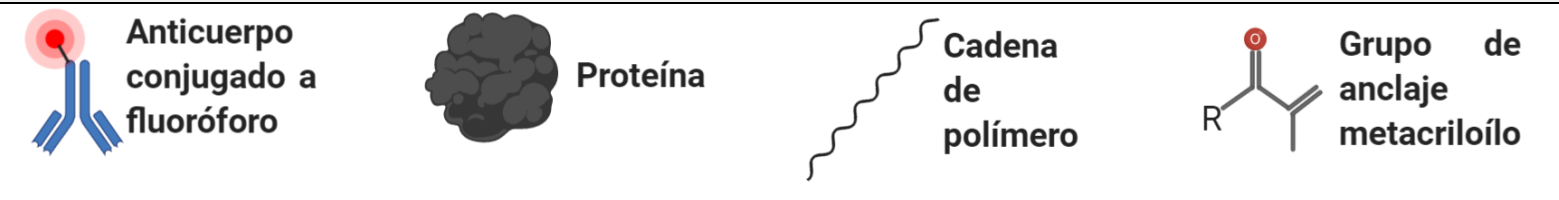
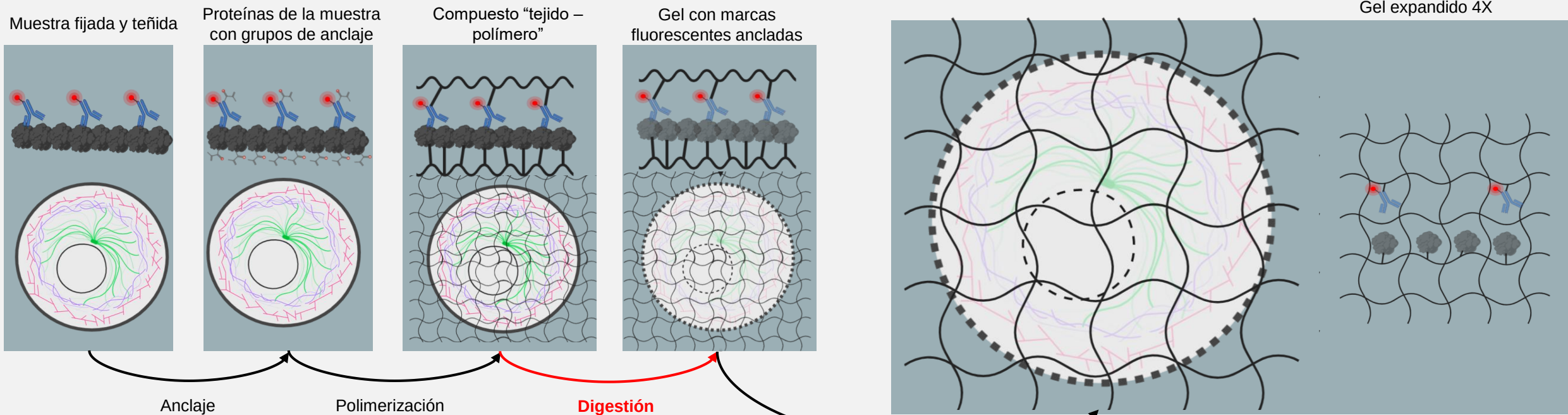


Expansion Microscopy en Bacterias y Biofilms

Nicole Canales Huerta, Dante Castagnini
Scian-Lab
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

ExM estándar (Chozinski et al 2016)



- Conservación de la forma general
- Expansión en factor ~ 4

ExM se ha implementado en diferentes modelos de estudio

Modelos “estándar”:

Cultivos celulares

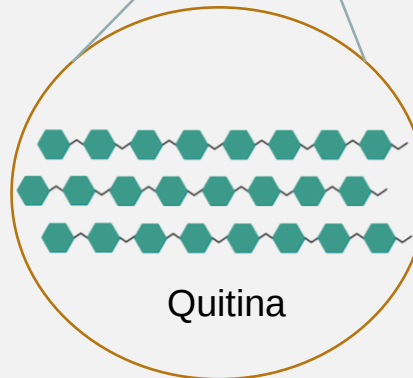
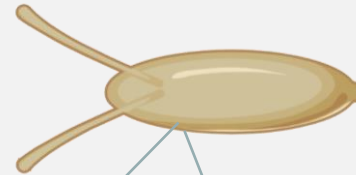


Cortes de tejidos



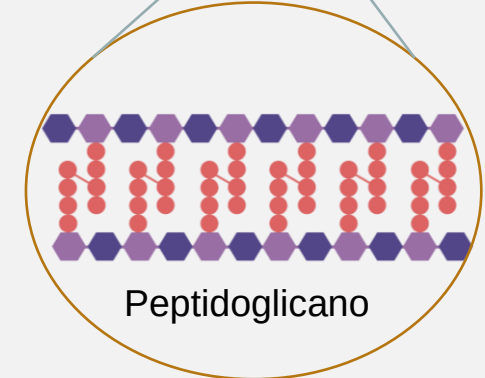
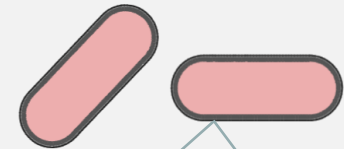
Otros modelos:

Embriones de *Drosophila*



Quitina

Bacterias (planctónicas e intracelulares)



Peptidoglicano

ExM se ha implementado en diferentes modelos de estudio

Modelos “estándar”:

Cultivos celulares

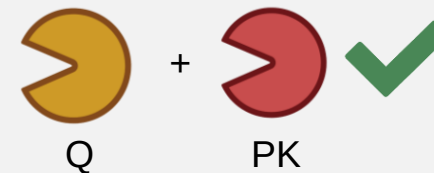
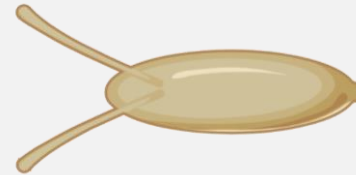


Cortes de tejidos



Otros modelos:

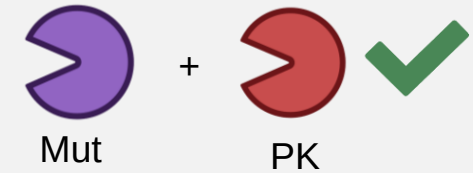
Embriones de *Drosophila*



Jiang et al. (2018)

“μExM”

Bacterias (planctónicas e intracelulares)



Lim et al. (2019)

ExM estándar no considera reactivos para degradar pared celular ni exopolisacáridos

EPS:

- **Exopolisacáridos**
- Proteínas
- ADN extracelular
- Lípidos



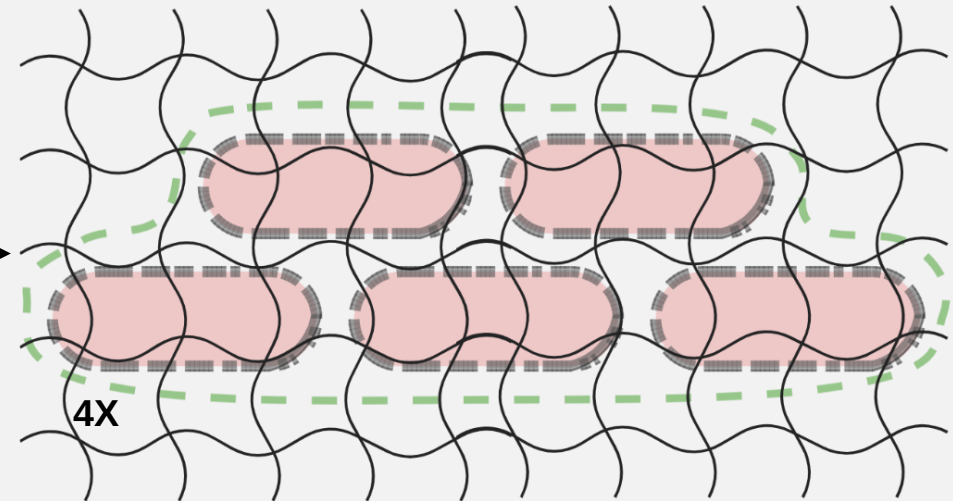
ExM estándar



μExM



Glicósido – hidrolasas y mutanolisina
son herramientas prometedoras



ExM estándar no considera reactivos para degradar pared celular ni exopolisacáridos

EPS:

- **Exopolisacáridos**
- Proteínas
- ADN extracelular
- Lípidos



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

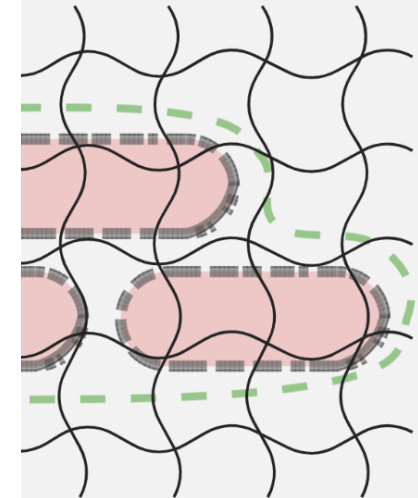
Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds

