



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Implicación de las vesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos

Irene Portas Torres

Grau de biologia

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 47405832A

Treball tutelat per Enriquer Llobet Brossa
Departament de Microbiologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Klebsiella pneumoniae, péptidos antimicrobianos, factor de virulencia, polisacàrido capsular, defensinas

Índice

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.2. Bacterias Gram negativas.....	6
2.3. Formación de vesículas (OMVs).....	6
2.4. Vesículas durante la infección y su interacción con el huésped.....	9
2.5. Respuesta inmune innata y péptidos antimicrobianos (APs).....	10
3. Objetivos e Hipótesis.....	11
4. Material y métodos.....	12
4.1. Cultivo bacteriano.....	12
4.2. Extracción de OMVs.....	12
4.3. Identificación de proteínas presentes en las OMVs.....	13
4.4. Estimulación celular mediante OMVs.....	14
4.5. Lisis celular.....	15
4.5.1. Células epiteliales A549.....	15
4.5.2. Macrófagos MH-S.....	16
4.6. Purificación del ARN celular.....	18
4.7. RT-PCR.....	18
4.8. Análisis estadístico.....	18
5. Resultados.....	19
5.1. Gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	19
5.2. Cuantificación ARN celular.....	20
5.3. Modulación sistema inmune y secreción de APs.....	21
6. Discusión.....	22
6.1. OMVs y las diferentes cepas estudiadas.....	22
6.2. Modulación secreción Aps.....	22
7. Conclusión.....	23
8. Bibliografía.....	24

1. Resumen

Actualmente, la bacteria patógena oportunista *Klebsiella pneumoniae* supone una amenaza en el sector clínico. Esta además de provocar toda una serie de infecciones especialmente a pacientes inmunodeprimidos pudiendo llegar a ocasionarles la muerte, ha originado cepas multiresistentes a péptidos antimicrobianos que impiden su tratamiento.

Tanto las bacterias Gram negativas patógenas como las no patógenas, secretan de forma espontánea vesículas de la membrana externa (OMVs, del inglés Outer Membrane Vesicles) durante su crecimiento. En el caso de las OMVs de bacterias patógenas, causan citotoxicidad, modulan la respuesta del sistema inmune del huésped, funcionan como vías secretoras de moléculas de señalización entre células bacterianas y contribuyen a la formación de biofilms.

Se sabe que unas de las proteínas mas abundantes en la membrana de *Klebsiella* son la OmpA y OmpK. Ambas proteínas ayudan a la adhesión y a la invasión de las células eucariotas, es por eso que su ausencia hace más vulnerable a la bacteria.

Es por eso que el presente estudio se ha centrado en la acción de las OMVs procedentes de tres cepas diferentes: wildtype y 52145 Δ ompA y 52145 Δ ompK36, a las que se les ha suprimido una de estas proteínas; y su acción sobre la regulación de la expresión de β -defensina 1 y 2, péptidos antimicrobianos (APs) secretados por el sistema inmune innato contra cualquier agente infeccioso.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de dichos APs , se encuentra directamente regulada por la acción de las OMVs, aunque todavía se desconocen las bases del mecanismo que utilizan.

2. Introducción

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una importante bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae, la cual se encuentra formada por una gran cantidad de especies bacterianas. *Klebsiella pneumoniae* se caracteriza por ser una bacteria capsulada en forma de bacilo. Es patógena oportunista, causante de diversos tipos de infecciones desde urinarias a neumonías adquiridas en hospitales, afectando especialmente a pacientes inmunodeprimidos, los cuales presentan una mortalidad de entre el 25% y el 60% (Sahly et al., 1997).

La facilidad con la que se transmite esta bacteria en el ambiente hospitalario ha hecho que sea la responsable de serios brotes epidémicos (Hervas et al., 1993). Esto, junto el incremento de cepas multiresistentes a agentes antimicrobianos y por provocar una falta de respuesta inmune temprana, provoca serios problemas en el entorno clínico y dificulta el tratamiento de estas infecciones (Lee et al. 2012).

En la mayoría de estudios de los factores de virulencia de *K. pneumoniae* se han centrado en la parte más superficial de la bacteria, como las proteínas de membrana, el polisacárido capsular (CPS) y el lipopolisacárido (LPS).

El más caracterizado es el polisacárido capsular (CPS) (Cortés et al., 2002; Campos et al., 2004), que recubre la bacteria. También se han identificado otros como, LPS (Shankar-Sinha et al., 2004; Lawlor et al. 2005), sideróforos (Nassif & Sansonetti, 1986) y adhesinas, aunque todavía no se ha determinado ningún factor citotóxico específico para células huésped (Lee et al., 2012).

El CPS se encuentra formado por polisacáridos en forma de capas que recubren la célula bacteriana constituyendo una matriz altamente hidratada. Muchas bacterias patógenas lo presentan otorgándoles una mayor resistencia y evitando la fagocitosis (Llobet et al., 2008).

Las infecciones de *K. pneumoniae* se caracterizan por una pobre respuesta inmune temprana, en parte debido a que el CPS ayuda a suprimir la respuesta inflamatoria del huésped (March et al., 2011).

Las proteínas que aparecen en la membrana externa (OMPs, del inglés *outer membrane proteins*) pueden ser lipoproteínas o proteínas integrales de membrana con forma de barril β . Estas son importantes a la hora de mantener la integridad de la membrana, transportar moléculas, y la patogénesis (Lin et al., 2002). Entre ellas, OmpA y OmpK son las OMPs más abundantes en *Klebsiella*. Ambas proteínas se encuentran altamente conservada en la familia

Enterobacteriaceae y a lo largo de la evolución (March et al., 2011). Estas proteínas ayudan a la adhesión y a la invasión de las células eucariotas (Prasadarao et al., 1996; Sukumaran et al., 2003; March et al., 2011).

2.2. Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas presentan dos bicapas lipídicas, la membrana interna (IM, del inglés inner membrane) y la externa (OM, del inglés outer membrane), separadas por el periplasma; donde se encuentra una capa de peptidoglicano (Bos et al., 2007).

Las membranas tienen diferente composición proteica y lipídica. En la mayoría de bacterias Gram negativas, la capa más externa de la membrana externa (OM) se encuentra formada principalmente por lipopolisacáridos (LPS), mientras que la capa más interna y la bicapa de la membrana interna (IM) se encuentran formadas por fosfolípidos (Kulp and Kuehn, 2010).

El periplasma se encuentra formado por una capa delgada y rígida de peptidoglicanos (PG); unida a ambas membranas mediante proteínas de anclaje como lipoproteínas de Braun (Lpp) y OmpA (Kulp and Kuehn, 2010), proteínas “housekeeping” y enzimas, y componentes residentes y transitorios de vías secretoras. Estudios de análisis bioquímicos de vesículas purificadas por densidad de gradiente, demuestran que las OMVs nativas están formadas únicamente por proteínas y lípidos de la membrana externa (OM) y el periplasma, y no contienen componentes de la membrana interna (IM) ni del citoplasma (McBroom and Kuehn, 2005).

