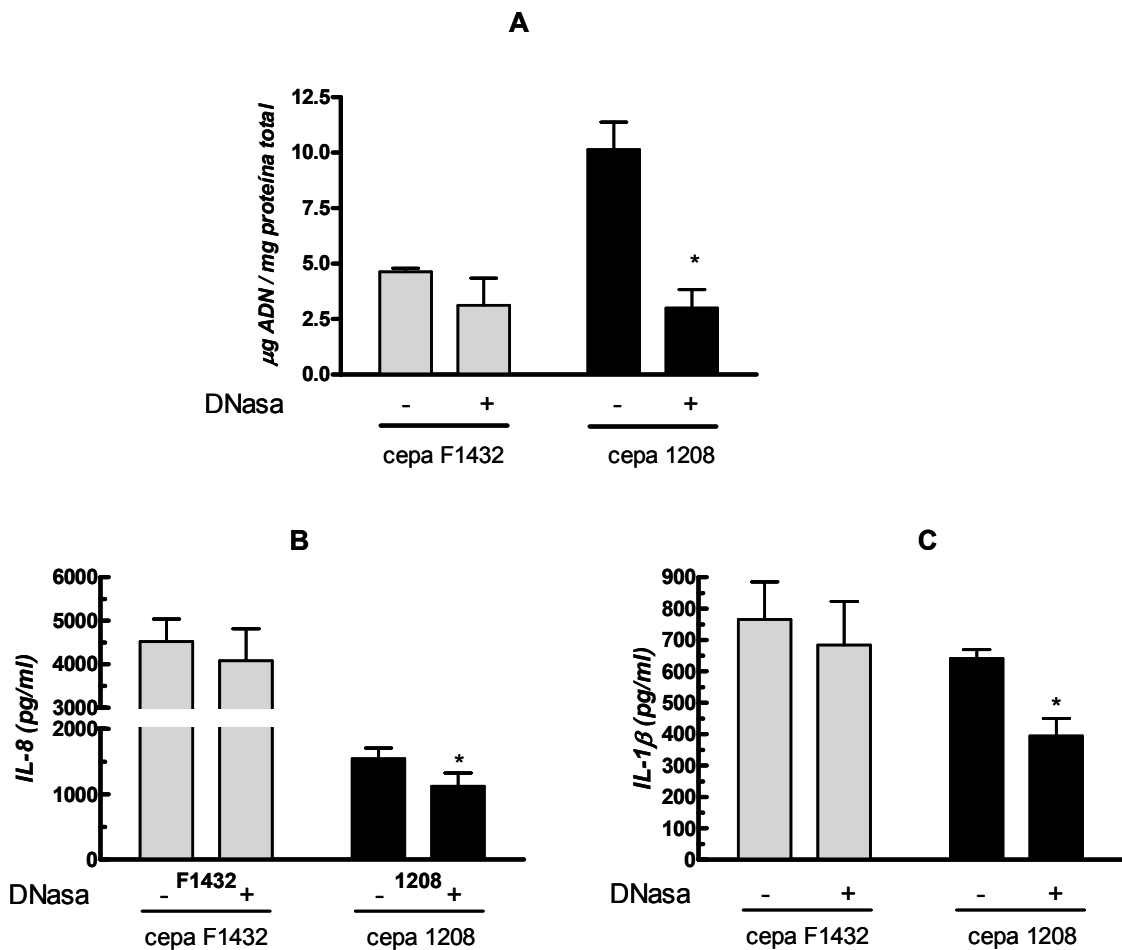


Figura 23: Efecto del tratamiento con DNasa en la capacidad proinflamatoria de los biofilms formados con cepas mucoides de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ cr\u00f3nicamente infectados. Se formaron biofilms de 2 d\u00edas de las cepas mucoides #1208 y F1432, luego se trataron o no con DNasa I (90 U/ml) por 60 min a 37\u00b0C y se lavaron 2 veces. Posteriormente, los biofilms fueron cultivados por 3 horas adicionales en RPMI 1640 sin rojo fenol. Se determin\u00f3 el contenido de ADN extracelular y el contenido proteico total y finalmente se grafic\u00f3 la raz\u00f3n ADN/prote\u00edna total (A). Alternativamente, los biofilms se co-cultivaron con neutr\u00f3filos (2×10^6 /ml) por 3 horas a 37\u00b0C y se evalu\u00f3 la producci\u00f3n de IL-8 (B) e IL-1 β (C) en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 4 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ vs biofilms tratados con veh\u00edculo.

En conjunto los hallazgos detallados indicaron que la degradaci\u00f3n del ADN de la matriz extracelular con DNasa I redujo marcadamente:

- la capacidad de los biofilms de *P. aeruginosa* de inducir la liberaci\u00f3n de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 e IL-1 β (>75%)
- el incremento de los marcadores de activaci\u00f3n CD18, CD11b y CD66b ($p < 0.001$)

- el número de bacterias fagocitadas por cada neutrófilo contactando con el biofilm (>60%); y
- la liberación de NET.

Además, indicaron que biofilms formados por la cepa *lasIIrhII* (JP-2) de *P. aeruginosa*, los cuales exhiben un muy bajo contenido de ADN en la matriz extracelular, presentaron una menor capacidad de estimular la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por neutrófilos, la cual no fue afectada por el tratamiento con DNasa I.

El impacto pro-inflamatorio del ADN en biofilms formados por cepas mucoides *P. aeruginosa* podría depender del contenido de ADN de cada cepa en particular.

Sobre la base de estos hallazgos, concluimos que el ADN de la matriz extracelular es un componente pro-inflamatorio relevante de los biofilms formados por *P. aeruginosa*.

Parte 2

Identificación de moléculas del neutrófilo con capacidad de unir ADN bacteriano

El ADN bacteriano activa a los neutrófilos humanos a través de un receptor proteico presente en la superficie celular

Como ya hemos mencionado, en trabajos previos de nuestro grupo demostramos que la inmovilización del ADN a un sustrato no inhibe su capacidad de inducir la activación de neutrófilos. Además, determinamos que tanto la cloroquina como la wortmanina, agentes que inhiben la maduración endosómica, no afectan la activación de los neutrófilos por ADN bacteriano. Estos hallazgos sugieren que el ADN activa a los neutrófilos a través de un receptor de membrana. Los estudios que detallaré a continuación tuvieron por objeto identificar a este receptor.

En trabajos previos determinamos, mediante citometría de flujo, la capacidad del ADN de *E. coli* simple cadena de unirse a la superficie de los neutrófilos humanos ((153) y figura 24A). En la presente tesis, confirmamos estos resultados mediante MLC (figura 24B).

Con el fin de determinar si el receptor putativo para ADN es una proteína de membrana, evaluamos la unión del ADN-biot a neutrófilos previamente tratados con una concentración de proteinasa K, suficiente para degradar las proteínas de la superficie pero incapaz de afectar la integridad celular. La figura 24C muestra que tratamiento de las células con esta proteasa redujo en un 80% su capacidad de unir ADN-biot sugiriendo la participación de una proteína de superficie en el reconocimiento del ADN de *E. coli*. Para corroborar la efectividad del tratamiento con proteinasa K, evaluamos la expresión de CD16, una molécula localizada en la membrana plasmática que es clivada por esta proteasa. Conforme a lo esperado, el tratamiento enzimático también redujo marcadamente la expresión de CD16 (figura 24C). Por otra parte, evaluamos la capacidad de las células tratadas con proteinasa K de responder a la estimulación con ADN bacteriano. Los resultados obtenidos demostraron una relación directa entre la inhibición de la unión del ADN-biot a la superficie de neutrófilos tratados con proteinasa K y la susceptibilidad de estas células para ser activadas por ADN de *E. coli*. Como puede observarse en la figura 24D, la producción de IL-8 inducida por el ADN de *E. coli* se encontró marcadamente reducida en neutrófilos tratados con proteinasa K. Esta disminución no fue consecuencia de una reducción en la viabilidad celular ni en la capacidad de los neutrófilos de producir citoquinas, debido a que el tratamiento enzimático no modificó la respuesta de los neutrófilos al PMA, un

agonista cuyo mecanismo de acción no involucra la interacción con receptores de superficie, sino que penetra a través de la membrana plasmática y estimula a la célula activando a la proteína quinasa C.

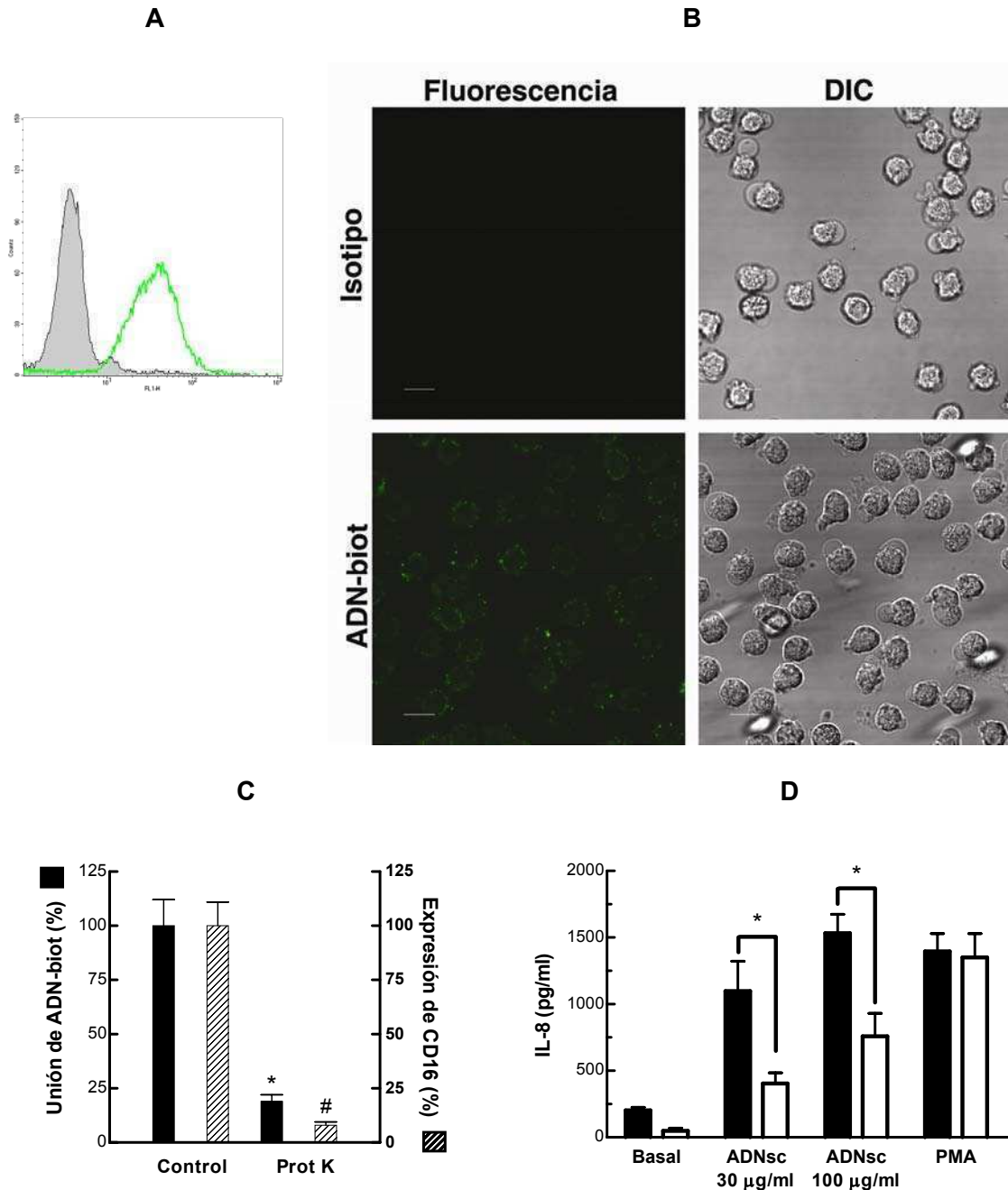


Figura 24: El ADN bacteriano se une a la superficie de los neutrófilos e induce la producción de IL-8 a través de un receptor proteico. Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia o ausencia de ADN-biot (60 µg/ml) por 30 min a 4°C. Luego fueron lavados y su unión fue revelada por el agregado de avidina-FITC (verde) mediante (A) citometría de flujo o (B) MLC. Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plapon 60x/1.42. (C) Los neutrófilos

(5×10^6 /ml) fueron tratados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron lavados 3 veces con PBS suplementado con 10 mg/ml de SAH y posteriormente se evaluó su capacidad de unir ADN-biot tal como se describió en (A) y el nivel de expresión del marcador CD16 utilizando un anticuerpo específico. Los resultados fueron expresados como porcentaje de unión de ADN-biot o porcentaje de expresión de CD16, respecto de los niveles exhibidos por células no tratadas con proteinasa K, considerados como 100%. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos. * $p < 0,01$ vs unión de ADN-biot en células no tratadas con proteinasa K, # $p < 0,01$ vs expresión de CD16 en células no tratadas con proteinasa K. (D) Los neutrófilos fueron tratados con vehículo (barras negras) o con proteinasa K (barras blancas) y luego fueron estimulados con 30 o 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de *E. coli* simple cadena o 10 ng/ml de PMA. Finalmente se determinó la IL-8 liberada a los sobrenadantes luego de cuatro horas de cultivo mediante ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos. * $p < 0,05$ vs la producción de IL-8 por células tratadas con vehículo.

Protocolo diseñado para la identificación del receptor de ADN en neutrófilos humanos

Considerando la naturaleza proteica del receptor putativo, diseñamos el protocolo experimental general, descrito en la figura 25, para purificarlo e identificarlo. El primer paso consistiría en purificar membrana plasmática de neutrófilos humanos e incubarla en presencia de moléculas que redujeran el pegado inespecífico de proteínas al ADN. Posteriormente, se incubarían las membranas con ADN biotinilado unido a perlas y se solubilizarían las proteínas mediante el empleo de detergentes. Luego, se eluirían las proteínas con capacidad de unir ADN y se someterían a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, para ser identificadas mediante espectrometría de masas.

Con el fin de optimizar cada una de las etapas más críticas de este protocolo nos propusimos determinar:

- 1) Las condiciones óptimas para la obtención de membrana plasmática de los neutrófilos
- 2) La existencia de alguna condición que condujera a los neutrófilos a expresar mayores niveles del receptor.
- 3) La identidad de la secuencia de ADN con mayor capacidad de unirse a la superficie de los neutrófilos y activarlos.
- 4) Las moléculas competidoras que se podrían emplear para evitar el pegado inespecífico de proteínas al ADN durante la purificación.

- 5) El método más adecuado para la elución de las proteínas unidas al ADN conjugado a las perlas.

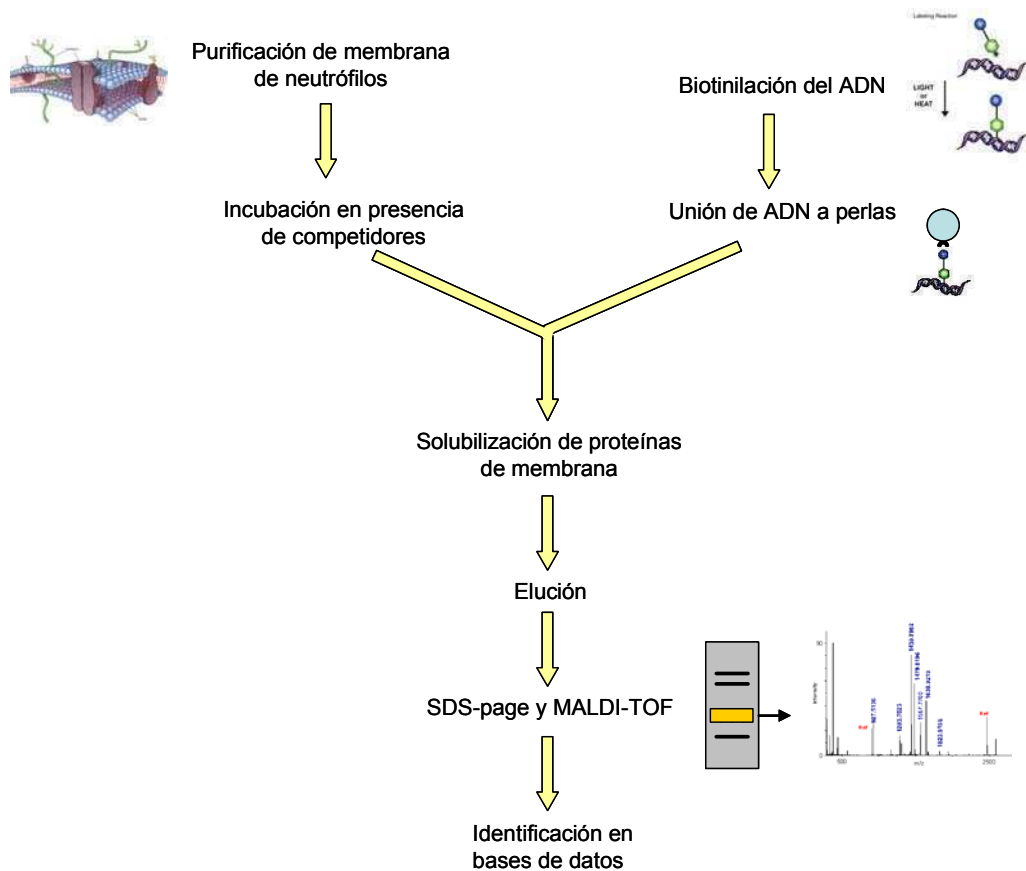


Figura 25: Esquema experimental de purificación e identificación del receptor de ADN presente en la superficie de los neutrófilos humanos.

Determinación de las condiciones óptimas para obtención de membrana plasmática del neutrófilo

Inicialmente comenzamos empleando métodos de disrupción celular por lisis mecánica con homogeneizador de Dounce o alternativamente, lisis hipotónica y congelamiento y descongelamiento. Sin embargo, estos métodos provocaban la ruptura de los gránulos y la liberación de las proteínas y enzimas en ellos contenidas, tal como pudo ser determinado mediante la evaluación de la actividad de mieloperoxidasa en las muestras de membranas obtenidas. Esto nos obligó a emplear un método de disrupción celular mediante cavitación por nitrógeno, que consiste en presurizar a las células bajo una atmósfera de N_2 en una bomba de disrupción celular, por un lapso de tiempo determinado. Cuando la presión aplicada y el tiempo son los

óptimos, la descompresión provoca la liberación del N₂ contenido en el interior de las células llevando a la ruptura de la membrana plasmática con la liberación de los núcleos, los gránulos y otras organelas intactos al medio extracelular. Por tal motivo, optimizamos estas condiciones, determinando que una presurización a 380 psi durante 7 minutos garantizaba la obtención de membrana plasmática con mínima ruptura de los gránulos. Esta condición constituye un aspecto fundamental a ser tenido en cuenta para el proceso de identificación del receptor, dado que de liberarse las proteínas catiónicas de los gránulos podrían unirse electrostáticamente al ADN, aún cuando no fuesen el receptor para el mismo, introduciendo resultados artefactuales. Además, las proteasas granulares podrían degradar parte de las proteínas liberadas, disminuyendo las chances de identificar al receptor.

Identificación de condiciones “*in vitro*” capaces de incrementar la expresión del receptor putativo para ADN

Con este objetivo, evaluamos si la estimulación de los neutrófilos con agonistas convencionales afecta su capacidad de unir ADN bacteriano. Los neutrófilos fueron estimulados alternativamente con dos quimioattractantes, FMLP o IL-8, o con PMA y luego se determinó la unión del ADN bacteriano empleando concentraciones saturantes de ADN-biot (120 µg/ml). Los resultados de estos experimentos, que formaron parte de mi tesis de licenciatura, indicaron que entre los agonistas evaluados el FMLP resultó ser el más potente. En línea con estos hallazgos previos, observamos que la estimulación de los neutrófilos con FMLP (5×10^{-9} M) durante 15 min a 37°C indujo un aumento de aproximadamente 4 veces en la unión del ADN-biot a la superficie celular en comparación con la observada en neutrófilos incubados en ausencia de FMLP (figuras 26A-B).