 Derek Fleming,^{a,b} Laura Chahin,^{a*} Kendra Rumbaugh^{a,b,c}

Mut

PK




αAm & Cel

+


Mut

+

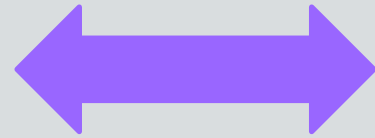
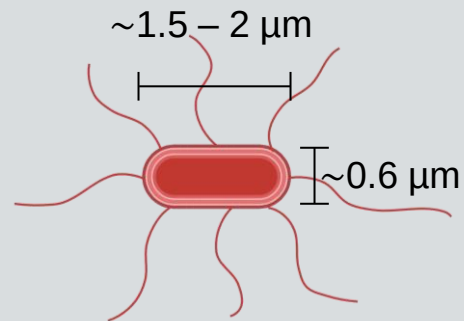

PK



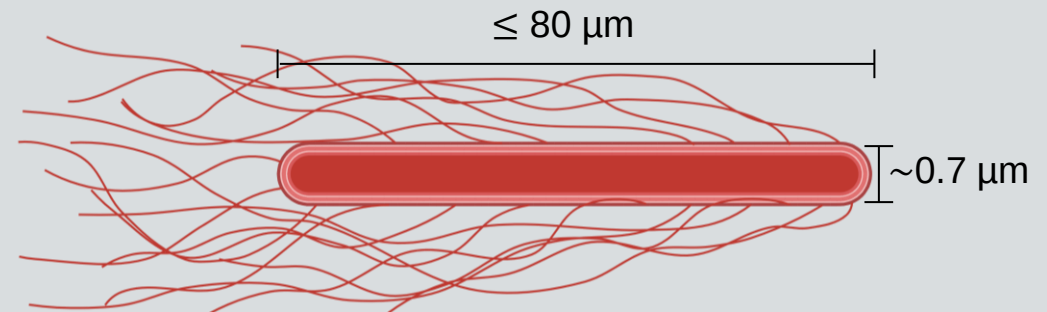
Glicósido – hidrolasas y mutanolisina
son herramientas prometedoras

***Proteus mirabilis*: patógeno formador de biopelículas en catéteres urinarios**

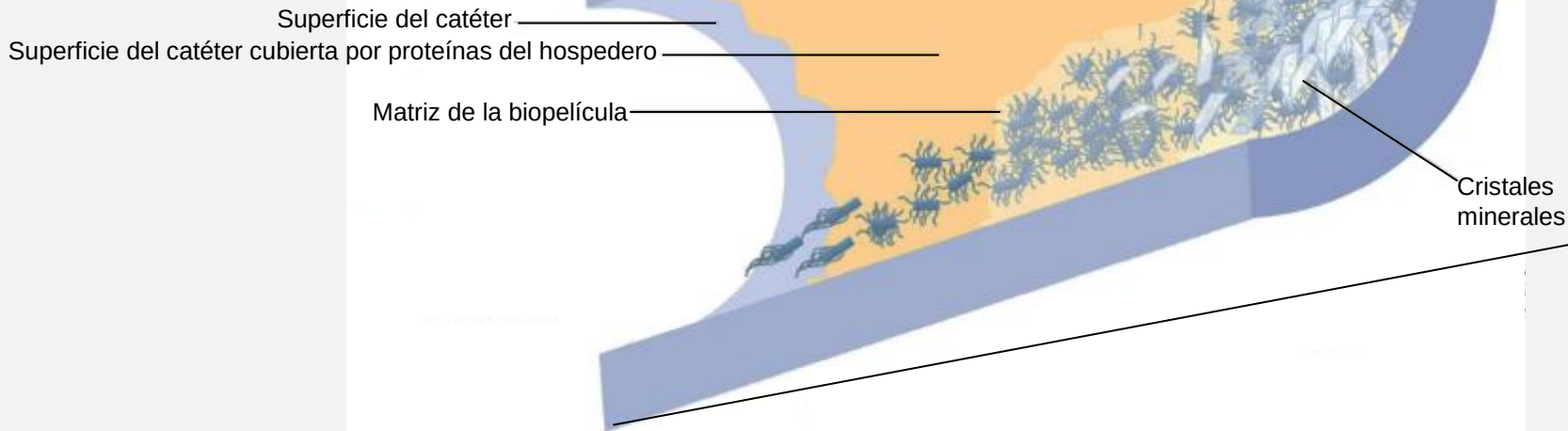
Célula nadadora (swimmer)



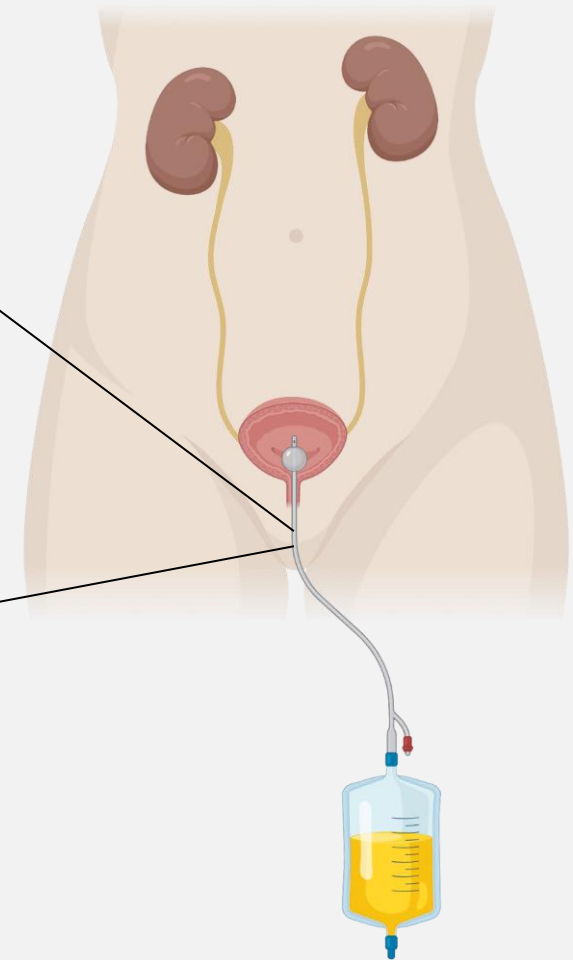
Célula enjambre (swarmer)



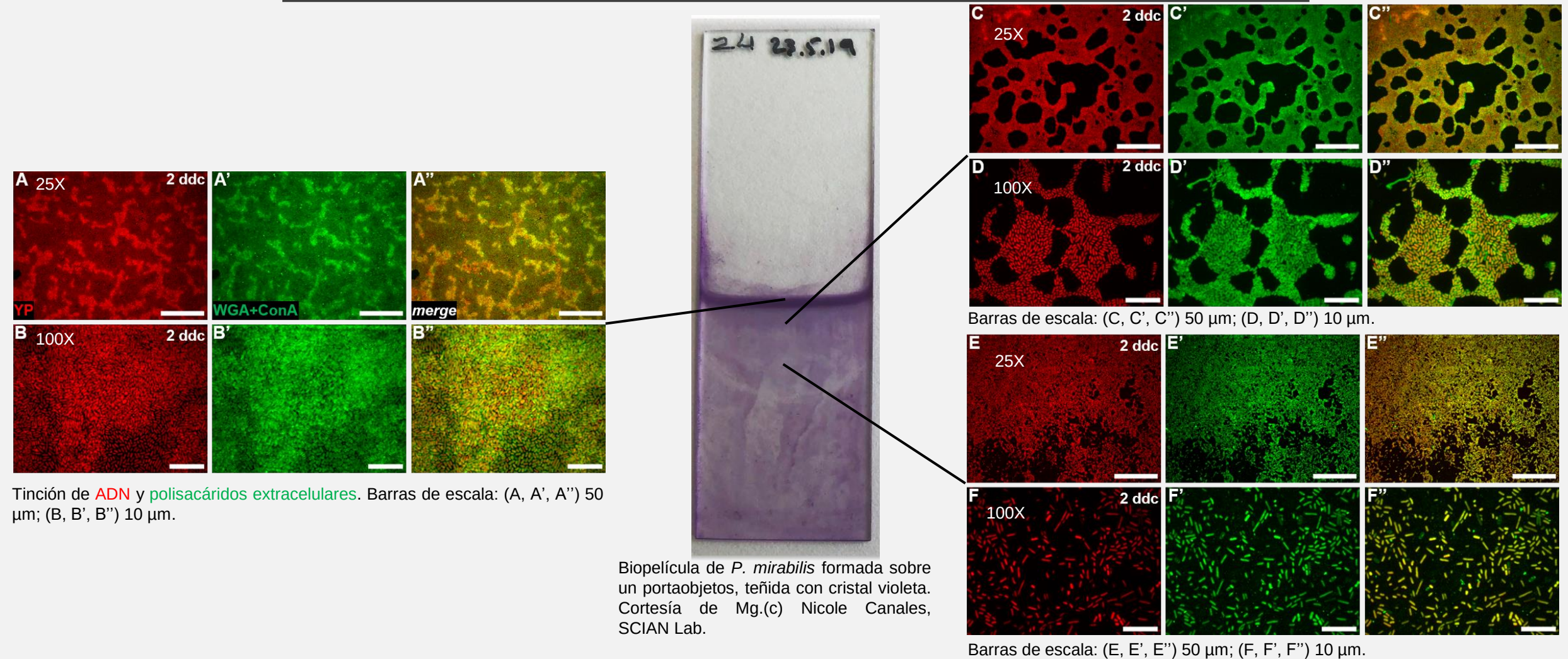
***Proteus mirabilis*: patógeno formador de biopelículas en catéteres urinarios**



Modificado de Wasfi et al. (2020).