2.3. Formación de vesículas (OMVs)

Las bacterias Gram negativas, patógenas y no patógenas, secretan de forma espontánea vesículas de la membrana externa (OMVs, del inglés Outer Membrane Vesicles) durante su crecimiento (Mayrand and Grenier 1989; Kadurugamuwa and Beveridge 1997; Li et al. 1998; Beveridge 1999). Diferentes estudios sobre el papel de vesículas procedentes de diferentes bacterias, han llegado a establecer una función común: estas son el medio por el cual las bacterias interactúan con células procariontas y eucariotas en su medio (Kuehn and Kesty, 2005). Aunque también se les atribuye numerosas funciones biológicas como la liberación de toxinas, la modulación del sistema inmune, el transporte de moléculas de señalización entre células bacterianas y la formación de biofilms (Ismail et al., 2003; Klieve et al., 2005; Kuehn & Kesty, 2005; Masburn-Warren & Whiteley, 2006; McBroom & Kuehn, 2007).

Las OMVs son producidas por evaginaciones de membrana en células en fase de crecimiento y división, no son productos de la lisis celular ni de la muerte celular (Mug-Opstelten and Witholt,

1978; Zhou et al., 1998; Yaganza et al., 2004; McBroom and Kuehn, 2005), ya que presentan nuevas proteínas sintetizadas y no contienen restos de lisis bacteriana (McBroom et al., 2006; Mug-Opstelten and Witholt, 1978; Zhou et al., 1998).

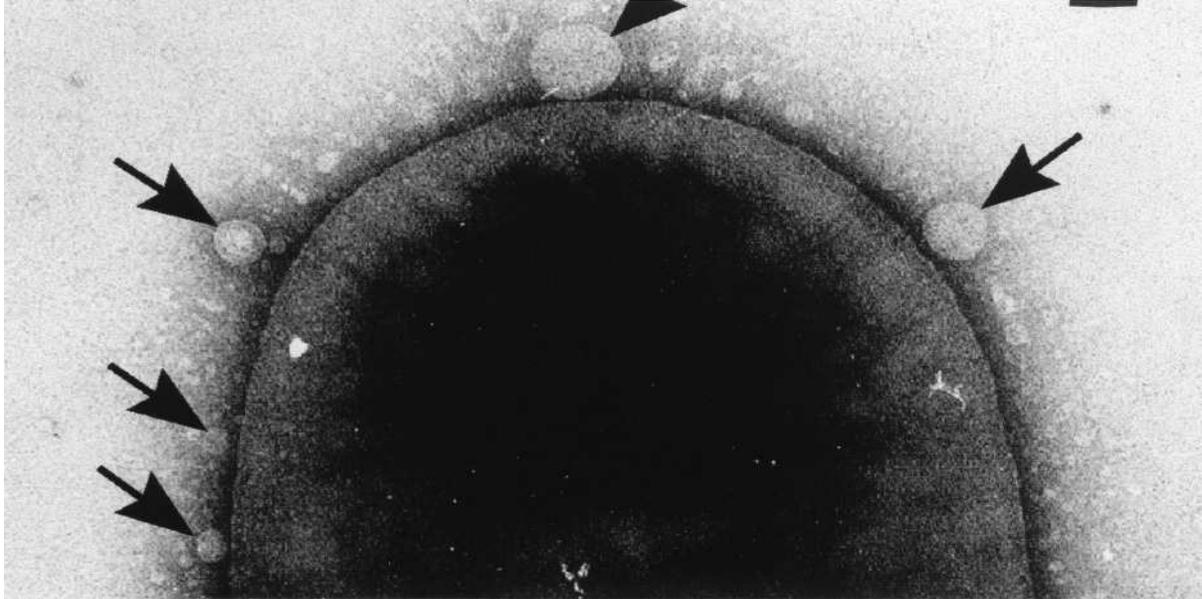


Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión de OMVs siendo liberadas de la superficie de *S. marcescens* (flechas) (Zusheng et al. 1998).

Estas se forman cuando una porción concreta de membrana externa y contenido periplásmico se evagina, y da lugar a vesículas redondeadas (Beveridge, T. J. 1999; Mayrand and Grenier, 1989; McBroom and Kuehn, 2005), manteniendo la integridad de la célula bacteriana de la cual se originan.

Estas vesículas tienen unas dimensiones heterogéneas de 50 a 250 nm de diámetro dependiendo de la cepa (Mashburn-Warren & Whiteley, 2006; Beveridge, 1999) y se encuentran formadas por una bicapa lipídica procedente de la OM, por lo que presentan una composición similar a esta: una membrana externa de lipopolisacáridos (LPS) y una membrana interna formada por fosfolípidos; también contienen proteínas de membrana externa (OMPs, del inglés outer membrane proteins), y componentes del periplasma (Gankema et al., 1980; Hoekstra et al., 1976; Horstman et al., 2000; Kadurugamuwa et al., 1995; McBroom et al., 2005).

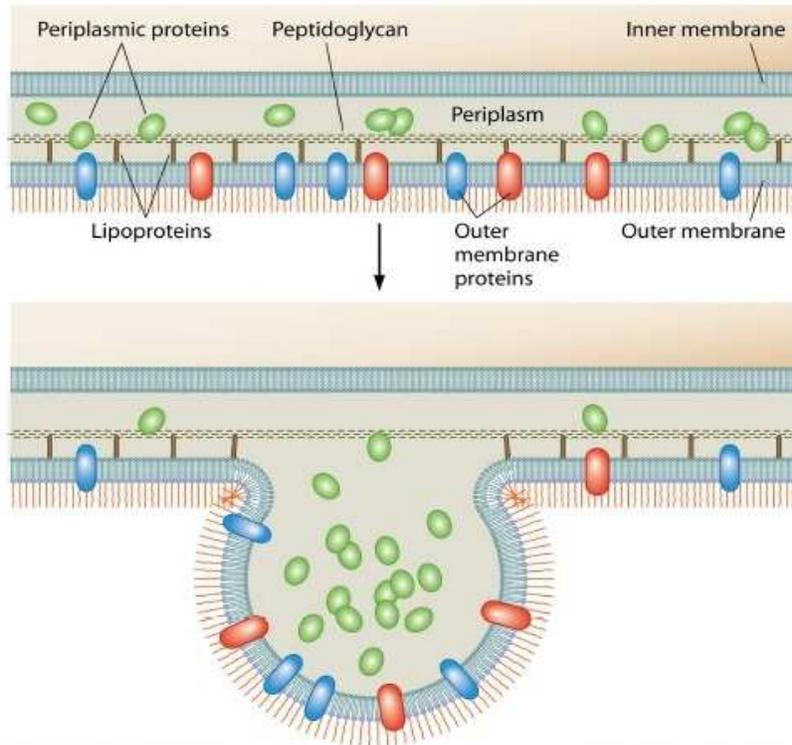


Figura 2. Modelo de formación de vesículas (OMVs). Las vesículas liberadas están formadas por los lípidos y proteínas de la membrana externa y contienen material del periplasma y factores de virulencia. Aunque algunos aspectos del mecanismo siguen sin estar claros, se sabe que estas suelen aparecer donde los enlaces entre lipoproteínas y la membrana externa tienen menor presencia o están ausentes.