Por otra parte, los neutrófilos pretratados con FMLP exhibieron una capacidad incrementada para producir IL-8 en respuesta al ADN bacteriano (figura 26C), que en conjunto con otros hallazgos previos, sugirieron una relación directa entre la intensidad de la unión del ADN y el nivel de activación celular (153). Los resultados de la figura 26A y resultados previos (153), muestran que el incremento de la unión de ADN bacteriano en neutrófilos estimulados con FMLP se puede evidenciar, al menos, desde los 5 min post-estimulación, indicando que no depende de la síntesis *de novo* del

receptor putativo. Por ende, el aumento en la unión del ADN-biot podría deberse a un incremento de la expresión del receptor de ADN a partir de un *pool* preexistente presente en la membrana de gránulos que pasan a formar parte de la membrana plasmática debido a la exocitosis de los gránulos en respuesta a la estimulación con FMLP, o a la exposición de receptores ya presentes en la membrana pero enmascarados por otras moléculas en células en reposo.

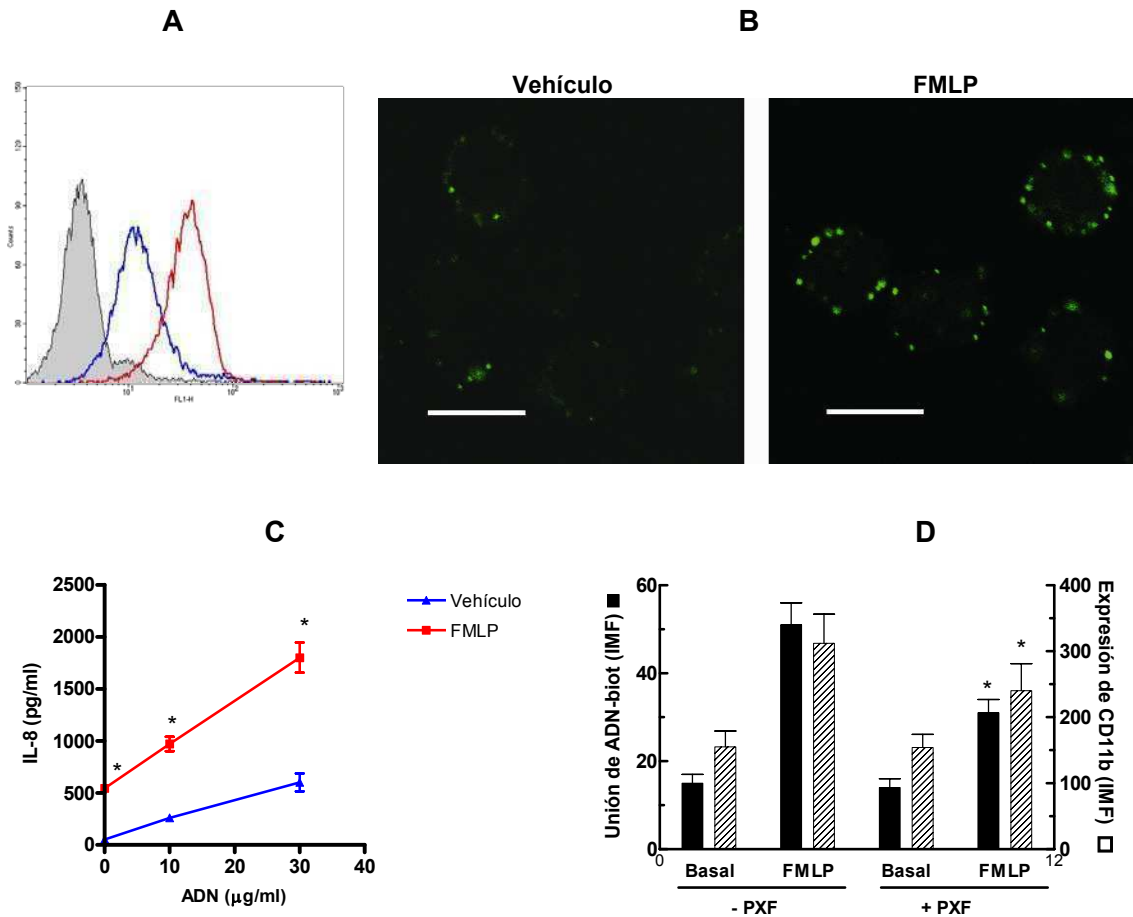


Figura 26: La activación de los neutrófilos con FMLP aumenta la expresión del receptor de ADN a expensas de un *pool* intracelular. (A) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron cultivados en presencia (línea roja) o ausencia (línea azul) de FMLP 5×10^{-9} M durante 15 min a 37°C y luego en ellos se analizó la unión del ADN bacteriano empleando $120 \mu\text{g/ml}$ de ADN-biot, por citometría de flujo. El histograma sombreado en gris representa la fluorescencia de células incubadas en ausencia de ADN-biot. (B) Imágenes de los neutrófilos tratados como en (A) por MLC. Se utilizó la lente de inmersión en aceite Plapon $60 \times / 1.42$. (C) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia o ausencia de FMLP 5×10^{-9} M durante 15 min a 37°C y luego fueron estimulados con las concentraciones indicadas de ADN de *E. coli* simple cadena durante 3 horas adicionales a 37°C . Luego, se determinó la concentración de IL-8 liberada al sobrenadante mediante ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos; $*p < 0,05$ vs la producción de IL-8 de células no estimuladas con FMLP. (D) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia o ausencia de PXF 5 mM y luego fueron

estimulados o no con FMLP 5×10^{-9} M durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se evaluó su capacidad de unir ADN-biot (eje izquierdo) y su expresión de CD11b (eje derecho) por citometría de flujo. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos; * $p < 0,05$ vs células incubadas en ausencia de PXF y estimuladas con FMLP.

Para distinguir entre estas alternativas, se pretrató a los neutrófilos con pentoxifilina (PXF, 5 mM), un derivado de la metilxantina capaz de inhibir la degranulación de los neutrófilos, y luego se los estimuló con FMLP durante 15 min a 37°C. Finalmente, se evaluó su capacidad de unir ADN-biot y la expresión de CD11b en la superficie celular. La evaluación de la expresión de CD11b tuvo por objeto determinar el grado de inhibición de la degranulación mediada por el pretratamiento con PXF, dado que este marcador también se expresa en la membrana de gránulos específicos, de gelatinasa y en vesículas secretorias, y sus niveles en membrana plasmática se incrementan tras la degranulación. Los resultados de la figura 26D indican que la PXF inhibió en niveles similares el aumento de la unión del ADN-biot (figura 26D, eje y izquierdo) y el aumento de la expresión de CD11b en neutrófilos tratados con FMLP (figura 26D, eje y derecho).

En conjunto, estos resultados sugieren que la estimulación de los neutrófilos con FMLP incrementa la expresión del receptor putativo para ADN a expensas de un *pool* intracelular de receptores. Este efecto podría ser aprovechado para la identificación del receptor, estimulando a los neutrófilos con FMLP previo a la aplicación del protocolo de aislamiento del receptor para aumentar la concentración específica del mismo en extractos de membrana de neutrófilos.

Identificación de la/s secuencia/s de ADN con mayor capacidad de unirse y activar a los neutrófilos

Nuestro siguiente objetivo fue determinar las secuencias o estructuras del ADN bacteriano capaces de unirse y activar a los neutrófilos humanos. El conocerlas nos permitiría optimizar la elección del ligando a inmovilizar a las perlas en el protocolo de purificación del receptor detallado en la figura 25.

El ADN genómico de *E. coli* tiene aproximadamente $4,6 \times 10^6$ pb lo cual dificulta la búsqueda de la/s secuencia/s o estructura/s capaces de unirse a la superficie de los

neutrófilos y gatillar su activación. Por este motivo decidimos determinar si el ADN plasmídico purificado a partir de *E. coli*, que tiene un tamaño del orden de los kpb, es capaz de unirse a la superficie celular e inducir la producción de IL-8 por neutrófilos humanos.

En experimentos donde evaluamos la unión del plásmido a la superficie de la célula aplicando la misma metodología descrita en la figura 24, observamos que el plásmido Bluescript II KS+ biotinilado se unió a la superficie de los neutrófilos con una avidéz similar a la del ADN de *E. coli* simple cadena (figura 27A). Asimismo, el ADN plasmídico fue capaz de inducir la producción de IL-8 por los neutrófilos (figura 27B).

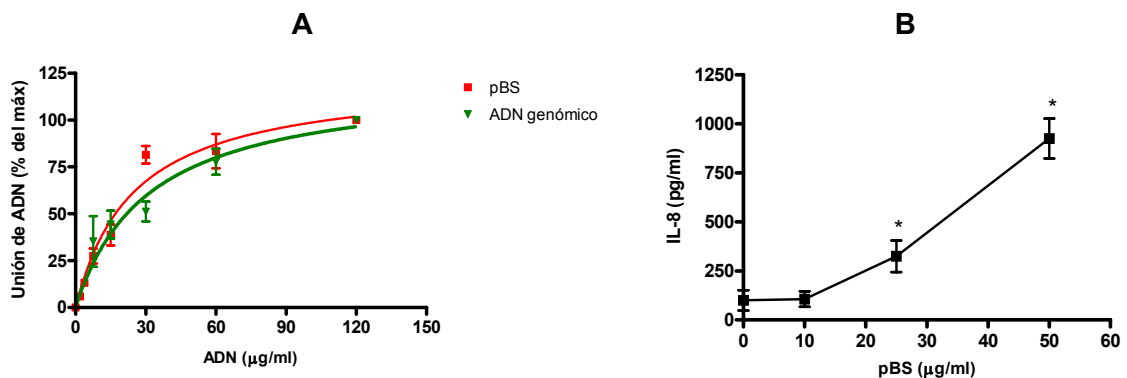


Figura 27: El plásmido Bluescript II KS+ se une a la superficie de los neutrófilos e induce su activación. (A) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de ADN-biot o de plásmido Bluescript II KS+ (pBS) biotinilado por 30 min a 4°C. Luego fueron lavados y la unión de los ADN fue revelada mediante el agregado de avidina-FITC por citometría de flujo. (B) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de plásmido Bluescript II KS+ durante 3 h a 37°C. Luego se evaluó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos; * $p < 0,05$ vs células incubadas en ausencia de plásmido.

Teniendo en cuenta estos resultados, procedimos a acotar la región del ADN plasmídico responsable de unirse y activar a los neutrófilos. En primer lugar, digerimos el plásmido con las enzimas de restricción de corte frecuente HpaII y/o HinP1I (figura 28A) y empleamos los productos de digestión para estimular a los neutrófilos. A pesar de que la digestión enzimática redujo levemente la producción de IL-8 inducida por el plásmido, los fragmentos siguieron siendo activos (Figura 28B).

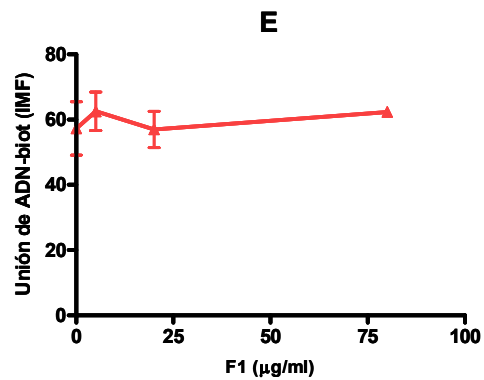
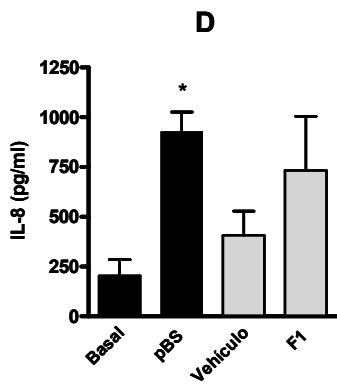
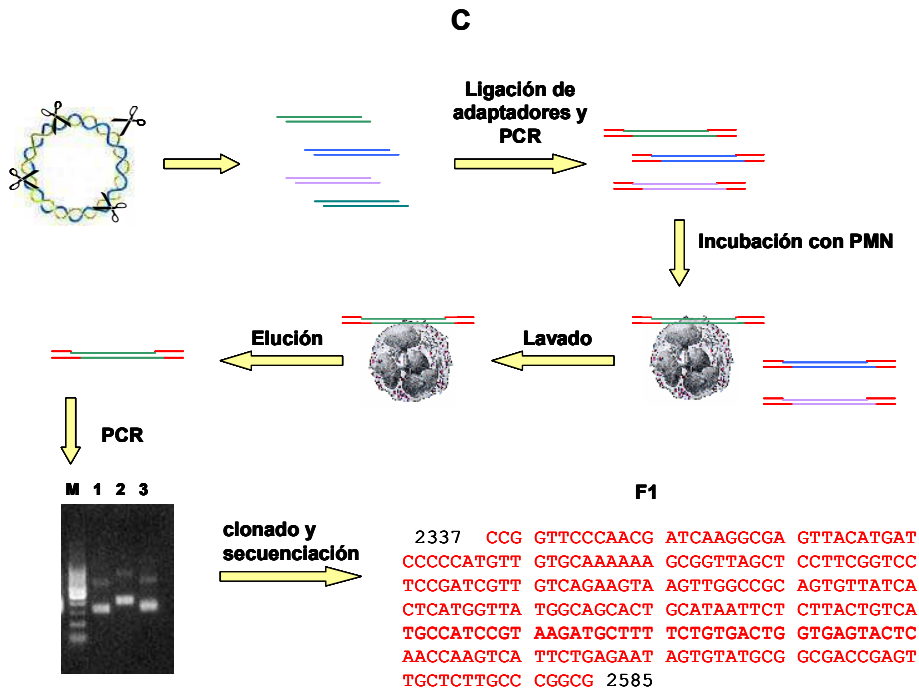
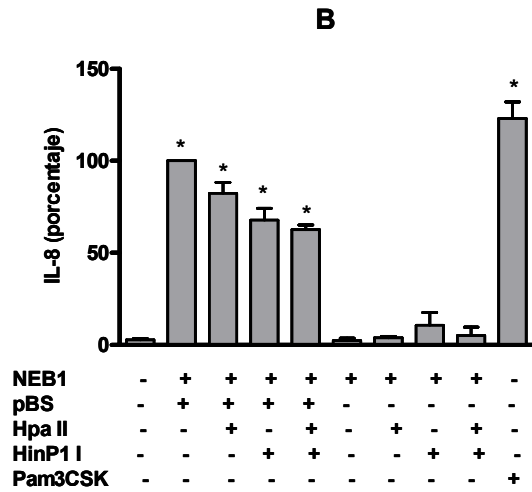
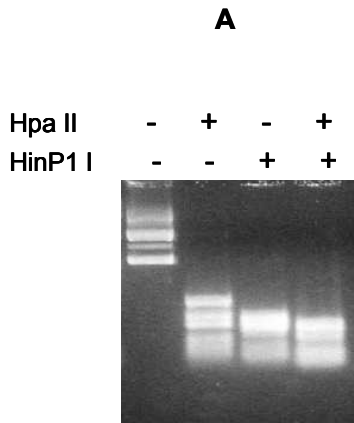


Figura 28: Identificación de un oligómero proveniente del plásmido Bluescript II KS+ con capacidad de unirse a la superficie de los neutrófilos. (A) El plásmido Bluescript II KS+ (calle 1) se digirió con las enzimas de restricción HpaII (calle 2), HinP1 I (calle 3), o ambas enzimas simultáneamente (calle 4), y luego fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1,5%. (B) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia 20 μ g/ml de plásmido Bluescript II KS+ (pBS), sus productos de degradación con enzimas de restricción, con las enzimas de restricción o con el buffer en el cual se digirió al plásmido, durante 3 h a 37°C. Luego se evaluó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs células incubadas con medio completo. (C) El plásmido Bluescript II KS+ fue digerido con las enzimas de restricción, luego se ligaron adaptadores y se seleccionaron los fragmentos con capacidad de unirse a la superficie de los neutrófilos; calle 1 (digerido con HpaII), calle 2 (digerido con HinP1 I) y calle 3 (digerido con ambas enzimas), calle M (marcador de peso de 100-1000 pb). Luego se clonaron estos fragmentos y se secuenciaron de acuerdo a lo detallado en materiales y métodos. (D) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia de 50 μ g/ml de plásmido Bluescript II KS+, del oligómero F1 o del vehículo en el que se encuentra resuspendido el oligómero F1 (conteniendo la mezcla de reacción de PCR) durante 3 h a 37°C. Luego se evaluó la producción de IL-8 por ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos; * $p < 0,05$ vs células incubadas en ausencia de ADN. (E) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados durante 20 min a 4°C en presencia de 0, 5, 20 u 80 μ g/ml del oligómero F1. Luego, fueron incubados por 30 min adicionales en presencia de 20 μ g/ml de ADN-biot y, luego de ser lavados, la unión de éste último fue revelada mediante el agregado de avidina-FITC por citometría de flujo. Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos.

Luego, se ligaron adaptadores a los fragmentos digeridos y se amplificaron por PCR. Estos productos de PCR se emplearon en ensayos de unión y los fragmentos que quedaron unidos a la superficie de los neutrófilos fueron eluidos con NaCl 1M y empleados en una segunda ronda de PCR, unión, elución (figura 28C). Finalmente, se eluyeron las bandas del gel, se clonaron y secuenciaron. Los tres oligómeros secuenciados se superponían casi completamente y correspondían a una secuencia de 255 pb, indicada en la figura 28C. Dicha secuencia, que se denominó F1, fue empleada para estimular a los neutrófilos. Los resultados que se desprenden de la figura 28D indican que F1 indujo un leve, pero no significativo aumento de la producción de IL-8 respecto de la inducida por el vehículo. Por otra parte, cuando se intentó bloquear la unión del ADN-biot con el oligómero F1, no se observaron diferencias respecto de las células incubadas sin competidor, aún empleando a F1 a una concentración 4 veces superior a la del ADN-biot (figura 28E). Estos hallazgos indicaron que, aún cuando F1 posee capacidad de unirse a los neutrófilos, carece de capacidad de competir la unión del ADN genómico al neutrófilo, razón por la cual, no representó una herramienta útil para emplearlo en la estrategia de identificación del receptor.

Los resultados de los hallazgos previos, nos condujeron a intentar determinar si alguna secuencia o estructura frecuente en el ADN bacteriano es la responsable de los efectos observados con el ADN genómico y plasmídico. En primer lugar, evaluamos si secuencias de ADN frecuentes en los genes bacterianos son capaces de activar a los neutrófilos (figura 29A). De este modo generamos oligonucleótidos de entre 20 y 50 nt conteniendo las siguientes secuencias:

- Caja -35: Secuencia consenso -35 de promotores bacterianos (TTGACA)
- Caja -10: Secuencia consenso de la caja de Pribnow de promotores bacterianos (TATAAT)
- SD: Secuencia de Shine-Dalgarno de inicio de la traducción (AGGAGG)
- Rho: Secuencias Rho independientes de terminación de la transcripción

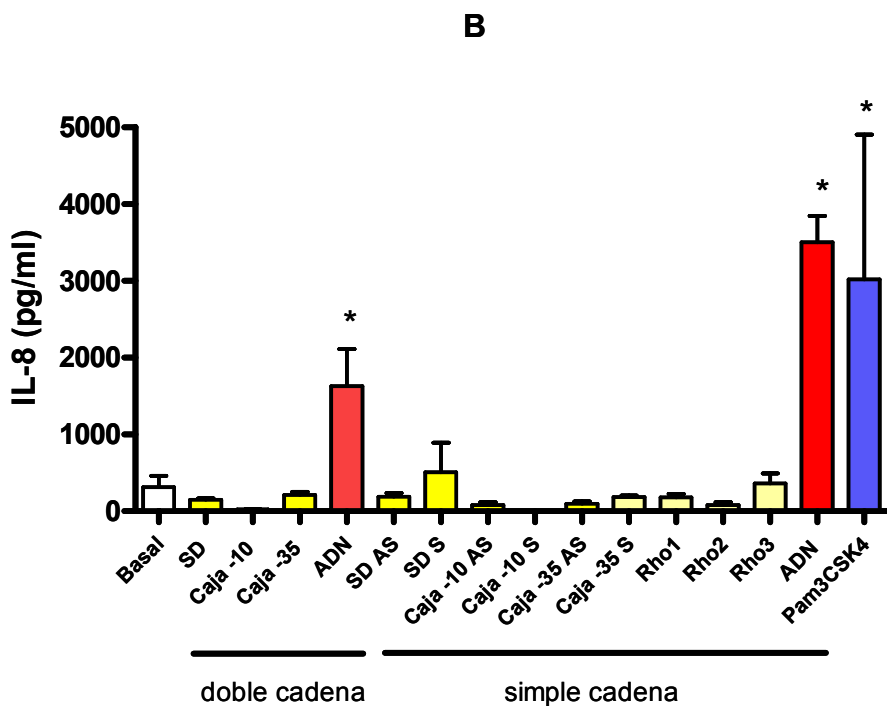
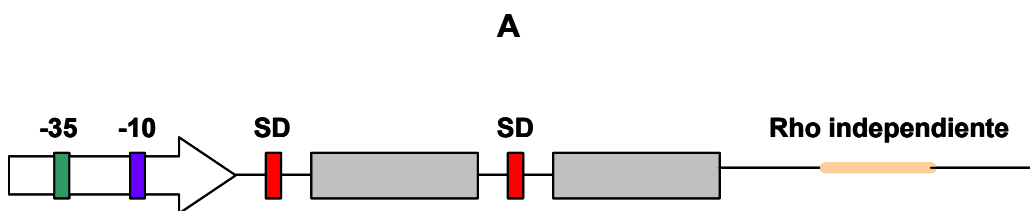


Figura 29: Respuesta de los neutrófilos a oligonucleótidos conteniendo secuencias frecuentes en genes bacterianos. (A) Esquema de un gen bacteriano con sus secuencias regulatorias: -35 (caja -35 TTGACA), -10 (caja -10 TATAAT), SD (secuencia de inicio de la traducción de Shine-Dalgarno), Rho independiente (secuencia terminadora de la transcripción independiente del factor Rho). (B) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia de 100 μ g/ml de los oligonucleótidos indicados, como doble cadena o simple cadena (S = secuencia sentido; AS = secuencia antisentido), 100 μ g/ml de ADN de *E. coli* o 500 ng/ml de Pam3CSK4 durante 3 h a 37°C. Luego, se evaluó la liberación de IL-8 en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos; * $p < 0,05$ vs la producción de IL-8 en células sin estimular.