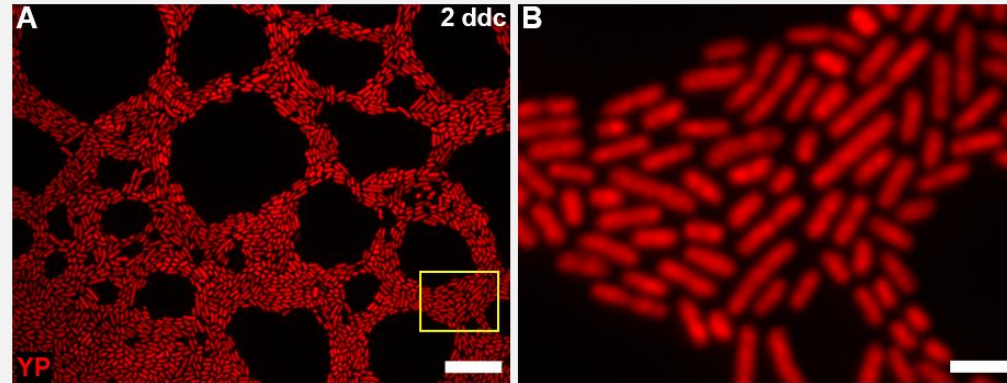
Visualización de la biopelícula de *P. mirabilis* D1 (WT)



Método para cuantificar factor de expansión

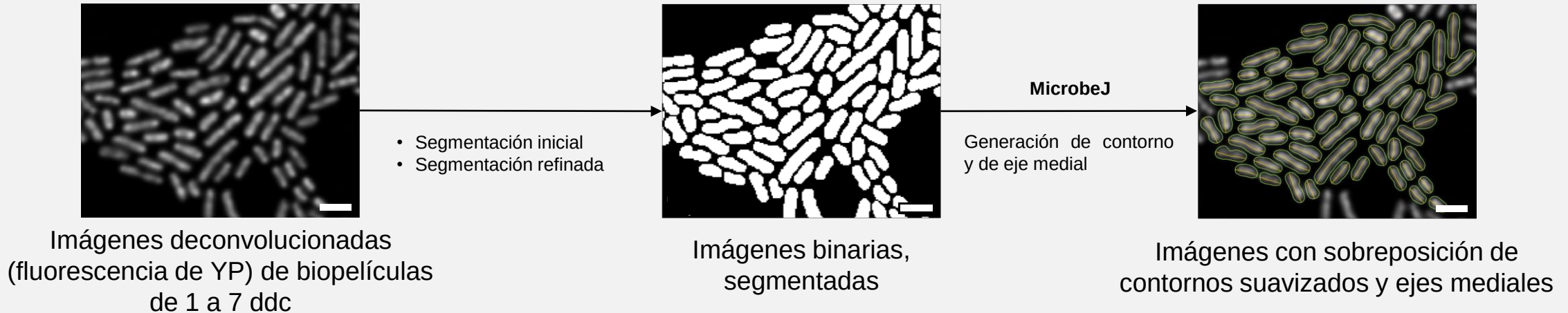
Selección de regiones que faciliten la segmentación

- Distribución espacial sin solapamiento.
- Fácil identificación de bacilos individuales.



Tinción de ADN con yoduro de propidio (YP). Barras de escala: (A) 10 μm ; (B) 2 μm .

Segmentación de bacterias individuales

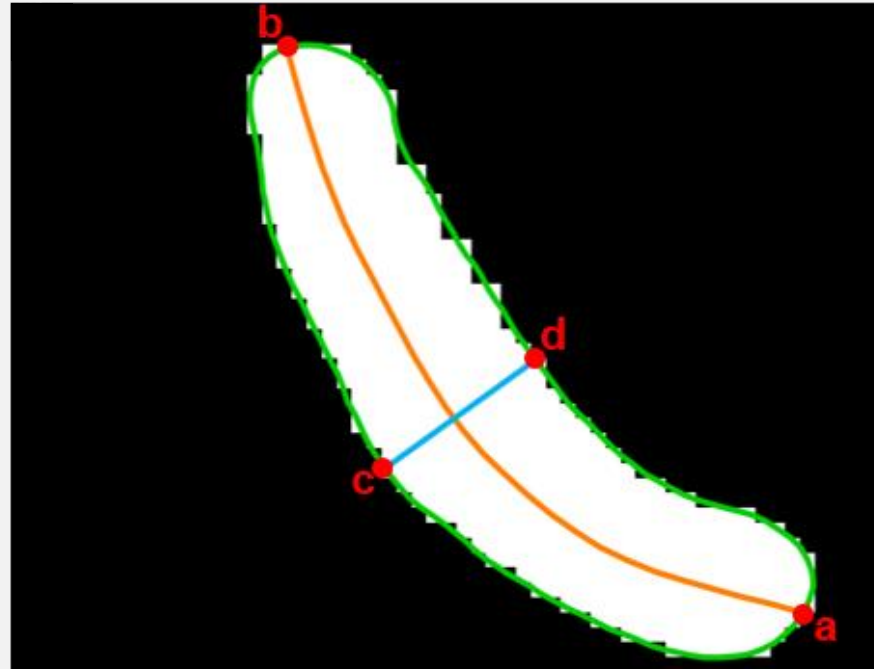


Barras de escala: 2 μm .

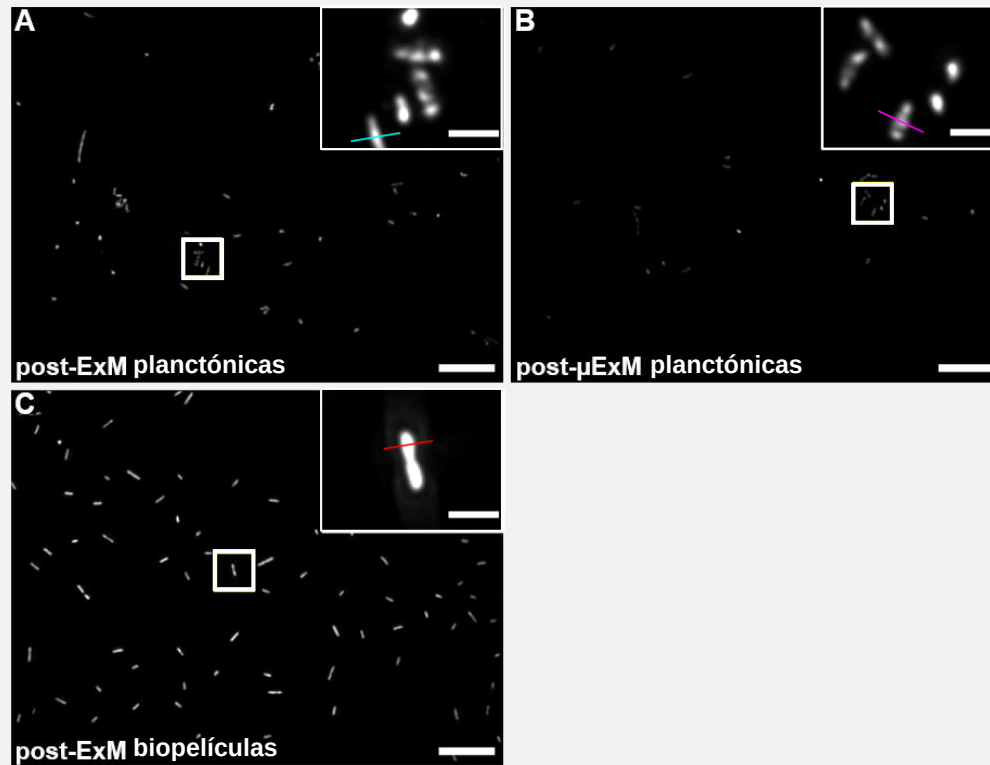
Extracción de descriptores morfológicos

- Área
- Perímetro
- Longitud

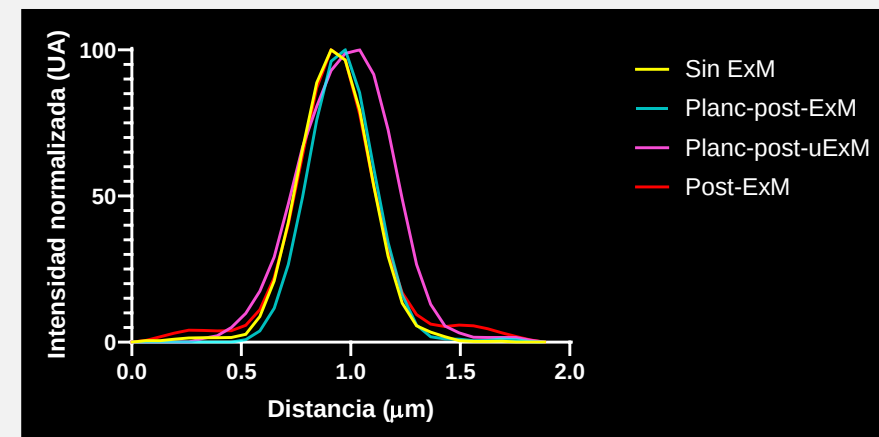
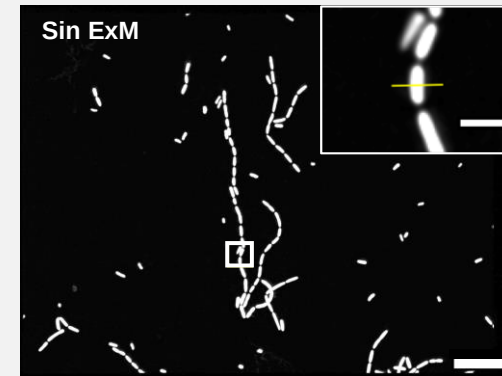
- Ancho máximo



