



# Comunicación microbiota-epitelio intestinal: Identificación de proteínas secretadas por el probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917 y caracterización funcional de la Serin Proteasa Sat

Lorena Toloza Maturana

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Comunicación microbiota-epitelio intestinal: Identificación de proteínas secretadas por el probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917 y caracterización funcional de la Serin Proteasa Sat.

**LORENA TOLOZA MATURANA**

**2014**





UNIVERSITAT DE BARCELONA



**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Memoria presentada por LORENA TOLOZA MATURANA para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Laura Baldomà Llavines y la Dra. Josefa Badía Palacín, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, Mayo de 2014

Dra. Laura Baldomà Llavines

Dra. Josefa Badía Palacín

Lorena Toloza Maturana



*A mi madre.*



*Gracias a la vida que me ha dado tanto.*

*Violeta Parra.*



## **Agradecimientos.**

*Hoy a punto de concluir esta etapa no puedo dejar de agradecer a quienes hicieron posible la culminación de esta tesis y a todos aquellos que me acompañaron durante el proceso.*

*A mis directoras de tesis, Dra. Laura Baldomà por guiar tan meticulosamente todo mi trabajo, por tu paciencia y por todos los conocimientos entregados, espero haberme impregnado aunque sea un poquito de tu pasión por la ciencia, gracias por hacerme creer que existen personas que disfrutan con su trabajo. A la Dra Josefa Badía, por tu preocupación constante, sin duda el grupo no sería lo mismo sin tus ganas de mirar el futuro con tanto optimismo, gracias por tu energía y por tu risa contagiosa, por los consejos y por sobretodo por la confianza que depositaste en mí hacia el final de esta tesis. A ambas, toda mi gratitud por su comprensión y ayuda en todo sentido.*

*A la Dra. Rosa Gimenez, quien sin ser mi directora de tesis estuvo conmigo en los momentos más agrios (sufriendo con las células y matanzas de ratones) pero también en los más divertidos con aquellos ataques de risa incontenibles con los análisis estadísticos jejeje. Muchas gracias por tu “empatía” y por aportar un punto de vista tan humano. Siempre recordaré tu ahugurio que a la larga se hizo realidad, gracias por tu sabiduría y por entregar siempre lo mejor de ti en pro de los demás.*

*A Juan Aguilar por su apoyo constante en las decisiones del grupo. A las Dras. Del Dpto. de Fisiología Raquel Martin y Luisa Miró por sus consejos y ayuda con la manipulación de radioactividad y las células. Al personal del estabulario sobretodo a David por mostrarme la cara más amable de los ratoncitos.*

*A las “Colis antiguas” que grandes recuerdos me llevo de ustedes chicas! cada una ocupa una parte importante dentro de mi corazón, estos años no hubieran sido lo mismo sin ustedes, a Laura Aguilera “la pequeña” quiero agradecer su “inmensa generosidad”, por ayudar a todas siempre con una sonrisa, sin duda eres la responsable del buen ambiente que se crea en el laboratorio, gracias por tu nobleza, por tu complicidad y tu amistad, ha sido un agrado compartir tantos años junto a ti, te deseo todo lo mejor del mundo a ti y los tuyos. A Elaine mi compañera de pollata de risas y bailes, gracias por hacerme sentir que podía contar contigo para lo que fuera, espero que el destino te sorprenda y te llene de alegrías y felicidad. A Karla mi amiga, que puedo decir que ya no sepas... gracias por tu amistad, porque a pesar de la distancia siempre estas presente, aún así te encuentres al otro lado del mundo, gracias por elegirme y por cuidar esta conexión tan nuestra.*

*A las “Colis nuevas” a Maria Alexandra gracias por tu solidaridad y buena voluntad, por ofrecerme una mano cuando me viste más agobiada, a Maria José por inundar el laboratorio de alegría, que buena sucesora a llegado para ocupar mi lugar! y a Carina por ayudarme con los últimos experimentos sobretodo con los interminables recuentos de colonias. A las tres les deseo mucho éxito y espero que esto que inician sea una experiencia tan enriquecedora como la que yo me llevo.*

*Como no mencionar a los estudiantes de paso: al encantador Cliff, al teatral Ricardo, a Mostafa y Dijana gracias por los gratos momentos vívidos y las risas que hicieron más*

*alegres los días, especialmente mis cariños a Isabella por multiplicar mis manos y aportar en la agilización de algunos experimentos “muitos beijos para você”.*

*Al departamento en pleno a los que aún permanecen y a los que ya no están, a los grupos Fausto; Ciudad-Noe; ST (Albert) y peces por aportar siempre un ambiente respetuoso y solidario, por la compañía en karaokes, caminatas, picnic y cuanta cosa se me ocurrió. En especial a Xenia y Maria por los abrazos que no pedí y que tanto me reconfortan, a Mida y Joan agradezco su forma de ser tan espontánea y cariñosa conmigo a todos gracias por compartir conversaciones y situaciones más allá de lo cotidiano.*

*A los profesores, por su trato tan cercano a Vero y Carlos, Maribel, Dolores, Guillermina Joana y Laura, agradezco más de alguna conversación alentadora durante estos años y sus buenas intenciones.*

*A Andrés por estar siempre dispuesto a echar una mano con cualquier problema, por sus charlas profundas y también las bromas. A Kim por su capacidad de escuchar y resolver problemas. Gracias a ambos por el apoyo técnico y moral cuando me vieron un tanto desanimada.*

*A Brugest, Mary Carmen y Assumpta, que a pesar de estar tan separadas realizan una labor tan importante, gracias por todo el papeleo, trámites y por estar atentas de cada uno de los becarios muchas veces sin nosotros darnos cuenta.*

*A los amigos entrañables en Barcelona Cris y Xime, Clarita, Daniela y Andrea por su compañía y apoyo total, estar tan lejos de los míos se vió compensando con su presencia. A mis entrañables en Chile Marianela y Cristian los mejores amigos que la vida me pudo regalar!. A mi compañero de costuras y camino Néstor... guardaré la experiencia de Santiago como el mejor camino que pude andar. A Beatriz y Evelyn por su amistad y bondad desinteresada que más de alguna vez me sorprendieron.*

*A la gente de la Universidad de Talca, al profesor Carlos Padilla por convencerme de venir a aquí y brindarme su apoyo. A mis amigas Olga, Wendy, Cony y Jime por tenderme sus manos y cuando más lo necesité. Gracias por su preocupación, cariño y amistad a la distancia.*

*A mi madre, por enseñarme la mejor lección que me ha abierto un mundo de posibilidades: la humildad, el respeto y el valor por las cosas simples. Para ti y por ti son todos mis logros y lo que anhelo ser. A mis hermanos Carolina, Juan Carlos y Mario gracias por su apoyo incondicional y por darme la tranquilidad de alejarme y cuidar de mamá y de nuestro círculo. Dicen que la familia no se elige pero soy afortunada por tener la mejor familia del mundo, gracias por poder contar con cada uno de ustedes; Matu-Matu la distancia que nos separa es sólo física porque están siempre presentes en mi día a día y en mi corazón.*

*Por último quiero dar las gracias a Taco, porque un día te cruzaste en mi camino y decidiste acompañarme, gracias por demostrarme que el camino es más llevadero si lo recorremos juntos, gracias por todo tu apoyo, comprensión y amor. Met dank aan jouw familie, vooral aan je ouders om bij dit proces betrokken te zijn en voor hun steun, heel erg bedankt voor de vele blijken van genegenheid*





## PRESENTACIÓN

El intestino de los mamíferos es uno de los ecosistemas más densamente poblados, con una población estimada de  $10^{14}$  bacterias en el intestino grueso. El conjunto de estas bacterias constituye la denominada microbiota, la cual presenta una enorme capacidad metabólica y un repertorio de genes que excede en 100 veces el número total de genes del organismo hospedador. La microbiota intestinal es considerada un órgano más que contribuye en diversas funciones y procesos esenciales del huésped.

El estudio de la microbiota comensal es un área de gran interés en el campo de la salud humana. Puesto que alteraciones en su composición pueden ser la base de diversas patologías, la intervención sobre la composición de la microbiota se contempla como una estrategia preventiva o terapéutica. En este sentido, la administración de probióticos pretende aprovechar los efectos beneficiosos de la microbiota comensal.

El epitelio gastrointestinal constituye la primera barrera de defensa del huésped frente a la invasión por patógenos y además es la superficie donde el huésped interactúa con la microbiota. Estudios recientes muestran que no existe un contacto directo entre la microbiota y el epitelio intestinal. Ambos tipos celulares están separados por la capa de mucina más interna. La propia estructura de la mucina y factores solubles secretados por el huésped contribuyen a esta separación. En este contexto, es importante identificar qué factores microbianos son capaces de acceder al epitelio intestinal y modular su función. Las proteínas secretadas por la microbiota, por su situación extracelular, pueden contribuir en este sentido. Además, las bacterias gram-negativas producen vesículas de membrana externa (OMVs) como vehículos de liberación a distancia de factores microbianos en un entorno más estable que la secreción de proteínas solubles. Estas vesículas permiten la interacción con otras células evitando el contacto intercelular directo, por ello se vislumbran como mediadores importantes en la señalización intestinal.