La formación de vesículas puede verse afectada por varios factores. Por una parte, una disminución en el número de enlaces entre la OM y la PG, puede dar lugar a la aparición de posibles sitios en los que se podrán liberar vesículas de OM (Hoekstra et al. 1976). Dichas uniones entre OM y PG, son establecidas durante el crecimiento de la envoltura celular e indicarán como afecta la división celular puede influir en la cantidad de vesículas que se producirán (Chatterjee Das y 1967 ; Kadurugamuwa y Beveridge 1996 ; Bernadac et al. 1998).

Por otra parte, se llega a un máximo de producción en la etapa logarítmica del final de la fase de crecimiento y se encuentran en mayor proporción en lugares de división celular (Chatterjee and Das 1967; Hoekstra et al. 1976; Gamazo and Moriyon 1987). La producción también se ve incrementada durante periodos de estrés bacteriano, como durante la colonización de tejidos del huésped (Ellis and Kuehn, 2010).

Por un lado, las vesículas en bacterias no patógenas, a veces tienen una función protectora; ya que ayudan a reducir los niveles tóxicos de compuestos como el tolueno y en la liberación de posibles fagos atacantes, facilitando la supervivencia bacteriana (Loeb 1974; Loeb and Kilner 1978; Kobayashi et al. 2000).

Las bacterias patógenas Gram negativas a la hora de secretar factores de virulencia, productos que mejorarán su supervivencia y/o dañarán a las células huéspedes, presentan un problema por el hecho de poseer dos bicapas lipídicas separadas por el periplasma. Es por eso, que han adquirido diversas estrategias, como la vía de secreción mediante OMVs, para conseguir que los factores de virulencia activos lleguen al medio extracelular y a las células huésped (Kuehn and Kesty, 2005).

Las OMVs liberadas por bacterias patógenas contienen adhesinas, toxinas y compuestos inmunomoduladores; y modulan directamente la unión de la bacteria y su infección, causan citotoxicidad, y modulan la respuesta inmune del huésped. Al participar en diversos aspectos de la interacción huésped-patógeno, las vesículas de membrana externa suponen potentes factores de virulencia de las bacterias (Kuehn and Kesty, 2005).

Estas también se caracterizan por facilitar la formación de un nicho de colonización en un ambiente en el que compiten diferentes bacterias, como sucede en la colonización de un huésped (Kuehn and Kesty, 2005).

Las vesículas también tienen un papel importante como vía secretora, ya que pueden transportar proteínas hidrofóbicas y proteínas solubles en el lumen de las vesículas (Kesty & Kuehn, 2004). Este hecho les permite transportar material beneficioso a otras bacterias, contribuyendo así en la diversidad genética y supervivencia bacteriana. Además de facilitar el transporte de materia entre bacterias, estas también pueden mediar la coagregación de las bacterias, pudiendo dar lugar a la formación de biofilms y la colonización (Grenier and Mayrand, 1987; Whitchurch et al., 2002).

Su formación es un proceso ubicuo, ya que aparecen en bacterias crecidas en diferentes medios incluyendo cultivo líquido, cultivo sólido y en biofilm (Beveridge, 1999).

2.4. Vesículas durante la infección y su interacción con el huésped

Las vesículas de membrana son el medio natural mediante el cual se realiza el transporte intercelular directo de factores de virulencia bacterianos en células y tejidos del huésped (Kuehn and Kesty, 2005).

Se han identificado vesículas procedentes de bacterias patógenas extracelulares y intracelulares en diferentes tipos de tejidos del huésped, cosa que indica una elevada capacidad de acceder a los diferentes medios dentro del huésped. Los factores del medio en los que se encuentran los patógenos en el interior del huésped, afectarán en la producción de vesículas y su contenido (Kuehn and Kesty, 2005).

Los factores que se encuentran en la superficie de las vesículas pueden regular la adhesión de estas a células eucariotas, así como la internalización del material del interior de la vesícula. Estos factores de la superficie se encuentran regulados genéticamente durante la infección, para que así la bacteria pueda unirse a las células huésped y evitar la respuesta inmune. La composición de las vesículas deben reflejar el estado de la membrana OM de la bacteria, así que dependerán del lugar y las condiciones en las que estas sean cultivadas (Kuehn and Kesty, 2005).

La interacción de la vesícula con la célula huésped puede ocurrir mediante la fusión de las membranas o mediante una vía de unión mediada por receptor adhesina. Esta unión contribuirá a la infección ya que permitirá que las vesículas liberen todo su contenido tóxico en el interior de las células. Es por eso, que además de provocar citotoxicidad, dicho proceso también incluye señalización y respuestas inmunes celulares tanto innatas como adaptativas (Ellis and Kuehn, 2010).

2.5. Respuesta inmune innata y péptidos antimicrobianos (APs)

Los péptidos antimicrobianos (APs, del inglés antimicrobial peptides) son una de las barreras protectoras que establece el sistema inmune innato del huésped para actuar contra los agentes infecciosos que pueden aparecer en zonas expuestas a microorganismos (Campos et al., 2004).

Los APs se caracterizan por tener un amplio espectro de actividad, siendo activos contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos y algunos virus, por esta razón son estudiados para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Hancock and Chapple, 1999; Nicolas and Mor, 1995).

Unas de las subfamilias de péptidos antimicrobianos más abundantes son las defensinas, moléculas pequeñas (3-6 kDa) altamente catiónicas, formadas por tres puentes disulfuro constituidos por seis residuos de cisteína. Estas se clasifican en tres subtipos, α -, β -, y θ -defensina, según la estructura espacial y la localización de los tres puentes disulfuro (Xie et al., 2014).

Las defensinas actúan mediante la formación de un poro en la membrana bacteriana. Los APs al poseer una carga positiva se pueden unir a los componentes de la membrana bacteriana, como lipopolisacáridos, fosfolípidos y ácidos teicoicos, cargados negativamente. Una vez unidos, forman un poro transmembrana, descomponiendo la integridad celular y causando la lisis bacteriana (Yamaguchi and Ouchi, 2012; Wang, 2014). Recientemente, también se cree que las

defensinas pueden producir la muerte bacteriana inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, al interactuar con ciertos precursores como el lípido II (Varney, et al., 2013).

Los APs, a pesar de poseer diferentes tamaños y estructuras, se caracterizan por tener una carga catiónica (positiva) y una estructura anfipática, resultante del plegamiento tridimensional (Hancock and Chapple, 1999; Nicolas and Mor, 1995).

Existen numerosas evidencias que muestran que la interacción electroestática entre los péptidos antimicrobianos cargados positivamente y la membrana bacteriana cargada de forma negativa es esencial para la muerte bacteriana, aunque cada vez es más evidente que la estructura hidrófoba de los péptidos también es importante en la interacción con la superficie bacteriana (Hancock and Chapple, 1999; Vaara, 1992).