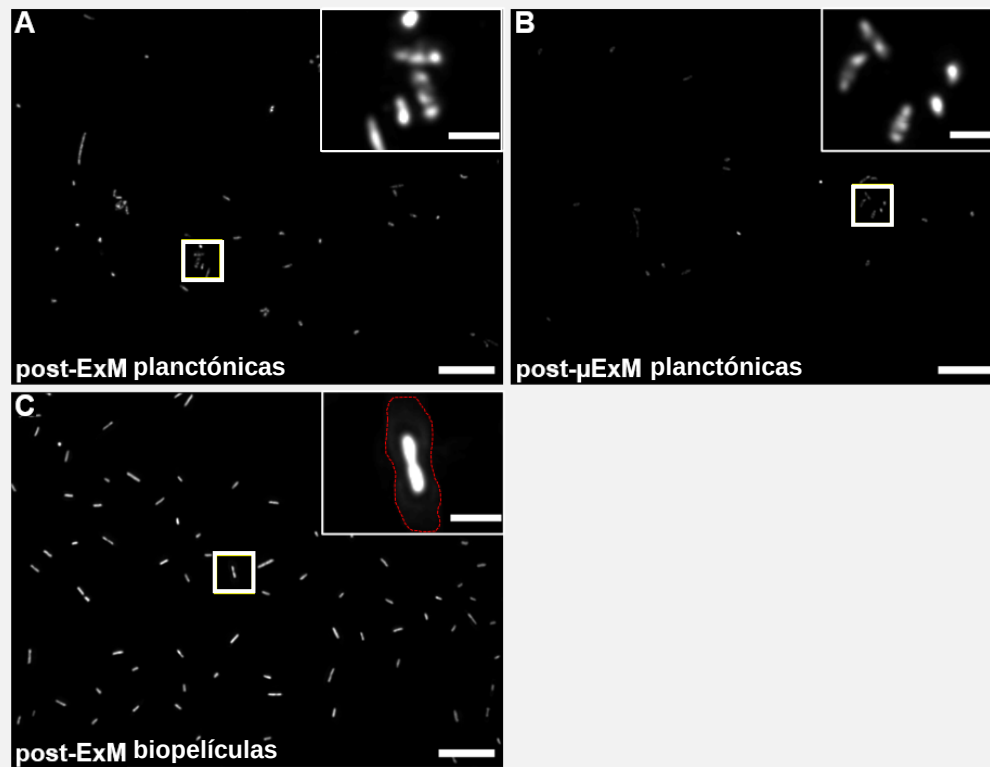
Aplicación de ExM estándar y μ ExM sobre *P. mirabilis*



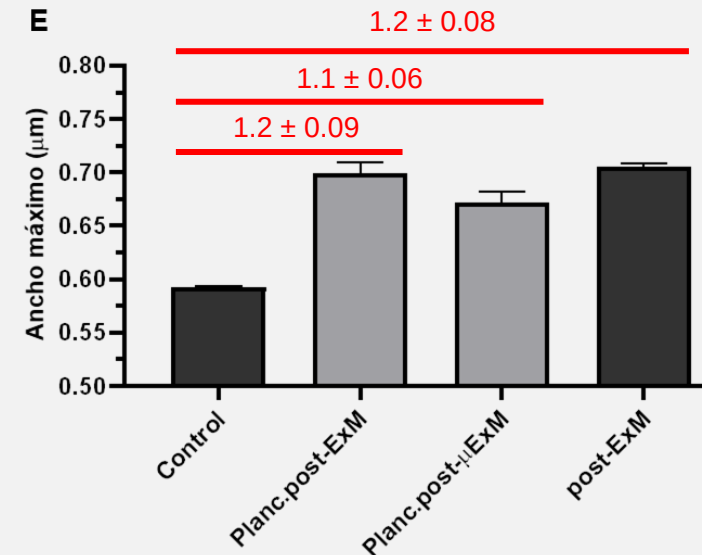
Tinción de ADN con YP, pseudocolor en escala de grises. Barras de escala de proyecciones planas: 10 μ m. Barras de escala de recuadros interiores: 2 μ m.



Aplicación de ExM estándar y μ ExM sobre *P. mirabilis*

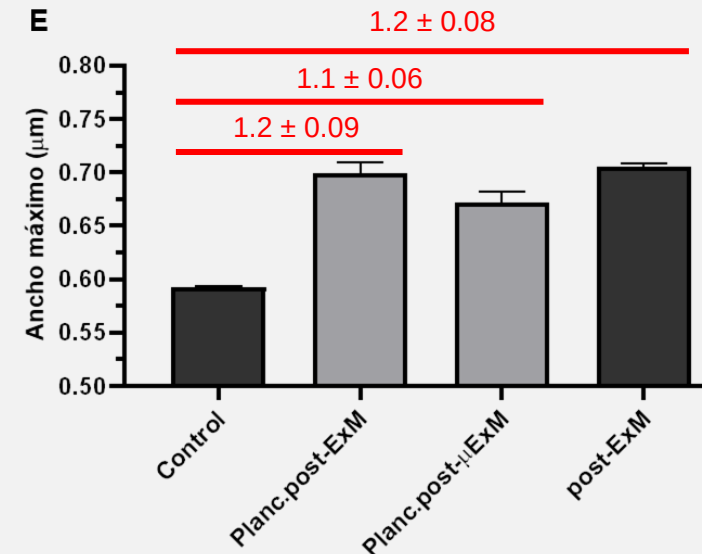
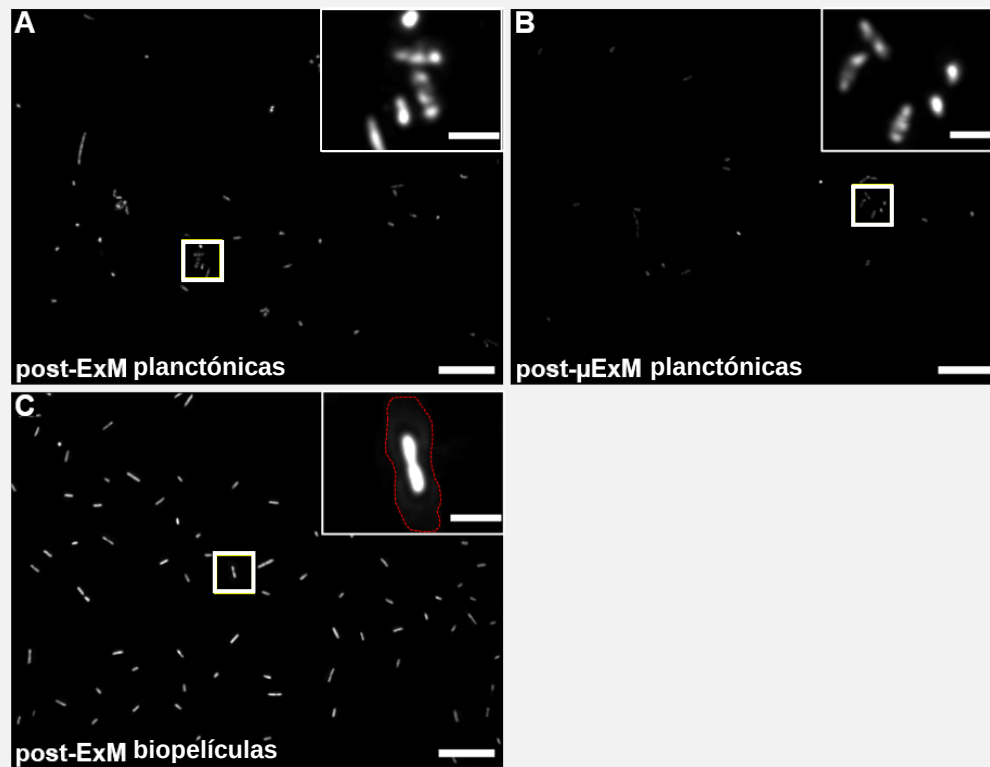


Tinción de ADN con YP, pseudocolor en escala de grises. Barras de escala de proyecciones planas: 10 μ m. Barras de escala de recuadros interiores: 2 μ m.



Se analizaron 13153 bacterias de biopelículas sin ExM (control); 121 bacterias planctónicas post-ExM estándar (Planc.post-ExM); 86 bacterias planctónicas post- μ ExM (Planc.post- μ ExM) y 1551 bacterias de biopelículas post-ExM estándar (post-ExM). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Gris claro: datos de bacterias planctónicas; gris oscuro: datos de bacterias de biopelículas.