Con la finalidad de profundizar en aspectos moleculares de la comunicación microbiota-epitelio intestinal, hemos abordado estudios en la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Esta bacteria gram-negativa es la única de su especie aprobada para uso farmacológico (Mutaflor; DMS6601, serotype O6:K5:H1). Esta cepa es un excelente colonizador del intestino con capacidad de inhibir la adhesión y colonización por parte de patógenos. A este efecto contribuye su capacidad de producir microcinas así como la de inducir la expresión de péptidos antimicrobianos. Este probiótico ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias intestinales. Estudios clínicos han demostrado que EcN es capaz de estimular la respuesta inmune favoreciendo el balance en favor de las citoquinas anti-inflamatorias tanto a nivel intestinal como sistémico.

Las proteínas secretadas por probióticos representan excelentes dianas de estudio para entender la interacción entre las bacterias probióticas y el huésped. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo fue abordar estudios proteómicos encaminados a caracterizar el secretoma de la cepa EcN, así como establecer qué proteínas son secretadas a través de OMVs.

Para realizar el análisis proteómico de las OMVs se partió de vesículas aisladas a partir de cultivos de la cepa EcN en medio DMEM. Las proteínas identificadas fueron comparadas con datos obtenidos previamente por el grupo a partir de OMVs aisladas de cultivos de esta cepa en medio LB. Este análisis permitió identificar proteínas asociadas a OMVs comunes a ambos proteomas y proteínas específicamente expresadas en las vesículas obtenidas dependiendo del medio de crecimiento, indicando que el medio de crecimiento determina la composición de las proteínas exportadas a través de vesículas, lo que puede repercutir en el tipo y diversidad de funciones asociadas a estas estructuras. El análisis *in silico* del proteoma de las OMVs así como en el secretoma global de la cepa EcN indican que las proteínas identificadas desempeñan funciones relacionadas con la adhesión, modulación del sistema inmune o supervivencia de la bacteria en nichos del huésped.

Una de las proteínas identificada en el sobrenadante de cultivos en LB fue la proteína Sat (*serin protease autotransporter toxin*), codificada por un gen presente en la isla genómica II de la cepa EcN. Sat pertenece a la familia de autotransportadores de enterobacterias (*SPATE*) y su función había sido sólo estudiada en cepas de *E. coli* uropatógenas y enteroadherentes (DAEC), no existiendo referencias sobre la función de Sat en la cepa probiótica. Por tanto, nuestro objetivo fue analizar si Sat es expresada en el tracto intestinal y secretada en forma activa por la cepa EcN. Con este análisis se pretendía establecer si Sat ha de ser considerada un factor de virulencia o, por el contrario, un factor *fitness* que contribuye a una mejor colonización a nivel intestinal.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en la cepa EcN Sat es secretada en forma soluble, no asociada a OMVs. La proteína secretada presenta actividad proteasa y esta actividad depende de la serina en la posición 256 del sitio catalítico. Los análisis de la expresión de fusiones de promotor a genes reporteros (*lacZ* o *gfp*) evidenciaron que el gen *sat* es inducible *in vitro* por componentes presentes en un tipo de mucina comercial, derivada de estómago de cerdo y comercializada como mucina Tipo II (Sigma), así como su expresión *in vivo* en el tracto intestinal de ratones.

Los efectos de la proteasa Sat de la cepa EcN sobre la integridad de la barrera intestinal fueron evaluados *in vitro* en monocapas de células Caco-2 polarizadas. Se llevaron a cabo determinaciones de la resistencia transepitelial (TER) y permeabilidad paracelular a manitol en monocapas incubadas con suspensiones bacterianas o sobrenadantes de cultivos de varias cepas que expresaban la proteína Sat de EcN *wild type* o la versión

mutada Sat-S256I. Los resultados indican que si bien la proteína Sat de esta cepa es capaz de producir un ligero aumento de la permeabilidad paracelular (de orden similar al descrito para la Sat de cepas DAEC), este efecto no se observa cuando la proteína es expresada en la cepa probiótica. Otros componentes secretados por el propio probiótico son capaces de contrarrestar el daño causado por Sat. Probablemente, la función de Sat no es desestructurar las *tight junctions*. Además, Sat no presenta actividad citotóxica en células Caco-2 diferenciadas.

La implicación de Sat en los procesos de adhesión y colonización fue evaluada comparando un mutante deficiente en Sat con respecto a la cepa EcN *wild type* en modelos *in vitro* (cultivos celulares) y en modelos *in vivo* (ratones). La proteína Sat de la cepa EcN no está implicada en la formación de *biofilms* sobre superficies abióticas ni en la adhesión del probiótico sobre células del epitelio intestinal. Los estudios de colonización en modelos murinos permitieron establecer que Sat no es requerida para la colonización intestinal puesto que ambas cepas, EcN *wild type* y la cepa EcN deficiente de Sat EcN*sat::cm*, son capaces de colonizar y adherirse a la mucosa intestinal de forma similar cuando son administradas individualmente. Sin embargo, en estudios de competición, administrando por vía orogástrica una mezcla (1:1) de ambas cepas, la cepa EcN*sat::cm* es capaz de desplazar a la cepa tipo salvaje y alcanzar una mayor proporción tanto en heces como en mucus aislado de íleon y colon. Estudios de competición *in vitro* en crecimiento planctónico en medio LB confirmaron la capacidad de la cepa EcN*sat::cm* de desplazar a la EcN *wild type*, y evidenciaron además su capacidad de desplazar más eficientemente a una cepa enteropatógena como EPEC.

Los resultados de este trabajo nos llevan a proponer que Sat no debe ser considerada un factor de virulencia en la cepa probiótica EcN. Su efecto citotóxico parece ser dependiente de varios factores como son la línea celular utilizada, su estadio de diferenciación, así como la combinación de otros factores y mecanismos propios de la bacteria productora capaces de contrarrestar el efecto de esta proteasa. La mayor capacidad del mutante deficiente en Sat de competir en crecimiento planctónico con cepas enteropatógenas podría ser explotada para derivar una cepa con mayor capacidad de colonización y desplazamiento de patógenos, si bien se requieren estudios adicionales para evaluar los efectos de este “nuevo” probiótico sobre otros parámetros de la homeostasis intestinal.