De esta manera, la resistencia bacteriana a APs, se ve ligada al desarrollo de estructuras peculiares para intentar prevenir la interacción de estos con la superficie bacteriana (Peschel, 2002), como puede ser el caso de el CPS de *Klebsiella pneumoniae* (Llobet et al., 2008).

En estudios anteriores se observó que la ausencia de la proteína OmpA en la membrana, hace más vulnerable a la bacteria a la acción de los APs. El mecanismo mediante el cual interviene la OmpA en la regulación de la resistencia todavía es desconocido (Llobet et al. 2009).

3. Objetivos e Hipótesis

Estudios realizados demuestran que las vesículas tienen un papel importante en la infección del huésped estableciendo un nicho de colonización, transportando factores de virulencia e influyendo en la respuesta inmune de este. Estudios anteriores demuestran que *K. pneumoniae* libera OMVs y que estas afectan a la respuesta inmune innata.

El objetivo del presente estudio es comprobar la secreción de OMVs en las tres cepas (wildtype 52145, 52145 Δ ompA y 52145 Δ ompK36) y estudiar el papel que juegan en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos.

4. Material y métodos

4.1. Cultivo bacteriano

Se utilizaron tres cepas diferentes de *Klebsiella pneumoniae*: wildtype 52145; 52145 Δ ompA, un mutante que no expresa la proteína OmpA en su membrana; y 52145 Δ ompK36, un mutante que no expresa la proteína OmpK en su membrana.

Las tres cepas se cultivaron en 100 ml de medio líquido LB (Luria-Bertani) a 37°C en agitación continua a 180 rpm durante 16 horas.

4.2. Extracción de OMVs

Se recogió todo el contenido del cultivo bacteriano de cada cepa en 2 tubos de 50 ml y se procedió a toda una serie de centrifugaciones, ya que de esta manera se pudieron separar las células bacterianas que precipitaron en el fondo y las vesículas que se mantuvieron suspendidas en el medio.

En primer lugar se centrifugaron las muestras a 6000g 20 min a 4°C. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de 0.2 μ m, de esta manera las células bacterianas no podrán pasar a través del filtro y quedarán solo las vesículas, y se volvió a centrifugar a 6000g 20 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a filtrar y se realizó un control sembrando las muestras en placas de LB, para comprobar si hay crecimiento bacteriano y que el filtrado se hizo correctamente.

Una vez comprobado el filtrado, se procedió a la centrifugación de la muestra mediante una ultracentrífuga a 100000g 3h a 4°C.

A continuación, se marcó la inclinación de los tubos para saber la localización de las vesículas en forma de pellet y se eliminó todo el sobrenadante mediante aspiración. Se añadió 100 μ l de PBS a cada tubo y se procedió a medir la concentración de proteína de cada muestra colocando 1 μ l en el NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo-Scientific) a OD=280 nm. Según la concentración de proteína de cada muestra se ajustaron las muestras añadiendo PBS, para que todas tuvieran la misma concentración.

Por último, se vortearon los tubos y se pasó su contenido a Eppendorf®, los cuales se conservaron a -20 °C.

4.3. Identificación de proteínas presentes en las OMVs

Se mezclaron 40 μ l de muestra y 40 μ l de tampón de carga con SDS (SDS gel loading buffer) que ayudará a visualizar y estabilizar las proteínas, en tubos Eppendorf®, y se procedió a la desnaturalización a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con una proporción de acrilamida:bisacrilamida del 10%. Las proteínas presentes en el gel se tiñeron con solución azul de Coomassie (0,25% azul bromofenol, 50% metanol y 10% ácido acético) durante 2 horas y después se lavaron aproximadamente durante 4 horas con solución desteñidora (10% metanol, 10% ácido acético).

Se realizaron dos mezclas con acrilamida 10% que constituirán el gel (Running y Stacking). En primer lugar se prepararon 10 ml de Running añadiendo: 4 ml de agua destilada, 3.3 ml del mix de acrilamida 30%, 2.5 ml de Tris 1.5M (pH 8.8), 100 μ l de SDS 10%, 100 μ l de Persulfato de Amonio (APS) 10% y 4 μ l de TEMED, estos dos últimos permitirán que el gel solidifique. Se homogeneizó inmediatamente y se cargó en el molde de cristal con la ayuda de una pipeta Pasteur y se dejó que solidificara. A continuación se prepararon 5 ml de Stacking añadiendo: 3.4 ml de agua destilada, 830 μ l de mix de acrilamida 30%, 630 μ l de Tris 0.5M (pH 6.8), 50 μ l de SDS 10%, 50 μ l de Persulfato de Amonio (APS) 10% y 5 μ l de TEMED. Se homogeneizó inmediatamente y se aplicó sobre el Running, colocando un peine de 1.5 mm para que se formen los pocillos.

Una vez se solidificó, se colocó el molde en un soporte y se colocó en la cubeta cubierto de buffer, se retiró el peine y se cargaron las muestras y el marcador de proteínas de bajo peso molecular (de 15 a 175 kDa) mediante una jeringa Hamilton. Cuando las muestras estuvieron cargadas, se conectó a una fuente de energía y se dejó correr el gel a 80V hasta que las muestras se introdujeron en el pocillo, después se subió a 140V.

Al someter las muestras a electroforesis mediante un gel de acrilamida (SDS-PAGE), las proteínas serán separadas y migrarán en el gel en función de su tamaño, siendo las de menor tamaño las que tengan una mayor migración.

Una vez las proteínas migraron, se separó el gel del molde de cristal y se retiraron los pocillos. A continuación se depositó el gel en una placa y se dejó en Coomassie blue en agitación 2h aproximadamente, y después se le añadió la solución desteñidora. De esta manera, podremos visualizar y diferenciar las diferentes bandas de proteínas y compararlas con el marcador.

4.4. Estimulación celular mediante OMVs

Se utilizaron dos líneas celulares, macrófagos alveolares de ratón MH-S (CRL-2019; ATCC) y células de epitelio alveolar basal humanas A549, como modelo in vitro de estimulación mediante vesículas de *Klebsiella pneumoniae*. Ambas líneas celulares se cultivaron en frascos de 75 cm² (BioLite, Thermo Scientific) a 37°C con una atmósfera saturada de humedad al 95% y CO₂ al 5%. Tanto los MH-S y las A549 se cultivaron en medio completo (C-RPMI 1640).

Para el subcultivo de las dos líneas celulares se siguió el mismo procedimiento, se descartó el medio de cultivo por decantación y las células adheridas en el frasco, se lavaron dos veces con PBS atemperado (37°C). A continuación se les añadió 2 ml de Tripsina (Biowest) y se incubaron unos 5 minutos a 37°C para despegar las células del frasco. Acto seguido, se añadió 10 ml de medio para detener la digestión y recoger las células. Después se procedió a centrifugar todo el contenido recogido del frasco a 1800 rpm durante 5 minutos, en tubos de 10 ml. Se descartó el sobrenadante, y a las células precipitadas se les añadió unos mililitros de medio y se resuspendieron. A continuación, se procedió a su recuento mediante la utilización de una cámara Neubauer, en la cual colocamos 10 µl de la resuspensión de las células. Una vez contadas se pasarán a placas de 6 pocillos, para ello se procedió a la realización de la dilución correspondiente para que el día del experimento tuvieramos los cultivos confluentes (2×10^6), teniendo en cuenta que hay el doble cada 24h. Se dejaron preparadas dos placas de cada tipo celular.