Los resultados representados en la figura 29B muestran que las secuencias empleadas no fueron capaces de activar a los neutrófilos tanto en su forma doble cadena como simple cadena, a diferencia de lo que ocurre con el ADN de *E. coli*.

Hallazgos recientes del grupo de Shizuo Akira indicaron que la transfección de la molécula de ADN sintético poli(dA-dT)*poli(dT-dA), que presenta estructura de ADN-B, es un potente inductor de interferones de tipo I en diferentes tipos celulares, a diferencia del poli(dG-dC)*poli(dC-dG) que tiene mayor tendencia a formar estructuras de tipo Z (65). Esto nos motivó a evaluar si estas secuencias/estructuras de ADN son capaces de activar a los neutrófilos humanos. Los resultados indicados en la figura 30 muestran que ni el poli(dA-dT)*poli(dT-dA) ni el poli(dG-dC)-poli(dC-dG) inducen la producción de IL-8 por los neutrófilos, a diferencia del ADN genómico de *E. coli* doble cadena.

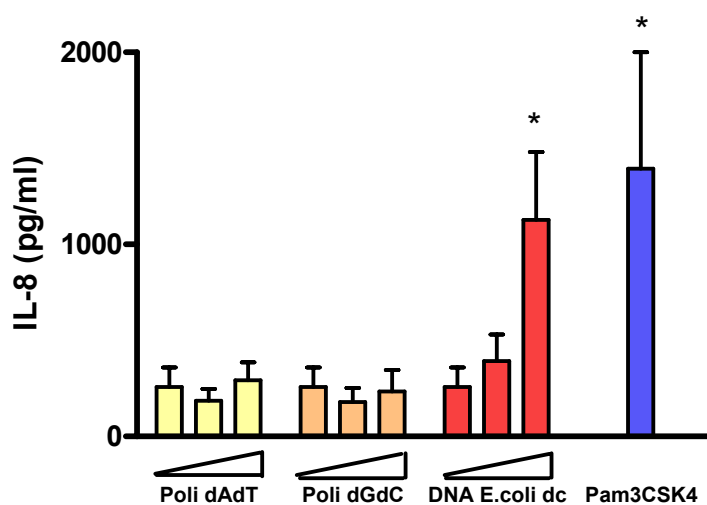


Figura 30: Estructuras de ADN capaces de activar a los neutrófilos humanos. Se incubaron los neutrófilos (5×10^6 /ml) en presencia de 0, 30 y 100 μ g/ml de poli(dA-dT)*poli(dT-dA), poli(dG-dC)*poli(dC-dG), ADN de *E. coli* o 500 ng/ml de Pam3CSK4 durante 3 h a 37°C. Luego, se evaluó la liberación de IL-8 en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 4 experimentos; * $p < 0,05$ vs la producción de IL-8 en células sin estimular.

Considerando que ninguna de las secuencias o estructuras evaluadas hasta el momento fueron capaces de inducir la producción de IL-8 por los neutrófilos y de inhibir la unión del ADN-biot, el mejor ligando del que disponíamos para unir a las perlas magnéticas a fin de aplicar la estrategia de identificación del receptor descrita en la figura 25, era el mismo ADN genómico de *E. coli*. Por ende, nuestro siguiente objetivo fue determinar la longitud óptima del mismo que pudiera unirse y activar a los neutrófilos.

En primer lugar, digerimos parcialmente el ADN de *E. coli* con DNasa I por diferentes períodos de tiempo a fin de obtener ADN de distintas longitudes. Luego, dializamos y cuantificamos los productos, y evaluamos el tamaño de los fragmentos obtenidos de cada digestión por comparación con marcadores de ADN de tamaño definido, en electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 0,8% (para los fragmentos obtenidos luego de 0, 2 o 5 min de digestión) o en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 5% (para los fragmentos obtenidos luego de más de 20 min de digestión). Por simplicidad, sólo se muestra el patrón de degradación del ADN en un gel de agarosa (figura 31A). Luego, empleamos estos fragmentos de ADN de diferentes tamaños en experimentos de competición para evaluar su capacidad de prevenir la unión del ADN-biot no digerido a la superficie de los neutrófilos. En la figura 31B puede observarse que las muestras que contuvieron fragmentos de entre 30 y 170 nt, aún utilizados a una concentración 10 veces superior a la del ADN-biot, no lograron inhibir su unión a la superficie de los neutrófilos. Sorpresivamente, las muestras de ADN conteniendo fragmentos de entre 50 y 390 nt aumentaron, aunque no significativamente, la unión del ADN-biot. En contraste, fragmentos de entre 290 y 6500 nt, empleados 10 veces en exceso, redujeron la unión del ADN-biot en un 60%. Si se tiene en cuenta que las muestras conteniendo fragmentos de entre 90 y 930 nt no fueron capaces de reducir la unión del ADN-biot, estos resultados sugieren que se requiere que el ADN presente una longitud mínima >930 nt a fin de desplazar la unión del ADN no digerido (figura 31B).

Luego, determinamos si el tamaño del ADN bacteriano afectaba su capacidad de gatillar la activación celular. Para ello, evaluamos la producción de IL-8 inducida por las muestras de ADN de diferente longitud. Como puede observarse en la figura 31C sólo las muestras de ADN conteniendo fragmentos de más de 170 nt indujeron una producción significativa de IL-8. Merece destacarse, sin embargo, que las muestras

enriquecidas en fragmentos de 290-6500 nt y 720-10800 evidenciaron una capacidad marcadamente superior de inducir la producción de esta quimiocina. Estos hallazgos, en conjunto con los detallados en el párrafo precedente, sugieren que aquellos fragmentos >930 nt son capaces de unirse eficientemente a los neutrófilos y disparar su activación, aún cuando, oligómeros de un tamaño menor presentan capacidad para activar a estas células.

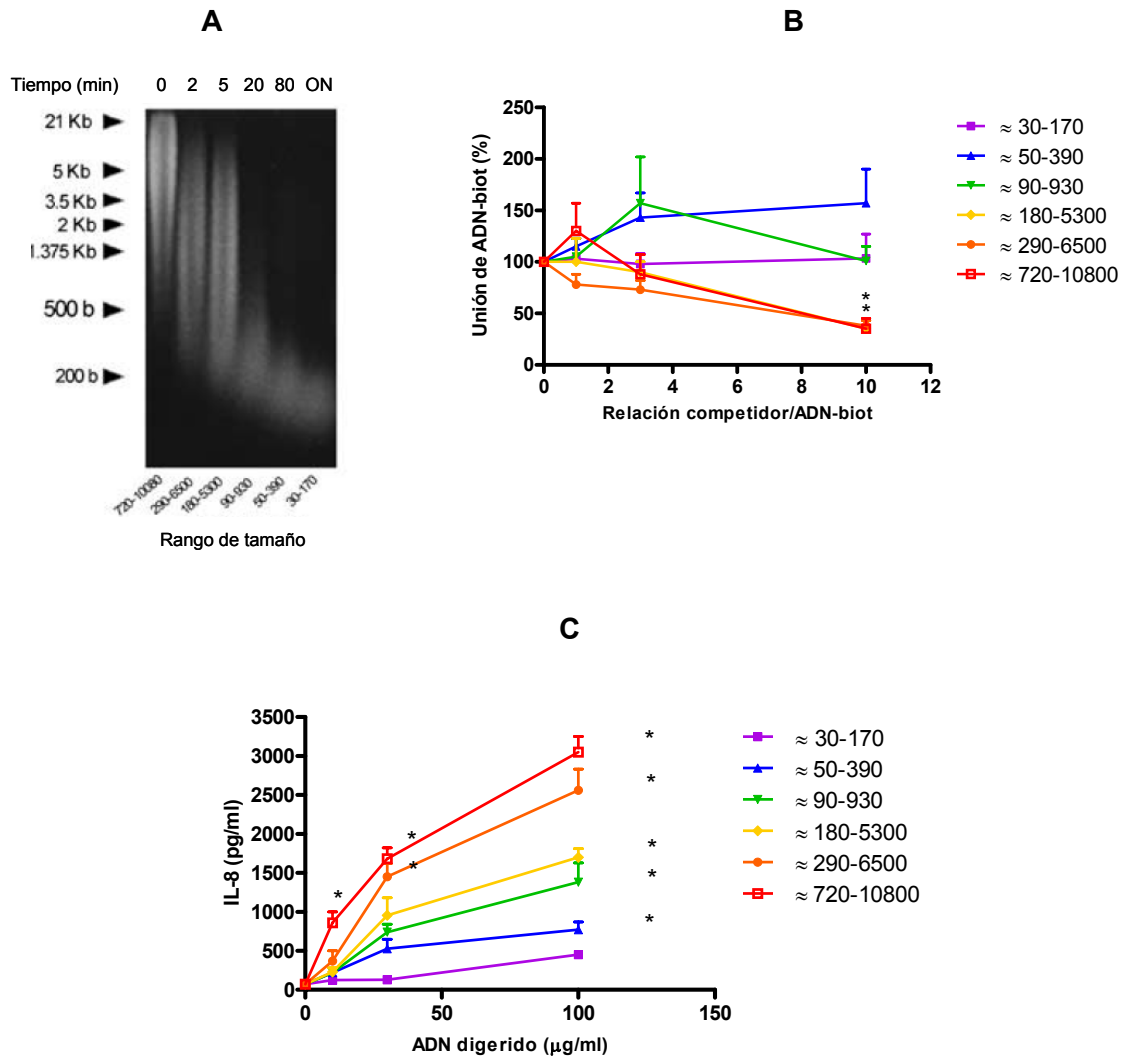


Figura 31: Identificación de la longitud mínima de ADN capaz de unirse a la superficie de los neutrófilos y activarlos. (A) Electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa 0,8% de ADN de *E. coli* tratado con DNasa RQ1 por los tiempos indicados. (B) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados durante 20 min a 4°C en presencia o ausencia de 60 (relación competidor/ADN-biot: 1), 180 (relación competidor/ADN-biot: 3) o 600 µg/ml (relación competidor/ADN-biot: 10) de fragmentos no marcados obtenidos luego de digestión de ADN de *E. coli* con DNasa. Luego, los neutrófilos fueron incubados por 30 min adicionales en presencia de 60 µg/ml de ADN-biot, lavados y el ADN-biot unido a la superficie del neutrófilo fue revelada por citometría de flujo empleando avidina-FITC. Los resultados están expresados como

porcentaje de la unión de ADN-biot observada en la ausencia de competidores considerada como 100%. Los datos representan la media \pm ES de 6 experimentos. * $p < 0,05$ vs unión de ADN-biot en ausencia de competidores. (C) Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados durante 3 h a 37°C en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de los fragmentos de ADN bacteriano obtenidos luego de la digestión con DNasa. Luego, se evaluó la liberación de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los datos representan la media \pm ES de 6 experimentos evaluados por triplicado. * $p < 0,05$ vs producción de IL-8 basal.

En base a estos resultados determinamos que los fragmentos de ADN que tendríamos que unir a las perlas magnéticas con el objeto de identificar al receptor deberían tener 1-2 kb aproximadamente, de manera que fuesen capaces de unirse al receptor pero que no fuesen demasiado grandes como para fragmentarse y liberarse de las perlas magnéticas durante el protocolo de purificación.

Identificación de polianiones incapaces de desplazar la unión del ADN bacteriano a la superficie del neutrófilo a ser empleados para reducir la unión inespecífica del ADN en los experimentos de purificación del receptor

Los neutrófilos contienen una gran cantidad de proteínas catiónicas capaces de unirse a polianiones como ácidos nucleicos y heparina, entre otros. Por este motivo, un factor importante a tener en cuenta en un protocolo de purificación de una proteína de unión a DNA bacteriano en neutrófilos es la utilización de moléculas capaces de reducir el pegado inespecífico del ADN-biot a proteínas que unen ADN exclusivamente por su carga eléctrica intrínseca. En estos estudios evaluamos la habilidad de la poliA, del ARNt de levaduras, del oligonucleótido fosfodiéster CpG2006 (capaz de inducir la maduración células B pero no la activación de los neutrófilos), del oligonucleótido invertido GpC 2006K y del ADN humano de inhibir la unión del ADN-biot a los neutrófilos. Los resultados, mostrados en la figura 32, indican que ni poliA ni ARNt de levaduras inhibieron la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos aún empleados en concentraciones diez veces superiores a la del ADN-biot. Por otra parte, los ODN 2006 y 2006K inhibieron levemente, aunque no significativamente, la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos humanos. Por el contrario, el ADN humano a pesar de no ser capaz de gatillar la activación de los neutrófilos, inhibió en más de un 50% dicha unión. De acuerdo a lo esperado, el ADN de *E. coli* (no biotinilado) empleado a concentraciones diez veces superiores logró desplazar la

unión del ADN-biot en más de un 80%. En conjunto estos resultados indicaron que tanto la poliA como ARNt de levaduras podrían ser utilizados para reducir el pegado inespecífico del ADN-biot a proteínas catiónicas del neutrófilo pues no compiten por la unión específica del receptor al ADN bacteriano.

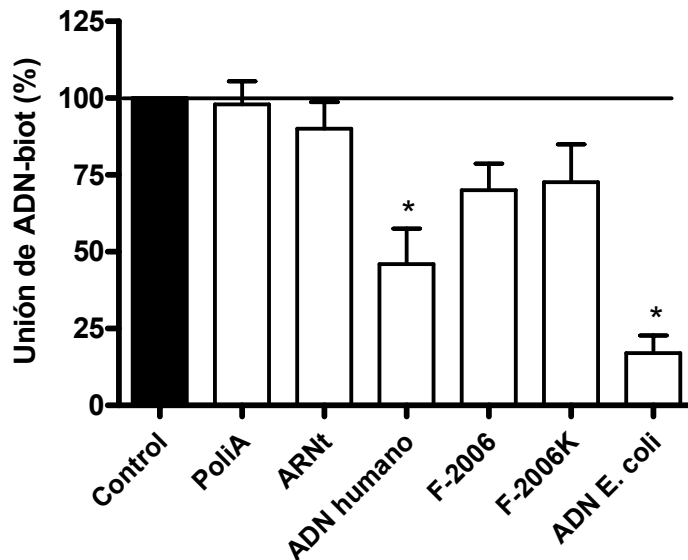


Figura 32: Capacidad de diferentes ácidos nucleicos de inhibir la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos. Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados durante 20 min a 4°C en presencia o ausencia de 600 μ g/ml de Poliadenosina (PoliA), ARNt de levadura (ARNt), ADN genómico de placenta humana (ADN humano), oligonucleótidos fosfodiésteres CpG 2006 (F-2006) o GpC 2006K (F-2006K) o ADN genómico de *E. coli* simple cadena (ADN *E. coli*). Luego, los neutrófilos fueron incubados por 30 min adicionales en presencia de 60 μ g/ml de ADN-biot, lavados y la unión del ADN-biot revelada mediante citometría de flujo empleando avidina-FITC. Los resultados están expresados como porcentaje de la unión del ADN-biot observada en la ausencia de competidores, la cual fue considerada como 100%. Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos. * $p < 0,05$ vs unión de ADN-biot en ausencia de competidores.

Disociación de la unión del ADN-biot de la superficie de los neutrófilos

Nuestro siguiente objetivo consistió en determinar las condiciones más adecuadas para disociar la unión del ADN-biot a las proteínas de superficie del neutrófilo. Esta información nos resultaba necesaria en el protocolo de aislamiento del receptor para ADN (figura 25) a fin de poder eluir a las proteínas que se unieran al ADN para luego someterlas a electroforesis.

Debido a la capacidad del ADN *E. coli* de desplazar la unión del ADN-biot a la superficie del neutrófilo, el mismo podría ser empleado en el paso de elución. Sin embargo, para disociar eficientemente a las proteínas unidas al ADN asociado a las perlas magnéticas, debería estar presente en concentraciones muy elevadas tornando viscoso el medio de elución. Por otra parte, el ADN podría luego interferir con la electroforesis de las proteínas eluidas, en la tinción con plata del gel y en la espectrometría de masas.

Es conocido que las interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas se ven marcadamente afectadas por (1) altas concentraciones de sales que pueden apantallar la carga negativa de los fosfatos y (2) por el pH ácido pues puede inducir la protonación de los residuos de los aminoácidos de las proteínas y, en menor medida, los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. Por este motivo, evaluamos la capacidad de una solución concentrada de cloruro de sodio o de un tampón con bajo pH para disociar el ADN-biot unido a la superficie de los neutrófilos. Las soluciones de alta molaridad de NaCl desplazaron el ADN-biot previamente unido a los neutrófilos, observándose un 50% de elución a una concentración de 0,5 M de NaCl (figura 33A y 33B). Por el contrario, un tampón de citrato pH 3 fue incapaz de eluir el ADN unido.

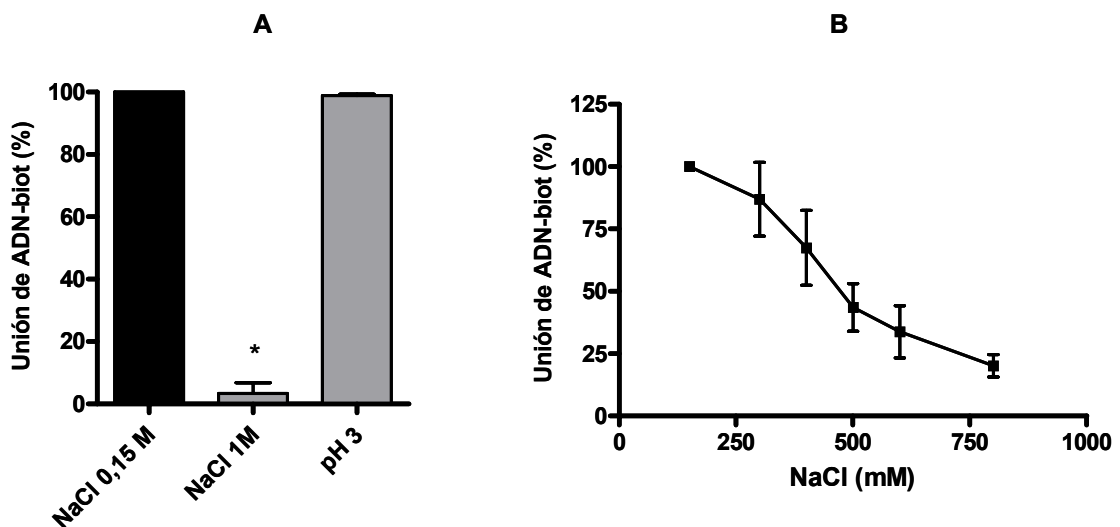


Figura 33: Disociación de la unión del ADN-biot de la superficie de los neutrófilos. Los neutrófilos (5×10^6 /ml) fueron incubados en presencia de 60 μ g/ml de ADN-biot durante 30 min a 4°C. Luego fueron lavados e incubados con soluciones de NaCl pH7 de distinta molaridad o tampón citrato pH 3 a 4°C durante 2 minutos. Luego fueron lavados y la unión del ADN-biot a la superficie celular fue revelada mediante citometría de flujo empleando avidina-FITC. Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos.* $p < 0,05$ vs tratado con NaCl 0,15 M pH 7.