Aplicación de ExM estándar y μ ExM sobre *P. mirabilis*



Se analizaron 13153 bacterias de biopelículas sin ExM (control); 121 bacterias planctónicas post-ExM estándar

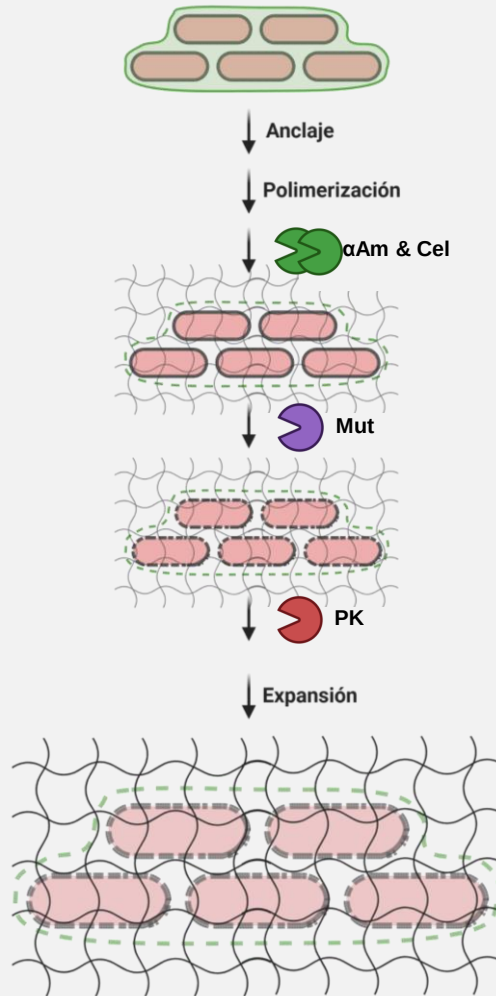
Tinción
proyecc

- ExM estándar y μ ExM fueron ineficaces para expandir bacterias planctónicas de *P. mirabilis*.
- ExM estándar fue ineficaz para expandir biopelículas de *P. mirabilis*.

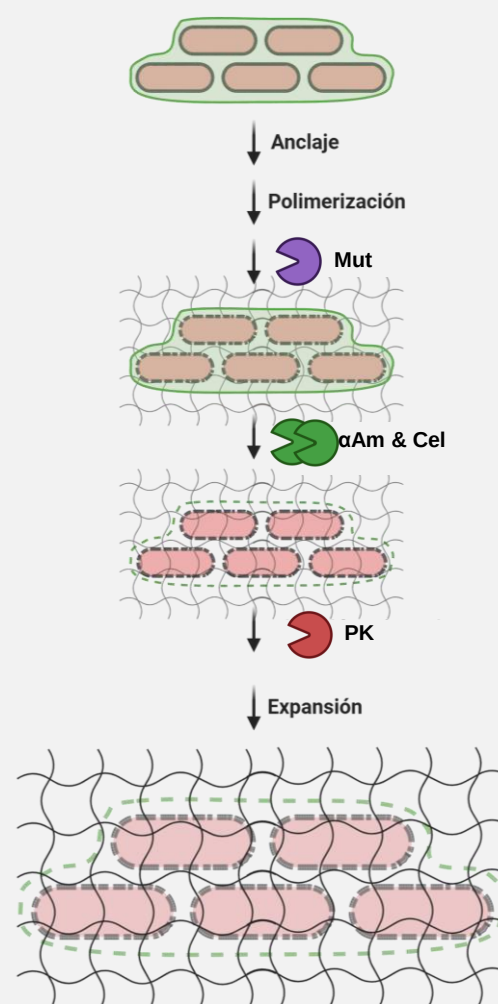
bacterias de biopelículas.

Diseño de *biofilm*ExM: diferentes secuencias de degradación

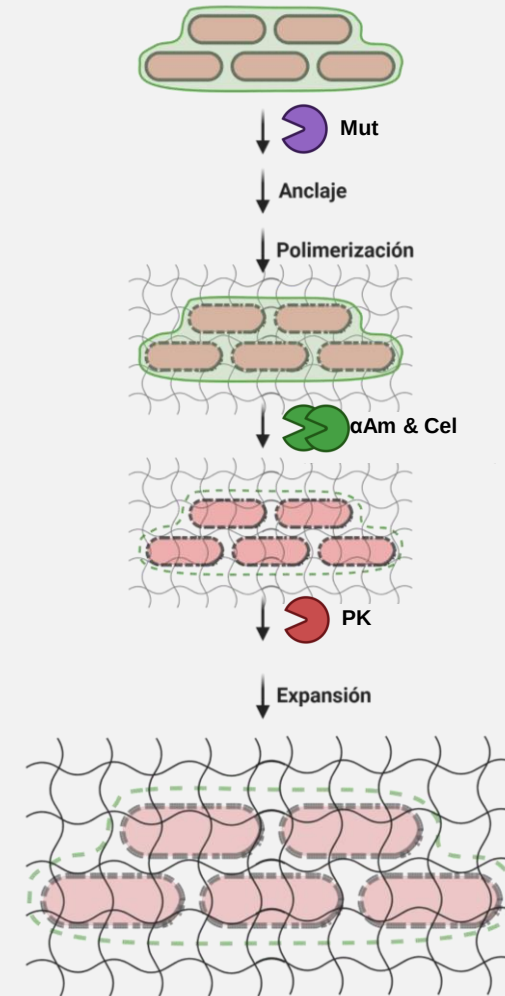
Exopolisacáridos - pared celular - proteínas