En el caso de las células A549, se realizó el experimento dos días después de realizar el pase. Mientras que en el caso de las células MH-S, se realizó al día siguiente.

En primer lugar, se aspiró el medio de los pocillos inclinando la placa para no aspirar las células. A continuación se añadieron 2 ml de suero sin antibiótico atemperado (37°C) a cada pocillo. Después se procedió a la estimulación de las células, añadiendo 40 µl de la disolución de OMVs extraídas de las diferentes cepas en el pocillo correspondiente. Se realizó un control negativo, añadiendo 40 µl de PBS a las células en el pocillo indicado. Se dejaron incubar las placas de las dos líneas celulares según el tratamiento establecido y se procedió a realizar el lisado celular.

4.5. Lisis celular

4.5.1. Células epiteliales A549

En el caso de las células A549, se prepararon 2 placas de 6 pocillos. En una de las placas se estimuló la primera columna (vertical) de dos pocillos con OMV de wildtype 52145 (Wildtype), la segunda con OMV de 52145 Δ ompA (Δ ompA) y la tercera con PBS, actuando como control negativo. Mientras que la otra placa se estimuló la primera columna de dos pocillos con OMV de wildtype, la segunda con OMV de 52145 Δ ompK36 (Δ ompK) y la tercera con PBS.

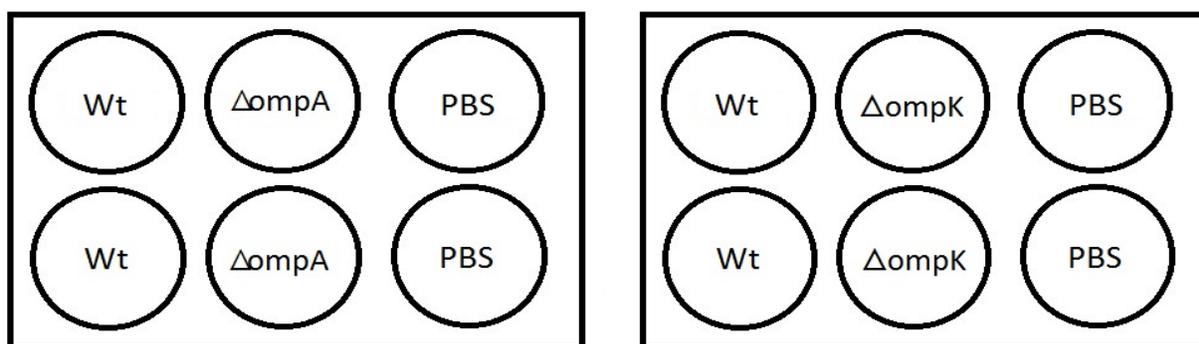


Figura 3. Distribución utilizada en los tratamientos de la estimulación de las células epiteliales A549: (Wt) Wildtype; (Δ ompA) 52145 Δ ompA; (Δ ompK) 52145 Δ ompK36 y PBS.

Las placas estimuladas se dejaron 30 minutos en la incubadora a 37°C y con una atmósfera saturada de humedad al 95% y CO₂ al 5%.

Transcurrido el tiempo, se procedió a lisis celular mediante la utilización de la Mastermix (RA1 + mercaptoetanol) del protocolo de ARN de NucleoSpin®. Por cada pocillo mezclamos 350 μ l de RA1 y 3.5 μ l de mercaptoetanol en un tubo de 10 ml, añadiendo cantidad para dos pocillos extras para asegurar que la cantidad sea suficiente.

Una vez preparada la Mastermix, se eliminó el medio de cada pocillo por aspiración y se lavaron dos veces con 2 ml de PBS atemperado y se volvió a aspirar. A continuación se añadió 350 μ l de la Mastermix a cada pocillo, apareciendo una consistencia viscosa, y con la ayuda de una pipeta recogiendo y soltando el contenido del pocillo se provocó la lisis de las células. Se recogió el contenido de cada pocillo y se guardó en Eppendorf® etiquetados en el congelador a -20°C.

4.5.2. Macrófagos MH-S

En el caso de los macrófagos MH-S, se prepararon 2 placas de 6 pocillos. En cada una se estimularon los macrófagos durante tres tiempos diferentes: 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos. En una de las placas, la fila superior de tres pocillos se estimuló con Wildtype y la inferior con $\Delta ompA$. Mientras que en la otra placa se estimuló la fila superior con PBS y la inferior con $\Delta ompK$. Cada tratamiento se observó en los tres tiempos establecidos, la primera columna de cada placa se incubó 15 min, la segunda durante 30 min y la tercera durante 60 min.

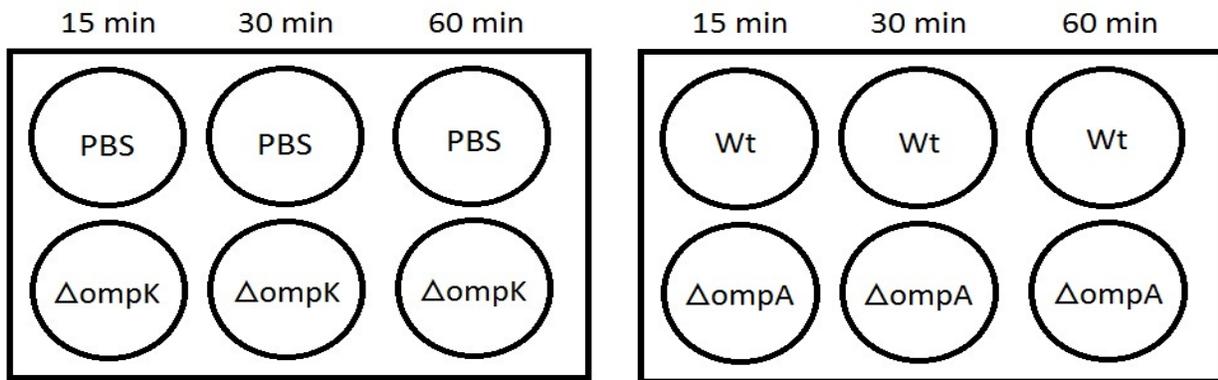


Figura 4. Distribución utilizada en los tratamientos de la estimulación de macrófagos MH-S : (Wt) Wildtype; ($\Delta ompA$) 52145 $\Delta ompA$; ($\Delta ompK$) 52145 $\Delta ompK36$ y PBS.