Identificación de proteínas de la superficie del neutrófilo con capacidad de unirse al ADN bacteriano

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos realizamos los ensayos de purificación del receptor de ADN empleando:

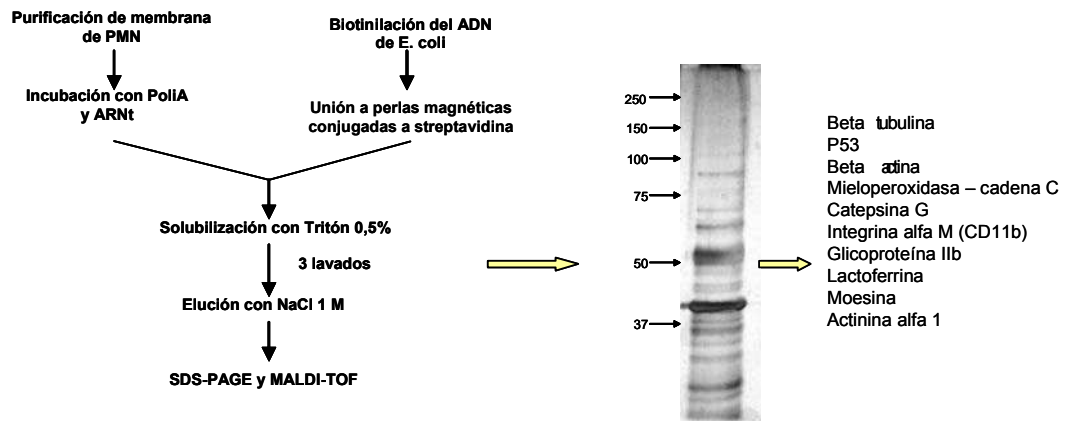
- 1) Neutrófilos estimulados o no con FMLP (en este caso para aumentar la concentración de receptores de ADN en la preparación de membrana).
- 2) ADN de *E. coli* de longitud entre 1 y 2 kb para unir a las perlas magnéticas.
- 3) poliA y ARNt de levaduras como competidores para disminuir la unión inespecífica de proteínas catiónicas al ADN.
- 4) Cloruro de sodio 1M para eluir las proteínas del ADN.

En base a estas consideraciones se diseñó el protocolo indicado en la figura 34A en donde la solubilización de las proteínas de membrana se efectuó luego de la incubación de las membranas con el ADN unido a las perlas magnéticas de modo de reducir la posible interferencia de los detergentes en la interacción ADN-receptor. Empleando esta estrategia se identificaron un gran cantidad de proteínas (figura 34A) muchas de las cuales resultaron ser proteínas de citoesqueleto, un hecho que sugiere que la solubilización de las membranas fue incompleta arrastrando otras proteínas que co-purificaron con el receptor. Por otra parte, también se identificaron varias proteínas catiónicas de los gránulos del neutrófilo sugiriendo que la ruptura celular por cavitación no impidió por completo la liberación de proteínas de los gránulos, las cuales pudieron unirse al ADN inmovilizado a las perlas magnéticas.

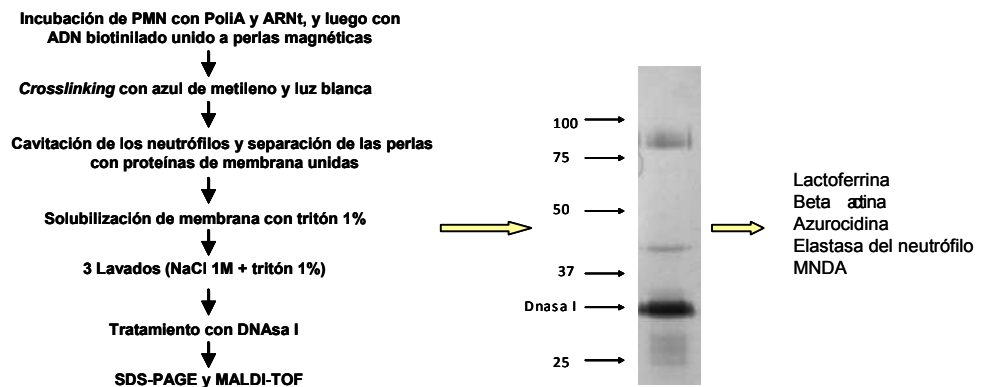
Por estos motivos, se decidió modificar la estrategia experimental a emplear con el fin de evitar la unión de proteínas del citoesqueleto y del interior celular al ADN conjugado a las perlas magnéticas. El nuevo protocolo (figura 34B) involucró la incubación de los neutrófilos con las perlas magnéticas con el ADN-biot asociado, y luego el tratamiento de esta muestra con azul de metileno en presencia de luz blanca, a fin de establecer una unión covalente entre el ADN y las proteínas a las cuales se había unido previamente. Posteriormente, incluyó un paso de cavitación celular y separación magnética del ADN con los fragmentos de membrana unidos. En este caso, la solubilización de las proteínas se realizó con una concentración mayor de tritón X-100 debido a la naturaleza covalente de la unión ADN-receptor. Del mismo

modo, se aumentó la fuerza iónica en los pasos de lavado de manera de disociar proteínas catiónicas de los gránulos que se hubieran unido al ADN luego de la ruptura celular. Finalmente las proteínas unidas covalentemente al ADN fueron liberadas mediante incubación de las muestras en presencia de DNasa I.

A) Estrategia 1



B) Estrategia 2



C) Estrategia 3

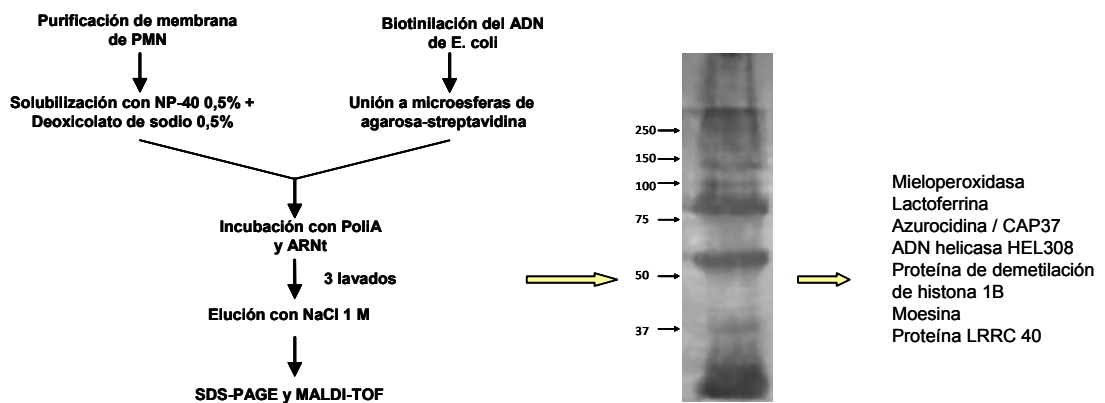


Figura 34: Identificación de proteínas del neutrófilo con capacidad de unir ADN bacteriano. Los esquemas experimentales han sido detallados en materiales y métodos. Para cada estrategia se muestra un gel representativo de 2-3 realizados y las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas empleando dicha estrategia.

Cabe destacar que la eficiencia del azul de metileno para unir covalentemente el ADN a la superficie del neutrófilo, fue evidenciada por el hecho que luego del tratamiento el 70% del ADN unido no pudo ser eluido por NaCl 1M a diferencia de lo que ocurrió en neutrófilos incubados en ausencia de azul de metileno (datos no mostrados). También es importante señalar que el tratamiento con azul de metileno no afecta a la biotina unida al ADN a diferencia de los protocolos que emplean formaldehído como agente para generar la unión covalente.

Siguiendo el esquema experimental recién detallado, se identificaron las proteínas lactoferrina, beta-actina, azurocidina, elastasa y MNDA (figura 34B). La literatura señala que en todos los casos se trata de proteínas de localización intracelular. Esto sugiere que la estrategia empleada podría no haber sido eficiente, sospechamos que debido a un escaso contacto entre las perlas magnéticas y los neutrófilos intactos. De todos modos, los resultados obtenidos resultan de interés ya que MNDA, por sus características (ver abajo) podría constituir un receptor intracelular para ADN.

Los resultados anteriores nos llevaron a diseñar una tercera estrategia experimental, en la que se incubaron las proteínas de membrana de los neutrófilos, previamente solubilizadas con NP-40 0,5% y deoxicolato de sodio 0,5%, con ADN unido a perlas de agarosa-streptavidina, las cuales exhiben mayor capacidad de unión del ADN que las perlas magnéticas. Posteriormente, las proteínas unidas fueron disociadas con NaCl 1M, separadas por electroforesis e identificadas por MALDI-TOF (figura 34C). Este esquema experimental nos permitió identificar a las siguientes proteínas: MPO, lactoferrina, azurocidina / CAP37, al receptor para Inositol 1,4,5-trisfosfato receptor tipo 3, a la helicasa de ADN HEL308, a la proteína de demetilación de histonas 1B, a la moesina y a la proteína LRRC 40.

Evaluación de las proteínas identificadas como posibles receptores de superficie para ADN bacteriano

A continuación, analizamos las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas, de modo de determinar si alguna de ellas era compatible con un receptor de ADN bacteriano presente en los neutrófilos. Para ello, nos apoyamos en evidencias bibliográficas y empleamos diversos programas bioinformáticos con el fin de reducir el número de proteínas a analizar experimentalmente. Los criterios considerados para este objetivo fueron:

- La localización subcelular de las proteínas identificadas: Nosotros esperamos que el receptor para ADN sea una proteína periférica o integral de membrana.
- La presencia de dominios de unión a ADN en las proteínas identificadas.
- Los tipos celulares en los que la proteína identificada es expresada, teniendo en cuenta que el ADN-biot se une a la superficie de neutrófilos y monocitos, pero no a los linfocitos (figura 35).
- La presencia de un dominio TIR o LRR en las proteínas identificadas por MALDI o, en su defecto, que se tratase de una proteína descrita como asociada a proteínas con dominio TIR. Este criterio se sustenta en hallazgos previos de nuestro grupo que demostraron que en neutrófilos, la respuesta a ADN bacteriano involucra la participación de MyD88, una molécula que suele ser reclutada cuando los TLR o los receptores de IL-1 e IL-18 son activados.

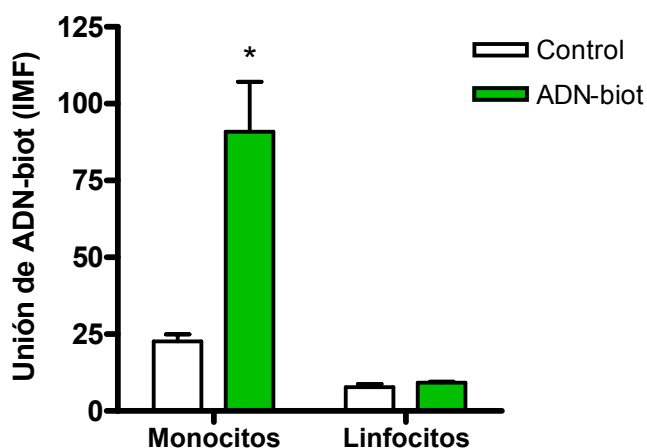


Figura 35: El ADN bacteriano se une a la superficie de los monocitos pero no de los linfocitos. Se incubaron 5×10^5 células mononucleares en presencia de $50 \mu\text{g/ml}$ de ADN-biot y luego se reveló la unión de acuerdo a lo previamente descrito. Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs control sin ADN-biot.

La tabla 4 contiene el resumen de la descripción del análisis realizado para cada una de las proteínas identificadas mediante las tres estrategias empleadas. La única proteína de las identificadas por MALDI que cumple con los cuatro criterios mencionados es la cadena alfa M o CD11b. Esta proteína es una de las subunidades que, junto con CD18, conforman la integrina Mac-1, molécula que se encuentra localizada en la membrana plasmática y en la membrana de vesículas secretorias, gránulos de gelatinasa y gránulos secundarios de los neutrófilos. Esta integrina incrementa su expresión en superficie como consecuencia de la activación celular. A su vez se expresa en monocitos, macrófagos y células dendríticas, pero no en linfocitos, correlacionando con nuestras observaciones indicando que los linfocitos son incapaces de unir ADN. De hecho, Benimetskaya y colaboradores demostraron que Mac-1 (CD11b/CD18) es una proteína capaz de unir oligodeoxinucleótidos con esqueleto fosforotioato en neutrófilos humanos (94). Por otra parte, Shi y colaboradores comprobaron que Mac-1 tiene la capacidad de interactuar físicamente con IRAK-1 y de activar NF- κ B y AP-1 a través de TRAF6-TAK1 (154) lo cual concuerda con resultados previos de nuestro grupo que indican que el ADN bacteriano gatilla esta vía de señalización celular (88).

Proteína	A	B	C	D	Nº
Beta-tubulina	citósol	---	Constitutiva	No presenta	0
p53	Citósol/núcleo/ER	Une ADN	Baja expresión en neutrófilos	No presenta	1
Beta-actina	citósol	---	Constitutiva	No presenta	0
Mieloperoxidasa	Gránulos azurófilos	Proteína catiónica con capacidad de unirse al ADN	Alta expresión en neutrófilos	No presenta	2
Catepsina G	Gránulos azurófilos	Proteína catiónica con capacidad de unirse al ADN	Alta expresión en neutrófilos	No presenta	2
Integrina alfa M (CD11b)	Membrana plasm. y de gránulos	Puede unir ODNs	Expresión en neutrófilos y monocitos	Activa IRAK-1	4
Glicoproteína IIb	Membrana plasm.	---	Expresión en plaquetas	No presenta	1
Lactoferrina	Gránulos secundarios	Une ADN con alta afinidad	Alta expresión en neutrófilos	No presenta	2
Moesina	Citósol	Puede unir ADN plasmídico y ODNs	Expresión en glóbulos blancos	Interacciona con TLR4	2
Actinina-alfa 1	citósol	---	Constitutiva	No presenta	0
Azurocidina	Gránulos azurófilos	No detectado	Alta expresión en neutrófilos	No presenta	1
Elastasa del neutrófilo	Gránulos azurófilos	Proteína catiónica con capacidad de unirse al ADN	Alta expresión en neutrófilos	No presenta	2
MNDA	Citósol / núcleo	Une ADN	Expresión en neutrófilos y baja en linfocitos	No presenta	2
ADN helicasa HEL308	Citósol / núcleo	Une ADN	Desconocida	No presenta	1
Proteína de demetilación de histona 1B	Núcleo	Une ADN	Expresión en varios tipos celulares	No presenta	1
Proteína LRRC 40	Citósol / núcleo	No detectado	Expresión en varios tipos celulares	Contiene 21 LRR	1

Tabla 4: Proteínas del neutrófilo que unen ADN bacteriano identificadas mediante MALDI-TOF. (A) Localización subcelular, (B) Capacidad de unir ADN, (C) Tipos celulares donde se expresa; (D) Presencia de dominios TIR, LRR o capacidad de interactuar con proteínas con dominio TIR. La última columna indica el número de condiciones (A-D) que se satisfacen.

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar si CD11b cumple un rol en la unión al ADN y en la respuesta de los neutrófilos al mismo. Con este fin, empleamos neutrófilos provenientes de un paciente con deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo I (LAD1), enfermedad muy poco frecuente, caracterizada por una expresión muy reducida de Mac-1 en la superficie celular. Los neutrófilos provenientes del paciente deficiente presentaron una expresión de CD11b y CD18 menor al 2% respecto de la un dador normal (figura 36A y 36B).

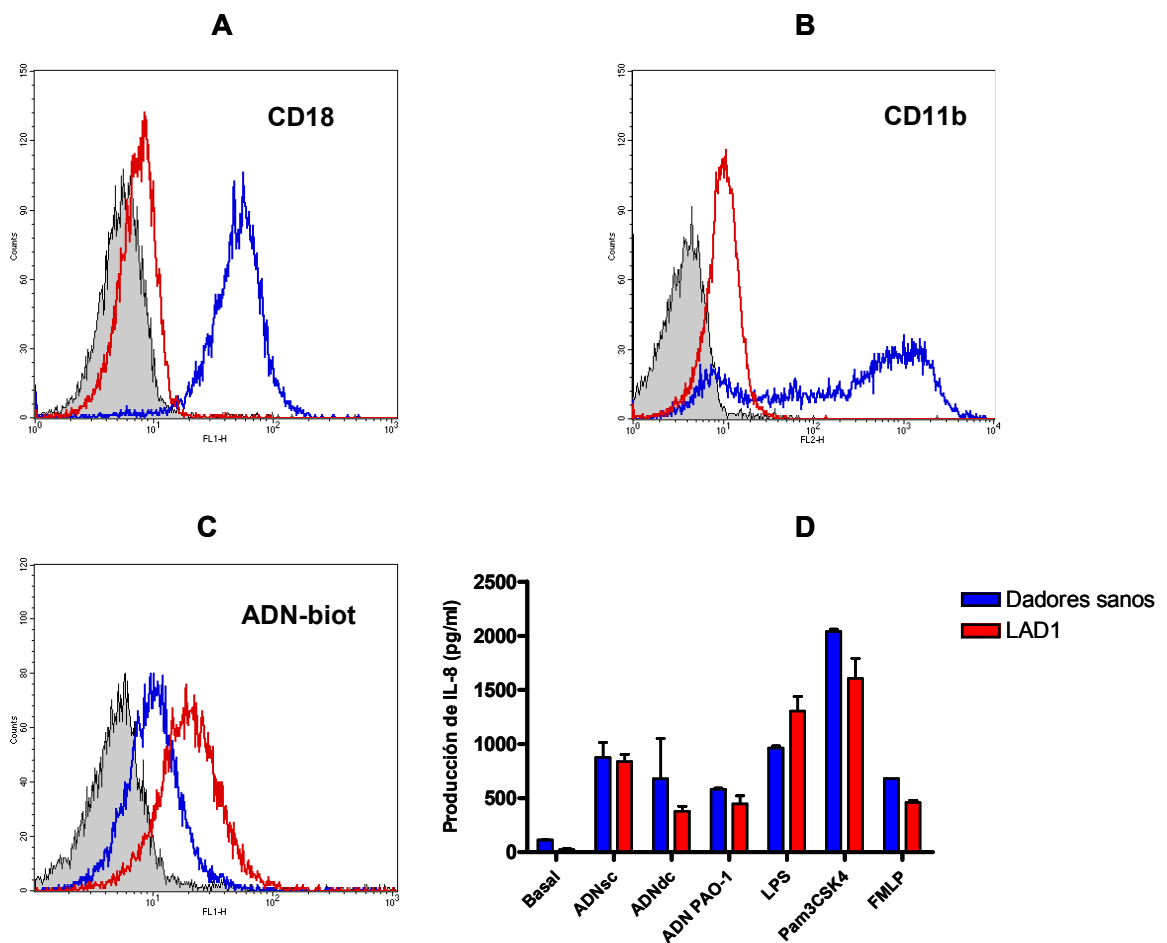


Figura 36: Los neutrófilos de pacientes deficientes en CD11b unen y responden al ADN bacteriano. Los neutrófilos de un paciente LAD1 y de tres dadores sanos fueron incubados con anticuerpos (A) anti-CD11b conjugado a PE o (B) anti-CD18 conjugado a FITC y luego la unión de los mismos fue revelada por citometría de flujo. El histograma gris corresponde al control de isotipo, la línea azul a la expresión en neutrófilos de un dador sano representativo y la línea roja a la expresión en los neutrófilos del paciente LAD1. (C) Los neutrófilos de un paciente LAD1 y de tres dadores normales fueron incubados en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN-biot durante 20 min a 4°C. Luego la unión de avidina-FITC fue revelada por citometría de flujo. El histograma gris corresponde a neutrófilos incubados con avidina-FITC en ausencia de ADN-biot, la línea azul corresponde a la unión de ADN-biot en neutrófilos de un dador normal representativo y la línea roja a la unión del ADN-biot a los neutrófilos del paciente LAD1. (D) Se estimuló a los neutrófilos (5×10^6 células/ml) en medio completo en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN genómico

de *E. coli* simple cadena o doble cadena, 100 µg/ml de ADN genómico doble cadena de la cepa PAO-1 de *P. aeruginosa*, 500 ng/ml de LPS, 500 ng/ml de Pam3CSK4 o FMLP 10^{-8} M durante 3 h a 37°C. Luego se evaluó la producción de IL-8 en el sobrenadante por ELISA. Los datos representan la media ± ES de 3 dadores normales y una paciente LAD1 evaluado por triplicado.