Pared celular - exopolisacáridos - proteínas

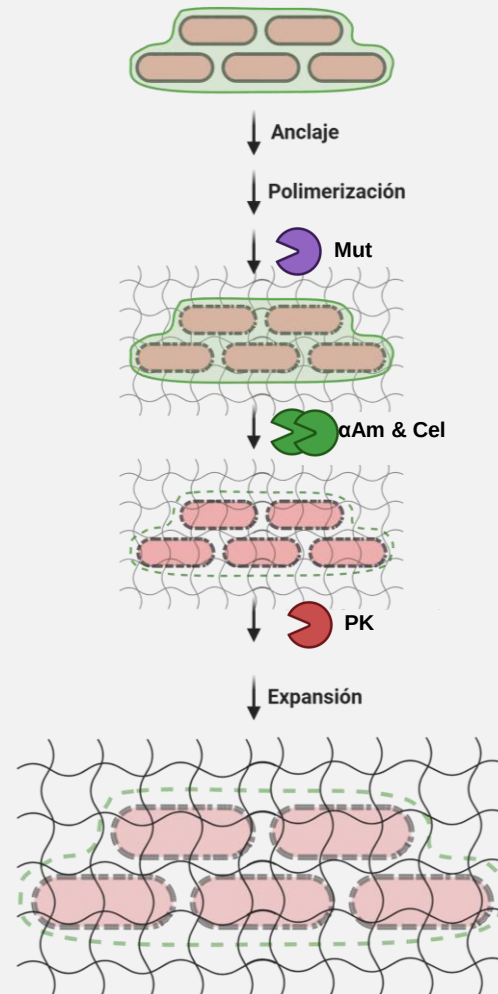


Pared celular - - - exopolisacáridos - proteínas

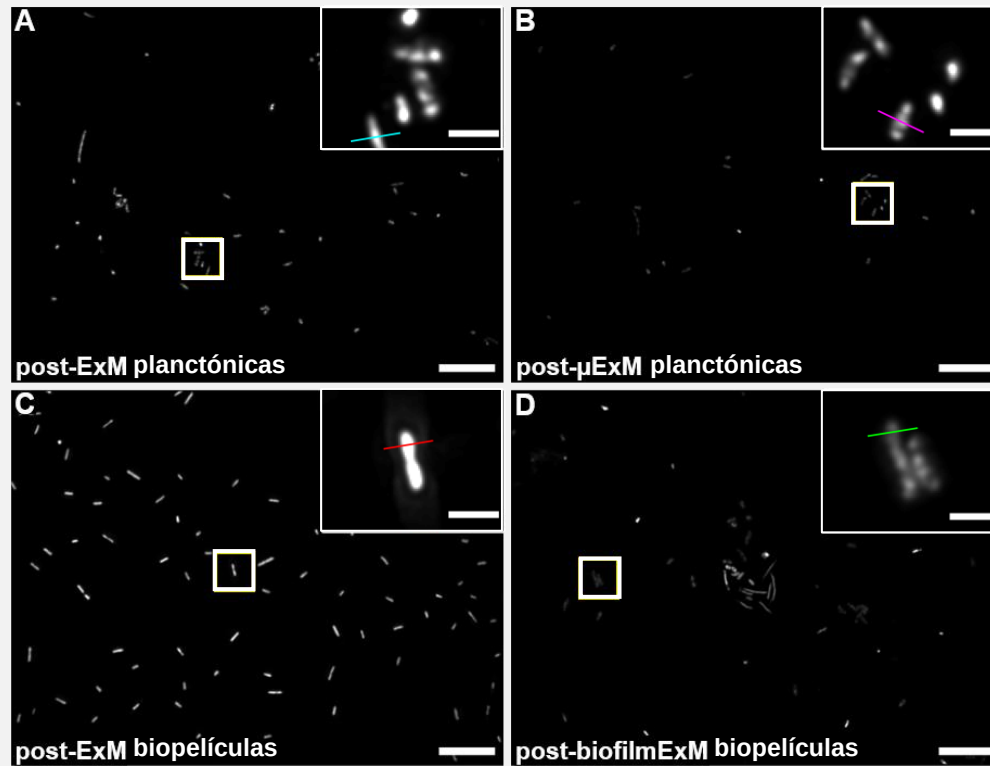


Diseño de *biofilm*ExM: diferentes secuencias de degradación

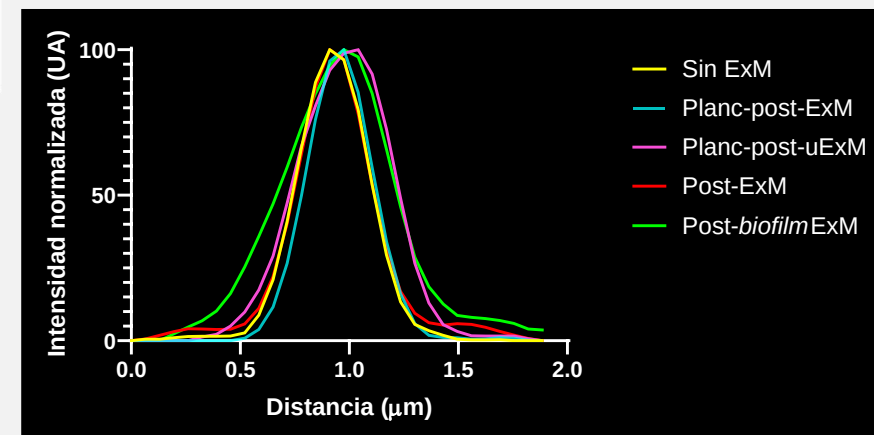
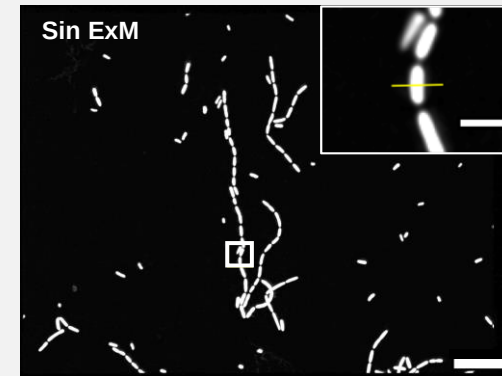
Pared celular - exopolisacáridos - proteínas



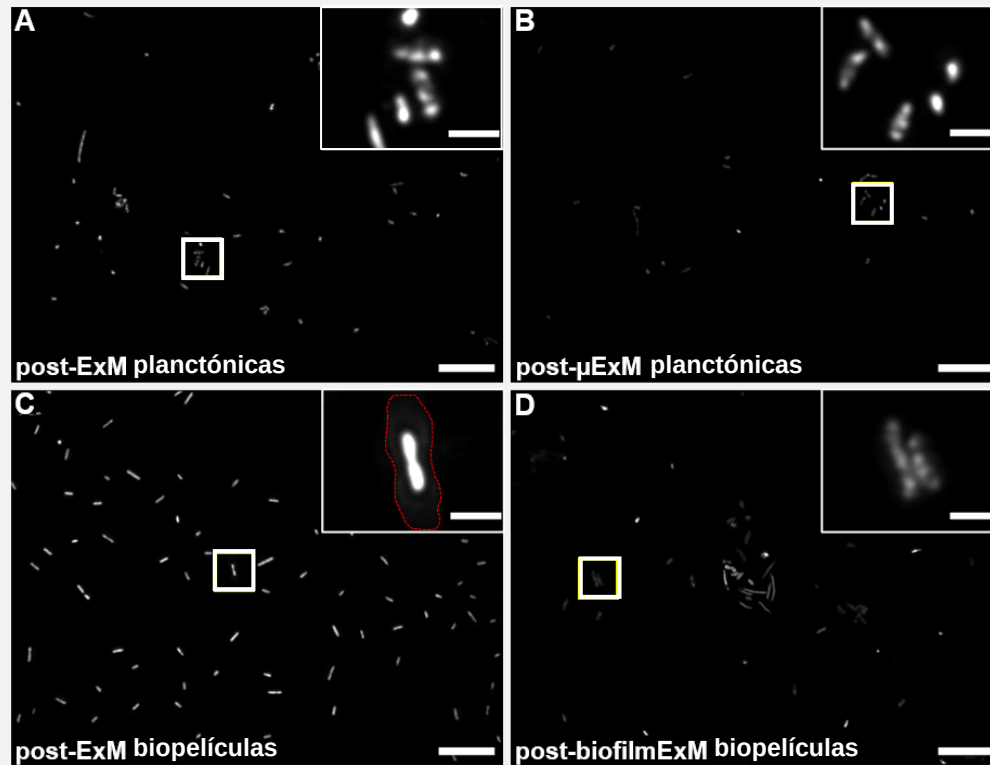
Aplicación de *biofilmExM* “V.1” sobre *P. mirabilis*



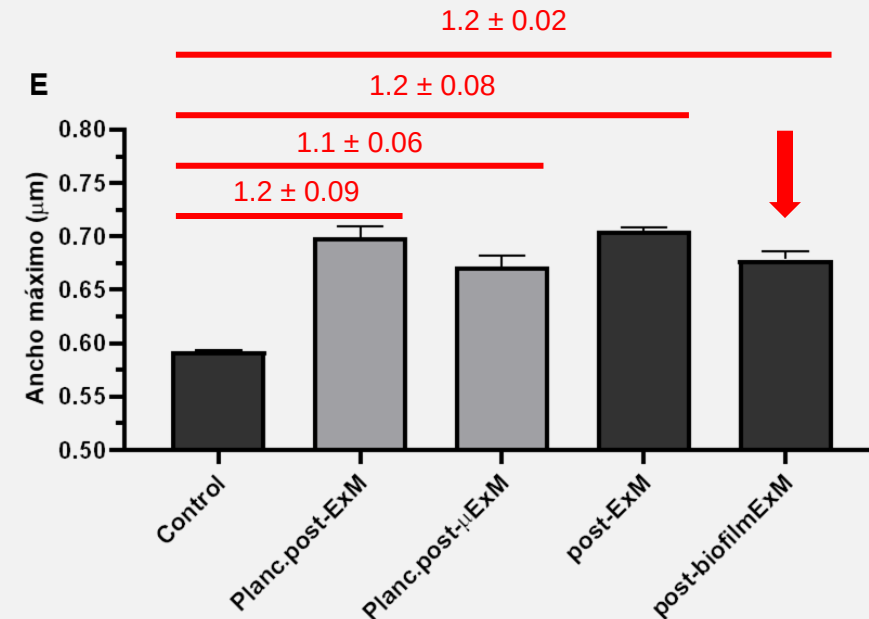
Tinción de ADN con YP, pseudocolor en escala de grises. Barras de escala de proyecciones planas: 10 μ m. Barras de escala de recuadros interiores: 2 μ m.



Aplicación de *biofilmExM* “V.1” sobre *P. mirabilis*

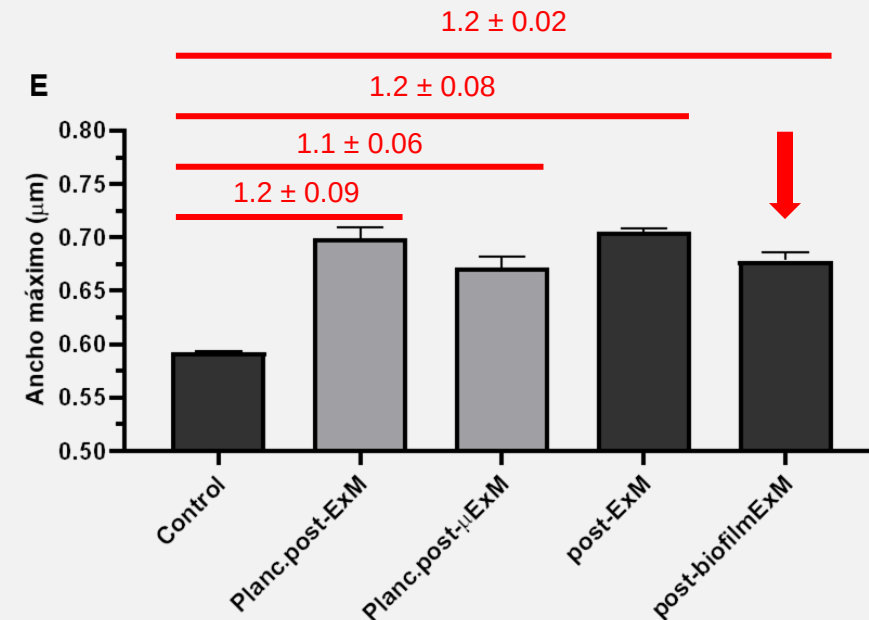
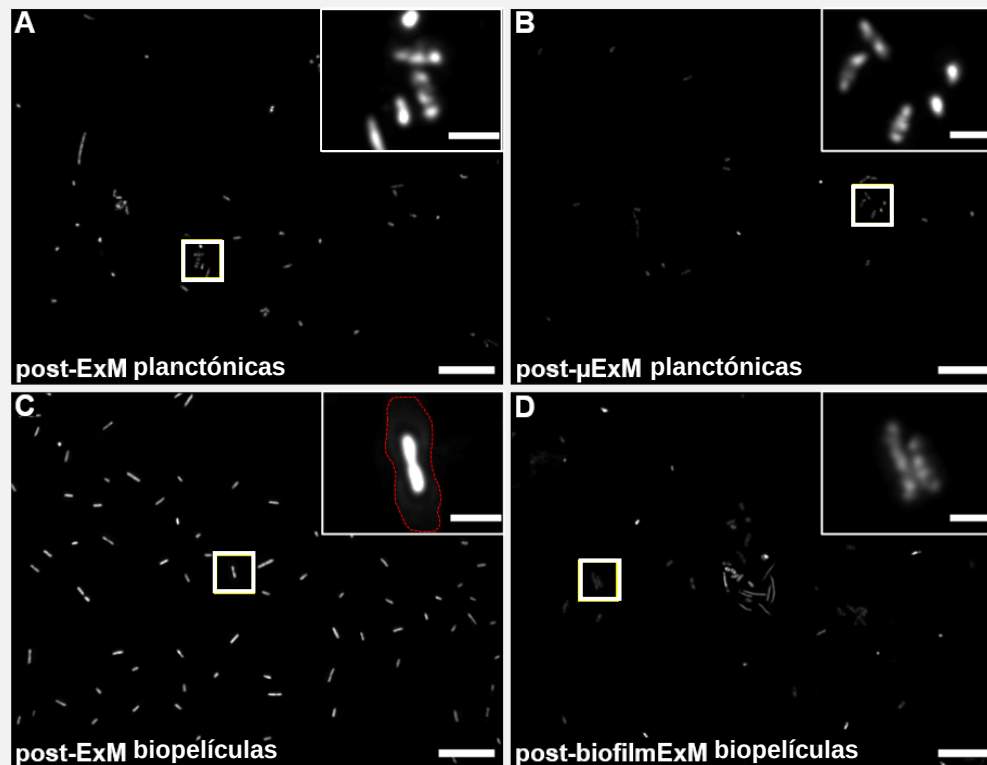