## ABREVIATURAS

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>2D</b>                      | <i>Electroforesis bidimensional</i>                               |
| <b>aa</b>                      | <i>Aminoácidos</i>  |
| <b>Amp</b>                     | <i>Ampicilina</i>   |
| <b>Bisacrilamida</b>           | <i>N, N'-Metileno-bisacrilamida</i>                               |
| <b>BSA</b>                     | <i>Albúmina de suero bovino</i>                                   |
| <b>Cm</b>                      | <i>Cloramfenicol</i>  |
| <b>Csp</b>                     | <i>Cantidad suficiente para</i>                                   |
| <b>DAEC</b>                    | <i>E. coli de adhesión difusa</i>                                 |
| <b>DMEM</b>                    | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                           |
| <b>DMSO</b>                    | <i>Dimetilsulfóxido</i>   |
| <b>dNTP</b>                    | <i>Desoxirribonucleótido trifosfato</i>                           |
| <b>DO</b>                      | <i>Densidad óptica</i>  |
| <b>DTT</b>                     | <i>Ditiotreitol</i>   |
| <b>EAEC</b>                    | <i>E. coli enteroagregativa</i>                                   |
| <b>EDTA</b>                    | <i>Etilendiaminotetracetato</i>                                   |
| <b>EHEC</b>                    | <i>E. coli enterohemorrágica</i>                                  |
| <b>EPEC</b>                    | <i>E. coli enteropatógena</i>                                     |
| <b>g</b>                       | <i>Gravedades</i>   |
| <b>FEB</b>                     | <i>Formación específica de biopelícula o biofilms</i>             |
| <b>GALT</b>                    | <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>                             |
| <b>GAPDH</b>                   | <i>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>                    |
| <b>HEPES</b>                   | <i>Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico</i>        |
| <b>Ig</b>                      | <i>Inmunoglobulina</i>  |
| <b>IL</b>                      | <i>Interleuquina</i>  |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b> | <i>Interferón <math>\gamma</math></i>                             |
| <b>IPTG</b>                    | <i>Isopropil <math>\beta</math>-D-tiogalactopiranosido</i>        |
| <b>JAM</b>                     | <i>Junctional adhesión molecules</i>                              |
| <b>Kb</b>                      | <i>Kilobase</i>   |
| <b>kDa</b>                     | <i>KiloDalton</i>   |
| <b>Km</b>                      | <i>Kanamicina</i>   |
| <b>LB</b>                      | <i>Medio de cultivo Luria-Bertani</i>                             |
| <b>LFA-1</b>                   | <i>leukocyte function-associated molecule 1</i>                   |
| <b>LPS</b>                     | <i>Lipopolisacárido</i>   |
| <b>mA</b>                      | <i>Miliamperio</i>  |
| <b>Maldi-TOF</b>               | <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i> |
| <b>MAPKs</b>                   | <i>Protein quinasas activadas por mitógenos</i>                   |
| <b>MHC</b>                     | <i>Complejo Mayor de Histocompatibilidad</i>                      |
| <b>MOI</b>                     | <i>Multiplicidad de infección</i>                                 |
| <b>MOPS</b>                    | <i>Ácido-3-(n-morfolín) propanosulfónico</i>                      |
| <b>MS</b>                      | <i>Espectrometría de masas</i>                                    |
| <b>NFKB</b>                    | <i>Nuclear factor kappa B</i>                                     |
| <b>NK</b>                      | <i>células asesinas naturales</i>                                 |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>O/N</b>    | <i>Overnight</i>  |
| <b>OM</b>     | <i>Outer membrane (membrana externa)</i>                                |
| <b>OMVs</b>   | <i>Vesículas de Membrana Externa</i>                                    |
| <b>ONPG</b>   | <i>O-Nitro-fenil-<math>\beta</math>-D-galactopiranosido</i>             |
| <b>PAGE</b>   | <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i>                          |
| <b>PBS</b>    | <i>Tampón fosfato salino</i>  |
| <b>PCR</b>    | <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>                              |
| <b>Pfu</b>    | <i>Unidad formadora de calva de lisis</i>                               |
| <b>pI</b>     | <i>Punto isoeléctrico</i>   |
| <b>PKC</b>    | <i>Proteína quinasa C</i>   |
| <b>PMSF</b>   | <i>Fluoruro de fenil-metil-sulfonil</i>                                 |
| <b>PVDF</b>   | <i>Fluoruro de polivinilideno</i>                                       |
| <b>Rif</b>    | <i>Rifampicina</i>  |
| <b>Sat</b>    | <i>Serín Autotransporter Toxina</i>                                     |
| <b>SDS</b>    | <i>Dodecil sulfato sódico</i>   |
| <b>SM</b>     | <i>Medio mineral basal</i>  |
| <b>SPATEs</b> | <i>Serino proteasas autotransportadoras de Enterobacteriaceae</i>       |
| <b>Str</b>    | <i>Estreptomina</i>   |
| <b>TAE</b>    | <i>Tampón Tris-ácido acético glacial</i>                                |
| <b>TBE</b>    | <i>Tampón Tris-HCl, Borato y EDTA</i>                                   |
| <b>TBS</b>    | <i>Tampón Tris-salino</i>   |
| <b>Tc</b>     | <i>Tetraciclina</i>   |
| <b>TCA</b>    | <i>Ácido tricloroacético</i>  |
| <b>TE</b>     | <i>Tampón Tris-HCl, EDTA</i>  |
| <b>TEMED</b>  | <i>N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina</i>                                  |
| <b>TER</b>    | <i>Resistencia eléctrica transepitelial</i>                             |
| <b>TFB</b>    | <i>Tampón de transformación</i>   |
| <b>TLRs</b>   | <i>Toll-like receptors</i>  |
| <b>Tm</b>     | <i>Temperatura de hibridación</i>                                       |
| <b>TNF</b>    | <i>Factor de necrosis tumoral</i>                                       |
| <b>Tris</b>   | <i>Tris (hidroximetil) aminometano</i>                                  |
| <b>U</b>      | <i>Unidad de actividad enzimática</i>                                   |
| <b>UFC</b>    | <i>Unidad formadora de colonias</i>                                     |
| <b>UPEC</b>   | <i>E. coli uropatógena</i>  |
| <b>V</b>      | <i>Voltio</i>   |
| <b>W</b>      | <i>Vatios</i>   |
| <b>wt</b>     | <i>Tipo salvage (wild type)</i>   |
| <b>X-Gal</b>  | <i>5-Bromo-4-cloro-3-indolil-<math>\beta</math>-D-galactopiranosido</i> |
| <b>ZO</b>     | <i>Zonula occludens</i>   |