En estos neutrófilos evaluamos su capacidad de unir ADN-biot y de responder a ADN bacteriano. Como puede observarse en la figura 36C, los neutrófilos del paciente LAD1 fueron capaces de unir ADN bacteriano en niveles superiores a los de donantes sanos. Este hecho podría deberse a que los neutrófilos LAD1 presenten un mayor nivel de activación basal como consecuencia de las infecciones severas y recurrentes que aquejan a estos pacientes. Por otra parte, la producción de IL-8 por neutrófilos del paciente LAD1 fue similar a la observada en neutrófilos de dadores normales tanto en respuesta a ADN de *E. coli* simple cadena como doble cadena así como también en respuesta al ADN doble cadena de *P. aeruginosa* (figura 36D). Estos resultados, junto con los resultados previos de nuestro grupo que demostraron que ni el fibrinógeno soluble ni un fragmento Fab anti-CD18 humano inhibieron la respuesta al ADN de *E.coli*, (62) indican que CD11b no constituye el receptor de los neutrófilos para ADN bacteriano.

De las proteínas restantes identificadas por espectrometría de masas, ninguna cumple con tres de las condiciones establecidas y seis proteínas cumplen con dos de las mismas: MPO, catepsina G, lactoferrina, moesina, elastasa del neutrófilo y MNDA.

La mieloperoxidasa, la catepsina G, la lactoferrina y la elastasa del neutrófilo son proteínas catiónicas normalmente encontradas en grandes concentraciones en los gránulos del neutrófilo. Sin embargo, como consecuencia de la activación de las células, estas proteínas pueden ser liberadas y, en parte, asociarse de manera periférica a la superficie celular. A su vez, debido a su naturaleza catiónica, estas proteínas han demostrado tener la capacidad de unir ADN (155-157). De hecho, nosotros encontramos a la MPO asociada al ADN extracelular de los biofilms de *P. aeruginosa* (figura 18). Por este motivo, especulamos que ellas podrían actuar como co-receptores para el ADN bacteriano en los neutrófilos. Para testear esta posibilidad analizamos su presencia en la superficie de los neutrófilos por citometría de flujo. Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la presencia de la MPO o de elastasa en la superficie de neutrófilos en reposo (figuras 37A y 38A) o de aquellos estimulados con FMLP (datos no mostrados), a pesar de haber detectado su presencia

intracelular. Por otra parte, el agregado de MPO exógena a los neutrófilos no potenció la unión del ADN-biot a su superficie ni la activación mediada por ADN de *E. coli* (figura 38B).

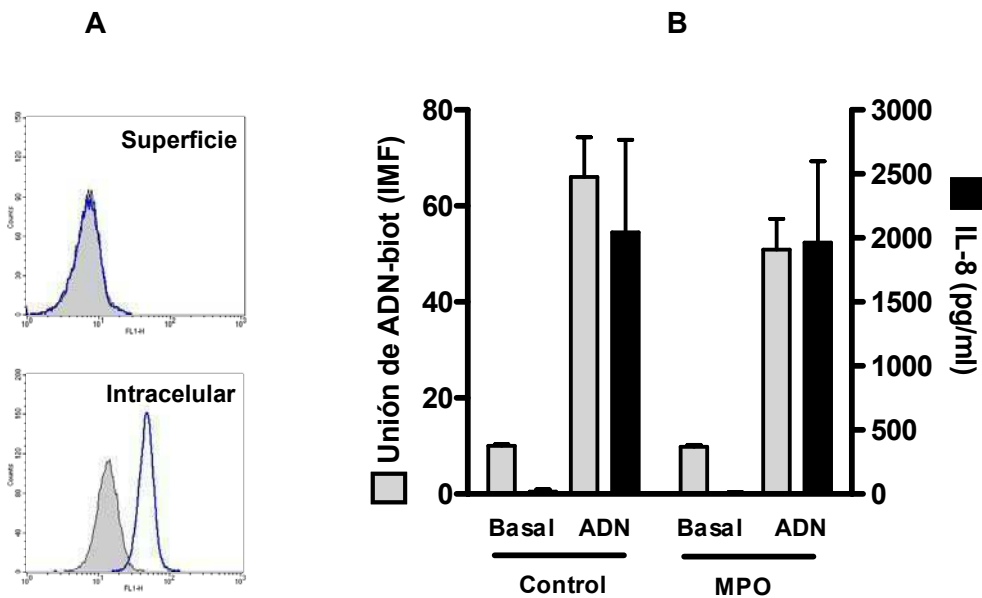


Figura 37: La MPO no constituye el receptor para ADN bacteriano. (A) Los neutrófilos fueron incubados con un anticuerpo anti-MPO conjugado a FITC o control de isotipo y su unión a MPO intracelular o la que pudiera estar presente en la superficie celular fue revelada mediante citometría de flujo. Los histogramas en gris representan a los controles de isotipo y las líneas azules a la expresión de MPO. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. (B) Los neutrófilos (5×10^6 células/ml) fueron incubados con $10 \mu\text{g/ml}$ de MPO y luego fueron estimulados con ADN de *E. coli* durante 3 h. Posteriormente se determinó la producción de IL-8 en el sobrenadante de cultivo (barras negras, eje y derecho) o se evaluó la unión del ADN-biot (barras grises, eje y izquierdo). Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos representativos.

De modo similar, la preincubación de los neutrófilos con concentraciones saturantes de anticuerpos anti-elastasa no bloquearon la unión del ADN-biot a la superficie celular ni lograron inhibir la producción de IL-8 en respuesta al ADN de *E. coli* (figura 38B). Estos resultados, sugieren que la MPO y la elastasa no constituyen el receptor para ADN bacteriano de los neutrófilos. Aún resta por evaluar el rol que podrían cumplir la lactoferrina y la catepsina G. Por otra parte, hasta el momento, no hay descripciones en la bibliografía científica que sugieran que estas proteínas señalicen por la vía de los TLR o que interactúan con otras que sí lo hagan. Tampoco hemos hallado evidencias de esta interacción mediante análisis con el programa STRING.

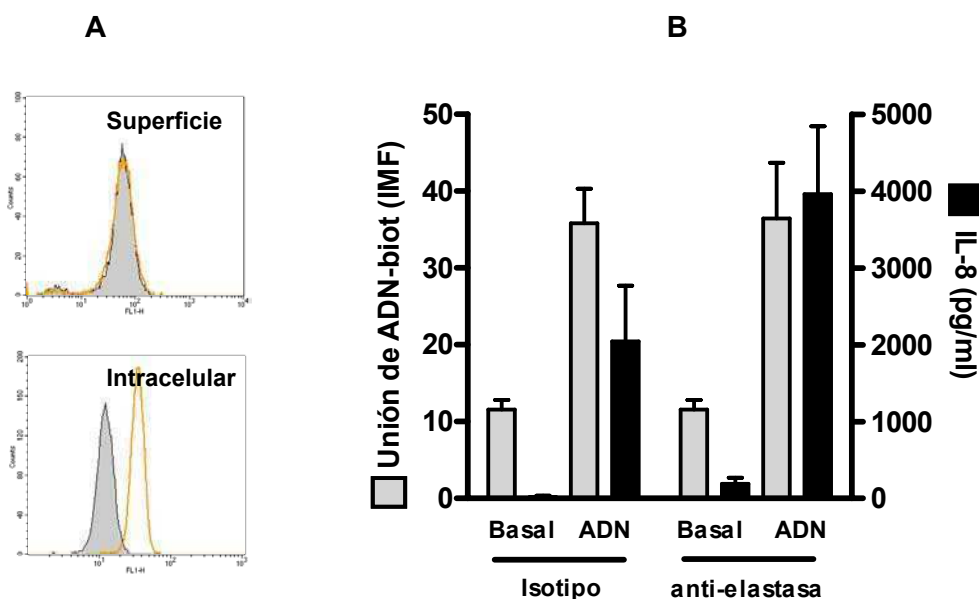


Figura 38: La elastasa del neutrófilo no constituye el receptor para ADN bacteriano. (A) Los neutrófilos fueron incubados con un anticuerpo anti-elastasa o IgG de conejo como control de isotipo y su unión a la elastasa intracelular o la que pudiera estar presente en la superficie celular fue revelada empleando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a FITC por citometría de flujo. Los histogramas en gris representan a los controles de isotipo y las líneas naranjas a la expresión de elastasa. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. (B) Los neutrófilos (5×10^6 células/ml) fueron incubados con $20 \mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-elastasa o la IgG de conejo y luego fueron estimulados con ADN de *E. coli* durante 3 h y se determinó la producción de IL-8 (barras negras, eje y derecho) o se evaluó la unión del ADN-biot (barras grises, eje y izquierdo). Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos representativos.

La moesina es una proteína intracelular que vincula el citoesqueleto con la membrana plasmática. En algunos tipos celulares, como monocitos, se la ha encontrado asociada a la membrana plasmática participando en el reconocimiento del LPS formando parte de un complejo con CD14, MD-2 y TLR4, por lo que podría inducir la señalización a través de la vía de MyD88 / IRAK-1 (158). En queratinocitos se ha descrito que moesina tiene capacidad de unir ADN plasmídico, por lo que nosotros sospechamos que podría tratarse del receptor para ADN bacteriano. Sin embargo, descripciones previas (159) comprobadas por nosotros (figura 39A) indicaron que la moesina no se encuentra expresada en la superficie de los neutrófilos humanos. En acuerdo con esta observación, concentraciones saturantes de anticuerpos anti-moesina no fueron capaces de inhibir la producción de IL-8 en respuesta al ADN bacteriano ni de bloquear la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos (figura 39B). Estos resultados sugieren que la moesina no sería el receptor para ADN bacteriano en los neutrófilos humanos.

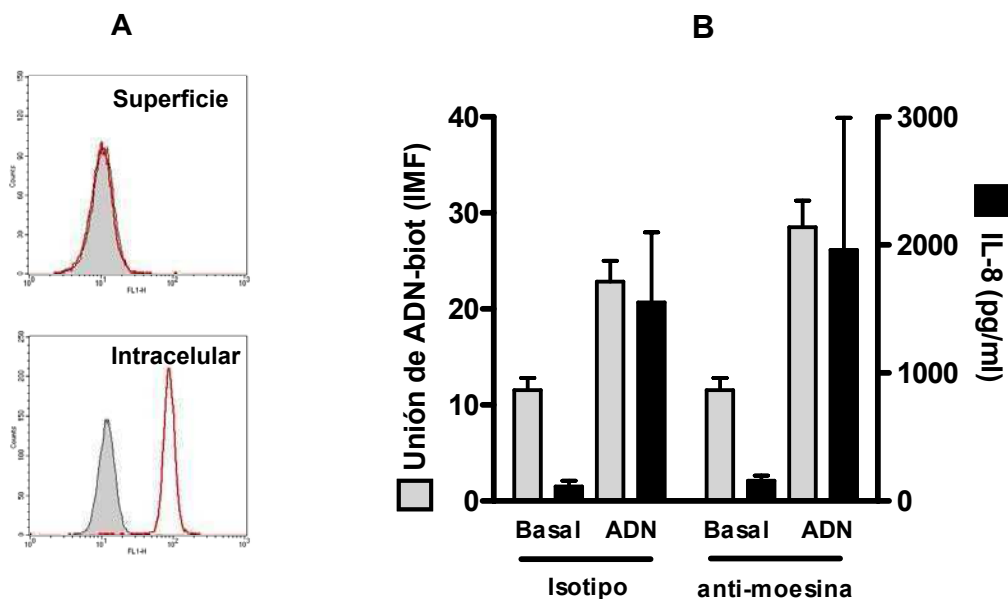


Figura 39: La moesina no constituye el receptor para ADN bacteriano de los neutrófilos. (A) Los neutrófilos fueron incubados con un anticuerpo anti-moesina o IgG de ratón como control de isotipo y su unión a la moesina intracelular o la que pudiera estar presente en la superficie celular fue revelada empleando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a FITC por citometría de flujo. Los histogramas en gris representan a los controles de isotipo y las líneas rojas a la expresión de moesina. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. (B) Los neutrófilos (5×10^6 células/ml) fueron incubados con $20 \mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-moesina o la IgG de ratón y luego fueron estimulados con ADN de *E. coli* durante 3 h y se determinó la producción de IL-8 (barras negras, eje y derecho) o se evaluó la unión del ADN-biot (barras grises, eje y izquierdo). Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos representativos.

Finalmente, analizamos el rol que podría cumplir la proteína MNDA en el reconocimiento del ADN bacteriano por los neutrófilos. Esta proteína pertenece a la familia Irf-200, un grupo de proteínas con capacidad de unir ADN cuya expresión es inducida por interferones y exhiben localización mayormente nuclear aunque también se las puede hallar en citoplasma. A nivel de ARNm, MNDA presenta una alta expresión en neutrófilos y otras células del linaje mieloide y baja en el linaje linfóide, un aspecto que correlaciona con nuestros resultados de unión de ADN-biot. Sin embargo, y de acuerdo a lo previamente descrito para otros tipos celulares, no detectamos la presencia de MNDA en la superficie de los neutrófilos (figura 40A) y sí en el interior celular. Por otra parte, concentraciones saturantes de anticuerpos anti-MNDA no bloquearon la unión de ADN-biot ni la activación de los neutrófilos con ADN de *E. coli* (figura 40B) sugiriendo que MNDA no sería el receptor para ADN presente en los neutrófilos.

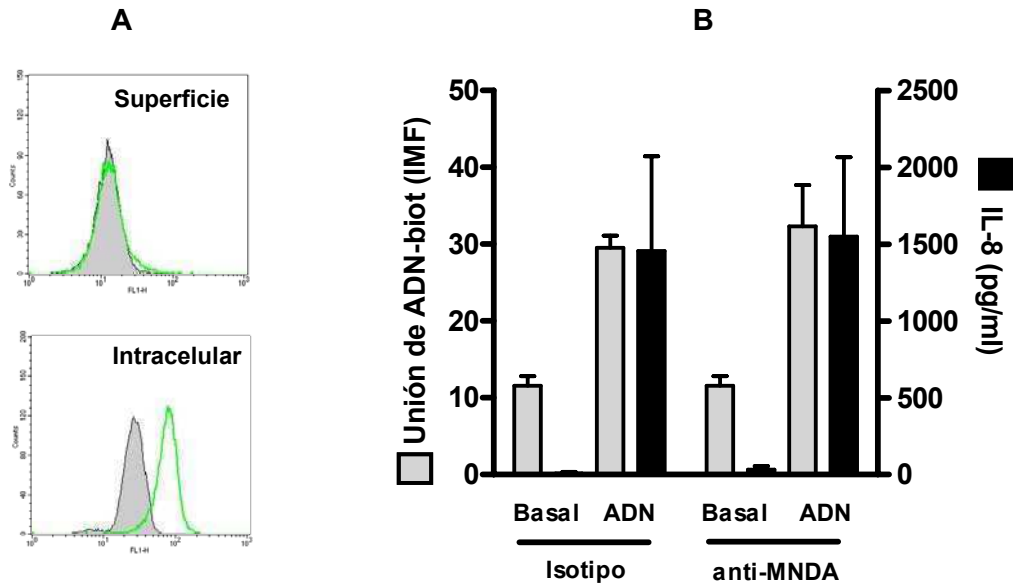


Figura 40: La MNDA no constituye el receptor para ADN bacteriano de los neutrófilos. (A) Los neutrófilos fueron incubados con un anticuerpo anti-MNDA o IgG de cabra como control de isotipo y su unión a la MNDA intracelular o la que pudiera estar presente en la superficie celular fue revelada empleando un anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a FITC por citometría de flujo. Los histogramas en gris representan a los controles de isotipo y las líneas verdes a la expresión de MNDA. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. (B) Los neutrófilos (5×10^6 células/ml) fueron incubados con $20 \mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-MNDA o la IgG de cabra y luego fueron estimulados con ADN de *E. coli* durante 3 h y se determinó la producción de IL-8 (barras negras, eje y derecho) o se evaluó la unión del ADN-biot (barras grises, eje y izquierdo). Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos representativos.

Los hallazgos realizados hasta el presente no nos han permitido identificar al receptor celular para ADN, por lo que actualmente los esfuerzos se encuentran concentrados en la identificación de un fragmento de ADN capaz de unir con alta avidéz a los neutrófilos, para poder ser empleado en lugar del ADN-biot aplicando la estrategia 3.

Discusión

*“Lo importante en ciencia no es tanto
obtener nuevos hechos como descubrir
nuevas formas de pensar sobre ellos”*

William Lawrence Bragg

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa frente a infecciones de naturaleza bacteriana y fúngica. Ellos exhiben un amplio arreglo de receptores de reconocimiento de patrones y receptores para opsoninas que les permiten detectar la presencia de los microorganismos y montar una respuesta inflamatoria que involucra la liberación de citoquinas y quimiocinas, y la participación de agentes antimicrobianos como enzimas degradativas, defensinas e intermediarios reactivos del oxígeno. Sin embargo, aún cuando los neutrófilos son efectores claves en la defensa anti-infecciosa, debido a su naturaleza pro-inflamatoria, su activación desregulada puede conducir a la generación de un daño extenso a los tejidos circundantes.

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que los neutrófilos son activados por ADN bacteriano a través de un mecanismo que difiere del canónico y que no involucra su internalización. Estos hallazgos motivaron los estudios presentados en esta Tesis, en los que: (1) se evaluó la capacidad pro-inflamatoria del ADN extracelular de la matriz de los biofilms bacterianos en relación a su habilidad para inducir la activación de neutrófilos humanos; y (2) se intentó determinar la identidad del receptor involucrado en el reconocimiento del ADN por los neutrófilos.

El ADN extracelular es un componente proinflamatorio relevante de los biofilms de *P. aeruginosa*

Los neutrófilos probablemente constituyan uno de los componentes más importantes de la respuesta inmune montada frente a las infecciones mediadas por biofilms (128, 160-161). Sin embargo, es evidente que su arsenal de agentes microbicidas, su capacidad fagocítica y los intermediarios reactivos del oxígeno que producen generalmente no son efectivos para combatir estas infecciones (128). Más aún, en el caso de las infecciones mediadas por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ, los neutrófilos contribuyen a la patología a través de los mediadores que liberan y porque proveen una fuente de ADN y polímeros de actina que aumentan la viscosidad del moco en los pulmones (130, 141).

Trabajos previos que estudiaron la respuesta inflamatoria de los neutrófilos frente a biofilms bacterianos se han centrado en evaluar el rol de los exopolisacáridos de la matriz y de las moléculas de *quorum sensing* en la funcionalidad de los

neutrófilos. Estos estudios demostraron que, mientras algunos componentes del biofilm inhiben ciertas funciones del neutrófilo, otros contribuyen a su activación. En este sentido, el exopolisacárido de *P. aeruginosa* inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos, mientras que el de *Streptococcus mutans* es capaz de inhibir la fagocitosis y la producción de intermediarios reactivos del oxígeno afectando la capacidad de los neutrófilos de eliminar a las bacterias (137, 162-163). Por el contrario, la molécula de *quorum sensing* N-3-oxododecanoil-homoserinlactona induce la quimiotaxis de los neutrófilos, incrementa la expresión en superficie de la integrina CD11b/CD18 y de los Fc- γ receptores CD16 y C64, aumenta la fagocitosis de las bacterias y acelera la apoptosis de los neutrófilos (164-166). Otros estudios realizados con mutantes deficientes en señales de *quorum sensing* demostraron que éstas moléculas inhiben el estallido respiratorio del neutrófilo (167).

