

VIII Jornades IdISBa

PÒSTERS DE L'ÀREA: Malalties Infeccioses, Resistència Antibiòtica i Resposta Immunològica



Institut
d'Investigació Sanitària
Illes Balears

IdISBa

limfòcits B humans per citometria de flux

M. Berman-Riu¹; V. Cunill¹; L. Mañogil¹; A. López-Gómez¹; A. Clemente²; J. Pons¹; JM. Ferrer¹

¹Grup Estudi de la Resposta Immunològica en Patologia Humana, Institut d'Investigació de les Illes Balears (IdISBa)

²Grup Multidisciplinari de Sèpsia, Institut d'Investigació de les Illes Balears (IdISBa)

INTRODUCCIÓ

- L'**autofàgia** és un procés catabòlic que permet el reciclatge i la degradació de components citoplasmàtics. En la macroautofàgia (el tipus més rellevant en els limfòcits) aquesta degradació es du a terme amb la formació de vesícules de doble membrana anomenades **autofagosomes**.
- L'autofàgia té un paper clau en la resposta a l'estrès energètic, l'homeòstasi cel·lular i la regulació de la immunitat¹. En la immunitat adaptativa, l'autofàgia es creu modula el **desenvolupament i diferenciació** dels limfòcits i és essencial per la supervivència de les cèl·lules de **memòria** o **efectores**, com les cèl·lules plasmàtiques².

- Alteracions en aquest procés autofàgic s'han vist relacionades amb nombroses **malalties autoimmunes** o **autoinflammatòries** com el lupus eritematós, l'artritis reumatoide o l'esclerosi múltiple, i el **càncer**².

OBJECTIUS

Els objectius d'aquest estudi són la caracterització dels mecanismes d'autofàgia dels limfòcits B d'individus sans en estat basal i després d'estimulació, així com la determinació del flux autofàgic.

METODOLOGIA

- Cèl·lules mononucleades de sang perifèrica d'individus sans (n=17) es cultiven en presència i absència d'estímuls que indueixen la mort cel·lular (*anti-BCR*) o diferenciació (*anti-CD40+IL-21* o *anti-TLR9*) dels limfòcits B. Paral·lelament, s'afegeix Bafilomicina A1 (BafA), un inhibidor de la degradació dels autofagosomes, per monitoritzar la seva acumulació i establir un flux autofàgic a les 24h.
- Després de 24h d'incubació, les cèl·lules es marquen amb els marcadors de superfície anti-CD19 i anti-CD27, el de viabilitat Live/Dead i el de la membrana de l'autofagosoma anti-LC3-II, per ser analitzades per citometria de flux.
- Es seleccionen les cèl·lules viables i es valora l'expressió del marcador anti-LC3-II de dues subpoblacions de limfòcits B: B naive (CD19+CD27-) i B memòria (CD19+CD27+).

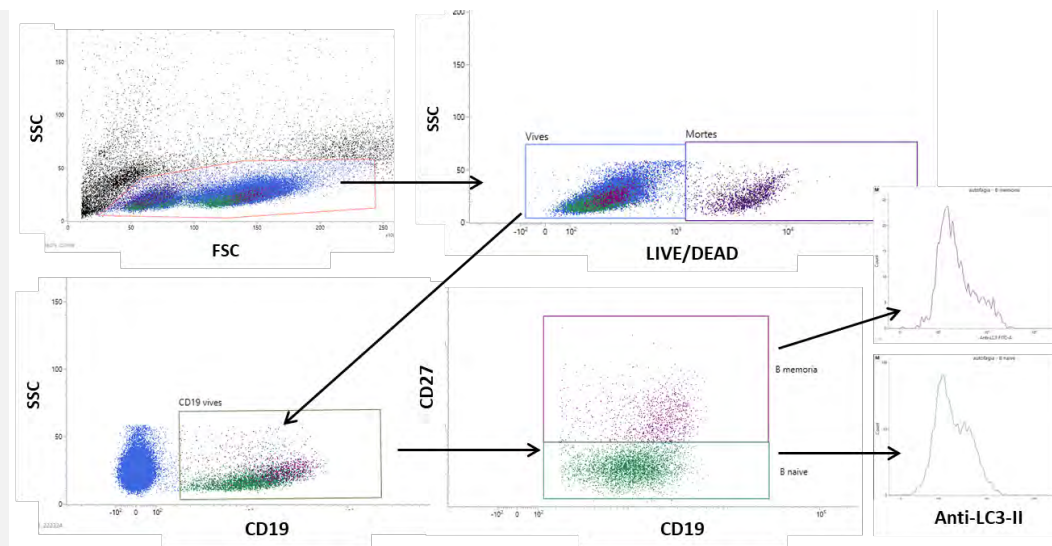


Figura 1. Estratègia de gateig representativa per la identificació dels limfòcits B viables (B naive (CD19+CD27-) i B memòria (CD19+CD27+)) on es valora l'expressió del marcador Anti-LC3-II.