# ÍNDICE



|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.1 TRACTO GASTROINTESTINAL Y MICROBIOTA.....</b>                                     | <b>3</b>  |
| 1.1.1 SISTEMAS DE BARRERA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.....                               | 4         |
| 1.1.1.1 <i>Capa de Mucus</i> .....   | 5         |
| 1.1.1.2 <i>Células Epiteliales</i> .....   | 8         |
| 1.1.1.3 <i>Sistema Inmunitario</i> .....   | 10        |
| 1.1.2 FUNCIONES DE LA MICROBIOTA.....  | 12        |
| 1.1.2.1 <i>Función Metabólica</i> .....  | 12        |
| 1.1.2.2 <i>Función Trófica</i> .....   | 12        |
| 1.1.2.3 <i>Función Protectora</i> .....  | 14        |
| 1.1.3 COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA HUMANA.....   | 14        |
| 1.1.4 PROBIÓTICOS.....   | 16        |
| 1.1.4.1 <i>Escherichia coli Nissle 1917 (EcN)</i> .....                                  | 17        |
| 1.1.4.1.1 <i>Mecanismos responsables de los efectos probióticos de la cepa EcN</i> ..... | 17        |
| <b>1.2 FAMILIA SERIN PROTEASAS AUTOTRANSPORTADORAS DE ENTEROBACTERIACIAE.....</b>        | <b>20</b> |
| 1.2.1 SERIN AUTOTRANSPORTER TOXIN (Sat).....   | 24        |
| <b>1.3 VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.....</b>                | <b>27</b> |
| 1.3.1 BIOGÉNESIS DE LAS OMVs .....   | 28        |
| 1.3.2 REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OMVs .....  | 29        |
| 1.3.3 LAS OMVs COMO SISTEMA DE SECRECIÓN Y LIBERACIÓN DE FACTORES MICROBIANOS.....       | 30        |
| 1.3.4 FUNCIONES DE LAS OMVs .....  | 32        |
| 1.3.5 ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE LAS OMVs.....  | 34        |
| 1.3.6 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LAS OMVs.....  | 34        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>3. MATERIALES.....</b>  | <b>43</b> |
| 3.1 CEPAS BACTERIANAS.....   | 43        |
| 3.2 VECTORES.....  | 44        |
| 3.3 LÍNEAS CELULARES.....  | 45        |
| 3.4 ANIMALES.....  | 45        |
| 3.5 OLIGONUCLEÓTIDOS.....  | 45        |
| 3.6 REACTIVOS Y KITS COMERCIALES.....  | 45        |
| 3.7 SOPORTE INFORMÁTICO.....   | 45        |
| 3.7.1 <i>Programas informáticos</i> .....  | 45        |
| 3.7.2 <i>Base de datos</i> .....   | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. MÉTODOS.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>4.1 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>4.1.1 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....</b>              | <b>49</b> |
| 4.1.1.1 <i>Composición de los medios de cultivos.....</i>                                | 49        |
| 4.1.1.2 <i>Mantenimiento de cepas bacterianas.....</i>                                   | 50        |
| <b>4.1.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....</b>                                       | <b>50</b> |
| 4.1.2.1 <i>Métodos químicos.....</i>   | 50        |
| A) <i>Método del TFB.....</i>  | 50        |
| B) <i>Método del CaCl<sub>2</sub>.....</i>   | 51        |
| 4.1.2.2 <i>Métodos Físicos.....</i>  | 52        |
| A) <i>Mediante electroporación.....</i>  | 52        |
| <b>4.1.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....</b>                                  | <b>52</b> |
| 4.1.3.1 <i>Mediante choque térmico.....</i>  | 52        |
| 4.1.3.2 <i>Por electroporación.....</i>  | 53        |
| <b>4.1.4 TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERIÓFAGO P1.....</b>                       | <b>53</b> |
| 4.1.4.1 <i>Preparación de un lisado P1.....</i>  | 54        |
| 4.1.4.2 <i>Transducción a genoma.....</i>  | 54        |
| <b>4.1.5 CONJUGACIÓN.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>4.1.6 OBTENCIÓN DE MUTANTES.....</b>  | <b>56</b> |
| 4.1.6.1 <i>Selección de mutantes espontáneos .....</i>                                   | 56        |
| 4.1.6.2 <i>Mutantes knockout por disrupción génica .....</i>                             | 56        |
| 4.1.6.3 <i>Mutagénesis dirigida de DNA por PCR .....</i>                                 | 59        |
| <b>4.2 CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....</b>  | <b>60</b> |
| 4.2.1 <b>COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....</b>                                   | 60        |
| 4.2.2 <b>EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS POR TRIPSINIZACIÓN.....</b>                           | 61        |
| 4.2.3 <b>CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS.....</b>  | 62        |
| 4.2.4 <b>DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.....</b>  | 62        |
| 4.2.5 <b>RECuento DE CÉLULAS.....</b>  | 63        |
| <b>4.3 INFECCIÓN BACTERIANA DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....</b>                               | <b>63</b> |
| <b>4.4 ANÁLISIS DE LA PERMEABILIDAD PARACELULAR DE CÉLULAS Caco-2 DIFERENCIADAS.....</b> | <b>64</b> |
| 4.4.1 <b>MEDIDA DE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL.....</b>                      | 64        |
| 4.4.2 <b>MEDIDA DE LOS FLUJOS UNIDIRECCIONALES APICAL-BASOLATERAL DE D-MANITOL.....</b>  | 65        |
| <b>4.5 ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....</b>                                     | <b>66</b> |
| 4.5.1 <b>OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES CONCENTRADOS DE CULTIVOS BACTERIANOS.....</b>        | 66        |
| 4.5.2 <b>OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....</b>                                       | 66        |
| 4.5.3 <b>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY.....</b>                           | 66        |
| 4.5.4 <b>CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR PRECIPITACIÓN.....</b>                           | 67        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.5.5      | DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....   | 68        |
| 4.5.5.1    | <i>Actividad <math>\beta</math>-galactosidasa.....</i>                                  | 68        |
| 4.5.5.2    | <i>Actividad serin proteasa Sat.....</i>  | 68        |
| 4.5.6      | SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....                 | 69        |
| 4.5.6.1    | <i>Electroforesis monodimensional.....</i>  | 69        |
| 4.5.6.2    | <i>Electroforesis bidimensional.....</i>  | 71        |
| 4.5.7      | ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT.....  | 72        |
| 4.5.8      | OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.....   | 73        |
| 4.5.9      | IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....                            | 73        |
| <b>4.6</b> | <b>COLONIZACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATONES CON CEPAS BACTERIANAS.....</b>   | <b>74</b> |
| <b>4.7</b> | <b>TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....</b>   | <b>76</b> |
| 4.7.1      | TINCIONES DE CÉLULAS Y VESÍCULAS.....   | 76        |
| 4.7.1.1    | <i>Tinción de Gram para células bacterianas.....</i>                                    | 76        |
| 4.7.1.2    | <i>Tinción de Giemsa para células eucariotas y bacterias.....</i>                       | 76        |
| 4.7.1.3    | <i>Tinción Negativa para observación de vesículas.....</i>                              | 77        |
| 4.7.2      | VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS, FUSIONADAS A GFP POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....      | 77        |
| <b>4.8</b> | <b>PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....</b>   | <b>78</b> |
| 4.8.1      | OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.....  | 78        |
| 4.8.2      | OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....  | 78        |
| 4.8.3      | DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE DNA.....  | 78        |
| 4.8.4      | LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....  | 78        |
| 4.8.5      | REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR).....  | 79        |
| 4.8.6      | OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....   | 81        |
| 4.8.7      | SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES.....  | 81        |
| 4.8.8      | SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA.....   | 81        |
| 4.8.9      | RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....                                     | 81        |
| 4.8.9.1    | <i>Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa mediante electroforesis.....</i> | 81        |
| 4.8.9.2    | <i>Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....</i>              | 82        |
| 4.8.9.3    | <i>Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.....</i>                         | 82        |
| 4.8.10     | CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA (OBTENCIÓN DE DNA RECOMBINANTE).....          | 82        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>4.9</b>  | <b>CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES.....</b>  | <b>83</b>  |
| 4.9.1       | FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN <i>lacZ</i> . ....   | 83         |
| 4.9.1.1     | <i>Obtención de la fusión del promotor Sat-lacZ en vector multicopia.....</i>  | 83         |
| 4.9.1.2     | <i>Transferencia de fusiones de promotor al genoma bacteriano.....</i>   | 84         |
| 4.9.2       | FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN <i>gfpmut3.2</i> .....   | 85         |
| <b>4.10</b> | <b>FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i>.....</b>   | <b>86</b>  |
| 4.10.1      | FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i> SOBRE SUPERFICIES ABIÓTICAS.....  | 87         |
| 4.10.2      | FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i> SOBRE SUPERFICIES BIÓTICAS.....   | 88         |
| <b>4.11</b> | <b>ENSAYOS DE COMPETICIÓN BACTERIANA EN CRECIMIENTO PLANCTÓNICO.....</b>   | <b>88</b>  |
| <b>4.12</b> | <b>ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....</b>   | <b>89</b>  |
| <b>4.13</b> | <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>  | <b>89</b>  |
| <b>5.</b>   | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>5.1</b>  | <b>IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR LA CEPA EcN..</b>  | <b>93</b>  |
| <b>5.2</b>  | <b>ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS OMVs GENERADAS POR LA CEPA PROBIÓTICA EcN EN MEDIO DMEM.....</b>                           | <b>98</b>  |
| <b>5.3</b>  | <b>ANÁLISIS FUNCIONAL DE Sat EN LA CEPA PROBIÓTICA EcN.....</b>  | <b>108</b> |
| 5.3.1       | LA PROTEÍNA Sat ES AUTOTRANSPORTADA Y SU DOMINIO FUNCIONAL LIBERADO AL MEDIO EXTRACELULAREN CULTIVOS DE LA CEPA EcN..... | 108        |
| 5.3.2       | ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE <i>sat</i> .....  | 111        |
| 5.3.2.1     | <i>Análisis de fusiones del promotor del gen sat al gen reportero lacZ</i> .....   | 112        |
| 5.3.2.2     | <i>Análisis de fusiones del promotor del gen sat al gen reportero gfp</i> .....  | 118        |
| 5.2.2.2.1   | <i>Análisis in vitro</i> .....   | 118        |
| 5.2.2.2.2   | <i>Análisis in vivo</i> .....  | 121        |
| 5.3.3       | OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES Y MUTANTES PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE Sat.....  | 125        |
| 5.3.3.1     | <i>Clonación del gen sat en el vector pBR322</i> .....   | 125        |
| 5.3.3.2     | <i>Mutagénesis dirigida de la serina catalítica de Sat...</i>  | 126        |
| 5.3.3.3     | <i>Construcción de un mutante EcN knockout del gen sat</i> .....   | 127        |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 5.3.4  | ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD PROTEASA DE Sat DE LA CEPA EcN.....  | 127 |
| 5.3.5  | EFFECTO DE LA SERIN PROTEASA Sat SOBRE LA PERMEABILIDAD PARACELULAR DE MONOCAPAS DE EPITELIO INTESTINAL EN CULTIVO.....      | 130 |
| 5.3.6  | ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE Sat EN LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i> EN LA CEPA EcN.....                                     | 136 |
|        | 5.3.6.1 <i>Formación de biofilms en superficies abióticas.....</i>   | 136 |
|        | 5.3.6.2 <i>Formación de biofilms sobre superficies bióticas.....</i>   | 137 |
| 5.3.7  | ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE Sat EN MONOCAPAS DE CÉLULAS Caco-2.....  | 138 |
| 5.3.8  | ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE Sat EN LA COLONIZACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.....  | 140 |
|        | 5.3.8.1 <i>Obtención de mutantes espontáneos resistentes a estreptomycin derivados de la cepa EcN.....</i>                   | 141 |
|        | 5.3.8.2 <i>Estudios de colonización en ratones CD-1.....</i>   | 142 |
| 5.3.9  | ENSAYOS DE COMPETICIÓN ENTRE CEPAS BACTERIANAS.....  | 146 |
| 5.3.10 | APORTACIONES DE ESTE TRABAJO EN LA INTERACCION DEL PROBIÓTICO EcN CON EL HUESPED A NIVEL INTESTINAL.....                     | 148 |
|        | 5.3.10.1 <i>Las OMVs de probióticos como vehículos de liberación de moléculas efectoras en la hemostasis intestinal.....</i> | 148 |
|        | 5.3.10.2 <i>La proteína Sat no debe ser considerada un factor de virulencia en la cepa EcN.....</i>                          | 149 |
| 6.     | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | 155 |
| 7.     | <b>REFERENCIAS.....</b>  | 159 |
| 8.     | <b>ANEXOS.....</b>   | 175 |
|        | 8.1. OLIGONUCLEÓTIDOS.....   | 175 |
|        | 8.2. PROTEOMA de EcN EN MEDIO DMEM.....  | 177 |
| 9.     | <b>PUBLICACIONES.....</b>  | 185 |