A pesar de la abundancia del ADN extracelular en la matriz de los biofilms y de su importancia en la formación de los mismos, antes del presente estudio no se registraban trabajos que se hubiesen abocado a dilucidar el impacto del ADN de la matriz en la activación de células inmunes. Los resultados obtenidos en la presente tesis nos permitieron determinar que el ADN extracelular de la matriz de los biofilms de *P. aeruginosa* cumple un rol clave en la activación de los neutrófilos, un hecho que fue puesto en evidencia al evaluar su capacidad de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, de estimular la degranulación, la fagocitosis y la inducción de la liberación de NET por neutrófilos.

Trabajos previos han determinado que el ADN bacteriano es un componente significativo de la matriz extracelular de biofilms de la cepa PAO-1 crecidos en condiciones estáticas y de flujo (168). De hecho, Matsukawa y colaboradores demostraron que el componente mayoritario de la matriz de los biofilms de PAO-1 crecidos en condiciones estáticas es ADN. Esta macromolécula, a su vez, es cerca de 5 veces más abundante que las proteínas y veinte veces más abundante que los carbohidratos en dichos biofilms (168). Estudios llevados a cabo en los años '70 mostraron que, en 18 de 20 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, el "slime" consistió principalmente de ADN (113-114). Desde entonces, el ADN extracelular fue detectado en la matriz de biofilms formados por especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Haemophilus* (116-118, 120).

¿Cuál es el mecanismo que determina la presencia del ADN en la matriz del biofilm? Se han propuesto diferentes hipótesis, como ser: (1) la inducción por señales de *quorum sensing* de un profago que provoca la lisis celular (100, 169); (2) la lisis de vesículas conteniendo ADN que son liberadas por las bacterias; (3) la lisis de una pequeña subpoblación de bacterias; y (4) a través del uso de sistemas de secreción de tipo IV (100, 109, 170).

En conjunto, estos hallazgos revelan una amplia distribución del ADN extracelular en biofilms bacterianos y la presencia de mecanismos conservados evolutivamente que aseguran su presencia en los mismos. En particular, en nuestras manos, los biofilms de 2 días de la cepa PAO-1 contuvieron alrededor de 8,7 μg de ADN / mg de proteína total. Teniendo en cuenta que los biofilms crecidos en las placas de 96 pocillos tuvieron un volumen aproximado de 0,6 μl y un contenido proteico total de 25 μg , la concentración media de ADN en nuestros biofilms sería aproximadamente de 360 $\mu\text{g/ml}$. Una proporción importante de este ADN extracelular se encuentra ubicado en la periferia de las estructuras con forma de hongo del biofilm, como lo demuestran las imágenes adquiridas por MLC, de modo que queda expuesto a los neutrófilos en los experimentos de co-cultivo, y posiblemente de modo similar en el contexto de una infección. La concentración detectada en nuestros biofilms es compatible con la que empleamos en los ensayos de unión del ADN a la superficie de los neutrófilos y es aún superior a las concentraciones que gatillan eficientemente la activación del neutrófilo *in vitro*. Además, el ADN inmovilizado, que simularía la forma en que se presenta el ADN en el biofilm, resultó ser más potente que el soluble para inducir la activación de los neutrófilos. Estos hallazgos sugirieron que el ADN extracelular de los biofilms de *P. aeruginosa* podría constituir un componente proinflamatorio relevante de los mismos, y motorizaron los siguientes estudios en los cuales comprobamos, ya en el contexto de un biofilm, que la eliminación del ADN extracelular del mismo mediante el empleo de DNasa I, reduce marcadamente la producción de citoquinas proinflamatorias por los neutrófilos en contacto con los biofilms, así como también el aumento de la expresión de marcadores de activación y la fagocitosis de bacterias. Sin duda, la relevancia del ADN de la matriz como componente pro-inflamatorio patrimonio del biofilm, cobra mayor dimensión si se tiene en cuenta la abundante cantidad y diversidad de PMAP que impone el biofilm al sistema inmune huésped.

El *quorum sensing* es un mecanismo que permite a las bacterias percibir la densidad de la población bacteriana circundante y responder coordinadamente regulando varios genes (171). *P. aeruginosa* utiliza los sistemas de *quorum sensing* lasRI y rhlRI para controlar la expresión de un amplio rango de factores de virulencia (172-174). Además, las moléculas de *quorum sensing* son capaces de estimular células eucariotas (171). En nuestras manos, los biofilms formados con la cepa mutante *lasI rhlI*, que se sabe que exhiben un contenido reducido de ADN extracelular (100), indujeron una menor producción de citoquinas por neutrófilos que la cepa PAO-1 salvaje. Aunque nuestros hallazgos no excluyen la posibilidad de que este efecto sea mediado por la deficiencia de algún otro factor regulado por los sistemas Las y Rhl, el hecho de que el tratamiento del biofilm mutante *lasI rhlI* con DNasa I no hubiese modificado su capacidad para estimular la producción de IL-8 e IL1 β por los neutrófilos, es consistente con nuestra conclusión de que el ADN extracelular juega un rol significativo en la activación de los neutrófilos por los biofilms bacterianos.

El ADN extracelular de la matriz de los biofilms de *P. aeruginosa* podría jugar un rol en la respuesta de los neutrófilos en pacientes con fibrosis quística

La infección pulmonar con *P. aeruginosa* en pacientes con FQ es la infección por excelencia en la cual se han mostrado claras evidencias de la participación de los biofilms en la patogenicidad. La FQ es una enfermedad hereditaria en la cual el defecto primario resulta en una secreción y absorción de electrolitos disfuncional particularmente en páncreas, pulmón, hígado y tracto gastrointestinal. Poco después del nacimiento se instaura un círculo vicioso, caracterizado por un moco espeso que obstruye las vías respiratorias, proporcionando un nicho para el crecimiento bacteriano, la infiltración de neutrófilos al tejido pulmonar y la descarga de su contenido que incluye el viscoso polianión ADN, aumentando así la viscosidad del moco (175). La colonización pulmonar del tracto respiratorio inferior en pacientes con FQ comienza en la infancia o en la niñez temprana y, para la adolescencia o juventud la mayoría de los pacientes con esta enfermedad (cerca del 80%) han sido colonizados con *P. aeruginosa* (121). Esta bacteria forma biofilms en el huésped, lo cual la hace tolerante a las concentraciones más altas de antibióticos administrables y no puede ser erradicada (121, 167).

Trabajos previos demostraron que grandes polímeros de ADN presentes en las secreciones purulentas en pacientes con FQ adhieren electrostáticamente proteínas catiónicas como la elastasa del neutrófilo y la MPO (176). En línea con estos hallazgos, encontramos que la MPO liberada por los neutrófilos queda inmovilizada al ADN extracelular de la matriz de los biofilms. Estudios previos demostraron que la MPO, independientemente de su actividad catalítica, media la activación de los neutrófilos y retrasa su apoptosis al asociarse con la integrina CD11b/CD18 (Mac-1) (177). Por este motivo, la MPO asociada al ADN podría promover respuestas proinflamatorias no solo catalizando la producción de hipoclorito y cloraminas, sino también incrementando la activación de los neutrófilos y su supervivencia. Cabe destacar, que la elevada concentración local de MPO sobre el biofilm y la expresión incrementada de Mac-1 en los neutrófilos, al aumentar la inflamación, podría contribuir no solo a la destrucción de las bacterias sino también al daño en los tejidos circundantes, como ha sido propuesto previamente (178).

Nuestros resultados también muestran que los biofilms bacterianos inducen a los neutrófilos a liberar abundantes NET, sugiriendo que la presencia de biofilms en pacientes con FQ crónicamente infectados con *P. aeruginosa* podría exacerbar la viscosidad del esputo purulento al gatillar la liberación de NET. En particular, el ADN extracelular de los biofilms mostró ser un potente inductor de la liberación de NET.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro* en los experimentos de co-cultivo, es posible especular que el ADN extracelular presente en los biofilms de *P. aeruginosa* instalados en pacientes con FQ contribuya a la respuesta inflamatoria recurrente característica de esta patología. La producción incrementada de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias favorecería el reclutamiento de neutrófilos a los pulmones. A su vez, estos neutrófilos tendrían una activación potenciada descargando parte del contenido de sus gránulos al medio extracelular causando injuria en los tejidos circundantes. Finalmente, la abundante liberación de NET inducida por el ADN extracelular de los biofilms, contribuiría a aumentar la viscosidad del esputo. En conjunto, esta respuesta inflamatoria exacerbada favorecería el desarrollo de la bronquiectasia, la fibrosis y, en última instancia, la falla respiratoria que conduce a la muerte.

Cabe mencionar, que recientemente hemos demostrado que el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) potencia las respuestas de los neutrófilos al ADN bacteriano (179). Teniendo en cuenta que se ha detectado un aumento en la expresión de GM-CSF asociado con la estimulación bacteriana en las células epiteliales de las vías respiratorias en pacientes con FQ en comparación con células epiteliales normales, es tentador especular que podría darse una respuesta aún más robusta al ADN extracelular de la matriz en pulmones colonizados con biofilms en pacientes con FQ (180-181).

Merece destacarse que el tratamiento actual para pacientes con FQ incluye la inhalación por nebulización de DNasa I recombinante humana (rhDNasa), empleada como agente mucolítico al degradar el polímero de ADN que es el mayor contribuyente en aumentar la viscosidad del esputo en las secreciones de las vías aéreas en estos pacientes (175, 182). A pesar de que el tratamiento con rhDNasa ha mostrado ser beneficioso también en niños, los cuales se supone no están colonizados con biofilms de *P. aeruginosa* (175), los resultados presentados en este trabajo sugieren que la DNasa también podría contribuir a reducir la inflamación al remover el ADN bacteriano de la matriz extracelular en aquellos pacientes en los que el biofilm se ha instalado. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los biofilms de cepas mucoides aisladas de pacientes con FQ crónicamente colonizados, esta capacidad podría depender del contenido de ADN de la cepa correspondiente.

El receptor para ADN del neutrófilo es una proteína localizada en la membrana plasmática

La capacidad del ADN bacteriano extracelular de inducir la activación de los neutrófilos, nos motivó a realizar estudios para dilucidar la identidad del receptor involucrado en su reconocimiento. Sin duda esta información podría redundar, en el futuro, en el diseño de estrategias terapéuticas capaces de modular el desarrollo de respuestas inflamatorias.

Previamente, en los estudios realizados como parte de mi Tesis de Licenciatura, determinamos mediante experimentos que involucraron citometría de flujo, que el ADN bacteriano se une a la superficie de los neutrófilos humanos. En el

presente trabajo confirmamos estos hallazgos mediante MLC. La unión del ADN a la superficie de los neutrófilos es saturable y puede ser inhibida de manera dosis dependiente por ADN no marcado, pero no por otros polianiones como PoliA o ARNt de levaduras, sugiriendo que se trata de un proceso mediado por receptor. El pretratamiento de los neutrófilos con proteinasa K previno la unión del ADN-biot a la superficie celular, y derivó en una incapacidad de los neutrófilos de producir IL-8 en respuesta al ADN bacteriano, sugiriendo fuertemente que el ADN se une a un receptor proteico de la superficie celular.

Búsqueda del motivo del ADN bacteriano capaz de inducir la activación de los neutrófilos

Con el fin de purificar e identificar el receptor para ADN, consideramos que sería muy útil disponer de la secuencia que sea reconocida por el neutrófilo, o en su defecto, de un pequeño oligómero con capacidad de unir y activar a los neutrófilos. Dicha información nos permitiría contar con una herramienta con alta capacidad de unión específica y reduciría el pegado inespecífico en cualquier estrategia empleada para identificar al receptor. En este estudio, comprobamos que el plásmido Bluescript II KS+ se une a la superficie de los neutrófilos y es capaz de inducir su activación. A partir de ese plásmido se aisló un oligómero de 255 pb denominado F1, con capacidad de unión a la superficie celular. Lamentablemente, F1 no logró desplazar la unión del ADN-biot a los neutrófilos ni gatillar eficientemente su activación. Estos resultados, aparentemente contradictorios, podrían ser explicados en base observaciones previas propias y otras realizadas en otros sistemas ligando-receptor. Por un lado, es posible que la activación por ADN requiera que el receptor putativo sufra dimerización, como ocurre con los TLR. De ser así, la secuencia reconocida por el receptor debería encontrarse duplicada en el oligómero activador para mediar su dimerización. No obstante, una sola copia de la secuencia de reconocimiento podría proveer la información necesaria para la unión al receptor. Es decir que F1 podría contener una copia de la secuencia de unión, que sería suficiente para mediar la unión pero no para gatillar la activación celular.

Pero, ¿cómo se podría explicar que F1 haya sido aislado sobre la base de su capacidad de unirse a la superficie del neutrófilo y no sea capaz de desplazar la unión

del ADN-biot (ADN genómico biotinilado) a la superficie del neutrófilo? Es posible que el pequeño tamaño del oligómero F1 le impidiera competir eficientemente la unión del ADN-biot, pues esta última podría estar más favorecida debido a que el tamaño del ADN-biot osciló entre 0,7 y 10 kb. En sustento de esta afirmación, cabe recordar que cuando realizamos experimentos con ADN digeridos con DNasa por distintos tiempos para determinar cuál es la mínima longitud del oligómero capaz de desplazar la unión del ADN genómico y de inducir la activación de los neutrófilos, sólo los ADN mayores a 930 nt cumplieron con ambas premisas (figura 31). Esto sugiere que existiría una longitud crítica a partir de la cual la unión eficiente y la activación celular se encontrarían favorecidas, un hecho que podría reflejar un incremento en la afinidad/avidez del receptor putativo si el ADN tuviera un tamaño tal que permitiera su interacción con dos o más receptores simultáneamente. Tal comportamiento permitiría explicar por qué un oligómero de 255 nt como F1 fue incapaz de desplazar la unión de un ADN genómico.

Las propiedades de F1 no ameritaron su empleo en estudios tendientes a identificar al receptor de ADN. Por este motivo, se continuó buscando una secuencia capaz de gatillar la activación de los neutrófilos. Nosotros razonamos que, dado que el ADN de vertebrados no induce la activación de los neutrófilos, la secuencia reconocida por el receptor podría ser una secuencia evolutivamente conservada en procariontes, cumpliendo de este modo uno de los postulados que definen a los PMAP. Esto motivó una serie de estudios en los que testeamos si ciertas secuencias frecuentes en los genes bacterianos (secuencias conservadas en promotores, secuencia de Shine-Dalgarno de iniciación de la traducción y terminadores Rho independientes de la transcripción) eran capaces de inducir la activación de los neutrófilos. Lamentablemente, ninguna de las secuencias evaluadas logró inducir la producción de IL-8. Sin embargo, estos resultados no las descartan como posibles secuencias de reconocimiento, pues como señalé previamente, podría ser necesario que la secuencia se encuentre por duplicado para inducir la activación, o se podría requerir de un ADN de mayor longitud para incrementar la afinidad/avidez del receptor por el ADN. Un estudio más exhaustivo debería evaluar el impacto de secuencias conservadas en el contexto de un ADN de mayor tamaño como ser un ADN plasmídico.

Por otra parte, numerosos trabajos han demostrado que, además de las diferencias en las secuencias entre el ADN bacteriano y el de vertebrados, existen diversas modificaciones en las bases o en el esqueleto fosfodiéster presentes en los ADN procariotas y ausentes en el de los vertebrados (183-184). En particular, los procariotas contienen en su ADN N⁶-metiladenina, 5-metilcitosina y N⁴-metilcitosina debido a la presencia de metiltransferasas (183). Sin embargo, previamente, nuestro grupo descartó la contribución de estas metilaciones en la respuesta al ADN bacteriano ya que no se observaron diferencias en la capacidad de inducir la activación de neutrófilos de un ADN genómico salvaje respecto de uno purificado a partir de una cepa deficiente en las metilasas.

Recientemente se describió una modificación ampliamente distribuida en diferentes especies bacterianas en el esqueleto de las moléculas de ADN. Dicha modificación consiste en un reemplazo, de manera secuencia específica, de un oxígeno en el enlace fosfodiéster por un átomo de azufre de modo de formar un enlace fosforotioato (184). En estos momentos nuestro laboratorio se encuentra abocado a evaluar el impacto de esta modificación en la respuesta de los neutrófilos al ADN bacteriano.

Nuestros resultados indicaron que el ADN humano también tiene capacidad de inhibir la unión del ADN-biot a la superficie celular. A pesar de que estos hallazgos no excluyen la posibilidad de que el ADN humano esté compitiendo por la unión del ADN-biot al mismo receptor putativo, considerando que el ADN humano es incapaz de inducir la activación de los neutrófilos (62), también es posible que las moléculas de ADN humano de alto peso molecular ejerzan un impedimento estérico para la unión del ADN bacteriano a los neutrófilos al interactuar de manera no específica con la superficie celular. Otra posibilidad es que el ADN humano se una eficientemente al mismo receptor que el ADN bacteriano, pero sea incapaz de gatillar la activación celular. Apoyando esta posibilidad, resultados de estudios previos mostraron que el TLR9 une ADN tanto estimulador como no estimulador. Sin embargo, sólo el ADN estimulador provoca un cambio conformacional sustancial en el ectodominio del TLR9 que resulta en la activación de las vías transduccionales (47). Más allá del mecanismo a través del cual el ADN humano interactúa con la superficie de los neutrófilos, la capacidad del ADN humano para inhibir la unión del ADN bacteriano podría tener consecuencias *in vivo* en reducir la capacidad proinflamatoria del ADN bacteriano. En

este sentido, estudios recientes demostraron la liberación de ADN por neutrófilos durante la muerte por NETosis (17). Considerando que las bacterias son potentes estimuladores de la liberación de NET, es posible especular que el ADN humano contenido en las NET compita con la unión del ADN bacteriano a neutrófilos viables, reduciendo de este modo su capacidad de gatillar respuestas proinflamatorias. En este marco, es interesante señalar que un exceso de 10 veces de ADN humano fue capaz de inhibir significativamente la producción de IL-8 gatillada por ADN bacteriano (resultados no mostrados).

Evaluación de la capacidad de distintas proteínas del neutrófilo de reconocer de ADN

Estudios previos desarrollados por Bennet y colaboradores (93) mostraron evidencias de la existencia de un receptor de unión a ADN, aún no identificado, en la membrana plasmática de los neutrófilos, que podría ser responsable de la endocitosis y degradación de ADN exógeno. Dichos estudios emplearon ADN-[H³] de fago λ como ligando y comprobaron que su unión a la superficie de los neutrófilos es dependiente de calcio, magnesio y sulfatos. Estos hallazgos difirieron de aquellos realizados por nosotros, indicando que la unión del ADN de *E. coli* es independiente de dichos iones y no es inhibible por EDTA (153). Estos resultados sugieren que podría existir más de un receptor para ADN en la membrana de los neutrófilos y/o que la unión de distintos tipos de ADN podría tener diferentes requerimientos.

Otros trabajos también reportaron la presencia de proteínas de unión a ADN en leucocitos, fibroblastos, queratinocitos y células de Kupffer (91-92, 94, 185-186). En particular, Loke y colaboradores determinaron que una proteína de 80 kDa media el transporte de ODN en células de la línea promielocítica HL-60 (92). Los autores reportaron que la unión de los ODN era independiente de la secuencia y podía ser inhibida en un 60-80% por una concentración dos veces superior de ODN no marcados (25 mM), así como también por deoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, ADN plasmídico y ARNt de levaduras. Sin embargo, la unión del ADN y la activación de neutrófilos descrita en esta tesis no parece estar mediada por la proteína detectada en células HL-60 debido a que en nuestros experimentos, (1) fragmentos de ADN menores a 170 nt no fueron capaces de competir la unión del ADN-biot no digerido a

los neutrófilos ni lograron inducir la activación de los mismos; y (2) otros polianiones, como poli-A y ARNt de levaduras, fueron completamente incapaces de inhibir la unión del ADN a la superficie de los neutrófilos.