Tinción de ADN con YP, pseudocolor en escala de grises. Barras de escala de proyecciones planas: 10 μ m. Barras de escala de recuadros interiores: 2 μ m.



Se analizaron 13153 bacterias de biopelículas sin ExM (control); 121 bacterias planctónicas post-ExM estándar (Planc.post-ExM); 86 bacterias planctónicas post- μ ExM (Planc.post- μ ExM); 1551 bacterias de biopelículas post-ExM estándar (post-ExM) y 197 bacterias de biopelícula post-biofilmExM (post-biofilmExM). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Gris claro: datos de bacterias planctónicas; gris oscuro: datos de bacterias de biopelículas.

Aplicación de *biofilmExM* “V.1” sobre *P. mirabilis*



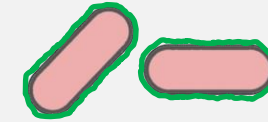
Se analizaron 13153 bacterias de biopelículas sin ExM (control); 121 bacterias planctónicas post-ExM estándar (Planc.post-ExM); 86 bacterias planctónicas post-μExM; 86 bacterias de biopelículas post-ExM; 86 bacterias de biopelículas post-biofilmExM. Los datos de error corresponden al error estándar de la media. Gris claro: datos de bacterias planctónicas; gris oscuro: datos de bacterias de biopelículas.

Esta primera versión de *biofilmExM* fue ineficaz para la expansión de una biopelícula madura de *P. mirabilis*.

Si se desea expandir el biofilm, primero se debe poder expandir la bacteria planctónica

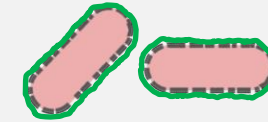
- μ ExM fue ineficaz para expandir bacterias planctónicas de *P. mirabilis*.

Bacterias fijadas,
permeabilizadas y
teñidas (IF, PF, u otras)



Digestión 1 (mutanolisina)

Bacterias con integridad
estructural de pared
celular comprometida



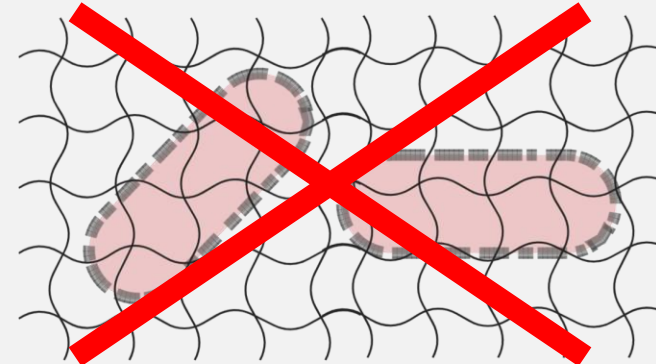
Anclaje

Polimerización

Digestión 2 (proteínasa K)

Expansión

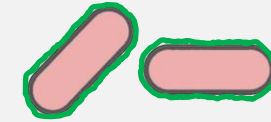
Gel expandido 4X



Si se desea expandir el biofilm, primero se debe poder expandir la bacteria planctónica

- μ ExM fue ineficaz para expandir bacterias planctónicas de *P. mirabilis*.

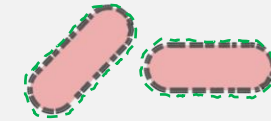
Bacterias fijadas,
permeabilizadas y
teñidas (IF, PF, u otras)



Digestión (α Am + Cel)
Digestión (mutanolisina)



Bacterias con integridad
estructural de pared
celular comprometida



Anclaje

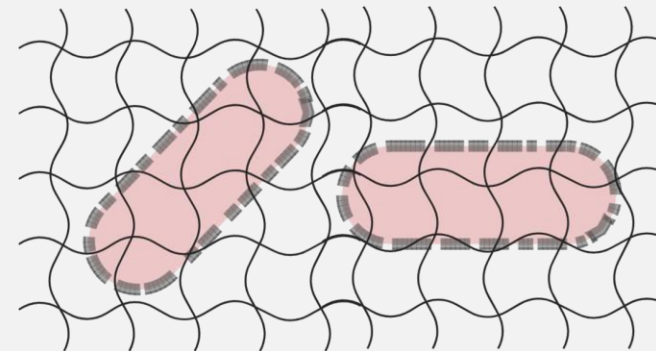
Polimerización

Digestión (proteínasa K)

Expansión

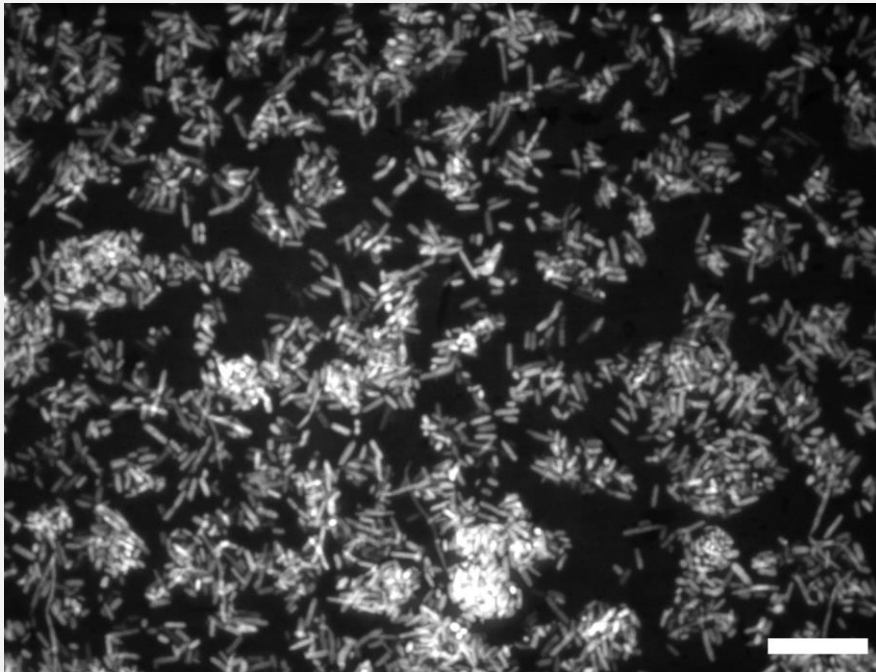


Gel expandido 4X

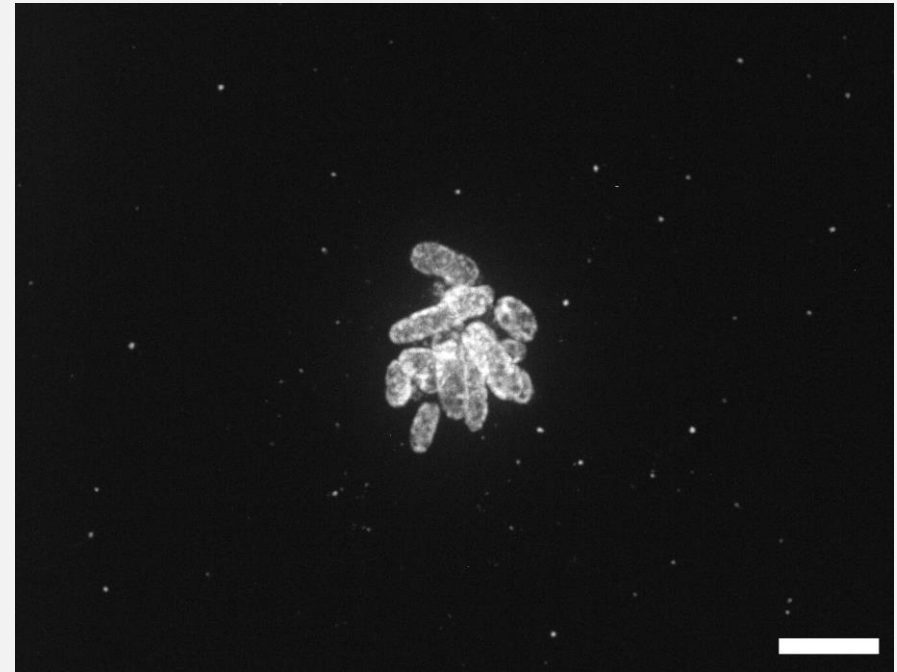


Muestras planctónicas de *P. mirabilis* expandidas tras modificaciones a μ ExM

Control (sin ExM)