# 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 TRACTO GASTROINTESTINAL Y MICROBIOTA.

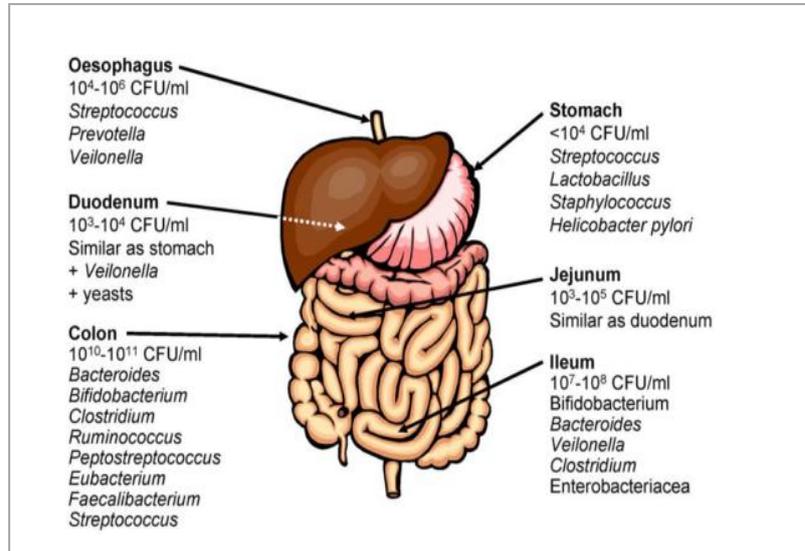
El tracto gastrointestinal, con una superficie de 200 m<sup>2</sup>, es uno de los sistemas más expuestos a elementos exógenos derivados de la alimentación y a los microorganismos ingeridos por vía oral. Los microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal constituyen la denominada microbiota. Se trata de una comunidad de microorganismos vivos, reunidos en un nicho ecológico determinado que establecen una relación de simbiosis con su hospedador, siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Hooper and Macpherson, 2010; Guarner, 2011). Por ello, el tracto gastrointestinal requiere un sistema de defensa complejo que le permita mantener separados los elementos en tránsito de los del propio tejido epitelial, regular la absorción de nutrientes, la interacción entre la flora bacteriana residente y el sistema inmune, e inhibir la penetración de agentes infecciosos al interior de los tejidos (Scaldaferri et al., 2013).

La composición general de la microbiota que alberga el tubo digestivo está compuesta principalmente de bacterias, pero también podemos encontrar hongos, virus, levaduras y protozoos. Esta población la podemos dividir en: a) microorganismos nativos o indígenas, los cuales después de la colonización permanecen en el tracto gastrointestinal y b) microorganismos en tránsito, que permanecen temporalmente en la luz intestinal o en las mucosas desapareciendo con el tiempo. La presencia de ácidos biliares y secreciones pancreáticas destruye la mayor parte de los organismos ingeridos. Estos factores junto con la actividad motora propulsiva dificultan la colonización en las porciones más altas del tracto gastrointestinal, como el estómago y el intestino delgado. Sin embargo, en las partes más distales del intestino, a nivel de yeyuno y colon, el contenido intestinal puede llegar a contener hasta 10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> bacterias/ml, incluso se habla de 10<sup>14</sup> bacterias/ml, lo que correspondería a 1.5 kg del peso total de un individuo. El alto número de bacterias en este tramo del intestino se debe al tránsito lento (2-4 días) lo que permite la división y proliferación bacteriana y la fermentación de los sustratos derivados de la dieta. La mayoría de los microorganismos que podemos encontrar a este nivel son anaerobios facultativos gram-negativos y algunos anaerobios obligados. (Guarner, 2011). La distribución del número y tipo de microorganismos en el tracto gastrointestinal se presenta en la Figura 1.1.

Antes del nacimiento el tracto gastrointestinal de un individuo es estéril, existiendo diferentes fases en su colonización. La fase 1 o colonización inicial ocurre durante el parto. Al atravesar el canal del útero el niño ingiere un bolo de microorganismos por vía oral provenientes de bacterias de origen vaginal y del colon de la madre. La fase 2

de colonización ocurre por el traspaso de microorganismos derivados de la lactancia materna y la fase 3 se inicia con el destete e incorporación de microorganismos presentes en los alimentos. Así, un niño presenta una flora total y madura hacia los 18 meses de edad, con una compleja comunidad bacteriana constituida por unas 500 a 1000 especies diferentes. Según estudios que involucraron la microbiota de varios sujetos, esta amplia diversidad de especies podría llegar hasta las 35000 especies diferentes si se tiene en cuenta la totalidad de la población humana, (Sekirov et al., 2010).

El número de bacterias intestinales excede en 10 veces el número de células eucariotas totales del cuerpo humano (Weng and Walker, 2013), llegando sólo el colon a albergar un 70% de las especies totales de bacterias presentes en un individuo. Es importante destacar que niños nacidos por cesárea no logran alcanzar una adecuada colonización en fase 1. Esta limitada colonización comporta problemas con implicaciones clínicas como una inadecuada protección en la competencia contra bacterias entéricas, menores efectos metabólicos y disminución de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Sherman et al., 2009). Por todo ello, se puede afirmar que la microbiota intestinal es un órgano que ayuda en las funciones de nutrición y defensa del tubo digestivo. El equilibrio entre intestino y microbiota mantiene la homeostasis del individuo dentro de su entorno (O'Hara and Shanahan, 2006).



**Figura 1.1. Distribución de bacterias en el traco gastrointestinal.** Localización anatómica y recuentos bacterianos en el tracto gastrointestinal, expresadas en unidades formadores de colonias (UFC)/ml. Imagen extraída de Tiihonen et al. (2010).

### 1.1.1 SISTEMAS DE BARRERA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Con el fin de mantener la integridad de la barrera, el hospedador produce una gruesa capa de mucus que recubre las células epiteliales del estómago, intestino, y colon, y es

responsable de la lubricación y protección de las mucosas del tracto intestinal. A continuación trataremos en detalle la función, estructura y composición de los componentes barrera del tracto gastrointestinal que son: capa de mucus, células epiteliales y el sistema inmunitario.

#### **1.1.1.1 Capa de Mucus.**

Esta superficie se encuentra continuamente expuesta a la presencia de microorganismos. La estructura de esta capa está regulada a través de la función de barrera del huésped y por adaptaciones específicas de los microorganismos. Los microorganismos comensales, en condiciones normales no causan enfermedades. Sin embargo, si la superficie de la mucosa está dañada éstos pueden actuar como patógenos oportunistas (McGuckin et al., 2011).

En el intestino, las células *globet cells* son las encargadas de sintetizar mucina que formará en conjunto la capa de mucus. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular con un número de repeticiones en tándem de aminoácidos ricos en prolina, serina y treonina. Estos dos últimos aminoácidos son centros de glicosilaciones (sitios O-glicosídicos) por unión de azúcares del tipo N-acetilgalactosamina. Existen cinco tipos de mucinas oligoméricas que son secretadas: MUC2, MUC5AC, MUC5BC, MUC6 y MUC19. Estas formas de mucinas son capaces de producir geles, en cambio la mucina secretada no oligomérica MUC7 no es capaz de formar esta estructura. Además de las mucinas secretadas existen varios tipos de mucinas asociadas a membranas celulares como MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20. La síntesis de mucinas no es exclusiva del tracto gastrointestinal, hallándose en múltiples tejidos y órganos (Tabla 1.1). Los diferentes tipos de mucina son sintetizados en diferentes órganos y regiones del tracto gastrointestinal (Kim, 2012).

Se han analizado las proteínas asociadas al mucus presente en distintas fracciones comprendidas entre el estómago y el colon distal de ratones. Así, muestras obtenidas de mucus de un grupo de ratones fueron sometidas a espectrometría de masas. Se identificaron unas 1300 proteínas, sin encontrar diferencias entre sexos, pero sí según la parte del tracto gastrointestinal analizado. Se encontró similitud entre las proteínas presentes en el duodeno y el estómago, probablemente como resultado de un transporte distal a través del tracto intestinal. El estudio mostró que el *core* del proteoma intestinal es relativamente estable. El 80% de las proteínas identificadas son comunes a todos los miembros (Rodríguez-Piñeiro et al., 2013).

Según datos de cuantificación de la expresión de *RNAm* de MUC5AC en el tracto gastrinal, esta mucina sólo se expresa en el epitelio del estómago y su presencia a lo largo del intestino y colon sería consecuencia del reflejo de propulsión. Por otra parte, MUC2 es la mucina predominante en el resto del intestino y colon, y ambas mucinas

demuestran ser relativamente resistentes a enzimas digestivas (Rodríguez-Piñeiro et al., 2013).