Nuestros resultados de MALDI-TOF identificaron a CD11b, componente de la integrina Mac-1, como una molécula de la superficie del neutrófilo capaz de unir ADN bacteriano. Benimetskaya y colaboradores previamente demostraron que la integrina Mac-1 tiene la capacidad de unir ODN (94). Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo descartaron de manera indirecta que esta proteína estuviese involucrada en el reconocimiento del ADN bacteriano, ya que la activación inducida por el mismo no pudo ser inhibida por concentraciones saturantes de un fragmento Fab anti-CD18 o por fibrinógeno soluble (62). En la presente tesis confirmamos esta presunción pues los neutrófilos provenientes de un paciente deficiente en Mac-1 no sólo fueron capaces de unir ADN bacteriano, sino que también pudieron ser activados por él.

Adicionalmente, nuestros resultados de espectrometría de masas identificaron a la moesina como molécula capaz de unir ADN bacteriano. A pesar de que la moesina es ampliamente conocida por su capacidad de mediar la unión de la membrana plasmática al citoesqueleto de actina (187), trabajos previos realizados en queratinocitos humanos, la habían descrito como proteína de unión a ADN (185). Empleando, análisis por south-western y ensayos de retardo en geles, los autores encontraron que tanto moesina como erzina (otra molécula con función similar) son capaces de unir ADN plasmídico, ADN de fago λ y ODN de manera independiente de secuencia y también ADN de timo bovino, pero son incapaces de unir ARN. Por otra parte, Wittrup y colaboradores demostraron que la incorporación de ADN desnudo por células de mamíferos es mediada por proteoglicanos de la superficie celular en conjunto con proteínas presentes en el medio condicionado de estas células, entre las que se encuentra la moesina (188). Más relevante aún resultan los hallazgos indicando que en monocitos, moesina forma un complejo con CD14, MD-2 y TLR4, participa en el reconocimiento del LPS y señalaría a través de la vía de MyD88 / IRAK-1 (158). Dado que en estudios previos determinamos que el ADN bacteriano activa a los neutrófilos por esta vía (88), consideramos posible que la moesina cumpla un rol en el reconocimiento del ADN extracelular por los neutrófilos. Lamentablemente, en acuerdo con trabajos previos que describieron la presencia de moesina en la membrana de linfocitos T, células NK y monocitos pero no en granulocitos (159),

nosotros no logramos detectarla en la superficie de los neutrófilos por citometría de flujo. Además, concentraciones saturantes de un anticuerpo anti-moesina no inhibieron la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos ni la producción de IL-8 inducida por ADN de *E. coli*. Estos hallazgos sugieren que la moesina no constituye el receptor responsable de la activación por ADN bacteriano en los neutrófilos. Sin embargo, es posible especular que el anticuerpo empleado esté dirigido contra un epítopo que no se encuentre expuesto en la moesina de neutrófilos, por lo cual, resultados concluyentes sólo podrán ser alcanzados cuando logremos establecer una línea celular deficiente en moesina y su papel en el reconocimiento del ADN pueda ser inequívocamente estudiado.

Otra proteína que identificamos por MALDI-TOF fue MNDA. Esta proteína pertenece, junto con AIM2, a una familia de proteínas con capacidad de unir ADN, que tienen localización mayormente nuclear, aunque también se las puede hallar en el citoplasma (156). Nosotros detectamos a MNDA en el interior del neutrófilo pero no en la membrana plasmática, y al igual que ocurrió con moesina, un anticuerpo anti-MNDA fue incapaz de inhibir la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos y la producción de IL-8 inducida por ADN de *E. coli*, sugiriendo que no constituye el receptor para ADN del neutrófilo.

Es interesante señalar, que tanto moesina como MNDA, podrían desempeñar un papel en el reconocimiento citoplasmático de ADN, motivo por el cual, el establecimiento de líneas celulares deficientes en estas moléculas constituirán herramientas valiosas para evaluar este rol.

Participación de proteínas granulares del neutrófilo identificadas por MALDI-TOF en el reconocimiento del ADN bacteriano

Previamente demostramos que la unión del ADN bacteriano a la superficie de los neutrófilos aumenta por estimulación con quimioattractantes y PMA. Dicho incremento puede ser evidenciado a los 5 min post-estimulación, indicando que no involucra la síntesis *de novo* del receptor putativo. Los resultados de experimentos presentados en esta Tesis, en los que el inhibidor de la degranulación PXF inhibió de manera similar el aumento en la expresión en superficie de CD11b (una molécula

presente en la membrana de gránulos específicos, terciarios y vesículas secretorias) y el incremento de la unión del ADN-biot gatillado por el FMLP, sugieren que este último podría ser consecuencia de la exposición de la proteína de unión a ADN desde un *pool* preexistente presente en la membrana de los gránulos que pasan a formar parte de la membrana plasmática como consecuencia de la degranulación que tiene lugar luego de la estimulación celular. Sin embargo, nuestros resultados no descartan que el incremento de la unión a ADN observado tras la activación celular pueda ser ocasionado por el aumento de una molécula capaz de unir ADN y cooperar en la unión de éste a un receptor con capacidad de transducir la señal.

En este sentido, merece destacarse que por espectrometría de masas nosotros identificamos a la MPO, la lactoferrina, la elastasa y la catepsina G como moléculas capaces de unir al ADN bacteriano. Estas proteínas, que se encuentran en alta concentración en los gránulos de los neutrófilos en reposo, pueden ser liberadas como consecuencia de la activación celular, y debido a su naturaleza catiónica, pueden unirse electrostáticamente a proteoglicanos de la membrana plasmática (189). Del mismo modo, su carga neta positiva al pH fisiológico favorecería su unión a polianiones como el ADN (157, 190-191).

Reportes previos determinaron que la MPO tiene capacidad de unir al ADN humano (17, 191). Además, nosotros detectamos a la MPO unida al ADN extracelular de los biofilms de *P. aeruginosa* en experimentos de co-cultivo con neutrófilos. Dado que esta proteína representa aproximadamente el 5% del peso seco del neutrófilo, sería posible que ejerciera un rol en el reconocimiento del ADN bacteriano. Sin embargo, no pudimos detectar su presencia en la superficie celular, tanto en neutrófilos en reposo como en aquellos estimulados con FMLP. A su vez, el agregado de MPO exógena a células en reposo no incrementó la unión del ADN-biot a la membrana plasmática de los neutrófilos ni potenció la activación inducida por ADN bacteriano, lo que sugiere que la MPO, aún cuando tiene capacidad de unir ADN, no participa del reconocimiento del ADN bacteriano en los neutrófilos.

La elastasa y la catepsina G también han sido descritas como moléculas capaces de unir ADN y, de hecho, fueron detectadas asociadas al ADN extracelular humano del esputo de pacientes con FQ (157, 192). Sin embargo, en las condiciones empleadas en nuestros experimentos no logramos detectar a la elastasa asociada a la

superficie celular, ni logramos bloquear la unión del ADN-biot o la activación de los neutrófilos por ADN bacteriano empleando concentraciones saturantes de un anticuerpo anti-elastasa, sugiriendo que la elastasa no participa del reconocimiento del ADN bacteriano en los neutrófilos. En este estudio no hemos evaluado el papel que podría desempeñar la catepsina G en el reconocimiento del ADN bacteriano, aunque constituye un proyecto a futuro teniendo en cuenta que esta molécula tiene mayor afinidad por el ADN que la elastasa (157).

He y colaboradores demostraron que la lactoferrina puede unirse al ADN con alta afinidad, con preferencia por las secuencias GGCACTT(G/A)C, TAGA(A/G)GATCAAA o ACTACAGTCTACA (190). En el mismo sentido, Britigan y colaboradores comprobaron que la lactoferrina une oligonucleótidos simple cadena de manera independiente de secuencia (193). Los autores propusieron que la lactoferrina soluble actuaría como mecanismo regulatorio disminuyendo los efectos de los oligonucleótidos CpG sobre las células inmunes. Los experimentos para determinar el rol que podría desempeñar la lactoferrina en el reconocimiento del ADN bacteriano por el neutrófilo constituye un proyecto pendiente que será encarado en el futuro.

Participación de los TLR en el reconocimiento del ADN

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la activación de los neutrófilos por ADN bacteriano es dependiente de MyD88 e involucra la activación de la vía transduccional común a los TLR. Por este motivo, nosotros esperábamos encontrar, producto de los ensayos de MALDI-TOF, a un TLR o a alguna molécula capaz de interactuar con un TLR que pudiera funcionar como un co-receptor. Los TLR presentan una expresión baja en comparación con otros receptores de células del sistema inmune, habiendo entre 75 y 2100 moléculas por célula dependiendo del TLR y del tipo celular involucrado (194). Considerando que en el protocolo de purificación del receptor partimos de 5×10^8 neutrófilos, esto implica que, en el caso de que el receptor involucrado fuese un TLR, la banda correspondiente en el gel contendría, a lo sumo, entre 0,06 y 1,7 pmoles de proteína. La técnica de MALDI-TOF no es eficiente para detectar proteínas presentes en cantidades menores a 0,1 y 0,2 pmoles en muestras complejas provenientes de geles 1D como las de nuestros ensayos (195). Por estos motivos, si el receptor para ADN bacteriano de los neutrófilos, fuese un TLR

u otra proteína cuya expresión fuese de unos pocos cientos de moléculas por célula, es posible que no lo hubiésemos detectado por encontrarnos por debajo del límite de detección de la técnica.

Por este motivo, decidimos cotejar los resultados de MALDI-TOF restringiendo la búsqueda a los distintos TLR y otras moléculas que pueden interactuar con ellos como MD-2, CD14 y CD36. Este análisis nos permitió identificar 4 péptidos de masas concordantes con las de los péptidos del TLR9. Lo mismo ocurrió para el TLR6 y TLR7. Sin embargo, esta cantidad de péptidos implica una cobertura menor al 5% para proteínas del tamaño de los TLR. Por otra parte, ninguno de los péptidos pudo ser secuenciado debido a la baja intensidad de señal, lo cual no nos permite asegurar fehacientemente que los TLRs mencionados hayan estado presentes en las muestras analizadas.

Cabe destacar que trabajos previos de nuestro grupo sugirieron que el TLR9 no participa del reconocimiento del ADN bacteriano por los neutrófilos. Esta conclusión está sustentada por experimentos indicando que (a) la respuesta al ADN bacteriano no es inhibida por cloroquina ni por wortmanina (inhibidores de la colocalización del ADN con el TLR9 en los endosomas); (b) los neutrófilos responden eficientemente a ADN inmovilizado y (c) los neutrófilos de ratones deficientes en TLR9 responden normalmente al ADN bacteriano.

Por otra parte, el TLR7 constituye un receptor para ARN simple cadena aunque también se le ha adjudicado capacidad de unir ADN. A su vez el TLR6 dimerizando con el TLR2 participa en el reconocimiento de una gran variedad de ligandos bacterianos. Sin embargo, es interesante notar que ni el Pam2CSK4 (ligando de TLR2/TLR6), ni el loxoribine (ligando de TLR7) lograron inhibir la unión del ADN-biot a la superficie de los neutrófilos aún empleados a concentraciones saturantes (datos no mostrados), un resultado que indirectamente sugiere que estos receptores no participan del reconocimiento del ADN.

Conclusiones

En la presente tesis se emplearon tres estrategias experimentales para purificar e identificar al receptor responsable de gatillar la activación de los neutrófilos inducida por ADN bacteriano. Como resultado se identificaron 16 proteínas de las cuales se escogieron 5 para ser evaluadas funcionalmente en base a: 1) su localización subcelular, 2) presencia de dominios de unión a ADN, 3) tipos celulares donde su expresión ha sido determinada y 4) presencia de dominio TIR o potencialidad de asociarse a otras proteínas con dominio TIR. Hasta el momento, ninguna de las proteínas estudiadas, a pesar de presentar capacidad de unir al ADN, mostró ser la responsable de gatillar la activación celular.

Hallazgos de numerosos grupos de investigación revelan una amplia distribución del ADN extracelular en biofilms bacterianos y la presencia de diversos mecanismos conservados evolutivamente que aseguran su presencia en los mismos. El modo de crecimiento en biofilm constituye una estrategia para la supervivencia microbiana que facilita la transmisión de patógenos proveyendo un ambiente protectoro estable y actuando como reservorio para la diseminación de un gran número de microorganismos a nuevas superficies (121). Por estos motivos es posible especular, desde un punto de vista evolutivo, que en los vertebrados se han seleccionado mecanismos para reconocer los biofilms bacterianos detectando el ADN de su matriz extracelular, de modo de incrementar las respuestas inmunes contra estas infecciones bacterianas persistentes. En algunos casos, sin embargo, como en las infecciones pulmonares con *P. aeruginosa* en pacientes con FQ o en infecciones crónicas en quemaduras, el ADN extracelular podría también contribuir a gatillar una respuesta inflamatoria sobre-dimensionada ocasionando daño tisular.

Referencias

*“El secreto de la creatividad es
saber esconder tus fuentes”*

Albert Einstein

1. Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.
2. Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
3. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects, *Lab Invest* 80, 617-653.
4. Lekstrom-Himes, J. A., and Gallin, J. I. (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes, *N Engl J Med* 343, 1703-1714.
5. Berliner, N. (1998) Molecular biology of neutrophil differentiation, *Curr Opin Hematol* 5, 49-53.
6. Christopher, M. J., and Link, D. C. (2007) Regulation of neutrophil homeostasis, *Curr Opin Hematol* 14, 3-8.
7. Crawford, J. (2002) Neutrophil growth factors, *Curr Hematol Rep* 1, 95-102.
8. Khwaja, A., and Linch, D. C. (1994) Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on neutrophil formation and function, *Curr Opin Hematol* 1, 216-220.
9. Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1990) The role of endothelial cells in inflammation, *Transplantation* 50, 537-544.
10. Choi, E. Y., Santoso, S., and Chavakis, T. (2009) Mechanisms of neutrophil transendothelial migration, *Front Biosci* 14, 1596-1605.
11. Parker, L. C., Whyte, M. K., Dower, S. K., and Sabroe, I. (2005) The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil, *J Leukoc Biol* 77, 886-892.
12. Underhill, D. M., and Gantner, B. (2004) Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity, *Microbes Infect* 6, 1368-1373.
13. Babior, B. M. (2004) NADPH oxidase, *Curr Opin Immunol* 16, 42-47.
14. Babior, B. M. (1999) NADPH oxidase: an update, *Blood* 93, 1464-1476.
15. Weiss, S. J. (1989) Tissue destruction by neutrophils, *N Engl J Med* 320, 365-376.
16. Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, *Microbes Infect* 5, 1317-1327.
17. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303, 1532-1535.

18. Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons, *Trends Immunol* 30, 513-521.
19. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J Cell Biol* 176, 231-241.
20. Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., and Cassatella, M. A. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines, *Immunol Rev* 177, 195-203.
21. Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009) Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils, *Immunity* 31, 761-771.
22. Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release, *J Immunol* 176, 3877-3883.
23. Dinarello, C. A. (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases, *Clin Exp Rheumatol* 20, S1-13.
24. Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (2000) How does the immune system distinguish self from nonself?, *Semin Immunol* 12, 185-188; discussion 257-344.
25. Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors, *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.
26. Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
27. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nat Immunol* 5, 987-995.
28. Lauw, F. N., Caffrey, D. R., and Golenbock, D. T. (2005) Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin, *Trends Immunol* 26, 509-511.
29. Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
30. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) Toll-like receptors, *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
31. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family, *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
32. Reis e Sousa, C. (2004) Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls, *Semin Immunol* 16, 27-34.
33. Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D. T., Latz, E., Czura, C. J., Fenton, M. J., Tracey, K. J., and Yang, H. (2006) HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2, *Shock* 26, 174-179.

34. Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome, *Nat Immunol* 5, 190-198.
35. Takeuchi, O., and Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell* 140, 805-820.
36. Hayashi, F., Means, T. K., and Luster, A. D. (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function, *Blood* 102, 2660-2669.
37. Sabroe, I., Dower, S. K., and Whyte, M. K. (2005) The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis, *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7, S421-426.
38. Sato, K., Yang, X. L., Yudate, T., Chung, J. S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R. P., Underhill, D., Cruz, P. D., Jr., and Ariizumi, K. (2006) Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses, *J Biol Chem* 281, 38854-38866.
39. Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S. Y. (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages, *J Immunol* 169, 3876-3882.
40. Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.
41. Limmon, G. V., Arredouani, M., McCann, K. L., Corn Minor, R. A., Kobzik, L., and Imani, F. (2008) Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA, *FASEB J* 22, 159-167.
42. Krieg, A. M. (1996) Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA, *Trends Microbiol* 4, 73-76.
43. Krieg, A. M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects, *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
44. Pisetsky, D. S. (1996) Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code, *Immunity* 5, 303-310.
45. Leifer, C. A., Brooks, J. C., Hoelzer, K., Lopez, J., Kennedy, M. N., Mazzoni, A., and Segal, D. M. (2006) Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9, *J Biol Chem* 281, 35585-35592.
46. Leifer, C. A., Kennedy, M. N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M. J., and Segal, D. M. (2004) TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation, *J Immunol* 173, 1179-1183.
47. Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C. M., Klein, D. C., Monks, B. G., McKnight, C. J., Lamphier, M. S., Duprex, W. P., Espevik, T., and

- Golenbock, D. T. (2007) Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9, *Nat Immunol* 8, 772-779.
48. Aissani, B., and Bernardi, G. (1991) CpG islands: features and distribution in the genomes of vertebrates, *Gene* 106, 173-183.
 49. Cooper, D. N. (1983) Eukaryotic DNA methylation, *Hum Genet* 64, 315-333.
 50. Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., and et al. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity, *J Natl Cancer Inst* 72, 955-962.
 51. Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Yamamoto, S. (1992) Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferons and activate natural killer cells, *Microbiol Immunol* 36, 55-66.
 52. Pisetsky, D. S., Grudier, J. P., and Gilkeson, G. S. (1990) A role for immunogenic DNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 33, 153-159.
 53. Wagner, H. (1999) Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger, *Adv Immunol* 73, 329-368.
 54. Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H., and Wagner, H. (2005) Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways, *J Immunol* 174, 6129-6136.
 55. Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E., and Wagner, H. (2008) The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation, *Immunity* 28, 315-323.
 56. Boule, M. W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I. R. (2004) Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes, *J Exp Med* 199, 1631-1640.
 57. Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J., and Marshak-Rothstein, A. (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors, *Nature* 416, 603-607.
 58. Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J. M., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide, *Nature* 449, 564-569.
 59. Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Lippa, P. B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S., and Wagner, H. (2006) CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA, *Eur J Immunol* 36, 431-436.

60. Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., and Kuroda, Y. (2001) Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus, *Nat Genet* 28, 313-314.
61. Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H. G., and Moroy, T. (2000) Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice, *Nat Genet* 25, 177-181.
62. Trevani, A. S., Chorny, A., Salamone, G., Vermeulen, M., Gamberale, R., Schettini, J., Raiden, S., and Geffner, J. (2003) Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway, *Eur J Immunol* 33, 3164-3174.
63. Dorn, A., Ludwig, R. J., Bock, A., Thaci, D., Hardt, K., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., and Kippenberger, S. (2007) Oligonucleotides suppress IL-8 in skin keratinocytes in vitro and offer anti-inflammatory properties in vivo, *J Invest Dermatol* 127, 846-854.
64. Elias, F., Flo, J., Lopez, R. A., Zorzopulos, J., Montaner, A., and Rodriguez, J. M. (2003) Strong cytosine-guanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT motifs, *J Immunol* 171, 3697-3704.
65. Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA, *Nat Immunol* 7, 40-48.
66. Pivarcsi, A. (2007) Toll-like receptor 9-independent suppression of skin inflammation by oligonucleotides, *J Invest Dermatol* 127, 746-748.
67. Rodriguez, J. M., Elias, F., Flo, J., Lopez, R. A., Zorzopulos, J., and Montaner, A. D. (2006) Immunostimulatory PyNTTTTGT oligodeoxynucleotides: structural properties and refinement of the active motif, *Oligonucleotides* 16, 275-285.
68. Sanjuan, M. A., Rao, N., Lai, K. T., Gu, Y., Sun, S., Fuchs, A., Fung-Leung, W. P., Colonna, M., and Karlsson, L. (2006) CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion, *J Cell Biol* 172, 1057-1068.
69. Spies, B., Hochrein, H., Vabulas, M., Huster, K., Busch, D. H., Schmitz, F., Heit, A., and Wagner, H. (2003) Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice, *J Immunol* 171, 5908-5912.
70. Stetson, D. B., and Medzhitov, R. (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response, *Immunity* 24, 93-103.
71. Wang, Y., and Krieg, A. M. (2003) Synergy between CpG- or non-CpG DNA and specific antigen for B cell activation, *Int Immunol* 15, 223-231.
72. Yasuda, K., Ogawa, Y., Kishimoto, M., Takagi, T., Hashida, M., and Takakura, Y. (2002) Plasmid DNA activates murine macrophages to induce inflammatory

cytokines in a CpG motif-independent manner by complex formation with cationic liposomes, *Biochem Biophys Res Commun* 293, 344-348.