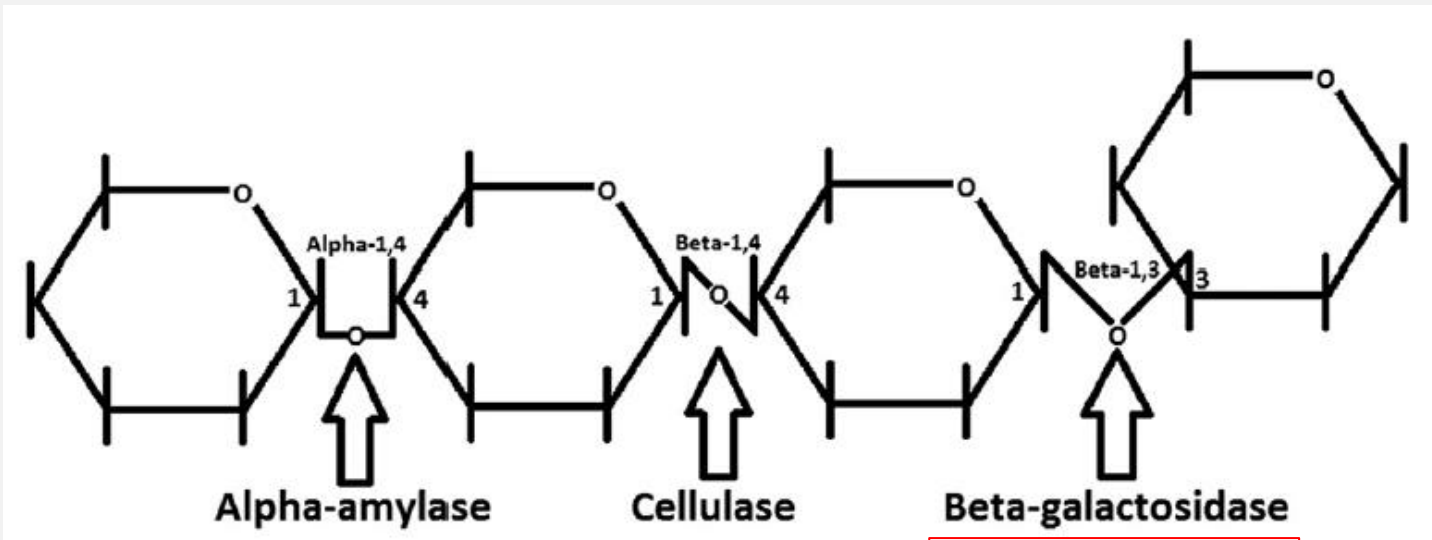
Post- μ ExM + GHs



Tinción de ADN con YP, pseudocolor en escala de grises. Barras de escala: 10 μ m.

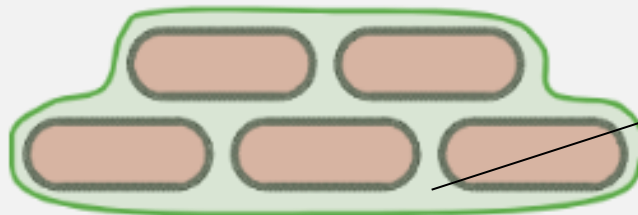
YP = yoduro de propidio
GHs = glicósido-hidrolasas

En proceso: evaluación de otras enzimas



Modificado de Fleming et al. (2017).

Liticasa



EPS:

- **Exopolisacáridos**
- Proteínas
- **ADN extracelular**
- Lípidos

ADNasa I

En proceso: evaluación de otras enzimas

Banar et al. *BMC Microbiology* (2019) 19:291
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1662-9>

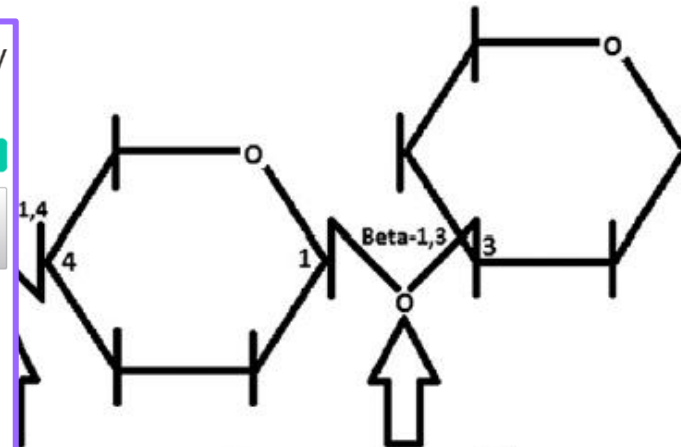
BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The efficacy of lyticase and β -glucosidase enzymes on biofilm degradation of *Pseudomonas aeruginosa* strains with different gene profiles

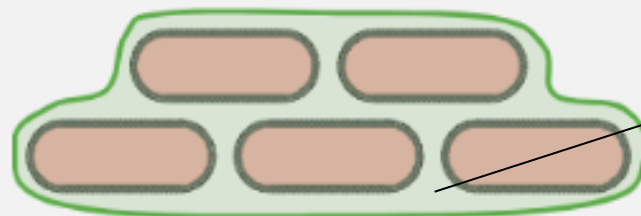
Maryam Banar¹, Mohammad Emameini¹, Reza Beigverdi¹, Rima Fanaei Pirlar¹, Narges Node Farahani¹, Willem B. van Leeuwen² and Fereshteh Jabalameli^{1*}



Beta-galactosidase

Liticasa

Modificado de Fleming et al. (2017).



EPS:

- Exopolisacáridos
- Proteínas
- ADN extracelular
- Lípidos

ADNasa I

En

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in
Biotechnology

Enzymes

Extracellular DNA as a target for biofilm control

Mira Okshevsky¹, Viduthalai R Regina¹ and
Rikke Louise Meyer^{1,2}

DNase treatment is effective against biofilm formation in a wide range of microbes

Bacterium	Prevention of biofilm formation	Disruption of preexisting biofilm	Type of DNase
Gram-negative bacteria			
<i>Acinetobacter baumannii</i>		✓	DNase I
<i>Acinetobacter baumannii</i>		✓	DNase I
<i>Actinobacillus</i>		✓	DNase I
<i>actinomycetemcomitans</i>			
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>		✓	DNase I
<i>Bordetella pertussis</i>		✓	DNase I
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		✓	DNase I
<i>Campylobacter jejuni</i>		✓	DNase I
<i>Comamonas denitrificans</i>	✓		DNase I
<i>Escherichia coli</i>		✓	DNase I, NucB
<i>Haemophilus influenzae</i>	✓	✓	DNase I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		✓	DNase I
<i>Neisseria meningitidis</i>	✓		DNase I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✓	DNase I, Varidase, DNase 1L2
<i>Shewanella oneidensis</i>	✓	✓	DNase I
<i>Vibrio cholera</i>		✓	DNase I, λExonuclease
Gram-positive bacteria			
<i>Bacillus licheniformis</i>		✓	NucB
<i>Bacillus subtilis</i>		✓	NucB
<i>Enterococcus faecalis</i>		✓	DNase I
<i>Listeria monocytogenes</i>	✓	✓	DNase I
<i>Micrococcus luteus</i>		✓	NucB
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	✓	DNase I, rhDNase I, NucB
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		✓	DNase I, DNase 1L2, NucB
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		✓	DNase I
<i>Streptococcus anginosus</i>		✓	NucB
<i>Streptococcus constellatus</i>		✓	NucB
<i>Streptococcus salivarius</i>		✓	NucB
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		✓	NucB
<i>Streptococcus intermedius</i>		✓	NucB
<i>Streptococcus intermedius</i>	✓		DNase I
<i>Streptococcus mutans</i>	✓		DNase I
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		✓	rhDNase I
<i>Streptococcus pyogenes</i>		✓	DNase I

Banar et al. *BMC Microbiology* (2019) 19:291
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1662-9>

RESEARCH ARTICLE

The efficacy of lytic
enzymes on biofilm
Pseudomonas aeruginosa
different gene proMaryam Banar¹, Mohammad Emameini¹,
Willem B. van Leeuwen² and Fereshteh J

Modifica

DNase

los

lar

ADNasa I