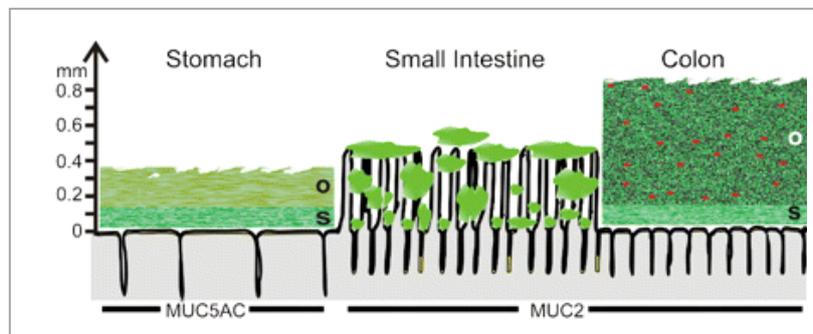
**Tabla 1.1. Distribución de mucinas en el organismo.** Texto modificado de Linden et al. (2008).

| Mucinas Secretadas formadoras de gel    |  |
|---|--|
| MUC2                                    | Intestino delgado, tracto respiratorio, ojos, epitelio del oído medio  |
| MUC5AC                                  | Tracto respiratorio, estómago, cérvix, ojos, epitelio del oído medio   |
| MUC5B                                   | Tracto respiratorio, glándulas salivales, cérvix, vesícula biliar, fluido seminal, epitelio del oído medio   |
| MUC6                                    | Estómago, duodeno, vesícula biliar, páncreas, fluido seminal, cérvix, epitelio del oído medio  |
| MUC19                                   | Glándula sublingual, glándula submaxilar, tracto respiratorio, ojos, epitelio del oído medio.  |
| Mucinas Secretadas no formadoras de gel |  |
| MUC7                                    | Glándulas salivales, tracto respiratorio, epitelio del oído medio  |
| Mucinas en superficie de células        |  |
| MUC1                                    | Estómago, pecho, vesícula biliar, cérvix, páncreas, tracto respiratorio, duodeno, colon, riñón, ojos, células B, células T, células dendríticas, epitelio del oído medio                             |
| MUC3A/B                                 | Intestino delgado, colon, vesícula biliar, duodeno, epitelio del oído medio  |
| MUC4                                    | Tracto respiratorio, colon, estómago, cérvix, ojos, epitelio del oído medio  |
| MUC12                                   | Colon, intestino delgado, estómago, páncreas, pulmón, riñón, próstata, útero   |
| MUC13                                   | Colon, intestino delgado, tráquea, riñón, apéndice, estómago, epitelio del oído medio  |
| MUC15                                   | Bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, colon, leucocitos de sangre periférica, médula ósea, nódulos linfáticos, amígdalas, pecho, hígado fetal, pulmón, epitelio del oído medio |
| MUC16                                   | Mesotelio peritoneal, tracto reproductivo, tracto respiratorio, ojos, epitelio del oído medio  |
| MUC17                                   | Intestino delgado, colon, duodeno, estómago, epitelio del oído medio   |
| MUC20                                   | Riñón, placenta, colon, pulmón, próstata, hígado, epitelio del oído medio  |

En el intestino delgado y colon existe un predominio de MUC2. Estudios recientes demuestran que el complejo MUC2 O-glucano se encuentra altamente conservado entre individuos, lo que tal vez sugiera un rol en la selección de la microbiota comensal proporcionando sitios de unión a determinados microorganismos (Juge, 2012).

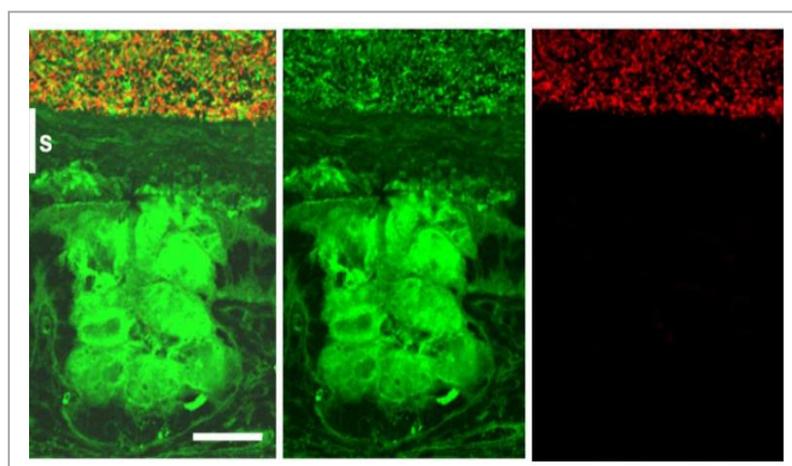
El proceso de ensamble de la capa de mucus comienza una vez que la mucina es secretada por las *globet cells*, es hidratada y expandida formando una estructura visco-elástica organizada, con un gradiente de espesor que va desde 700  $\mu\text{m}$  en el estómago a 150-300  $\mu\text{m}$  en el intestino, siendo más ancho hacia el final del colon. Esta capa mucosa se puede dividir en dos secciones: una *capa interna* de mucus estratificado que se encuentra fuertemente adherido a las células epiteliales con un espesor de 50  $\mu\text{m}$  en ratones y 100  $\mu\text{m}$  en ratas. Esta capa interna, altamente

condensada, da paso a la capa externa. En humanos se cree que este espesor sería mayor pero aún no se ha determinado con exactitud debido a lo extenso del tejido humano (Johansson et al., 2011). La segunda *capa externa* presenta una estructura más laxa o relajada, producto de la actividad proteolítica del huésped y de la degradación por parte de la microbiota comensal. Las bacterias adheridas a esta capa generan glicosidasas que degradan enlaces para la obtención de azúcares. Algunos patógenos han desarrollado estrategias virulentas para degradar el mucus; por ejemplo *Helicobacter pylori* reduce las uniones de puentes disulfuro a través de sulfatasas. *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, y *Entamoeba histolytica* también son capaces de producir proteasas para penetrar a estratos más profundos y acceder hacia el interior de los tejidos (Scaldaferri et al., 2013; Ohland and Macnaughton, 2010). La Figura 1.2 presenta la variación en cuanto a composición y estructura de la capa de mucus en diferentes zonas del tracto gastrointestinal.



**Figura 1.2. Espesor y composición de la capa de mucus.** Representación de la composición de la capa de mucus a través del tracto gastrointestinal. Imagen extraída de Johansson et al. (2011).

Mediante anticuerpos anti-mucina y técnicas de tinción del RNA ribosomal bacteriano 16S (rRNA FISH) se ha podido visualizar claramente la composición de la capa de mucus. A modo ilustrativo se presenta la Figura 1.3.



**Figura 1.3. Organización de la capa de mucus:** Inmunotinción de colon de ratón. El anticuerpo anti-MUC marca en verde la presencia de mucina en las *globet cells* y sobre ellas la estructuración de mucina en capa interna y capa externa. La presencia de bacterias contrastadas en color rojo con DAPI, se puede observar sobre la capa externa. Imagen extraída de Johansson et al. (2008).

### 1.1.1.2. Células epiteliales.

La estructura del epitelio intestinal lo constituye una monocapa de células, entre las que podemos encontrar 5 tipos de células diferentes: células endocrinas secretoras de hormonas, células M, *globet cells*, *Paneth cells* y enterocitos, siendo los enterocitos los más abundantes. Estas células permanecen en constante recambio entre 4-7 días, con tal de mantener la integridad y la funcionalidad de las criptas de las vellosidades, cuya función principal es inhibir la translocación del contenido luminal al interior de los tejidos (Jeon et al., 2013).

Las células del epitelio desarrollan diversas funciones que incluyen: secreción de mucus (*globet cells*), síntesis de péptidos con acción antibacteriana (*Paneth cells*), captación de antígenos del lumen (*células M*), regulación del recambio celular, mantenimiento de las uniones intercelulares y regulación del paso de sustancias a través de la vía paracelular y transcitosis (enterocitos). En la superficie de las células epiteliales podemos encontrar numerosos receptores de reconocimiento denominados “*Toll-like receptors*” (TLRs), incluyendo TLR5, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, así como receptores intracelulares como NOD2, que son capaces de estimular inflamación por producción de factores quimiotácticos de las células linfoides y mieloides presentes en la lámina propia (McDermott and Huffnagle, 2014). Los TLRs son proteínas transmembrana que unen ligandos específicos y promueven la señal a través de proteínas adaptadoras (MyD88, MAL/TIRAP, TRIF/TICAM-1 y TRAM/TIRP/TICAM-2) y vías de señalización que implican al factor nuclear NF $\kappa$ B, protein quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y factor regulador del interferón. Estas vías inducirán la expresión de genes inflamatorios, citoquinas, proteínas inmuno-reguladoras, moléculas de adhesión, proteínas asociadas a estrés, y otros mediadores celulares como células T, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK) que en conjunto conducirán a la eliminación de patógenos (Sanz and De Palma, 2009).