73. Yasuda, K., Ogawa, Y., Yamane, I., Nishikawa, M., and Takakura, Y. (2005) Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways, *J Leukoc Biol* 77, 71-79.
74. Zhao, H., Hemmi, H., Akira, S., Cheng, S. H., Scheule, R. K., and Yew, N. S. (2004) Contribution of Toll-like receptor 9 signaling to the acute inflammatory response to nonviral vectors, *Mol Ther* 9, 241-248.
75. Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A., and Hornung, V. (2009) RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate, *Nat Immunol* 10, 1065-1072.
76. Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., and Taniguchi, T. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response, *Nature* 448, 501-505.
77. Takeshita, F., and Ishii, K. J. (2008) Intracellular DNA sensors in immunity, *Curr Opin Immunol* 20, 383-388.
78. Wang, Z., Choi, M. K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., and Taniguchi, T. (2008) Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5477-5482.
79. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E. S. (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA, *Nature* 458, 509-513.
80. Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., Parks, R. J., and Tschopp, J. (2008) The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response, *Nature* 452, 103-107.
81. Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., and Akira, S. (2008) TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines, *Nature* 451, 725-729.
82. Fillion, M. C., Saha, N., Gueddi, M., and Phillips, N. C. (2003) Development of short non-CpG phosphodiester oligonucleotides as immune stimulatory agents, *Vaccine* 21, 983-989.
83. Vollmer, J., Janosch, A., Laucht, M., Ballas, Z. K., Schetter, C., and Krieg, A. M. (2002) Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12, 165-175.

84. Ishii, K. J., Takeshita, F., Gursel, I., Gursel, M., Conover, J., Nussenzweig, A., and Klinman, D. M. (2002) Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation, *J Exp Med* 196, 269-274.
85. Macfarlane, D. E., and Manzel, L. (1998) Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds, *J Immunol* 160, 1122-1131.
86. Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S., and Krieg, A. M. (1996) Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway, *J Immunol* 157, 5394-5402.
87. Yi, A. K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J., and Krieg, A. M. (1998) CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species, *J Immunol* 160, 4755-4761.
88. Alvarez, M. E., Fuxman Bass, J. I., Geffner, J. R., Calotti, P. X., Costas, M., Coso, O. A., Gamberale, R., Vermeulen, M. E., Salamone, G., Martinez, D., Tanos, T., and Trevani, A. S. (2006) Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation, *J Immunol* 177, 4037-4046.
89. Beltinger, C., Saragovi, H. U., Smith, R. M., LeSauter, L., Shah, N., DeDionisio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarett, L., and Gewirtz, A. M. (1995) Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides, *J Clin Invest* 95, 1814-1823.
90. Kimura, Y., Sonehara, K., Kuramoto, E., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Tokunaga, T. (1994) Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN, *J Biochem* 116, 991-994.
91. Yakubov, L. A., Deeva, E. A., Zarytova, V. F., Ivanova, E. M., Ryte, A. S., Yurchenko, L. V., and Vlassov, V. V. (1989) Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6454-6458.
92. Loke, S. L., Stein, C. A., Zhang, X. H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J. S., and Neckers, L. M. (1989) Characterization of oligonucleotide transport into living cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3474-3478.
93. Bennett, R. M., Gabor, G. T., and Merritt, M. M. (1985) DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA, *J Clin Invest* 76, 2182-2190.
94. Benimetskaya, L., Loike, J. D., Khaled, Z., Loike, G., Silverstein, S. C., Cao, L., el Khoury, J., Cai, T. Q., and Stein, C. A. (1997) Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein, *Nat Med* 3, 414-420.
95. Takagi, T., Hashiguchi, M., Mahato, R. I., Tokuda, H., Takakura, Y., and Hashida, M. (1998) Involvement of specific mechanism in plasmid DNA uptake

- by mouse peritoneal macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 245, 729-733.
96. Yoshinaga, T., Yasuda, K., Ogawa, Y., and Takakura, Y. (2002) Efficient uptake and rapid degradation of plasmid DNA by murine dendritic cells via a specific mechanism, *Biochem Biophys Res Commun* 299, 389-394.
 97. Zhu, F. G., Reich, C. F., and Pisetsky, D. S. (2001) The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides, *Immunology* 103, 226-234.
 98. Butler, M., Crooke, R. M., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Lougheed, M., Murray, S. F., Witchell, D., Steinbrecher, U., and Bennett, C. F. (2000) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides distribute similarly in class A scavenger receptor knockout and wild-type mice, *J Pharmacol Exp Ther* 292, 489-496.
 99. Takakura, Y., Takagi, T., Hashiguchi, M., Nishikawa, M., Yamashita, F., Doi, T., Imanishi, T., Suzuki, H., Kodama, T., and Hashida, M. (1999) Characterization of plasmid DNA binding and uptake by peritoneal macrophages from class A scavenger receptor knockout mice, *Pharm Res* 16, 503-508.
 100. Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms, *Mol Microbiol* 59, 1114-1128.
 101. Lorenz, M. G., Gerjets, D., and Wackernagel, W. (1991) Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria, *Arch Microbiol* 156, 319-326.
 102. Palchevskiy, V., and Finkel, S. E. (2006) *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient, *J Bacteriol* 188, 3902-3910.
 103. Romanowski, G., Lorenz, M. G., Sayler, G., and Wackernagel, W. (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay, *Appl Environ Microbiol* 58, 3012-3019.
 104. Romanowski, G., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I, *Appl Environ Microbiol* 57, 1057-1061.
 105. Romanowski, G., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1993) Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm--adsorption, DNAase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*, *Mol Ecol* 2, 171-181.
 106. Moscoso, M., and Claverys, J. P. (2004) Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA, *Mol Microbiol* 54, 783-794.
 107. Ottolenghi, E., and Hotchkiss, R. D. (1960) Appearance of genetic transforming activity in pneumococcal cultures, *Science* 132, 1257-1258.

108. Steinberger, R. E., and Holden, P. A. (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms, *Appl Environ Microbiol* 71, 5404-5410.
109. Steinmoen, H., Knutsen, E., and Havarstein, L. S. (2002) Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7681-7686.
110. Petersen, F. C., Tao, L., and Scheie, A. A. (2005) DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation, *J Bacteriol* 187, 4392-4400.
111. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., and Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, *Science* 295, 1487.
112. Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 45, 999-1007.
113. Murakawa, T. (1973) Slime production by *Pseudomonas aeruginosa*. IV. Chemical analysis of two varieties of slime produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Jpn J Microbiol* 17, 513-520.
114. Murakawa, T. (1973) Slime production by *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Purification of slime and its physicochemical properties, *Jpn J Microbiol* 17, 273-281.
115. Nemoto, K., Hirota, K., Murakami, K., Taniguti, K., Murata, H., Viducic, D., and Miyake, Y. (2003) Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Chemotherapy* 49, 121-125.
116. Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., and Kaplan, J. B. (2008) Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *Appl Environ Microbiol* 74, 470-476.
117. Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., and Qu, D. (2007) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, *Microbiology* 153, 2083-2092.
118. Thomas, V. C., Thurlow, L. R., Boyle, D., and Hancock, L. E. (2008) Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development, *J Bacteriol* 190, 5690-5698.
119. Moscoso, M., Garcia, E., and Lopez, R. (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion, *J Bacteriol* 188, 7785-7795.
120. Jurcisek, J. A., and Bakaletz, L. O. (2007) Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein, *J Bacteriol* 189, 3868-3875.

121. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108.
122. Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections, *Cell Microbiol* 11, 1034-1043.
123. del Pozo, J. L., and Patel, R. (2007) The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections, *Clin Pharmacol Ther* 82, 204-209.
124. Parsek, M. R., and Singh, P. K. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis, *Annu Rev Microbiol* 57, 677-701.
125. James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., and Stewart, P. S. (2008) Biofilms in chronic wounds, *Wound Repair Regen* 16, 37-44.
126. Lam, J., Chan, R., Lam, K., and Costerton, J. W. (1980) Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis, *Infect Immun* 28, 546-556.
127. Leid, J. G., Shirliff, M. E., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms, *Infect Immun* 70, 6339-6345.
128. Jesaitis, A. J., Franklin, M. J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C. I., Bleazard, J. B., Duffy, J. E., Beyenal, H., and Lewandowski, Z. (2003) Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions, *J Immunol* 171, 4329-4339.
129. Leid, J. G., Willson, C. J., Shirliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., and Jeffers, A. K. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing, *J Immunol* 175, 7512-7518.
130. Walker, T. S., Tomlin, K. L., Worthen, G. S., Poch, K. R., Lieber, J. G., Saavedra, M. T., Fessler, M. B., Malcolm, K. C., Vasil, M. L., and Nick, J. A. (2005) Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils, *Infect Immun* 73, 3693-3701.
131. Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Roos, V., Hoiby, N., Givskov, M., and Klemm, P. (2007) Biological Trojan horse: Antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils, *Infect Immun* 75, 30-34.
132. Jensen, P. O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., and Hoiby, N. (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 153, 1329-1338.
133. Cerca, N., Jefferson, K. K., Oliveira, R., Pier, G. B., and Azeredo, J. (2006) Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state, *Infect Immun* 74, 4849-4855.

134. de Beer, D., Stoodley, P., and Lewandowski, Z. (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy, *Biotechnol Bioeng* 53, 151-158.
135. Tashiro, Y., Nomura, N., Nakao, R., Senpuku, H., Kariyama, R., Kumon, H., Kosono, S., Watanabe, H., Nakajima, T., and Uchiyama, H. (2008) Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 190, 3969-3978.
136. Jensen, E. T., Kharazmi, A., Lam, K., Costerton, J. W., and Hoiby, N. (1990) Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms, *Infect Immun* 58, 2383-2385.
137. Steinberg, D., Poran, S., and Shapira, L. (1999) The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils, *Arch Oral Biol* 44, 437-444.
138. Cross, A., Allen, J. R., Burke, J., Duce, G., Harris, A., John, J., Johnson, D., Lew, M., MacMillan, B., Meers, P., and et al. (1983) Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends, *Rev Infect Dis* 5 Suppl 5, S837-845.
139. Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. W., Campbell, J. I., Jensen, P., Johnsen, A. H., Givskov, M., Ohman, D. E., Molin, S., Hoiby, N., and Kharazmi, A. (1999) Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung, *Microbiology* 145 (Pt 6), 1349-1357.
140. Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464.
141. Hassett, D. J., Korfhagen, T. R., Irvin, R. T., Schurr, M. J., Sauer, K., Lau, G. W., Sutton, M. D., Yu, H., and Hoiby, N. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies, *Expert Opin Ther Targets* 14, 117-130.
142. Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R., and Olson, M. V. (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8487-8492.
143. Govan, J. R., and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiol Rev* 60, 539-574.
144. Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis, *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222.
145. Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F., and Koch, C. (1992) Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, *Thorax* 47, 6-13.

146. Smith, G. L., Socransky, S. S., and Smith, C. M. (1989) Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms, *Oral Microbiol Immunol* 4, 47-51.
147. Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., and Nakai, K. (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor, *Nucleic Acids Res* 35, W585-587.
148. Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Buillard, V., Cerutti, L., Copley, R., Courcelle, E., Das, U., Daugherty, L., Dibley, M., Finn, R., Fleischmann, W., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Hunter, S., Kahn, D., Kanapin, A., Kejariwal, A., Labarga, A., Langendijk-Genevaux, P. S., Lonsdale, D., Lopez, R., Letunic, I., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., Mistry, J., Mitchell, A., Nikolskaya, A. N., Orchard, S., Orengo, C., Petryszak, R., Selengut, J. D., Sigrist, C. J., Thomas, P. D., Valentin, F., Wilson, D., Wu, C. H., and Yeats, C. (2007) New developments in the InterPro database, *Nucleic Acids Res* 35, D224-228.
149. Parkinson, H., Kapushesky, M., Shojatalab, M., Abeygunawardena, N., Coulson, R., Farne, A., Holloway, E., Kolesnykov, N., Lilja, P., Lukk, M., Mani, R., Rayner, T., Sharma, A., William, E., Sarkans, U., and Brazma, A. (2007) ArrayExpress--a public database of microarray experiments and gene expression profiles, *Nucleic Acids Res* 35, D747-750.
150. Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., and von Mering, C. (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms, *Nucleic Acids Res* 37, D412-416.
151. Schwartz, J., Leidal, K. G., Femling, J. K., Weiss, J. P., and Nauseef, W. M. (2009) Neutrophil blebbing of GFP-expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria, *J Immunol* 183, 2632-2641.
152. Moulton, P., Martin, H., Ainger, A., Cross, A., Hoare, C., Doel, J., Harrison, R., Eisenthal, R., and Hancock, J. (2000) The inhibition of flavoproteins by phenoxaiodonium, a new iodonium analogue, *Eur J Pharmacol* 401, 115-120.
153. Fuxman Bass, J. I., Gabelloni, M. L., Alvarez, M. E., Vermeulen, M. E., Russo, D. M., Zorreguieta, A., Geffner, J. R., and Trevani, A. S. (2008) Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface, *Lab Invest* 88, 926-937.
154. Shi, C., Zhang, X., Chen, Z., Robinson, M. K., and Simon, D. I. (2001) Leukocyte integrin Mac-1 recruits toll/interleukin-1 receptor superfamily signaling intermediates to modulate NF-kappaB activity, *Circ Res* 89, 859-865.
155. Bennett, R. M., Davis, J., Campbell, S., and Portnoff, S. (1983) Lactoferrin binds to cell membrane DNA. Association of surface DNA with an enriched population of B cells and monocytes, *J Clin Invest* 71, 611-618.
156. Choubey, D., and Panchanathan, R. (2008) Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus, *Immunol Lett* 119, 32-41.

157. Durantou, J., Belorgey, D., Carrere, J., Donato, L., Moritz, T., and Bieth, J. G. (2000) Effect of DNase on the activity of neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3 in the presence of DNA, *FEBS Lett* 473, 154-156.
158. Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A., and Van Dyke, T. E. (2004) Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction, *Infect Immun* 72, 2312-2320.
159. Takamatsu, H., Espinoza, J. L., Lu, X., Qi, Z., Okawa, K., and Nakao, S. (2009) Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma, *J Immunol* 182, 703-710.
160. Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E. C., Rehm, B. H., and Hancock, R. E. (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation, *Infect Immun* 76, 4176-4182.
161. Reid, S. D., Hong, W., Dew, K. E., Winn, D. R., Pang, B., Watt, J., Glover, D. T., Hollingshead, S. K., and Swords, W. E. (2009) *Streptococcus pneumoniae* forms surface-attached communities in the middle ear of experimentally infected chinchillas, *J Infect Dis* 199, 786-794.
162. Munro, C. L., and Macrina, F. L. (1993) Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis, *Mol Microbiol* 8, 133-142.
163. Stiver, H. G., Zachidniak, K., and Speert, D. P. (1988) Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by the mucoid exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Invest Med* 11, 247-252.
164. Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., Standiford, T. J., Ishiguro, M., and Yamaguchi, K. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils, *Infect Immun* 71, 5785-5793.
165. Wagner, C., Zimmermann, S., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., and Hansch, G. M. (2007) The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN), *Anal Bioanal Chem* 387, 481-487.
166. Zimmermann, S., Wagner, C., Muller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., and Hansch, G. M. (2006) Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, *Infect Immun* 74, 5687-5692.
167. Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Burmolle, M., Hentzer, M., Haagensen, J. A., Hougen, H. P., Calum, H., Madsen, K. G., Moser, C., Molin, S., Hoiby, N., and Givskov, M. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent, *Microbiology* 151, 373-383.

168. Matsukawa, M., and Greenberg, E. P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J Bacteriol* 186, 4449-4456.
169. Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J Bacteriol* 185, 4585-4592.
170. Palmen, R., and Hellingwerf, K. J. (1995) *Acinetobacter calcoaceticus* liberates chromosomal DNA during induction of competence by cell lysis, *Curr Microbiol* 30, 7-10.
171. Smith, R. S., and Iglewski, B. H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence, *Curr Opin Microbiol* 6, 56-60.
172. Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS, *Mol Microbiol* 21, 1137-1146.
173. Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A., and Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Mol Microbiol* 17, 333-343.
174. Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., and Iglewski, B. H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication, *Science* 260, 1127-1130.
175. McKenzie, S. G., Chowdhury, S., Strandvik, B., and Hodson, M. E. (2007) Dornase alfa is well tolerated: data from the epidemiologic registry of cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol* 42, 928-937.
176. Lieberman, J. (1967) Inhibition of protease activity in purulent sputum by DNA, *J Lab Clin Med* 70, 595-605.
177. El Kebir, D., Jozsef, L., Pan, W., and Filep, J. G. (2008) Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation, *Circ Res* 103, 352-359.
178. Plotkowski, M. C., Beck, G., Tournier, J. M., Bernardo-Filho, M., Marques, E. A., and Puchelle, E. (1989) Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelium and the effect of leucocyte elastase, *J Med Microbiol* 30, 285-293.
179. Fuxman Bass, J. I., Alvarez, M. E., Gabelloni, M. L., Vermeulen, M. E., Amaral, M. M., Geffner, J. R., and Trevani, A. S. (2008) GM-CSF enhances a CpG-independent pathway of neutrophil activation triggered by bacterial DNA, *Mol Immunol* 46, 37-44.
180. Chmiel, J. F., and Davis, P. B. (2003) State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?, *Respir Res* 4, 8.

181. Saba, S., Soong, G., Greenberg, S., and Prince, A. (2002) Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways, *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 561-567.
182. Paul, K., Rietschel, E., Ballmann, M., Griese, M., Worlitzsch, D., Shute, J., Chen, C., Schink, T., Doring, G., van Koningsbruggen, S., Wahn, U., and Ratjen, F. (2004) Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med* 169, 719-725.
183. Jeltsch, A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases, *ChemBiochem* 3, 274-293.
184. Wang, L., Chen, S., Xu, T., Taghizadeh, K., Wishnok, J. S., Zhou, X., You, D., Deng, Z., and Dedon, P. C. (2007) Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes, *Nat Chem Biol* 3, 709-710.
185. Basner-Tschakarjan, E., Mirmohammadsadegh, A., Baer, A., and Hengge, U. R. (2004) Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: evidence for DNA-binding proteins, *Gene Ther* 11, 765-774.
186. Emlen, W., Rifai, A., Magilavy, D., and Mannik, M. (1988) Hepatic binding of DNA is mediated by a receptor on nonparenchymal cells, *Am J Pathol* 133, 54-60.
187. Lankes, W. T., and Furthmayr, H. (1991) Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8297-8301.
188. Wittrup, A., Sandgren, S., Lilja, J., Bratt, C., Gustavsson, N., Morgelin, M., and Belting, M. (2007) Identification of proteins released by mammalian cells that mediate DNA internalization through proteoglycan-dependent macropinocytosis, *J Biol Chem* 282, 27897-27904.
189. Campbell, E. J., and Owen, C. A. (2007) The sulfate groups of chondroitin sulfate- and heparan sulfate-containing proteoglycans in neutrophil plasma membranes are novel binding sites for human leukocyte elastase and cathepsin G, *J Biol Chem* 282, 14645-14654.
190. He, J., and Furmanski, P. (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA, *Nature* 373, 721-724.
191. Murao, S., Stevens, F. J., Ito, A., and Huberman, E. (1988) Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1232-1236.
192. Vogelmeier, C., and Doring, G. (1996) Neutrophil proteinases and rhDNase therapy in cystic fibrosis, *Eur Respir J* 9, 2193-2195.
193. Britigan, B. E., Lewis, T. S., Waldschmidt, M., McCormick, M. L., and Krieg, A. M. (2001) Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells, *J Immunol* 167, 2921-2928.

194. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K., and Segal, D. M. (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells, *J Immunol* 166, 249-255.
195. Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H., and Mann, M. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14440-14445.