RESULTATS

- No s'observen diferències en els nivells d'**autofàgia basal** (no es mostra) entre les subpoblacions B naive i B memòria però sí un augment significatiu del **flux autofàgic** en la subpoblació B de memòria a les 24 hores (Figura 2A).
- L'estímul *anti-BCR* augmenta els nivells d'autofàgia significativament respecte la mostra sense estimular (SE) en ambdues subpoblacions. (Figura 2B-C).
- La inducció d'autofàgia per *anti-BCR* és significativament superior en els **limfòcits B de memòria** respecte els limfòcits B naive (Figura 2C).

CONCLUSIONS

L'estudi de l'autofàgia en limfòcits B de controls sans suposa un **estudi preliminar** imprescindible per poder investigar aquest mecanisme en altres individus amb disfuncions en el metabolisme d'aquests limfòcits com podrien ser els individus amb **immunodeficiència comuna variable**.

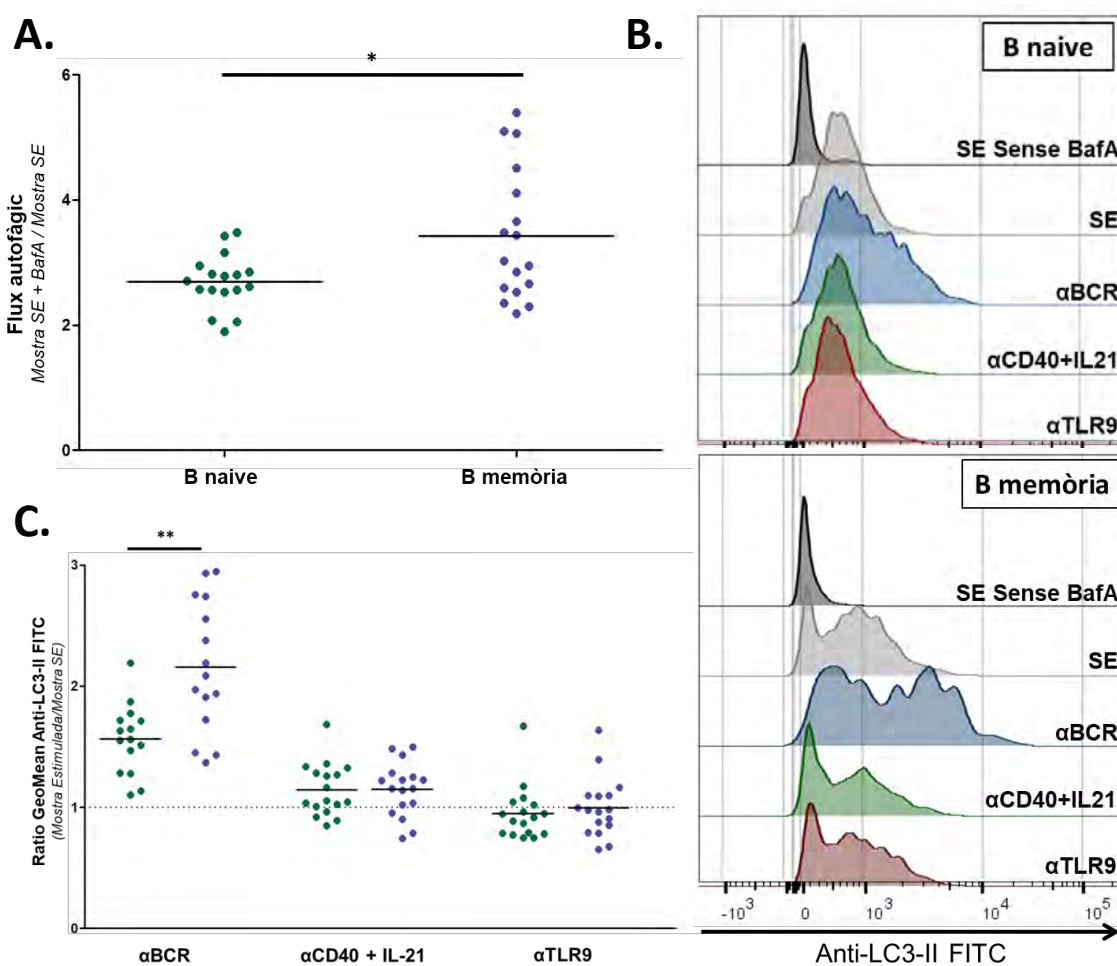


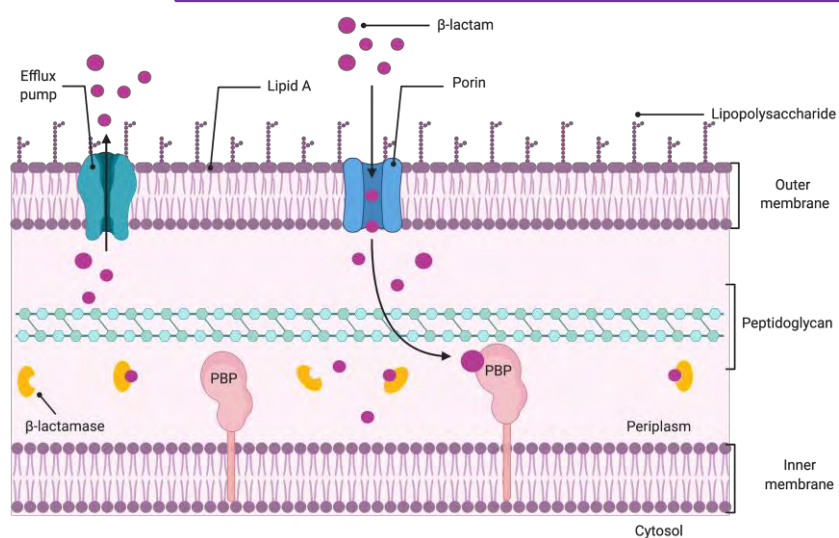