Transcurrido el tiempo, se procedió a realizar la lisis celular mediante la Mastermix del protocolo de ARN de NucleoSpin® ya descrito anteriormente, y se recuperó el contenido de los pocillos en Eppendorf®. Una vez realizada la lisis, las placas se conservan en hielo en todo momento para evitar la degradación de las muestras. Una vez acabado el proceso, las muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

4.6. Purificación del ARN celular.

Después de lisar las células, se procedió a realizar toda una serie de filtraciones para conseguir extraer y purificar el ARN. En primer lugar se redujo la viscosidad del lisado mediante la filtración, colocando los NucleoSpin® Filter (violetas) en Eppendorf® nuevos y aplicando sobre estos todo el volumen de las muestras, se centrifugaron 1 minuto a 11000 g. Se descartaron los filtros violetas, se añadieron a las muestras 350 µl de EtOH 70% y se pipetearon las muestras para homogeneizarlas. A continuación se aplicaron todas las muestras sobre el NucleoSpin® RNA Column (azul claro) colocados sobre tubos de 2 ml, proporcionados por el kit, y se centrifugaron 30 segundos a 11000 g. Descartando el flujo, se colocaron las columnas en tubos de 2 ml nuevos y se aplicó 350 µl de MDB (Membrane Desalting Buffer), que permitirá la eliminación de las sales, y se centrifugaron 1 minuto a 11000 g. Se descartó el flujo y se procedió a la digestión del ADN aplicando sobre la columna 95 µl de la mezcla de DNasa y el DNasa Buffer y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 min. Para realizar dicha mezcla se aplicaron 10 µl de DNasa reconstituida atemperada y 90 µl de DNasa Buffer por cada muestra. Se añadió 200 µl de RAW2 Buffer a la columna, este inactiva la DNasa, y se centrifugaron las muestras 30 segundos a 11000 g. Se descartó el flujo, y se colocaron las columnas sobre nuevos tubos de 2ml, se añadieron 600 µl de Buffer RA3 y se centrifugaron 30 segundos a 11000 g. Se descartó el flujo y las columnas se volvieron a colocar en nuevos tubos de 2 ml y se realizó otro lavado con 250 µl de Buffer RA3, centrifugando las muestras 2 min a 11000 g. Por último, se colocaron las columnas sobre tubos libres de nucleasas de 1.5 ml suministrados en el kit, y se eluyó el ARN de cada muestra con 40 µl de agua libre de ARNasa suministrada en el kit y se centrifugaron 1 min a 11000 g. Una vez extraído el ARN, las muestras se conservaron en hielo en todo momento para evitar su degradación.

Una vez extraído el ARN de las dos líneas celulares se procedió a medir la concentración de ARN de cada muestra colocando 1 µl en el NanoDrop Spectrophotometer (Thermo-Scientific) a OD=260 nm, OD=280 nm, ratio 260/280 que mide la pureza del ARN (aprox. 2= puro) y ratio 260/230 que mide la pureza de los ácidos nucleicos (1.8-2.2= puro, si es más bajo indica la presencia de contaminantes). Se escogió como blanco 1 µl de agua libre de ARNasa.

4.7. RT-PCR

Se cuantificó el mRNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para obtener el cDNA que sirve de molde para la PCR cuantitativa se retrotranscribieron 2 µg de RNA usando primers, Oligo(dT)18 primer (Ref. S0132, Thermo Scientific) y la "M-MLV Reverse transcriptase" (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante.

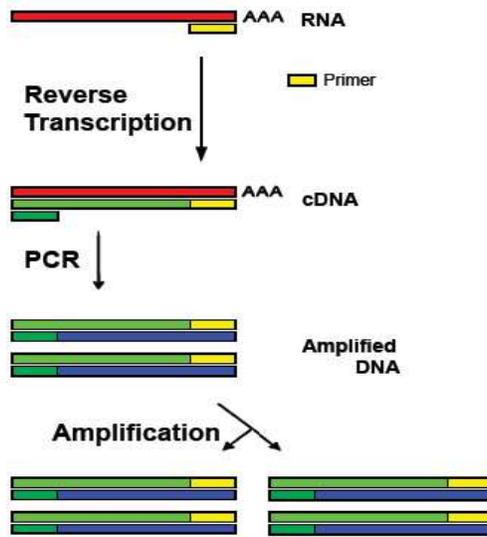


Figura 5. Esquema representativo de las bases de la técnica de RT-PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa se realizó mediante iQ5 real-time PCRinstrument (BioRad®) con la Master Mix “KappaSYBR Fast qPCR Kit” (Kapa Biosystems) y cebadores para β -Defensina 1 y β -Defensina 2. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l utilizando 100 ng del cDNA. El protocolo que se siguió para realizar la amplificación fue: 3 minutos a 95°C para activar la polimerasa y 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C.

A continuación, se realizó una curva de fusión para comprobar la especificidad de los cebadores y los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5-2% para comprobar que el tamaño del amplímero era el correcto. El aumento relativo de un mRNA determinado se calculó en base a su ciclo umbral (Ct, del inglés cycle threshold) con respecto al Ct del mRNA de un gen housekeeping. El ciclo umbral es aquel en el que el lector empieza a detectar un incremento significativo de la fluorescencia respecto a la señal base, y es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA presente en la muestra.

4.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se representaron de forma gráfica utilizando el *t*-test y la prueba U de Mann-Whitney utilizando el GraphPad Software. Indicando los datos significativos ($p > 0.001$).

5. Resultados

5.1. Gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

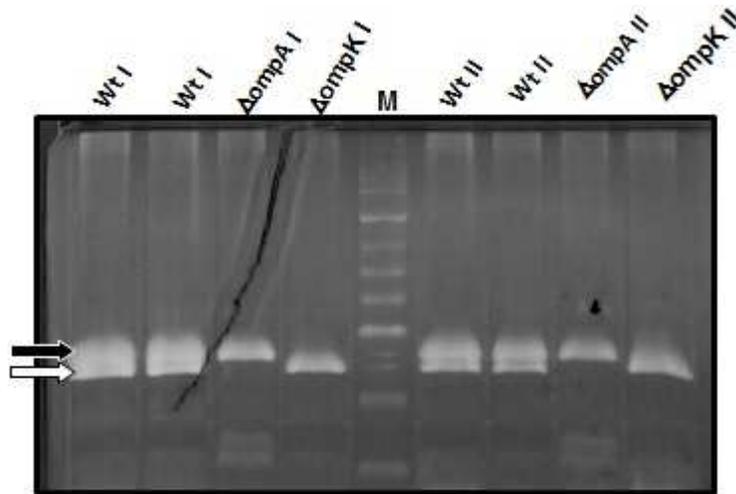


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con una concentración de acrilamida del 10% seguida de una tinción con Comassie blue de las proteínas OMP de las vesículas procedentes de las tres cepas (Wt) Wildtype; (Δ ompA) 52145 Δ ompA; (Δ ompK) 52145 Δ ompK36. M, marcador de bajo peso molecular. La flecha negra marca la proteína OmpK y la flecha blanca la OmpA.

Se aislaron las OMVs de los cultivos bacterianos mediante una serie de centrifugaciones y filtrados, y se procedió a realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con una concentración de acrilamida de 10% y se tiñeron las proteínas para poder visualizar y diferenciar las OMP de las OMVs de las diferentes cepas estudiadas: 52145 Wildtype; (Δ ompA) 52145 Δ ompA; (Δ ompK) 52145 Δ ompK36.