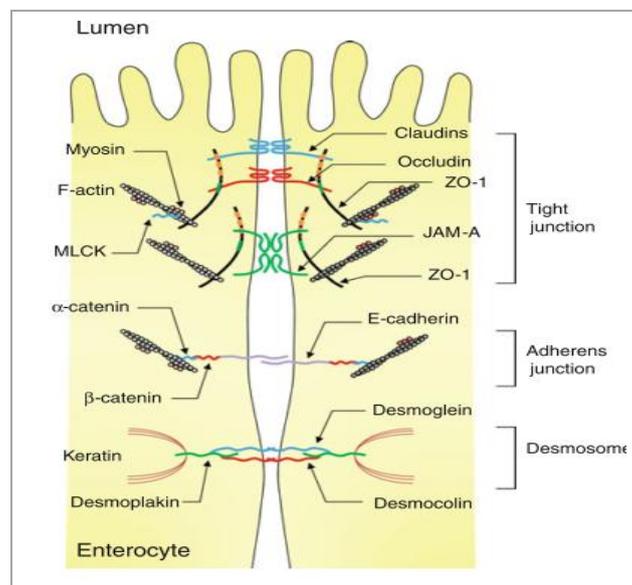
La integridad del tejido epitelial depende de varios tipos de uniones intercelulares que regulan la permeabilidad de iones y moléculas desde el compartimento externo al compartimento interno (vía paracelular). Estas uniones son variadas y clasificadas como: *tight junctions* o uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Estas uniones forman dos barreras diferentes, una entre la zona apical y la zona basolateral de las membranas celulares y la segunda entre la zona apical y el compartimento basal. Las uniones adherentes y desmosomas forman sitios de unión y permiten la comunicación entre células adyacentes pero no determinan permeabilidad paracelular (Suzuki, 2013).

Estructuralmente las *tight junctions* están constituidas por 4 proteínas transmembrana: ocludinas, claudinas, tricelulina y moléculas de unión adhesiva o

*junctional adhesion molecules* (JAM). Las tres primeras proteínas atraviesan la membrana cuatro veces formando dos *loops* extracelulares implicados en la interacción homofílica y heterofílica con proteínas de las células adyacentes (en el caso de tricelulina el contacto será entre 3 células adyacentes). Los 3 dominios intracelulares de estas proteínas interactúan a nivel de su extremo carboxiterminal con proteínas de la *zonula occludens* (ZO), formada por las proteínas citosólicas ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que actúan como acopladores a proteínas del citoesqueleto (Figura 1.4). En el dominio carboxiterminal se encuentran además sitios de fosforilación relacionados con varias protein quinasas como PKC, caseína quinasa y quinasa dependiente de AMPc (PKA). Las fosforilaciones son claves para mantener regulado el paso de moléculas a través de la vía paracelular.

Por último, las proteínas JAM provienen de la superfamilia de inmunoglobulinas y están caracterizadas por dos dominios, uno transmembrana y otro C-terminal. Estas proteínas establecen interacciones homofílicas, en las que un dominio extracelular interactúa con otras proteínas de adhesión celular del mismo tipo en células adyacentes, contribuyendo a la formación de *tight junctions* (Assimakopoulos et al., 2011).

La Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER) representa la suma de las resistencias ejercidas tanto a nivel paracelular como a nivel transcelular. Estas resistencias pueden ser determinadas por el potencial de membrana celular a través de un voltímetro y por determinación de flujos a través de las membranas celulares.



**Figura 1.4. Uniones intercelulares en células epiteliales.** Estructura de uniones intercelulares en tejido epitelial, y asociación con proteínas citoplasmáticas. Imagen extraída de Suzuki (2013).

### **1.1.1.3. Sistema inmunitario.**

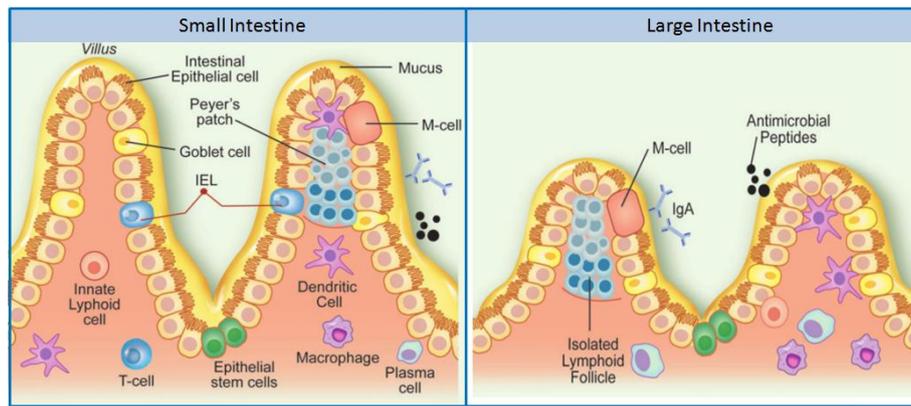
El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa del sistema inmune, y su función principal es distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inoos procedentes de los alimentos y de bacterias comensales. El epitelio intestinal es una barrera selectiva que separa el contenido luminal de los tejidos del huésped. Diversos mecanismos como producción de enzimas digestivas, sales biliares, el propio epitelio intestinal y la microbiota comensal son las encargadas de mantener una barrera funcional e impedir el paso de patógenos.

Las células epiteliales, son las encargadas de iniciar la estimulación de células especializadas del sistema inmune presentes en la lámina propia o GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) (Sanz and De Palma, 2009). Esto lleva a la expresión o co-estimulación de moléculas y componentes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y a la producción de mediadores inflamatorios en respuesta a estímulos (TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, etc).

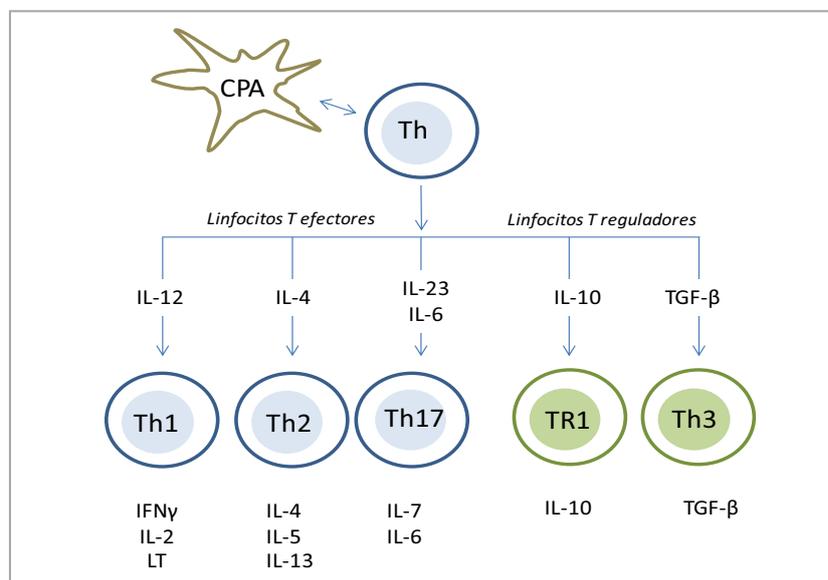
GALT se divide en dos compartimientos: A) GALT organizado que será inductor de la respuesta inmune intestinal, constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados a placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos y B) GALT difuso o efector, integrado por poblaciones de linfocitos dispersos en el entramado epitelial o en la lámina propia intestinal (Ramiro-Puig et al., 2008).

Las placas de Peyer están conformadas por agregados linfoides y están separadas del lumen por una monocapa formada por los diferentes tipos de células epiteliales. Bajo esta capa epitelial podemos encontrar también células dendríticas y macrófagos. En las zonas interfoliculares encontramos linfocitos T, principalmente del tipo colaboradores o *helper* (Th). Inmersos en las placas de Peyer encontramos linfocitos B de memoria, precursores de células plasmáticas productoras de IgA. La distribución de GALT es diferente según el tejido. Las células T y las placas de Peyer predominan en el intestino delgado, mientras que las células B son predominantes en el intestino grueso (Ver figura 1.5).(Sanz and De Palma, 2009; (McDermott and Huffnagle, 2014).

Los antígenos lumbales pueden ser captados por las células M, que inician un proceso de transcitosis (endocitosis o fagocitosis) y los transportan hacia células presentadoras de antígenos (CPA). Estas células procesarán los antígenos y los expresarán en la membrana plasmática asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para ser reconocidos por receptores de células T (TCR). Una vez activados los linfocitos Th vírgenes, se diferenciarán en dos subpoblaciones según el estímulo recibido: linfocitos T efectoras, en concreto linfocitos T *helper* 1, 2 y 17 (LTh1, LTh2, LTh17) y linfocitos T reguladores (TR1 y Th3) (Figura 1.6).