Figura 2. Resultats estudi autofàgia en limfòcits B humans d'individus sans. A. Flux autofàgic de les subpoblacions B naive i B memòria; (Flux autofàgic = Mostra Sense Estimular + BafA/Mostra Sense Estimular). B. Intensitat de fluorescència del marcador Anti-LC3-II en les subpoblacions B naive i B memòria amb/sense estimulació després de 24h d'incubació. C. Ratio de fluorescència de les diferents mostres estimulades respecte la mostra sense estimular de les subpoblacions B naive (en verd) i B memòria (en lila). (Test Mann Whitney; valors P: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)

Differential contribution of resistance determinants to target-site attainment and binding of β -lactams to penicillin binding proteins (PBP) of *Pseudomonas aeruginosa*.

López-Argüello S¹, Montaner M¹, Oliver A¹, Moya B¹

¹Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria Illes Balears (IdISBa), Palma de Mallorca, Spain

INTRODUCTION & AIMS

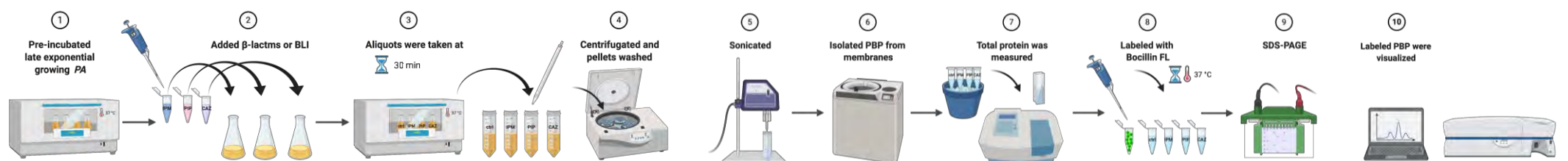


Increased drug resistance (permeability-limiting, drug extrusion or hydrolysis) is the rate-limiting factor for the *P. aeruginosa*-targeted antimicrobial development. So far, PBP-targeting β -lactams have been effectively used against this pathogen.