Podemos observar que las muestras Wt I y WtII presentan dos bandas que corresponden a la OmpA y a la OmpK; mientras que por un lado las muestras Δ ompA I y Δ ompA II presentan sólo la proteína OmpK y por otro lado, las muestras Δ ompK I y Δ ompK II sólo presentan la OmpA.

5.2. Cuantificación ARN celular

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
wt I	Default	03/03/2015	17:54	50,13	1,253	0,608	2,06	1,7	40	230	0,736	-0,003
wt II	Default	03/03/2015	17:56	49,25	1,231	0,567	2,17	1,13	40	230	1,088	-0,027
OmpK I	Default	03/03/2015	17:57	38,92	0,973	0,447	2,18	0,7	40	230	1,388	-0,027
OmpK II	Default	03/03/2015	17:59	46,73	1,168	0,547	2,14	1,99	40	230	0,586	-0,002
PBS I	Default	03/03/2015	18:00	39,48	0,987	0,439	2,25	0,95	40	230	1,036	-0,017
PBS II	Default	03/03/2015	18:01	57,33	1,433	0,668	2,15	1,73	40	230	0,83	0,043
wt I	Default	03/03/2015	18:02	41,16	1,029	0,452	2,28	0,42	40	230	2,469	-0,026
wt II	Default	03/03/2015	18:03	54,16	1,354	0,662	2,05	1,07	40	230	1,26	-0,011
OmpA I	Default	03/03/2015	18:04	49,52	1,238	0,606	2,04	0,9	40	230	1,373	-0,009
OmpA II	Default	03/03/2015	18:05	60,58	1,515	0,722	2,1	1,31	40	230	1,156	-0,02
PBS I	Default	03/03/2015	18:06	41,03	1,026	0,47	2,18	1,79	40	230	0,574	-0,024
PBS II	Default	03/03/2015	18:07	52,96	1,324	0,622	2,13	0,24	40	230	5,484	-0,008

Figura 7 . Concentraciones (ng/μl) y absorvancias de ARN celular obtenidas mediante el NanoDrop. (wt) wildtype; (K) ΔompK; (A) ΔompA y PBS (Control).

Los datos recogidos muestran que se ha extraído una cantidad muy baja de ARN, no superando los 60,58 ng/μl por muestra. Aunque el ratio 260/280 de las absorvancias de las muestras a 260 nm y 280 nm, al ser superiores a 2 nos indican que el ARN podría considerarse como puro. Mientras que el ratio 260/230 de las absorvancias de las muestras a 260 nm y 230 nm, nos muestran que en estas hay contaminantes al ser menores que 1.8- 2.2.

Debido a los bajos niveles de ARN extraídos, a causa de la degradación de la muestra a la hora de no trabajar en hielo en todo momento, y junto a la poca estabilidad de la muestra, no se pudo proceder a realizar la RT-PCR con dichas muestras. De esta manera, se tuvieron que tener en cuenta estudios previos realizados por el grupo de investigación, sobre las OMVs de cepa wildtype de *Klebsiella pneumoniae* y su influencia en la regulación de los APs, sin tener en cuenta las otras dos cepas mutantes.

5.3. Modulación sistema inmune y secreción de APs

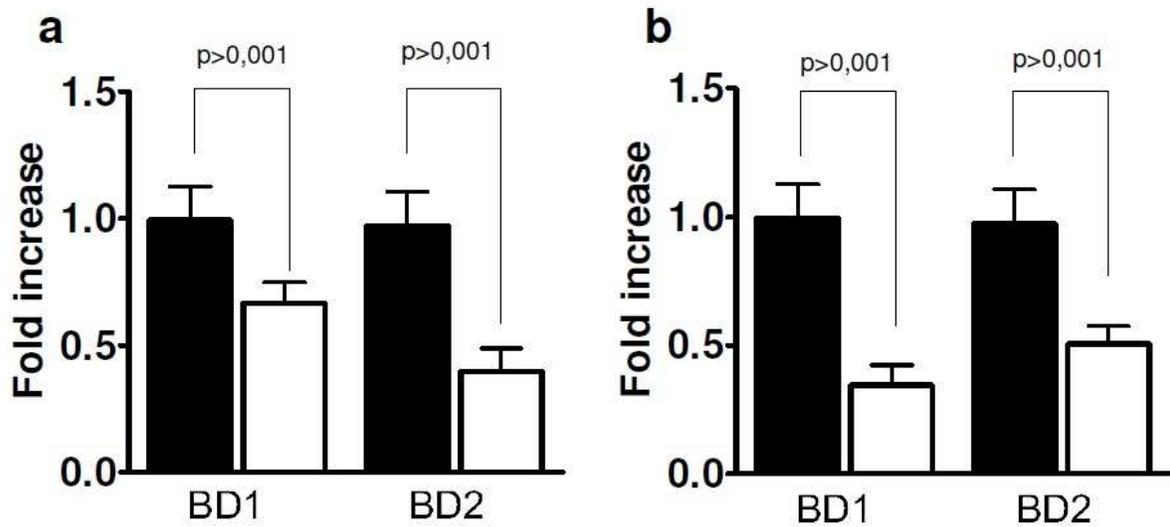


Figura 8. Expresión de β -Defensina 1 y β -Defensina 2 en células epiteliales A549 (a) y en macrófagos MH-S (b) después de haberles suministrado OMVs de *Klebsiella pneumoniae*. Las columnas negras representan el control, las células a las que se les suministró PBS, mientras que la columna blanca representan a las que se les suministró OMVs.

Se estudió cómo influyen las OMVs de la cepa wildtype en la regulación de la expresión de las β -defensinas mediante la cuantificación del ARN de las células (epiteliales A549 y macrófagos MH-S) que contienen genes de β -Defensina 1 y β -Defensina 2, estimuladas con OMVs y PBS como control.

Se puede observar en la Figura 8, que las células A549 y los macrófagos MH-S tratados con OMVs, presentan una menor expresión de β -defensinas que las control.

6. Discusión

6.1. OMVs y las diferentes cepas estudiadas

Según los resultados obtenidos se observa una coincidencia entre la composición de la membrana bacteriana de las tres cepas y la composición de las OMVs, ya que presentan las mismas OMPs, proteínas más abundantes de la membrana bacteriana. Esto verifica el hecho de que las OMVs reflejan la composición de la membrana externa de las bacterias (Gankema et al., 1980; Hoekstra et al., 1976; Horstman et al., 2000; Kadurugamuwa et al., 1995; McBroom et al., 2005).

6.2. Modulación secreción de β -defensinas por la acción de las OMVs

Los resultados muestran una disminución de la expresión de β -defensina 1 y β -defensina 2 con la influencia de las OMVs, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual estas intervienen en la regulación de la expresión de APs del sistema inmune innato.

Se podría considerar cómo una posibilidad de estudio que estas OMVs al actuar como vías secretoras, transportaran proteínas solubles en su interior, productos de la bacteria de la cual proceden permitiendo su transporte a otras bacterias (Kesty & Kuehn, 2004). Estos productos transportados podrían interferir en las cascadas que regulan la inflamación. Bloqueando algún receptor o inhibiendo alguna reacción, evitando que esta se produzca.

