

Cribado de una genoteca de mutantes obtenida mediante transformación natural para la identificación de genes de *Haemophilus influenzae* implicados en la invasión del epitelio respiratorio humano

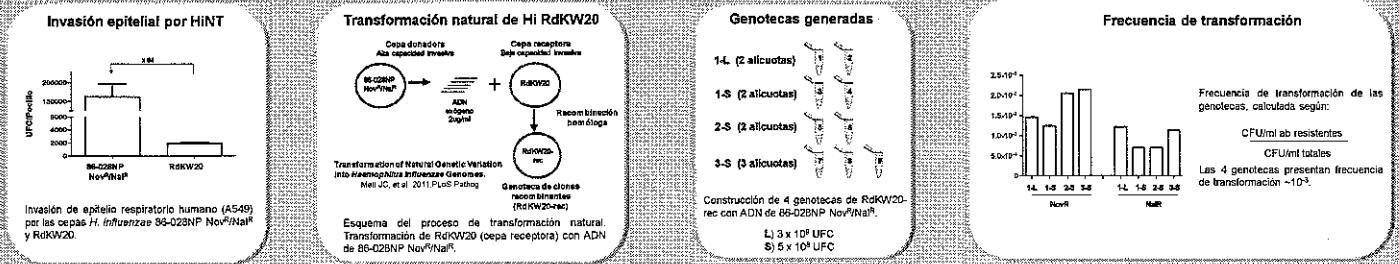
Vidas C¹, Mell JC², Redfield RJ², Garmendia J¹

¹Instituto de Agrobiotecnología (IdAB)-CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra, Spain, ²University British Columbia (UBC), Vancouver, Canada

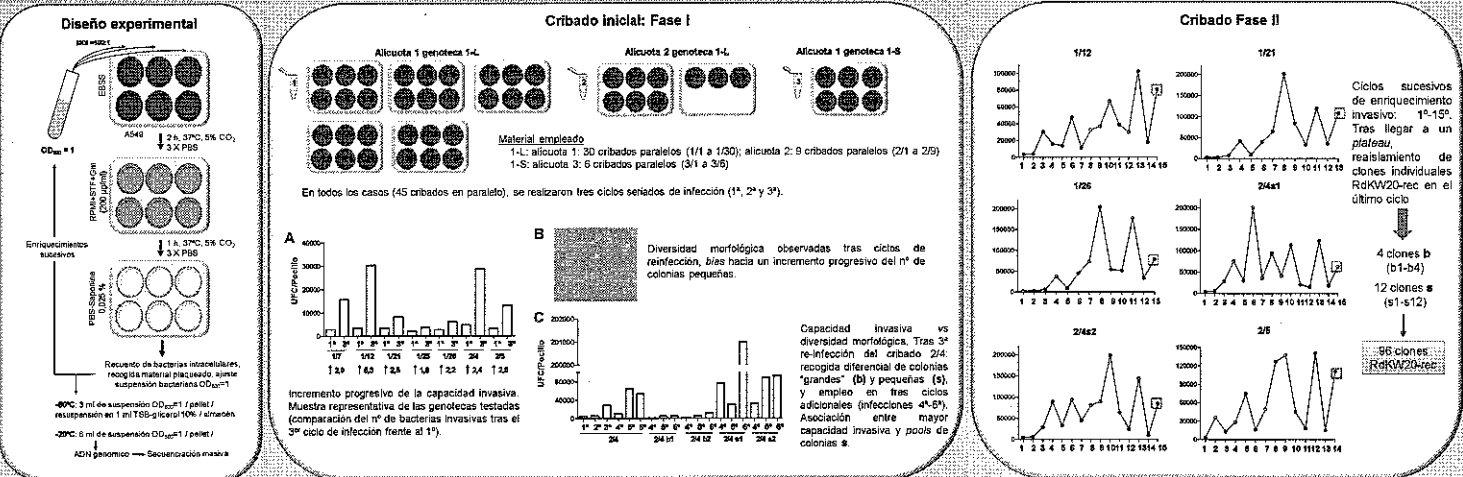
Email: cvidas@gmail.com

Haemophilus influenzae no tipable (HINT) es un patógeno bacteriano oportunista causante de infecciones respiratorias, infecciones no respiratorias agudas y que coloniza el tracto respiratorio de pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas, contribuyendo a la progresión irreversible de las mismas. HINT es un patógeno intracelular facultativo, que invade células de epitelio respiratorio humano y presenta una localización intracelular no replicativa en un compartimento subcelular con características de endosoma tardío. Las evidencias disponibles nos permiten hipotetizar que la localización intracelular de HINT favorece la persistencia de la infección. Por ello, proponemos que la identificación y caracterización de factores bacterianos implicados en la invasión epitelial por HINT permitirá proponer nuevas terapias que frenen a la infección por este patógeno bacteriano. El objetivo de este trabajo es la identificación de genes de HINT involucrados en la invasión del epitelio respiratorio humano por este patógeno. Para ello, identificamos las cepas de *H. influenzae* Hi RdkW20 y 86-028NP, cuya capacidad invasiva es significativamente distinta, siendo ~80 veces mayor en el caso de 86-028NP. Los genomas de ambas cepas han sido secuenciados y difieren ~2.4%. Mediante transformación natural de RdkW20 (cepa receptora) con ADN de 86-028NP (cepa donadora de ADN exógeno), se generó una genoteca de clones recombinantes (RdkW20-rec) con frecuencia de transformación ~10⁻⁹. Dicha genoteca se empleó para identificar clones RdkW20-rec con capacidad epitelial invasiva significativamente superior a RdkW20. El cribado de clones RdkW20-rec con ganancia de capacidad invasiva se realizó mediante infección de la línea celular de epitelio respiratorio humano A549, y protección frente a gentamicina, lo que permite la recuperación selectiva de bacterias intracelulares y su empleo inmediato en un nuevo ensayo de invasión epitelial. Este proceso fue repetido 15 veces consecutivas para el enriquecimiento progresivo de la genoteca en clones invasivos, y permitió el aislamiento de 96 clones RdkW20-rec. El análisis de la capacidad invasiva de dichos clones permitió su clasificación en tres categorías: clones RdkW20-rec con ganancias de capacidad invasiva 5-, 10- y 15X, respecto a la cepa RdkW20. La identificación de (las) regiones de ADN de 86-028NP insertadas en el genoma de RdkW20, y responsables de la ganancia de invasión observada en los clones RdkW20-rec se realizará mediante secuenciación y análisis genómico comparado, lo que permitirá la identificación de factores bacterianos implicados en la invasión del epitelio pulmonar por *H. influenzae*.

Genoteca de clones recombinantes (RdkW20-rec) obtenidos mediante transformación natural



Cribado de clones RdkW20-rec con ganancia de capacidad invasiva



Análisis fenotípico de clones individuales RdkW20-rec