Assessing the extent of PBP binding of β -lactams in different mutational backgrounds is fundamental to collect the mechanistic information needed to optimize therapies and develop new compounds to treat infections caused by resistant *P. aeruginosa* isolates.

To dissect the contribution of the most prevalent resistance mechanisms, we studied the target-site penetration and binding of 8 chemically different β -lactams and 4 β -lactamase inhibitors (BLI) in *P. aeruginosa* live cells.

MATERIALS AND METHODS



To assess permeability and binding of *P. aeruginosa*. PBP-binding affinities were determined in intact cells by Bocillin FL assay using $0.5 \times \text{MIC}$ of each compound (BLI were used at $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ fixed concentration).

RESULTS

Strain ^a	IPM				DOR				MEM				ETP			
	ΔoprD	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$	ΔoprD	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$	ΔoprD	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$	ΔoprD	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$
ΔMIC^b	8.00	0.13	1.00	0.33	4.00	0.50	0.50	0.24	2.00	0.50	0.13	0.13	2.00	0.50	0.25	0.06
PBP1a	-0.26	0.09	-0.05	0.01	-0.17	-0.07	-0.17	0.05	0.01	0.00	0.22	0.74	0.06	-0.05	0.06	0.26
PBP1b	-0.22	0.09	-0.06	0.03	-0.28	0.00	-0.07	0.20	-0.07	0.06	0.43	0.55	0.07	-0.08	0.15	0.46
PBP2	-0.26	-0.03	-0.09	0.04	-0.34	0.02	-0.04	0.10	-0.04	0.12	0.40	0.45	0.01	-0.14	0.06	0.39
PBP3	-0.33	0.06	-0.11	-0.19	-0.04	0.04	0.00	0.12	-0.03	0.05	0.22	0.28	-0.02	-0.11	0.10	0.32
PBP4	-0.18	-0.02	-0.22	0.06	-0.02	0.00	0.01	0.01	-0.05	-0.04	0.00	-0.02	-0.21	-0.02	0.10	0.09
PBP5/6	-0.01	-0.17	-0.08	-0.29	-0.48	-0.54	0.23	-0.45	0.00	0.00	0.46	0.09	0.18	-0.08	-0.05	-0.08

Strain ^a	FEP			CAZ			CAR			TIC		
	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$	ΔampC	ΔoprM	$\Delta\text{ampC}_{\text{oprM}}$
ΔMIC^b	1.00	0.13	0.13	0.50	0.25	0.25	1.00	0.01	0.01	2.00	0.03	0.03
PBP1a	0.23	0.46	0.57	0.07	0.48	0.29	0.00	0.44	0.68	-0.04	0.32	0.31
PBP1b	0.00	0.13	0.27	0.00	0.25	0.04	-0.02	0.39	0.62	-0.02	0.26	0.31
PBP2	0.00	0.00	0.06	0.00	0.26	0.00	-0.03	0.02	0.04	0.03	-0.03	0.07
PBP3	0.22	0.31	0.37	0.24	0.34	0.29	0.01	0.11	0.17	0.03	0.04	-0.02
PBP4	-0.11	0.57	0.67	-0.12	0.18	-0.06	-0.02	0.32	0.44	-0.08	0.31	0.30
PBP5/6	0.00	0.00	0.12	0.00	0.27	0.00	0.01	0.22	0.00	0.08	0.00	-0.19

^aAverage PBPs fraction unbound difference between PAO1 and isogenic knockout mutants.

^b ΔMIC , average fold increase or decrease in the MIC of mutants relative to the parent strain.

OprD porin inactivation showed the greatest reduction in PBP occupancy for carbapenems, especially imipenem, followed by doripenem and meropenem. OprM efflux component inactivation showed a significant increase in penetration and PBP binding of meropenem, cephalosporins and penicillins. Highest PBP inactivation was observed for the double AmpC β -lactamase and OprM (efflux) mutant. Significant differences in BLI binding were observed for the OprM single and double mutants.

CONCLUSIONS

We created the first *P. aeruginosa* whole cell PBP binding dataset for chemically diverse β -lactams and BLI that accounts for the differential contribution of resistance mechanisms to target-site penetration and binding.

The novel approach provides valuable mechanistic insights to neutralize the resistance armamentarium, optimize therapies against MDR *P. aeruginosa*, and help reactivating the antibiotic discovery pipeline.