Otro posible aspecto a estudiar, es si el efecto observado no se debe en si a las posibles proteínas que pueden transportar en su interior sino a la propia naturaleza de las OMVs. Y que sea por tanto la propia vesícula la que induce una determinada respuesta al adherirse y/o entrar en contacto con las células del huésped.

En todo caso, y sea cual sea el mecanismo de acción, parece claro que las OMVs de *Klebsiella pneumoniae* inducen una disminución en la transcripción de los genes para la β -defensina 1 y β -defensina 2. Este hecho permite que las consideremos como potencialmente nuevos factores de virulencia de la bacteria. Hecho que deberá ser contrastado con estudios más completos en el futuro.

7. Conclusión

1. Se observó que las OMVs presentaban las OMPs que manifestaban las bacterias iniciales en su membrana externa bacteriana.
2. Se observó un efecto directo de las OMVs en la expresión de las β -Defensina 1 y 2.
3. La expresión de las β -Defensina 1 y 2 se vio disminuída por la acción de las OMVs a través de mecanismos aún desconocidos.
4. Se cree de gran interés el seguimiento de estos estudios, con el análisis del contenido de las OMVs, para asegurar si éste es la razón por la que interfieren en la expresión de β -Defensina.

8. Bibliografía

- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S., and Lloubes, R. 1998. Escherichia coli tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 180: 4872–4878.
- Beveridge, T. J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181:4725–4733.
- Bos, M. P., Robert, V., Tommassen, J. 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:191–214.
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompарт, C. M., Albertí, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides . *Infection and Immunity*, 72(12), 7107–7114. doi:10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004.
- Chatterjee, S.N. and Das, J. 1967. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 49: 1–11.
- Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J. & Albertí, S. (2002) Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun* 70: 2583–2590.
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *: *MMBR*, 74(1), 81–94. doi:10.1128/MMBR.00031-09
- Gankema, H., J. Wensink, P. A. Guinee, W. H. Jansen, and B. Witholt. 1980. Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 29:704–713.
- Gamazo, C. and Moriyon, I. 1987. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 55: 609–615.
- Grenier, D. and Mayrand, D. 1987. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* 55:111–117.
- Hancock, R. E. W., and D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemothera.* 43:1317–1323.

Hervas, J. A., Alomar, A., Salva, F., Reina, J. & Benedi, V. J. Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca, Spain, 1977-1991. *Clin. Infect. Dis.* 16, 719-724 (1993).

Hoekstra, D., J. W. van der Laan, L. de Leij, and B. Witholt. 1976. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 455:889–899.

Horstman, A. L., and M. J. Kuehn. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 275:12489–12496.

Ismail, S., Hampton, M.B., and Keenan, J.I. 2003. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 71: 5670–5675.

Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J..1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: Conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.* 178: 2767–2774.

Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J. 1997. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 615–621.

Klieve, A.V., Yokoyama, M.T., Forster, R.J., Ouwerkerk, D., Bain, P.A., Mawhinney, E.L., & Canada, A. (2005). Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus spp.* of ruminal origin. *Applied Environmental Microbiology*, 71(8), 4248-4253.

Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H., and Horikoshi, K. 2000. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *J. Bacteriol.* 182: 6451–6455.

Kuehn, M.J., and Kesty, N.C. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 19:2645–2655.doi:10.1101/gad.1299905.

Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64, 163–184. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073413

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

Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., IlKim, S., Kang, S. S., Hyun, S. 2012. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiology Letters* Jun 2012, 331 (1) 17-24; DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02549

Li, Z., Clarke, A., and Beveridge, T.J. 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* 180: 5478–5483.

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

Llobet, E., March, C., Giménez, P. and Bengoechea, J. A. 2009. *Klebsiella pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 298–302. doi:10.1128/AAC.00657-08

Llobet, E., Tomás, J.M. and Bengoechea, J.A. 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* vol. 154 no. 12 3877-3886.

Loeb, M.R. 1974. Bacteriophage T4-mediated release of envelope components from *Escherichia coli*. *J. Virol.* 13: 631–641.

Loeb, M.R. and Kilner, J. 1978. Release of a special fraction of the outer membrane from both growing and phage T4-infected *Escherichia coli* B. *Biochim. Biophys. Acta* 514: 117–127.

March, C., Moranta, D., Regueiro, V., Llobet, E., Tomás, A., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Protein A Is Required to Prevent the Activation of Airway Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 9956–9967. doi:10.1074/jbc.M110.181008

Mashburn-Warren, L.M., & Whiteley, M. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 61(4), 839-846.

Mayrand, D., and D. Grenier. 1989. Biological activities of outer membrane vesicles. *Can. J. Microbiol.* 35:607–613.

McBroom, A. J., Johnson, A. P. , Vemulapalli,S., and Kuehn, M. J. 2006. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* 188:5385–5392.

McBroom, A. and Kuehn, M.J. 2005. Outer membrane vesicles. In *EcoSal–Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (ed. R. Curtiss III), Chapter 2.2.4 [Online]. ASM Press, Washington, DC.

McBroom, A.J., & Kuehn, M.J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular microbiology*, 63(2), 545-558.

Moranta, D. et al. (2010). *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of b-defensins by airway epithelial cells. *Infect.Immun.* 78, 1135-1146 .

Mug-Opstelten, D. and Witholt, B. 1978. Preferential release of new outer membrane fragments by exponentially growing *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 508: 287–295.

Nassif, X. & Sansonetti, P. J. (1986). Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* 54: 603–608.

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

Prasadarao, N. V., C. A. Wass, J. N. Weiser, M. F. Stins, S. H. Huang, and K. S. Kim. 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 64:146–153.

Peschel, A. 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides?. *Trends Microbiol.* 10:179–186.

Sahly, H., & Podschun, R. (1997). Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(4), 393–399.

Shankar-Sinha, S., Valencia, G. A., Janes, B. K., Rosenberg, J. K., Whitfield, C., Bender, R. A., Standiford, T. J. & Younger, J. G. (2004). The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect. Immun* 72: 1423–1430.

Sukumaran, S. K., H. Shimada, and N. V. Prasadarao. 2003. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect. Immun.* 71:5951–5961

Varney, K. M., Bonvin, A. M. and Pazgier, M. 2013. Turning defensin mimetics novel antibiotics targeting lipid II. *PLOS Pathogens*, vol. 9, no. 11, Article ID e1003732.

Xie, G.-H., Chen, Q.-X., Cheng, B.-L., & Fang, X.-M. (2014). Defensins and Sepsis. *BioMed Research International*, 2014, 180109. doi:10.1155/2014/180109

Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56:395–411.

Wang, G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, vol. 7, no. 5, pp. 545–594, 2014.

Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295:148.

Yaganza, E.S., Rioux, D., Simard, M., Arul, J., and Tweddell, R.J. 2004. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6800–6808.

Yamaguchi, Y. and Ouchi, Y. 2012. Antimicrobial peptide defensin identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proceedings of the Japan Academy B, Physical and Biological Sciences*, vol. 88, no. 4, pp. 152–166, 2012.

Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., and Doyle, R.J. 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 223–228.