**Figura 1.5. Composición celular del sistema inmune y epitelio Intestinal.** A) Estructura del intestino delgado con predominio de células T y placas de Peyer. B) Estructura del intestino grueso con predominio de células B, productoras de IgA. Imagen extraída de (McDermott and Huffnagle, 2014)).



**Figura 1.6. Diferenciación celular de linfocitos T.** Diferenciación según estímulo de antígeno presentado por las células presentadoras de antígeno y citoquinas expresadas por cada línea. Imagen extraída de Ramiro-Puig et al. (2008).

Los linfocitos Th1 tienen por función la defensa mediada por fagocitosis contra microorganismos intracelulares (virus, bacterias y algunos protozoos). Los linfocitos Th2 actúan como mediadores de reacciones alérgicas y en la defensa frente a infecciones producidas por helmintos y artrópodos. Cada subpoblación linfocitaria se amplifica a sí misma y además ejerce un papel regulador sobre la otra. La función de Th17 parece estar implicada en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas no cubiertas totalmente por la respuesta Th1 y Th2. En cuanto a los linfocitos T reguladores, TR1 y Th3, estos son importantes por regular la respuesta inmunitaria durante procesos inflamatorios e infecciosos. Además contribuyen en el desarrollo de tolerancia oral frente a antígenos inocuos procedentes de la dieta y de la microbiota.

Ciertas citoquinas como IL-4, IL-5 y TGF- $\beta$  inducen además la síntesis de IgA en linfocitos B presentes en los folículos de las placas de Peyer (Ramiro-Puig et al., 2008).

### **1.1.2 FUNCIONES DE LA MICROBIOTA.**

El uso de animales nacidos y criados en condiciones de esterilidad (*germ-free*) ha permitido establecer la importancia de la microbiota intestinal y los efectos de la colonización controlada tanto a nivel fisiológico como patológico. Las funciones específicas de la microbiota intestinal se clasifican como: metabólicas, tróficas y de protección.

#### **1.1.2.1 Función Metabólica.**

La incorporación de gran cantidad de genes provenientes de las bacterias provee al huésped de varias enzimas y vías bioquímicas que ayudan a los procesos de fermentación y degradación de residuos no digeribles incorporados a través de la dieta. Esta actividad proporciona energía metabólica a través de la generación de ácidos grasos de cadena corta, fermentación de polisacáridos vegetales de estructura compleja (fibra) y degradación del mucus endógeno. Estas dos últimas constituyen la mayor fuente de energía en el colon. La degradación de otros compuestos no digeribles como celulosa, hemicelulosa, pectinas, así como el metabolismo anaeróbico de proteínas y péptidos como la elastina y el colágeno contribuyen también a la producción de energía. Toda esta compleja actividad metabólica permitirá nutrir tanto al huésped como a las bacterias, contribuyendo en estas últimas su propio proceso de colonización.

Otra función metabólica importante de los microorganismos es la síntesis de vitaminas (vitamina K, biotina y folatos) y la absorción de iones como calcio, magnesio y hierro que cumplen una posterior función fisiológica en el huésped (O'Hara and Shanahan, 2006; Guarner and Malagelada, 2003).

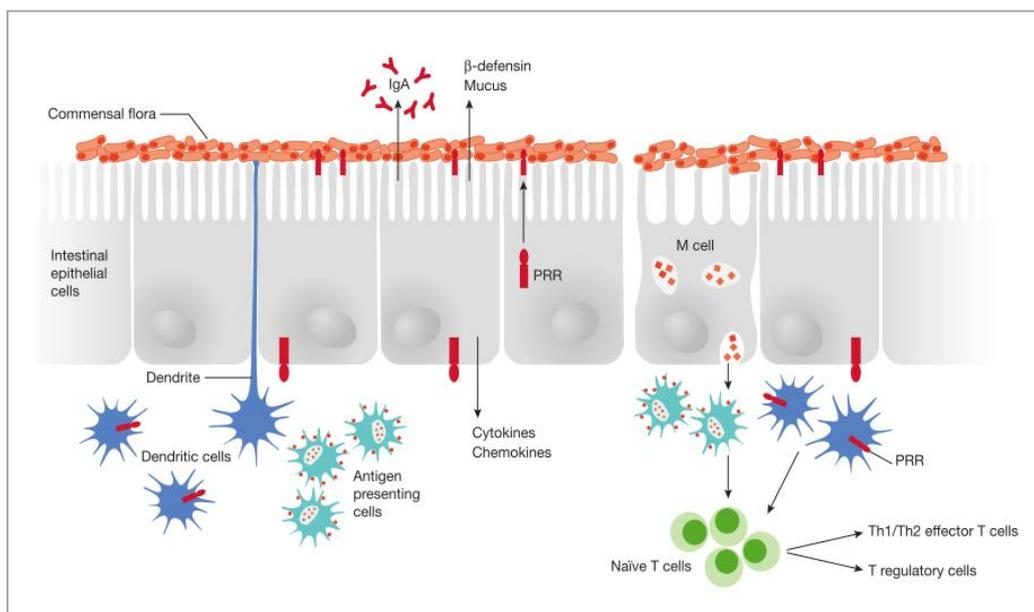
#### **1.1.2.2 Función Trófica.**

La función trófica se abordará a dos niveles, uno a nivel de diferenciación y proliferación del tejido epitelial y otro sobre el sistema inmune.

A nivel de la diferenciación y la proliferación del tejido epitelial, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta por parte de la microbiota cumple una importante función trófica al estar implicados en la producción de células de la cripta en el epitelio intestinal. Estudios realizados en ratas libre de gérmenes así lo indican. Estas ratas producen un bajo número de células epiteliales, sugiriendo que la síntesis bacteriana de ácidos grasos ayuda a la proliferación del tejido. Por otra parte compuestos producidos por el metabolismo bacteriano, como el butirato, promueven la reversión

de células neoplásicas a fenotipos no neoplásicos ya que inhibe la proliferación celular y estimula la diferenciación de células neoplásicas *in vitro*. El rol de los ácidos grasos de cadena corta es proteger a los tejidos en estados patológicos como la colitis ulcerosa crónica, o la carcinogénesis entre otras (Guarner and Malagelada, 2003).

En la función trófica sobre el sistema inmune, la microbiota es esencial para el desarrollo del sistema inmune. La correcta interpretación por parte del huésped para distinguir entre organismos comensales y patógenos llevará a la activación de una respuesta inmune para controlar la invasión o mantener un estado de inmunotolerancia frente a bacterias comensales. Como ya se ha comentado, el epitelio posee una primera línea celular de acción mediada por los enterocitos que a través de TLR a nivel extracelular y de proteínas NOD a nivel intracelular, activarán factores de transcripción (*NF-kappaB* y otros). Estos factores estimularán la secreción de citoquinas y quimioquinas que actuarán como sensores generando la respuesta innata y adaptativa. En segundo lugar las células M son las encargadas de transportar los microorganismos o estructuras antigénicas desde la luz intestinal hasta el tejido linfoide subyacente que contiene las células presentadoras de antígeno. Estas células presentan los antígenos a los linfocitos T dando lugar a la estimulación de linfocitos T *helper* encargados de secretar citoquinas inflamatorias reguladoras (IL-10, TGF-beta) que mantendrán un estado de inmunotolerancia frente a las bacterias reconocidas como no patógenas (Figura 1.7). La tercera línea de defensa son las células dendríticas, estas pueden atravesar entre los enterocitos e ingerir las bacterias comensales y transportarlas hasta los linfonodos mesentéricos donde se estimula una respuesta inmune local (O'Hara and Shanahan, 2006; Guarner, 2011).



**Figura 1.7. Detección de antígenos bacterianos por componentes celulares.** Inmuno-detección de bacterias en la superficie del epitelio intestinal y activación de células efectoras que actúan controlando la colonización. Imagen extraída de O'Hara and Shanahan (2006).

### **1.1.2.3 Función Protectora.**

La microbiota comensal ejerce una línea de resistencia frente a la colonización por bacterias exógenas proporcionando una alta prevención ante la colonización por parte de estos agentes foráneos. Las bacterias de la microbiota al permanecer establecidas a lo largo del epitelio actúan frente a bacterias oportunistas compitiendo por la disponibilidad de nutrientes.

Otra función de la microbiota es estimular en el epitelio intestinal la síntesis y liberación de proteínas antibacterianas. Estas proteínas pertenecen a diversas familias, entre las que se incluyen defensinas, catelicidinas y lectinas tipo C. Muchas de estas proteínas provocan la muerte bacteriana a través de un ataque enzimático que causa daños en su membrana externa. Otra proteína, la lipocalina 1, compete por la captación de hierro. La expresión de estas proteínas está regulada por diferentes señales bacterianas a través de los TLR, aunque algunas se expresan constitutivamente. Estas proteínas secretadas por el epitelio son retenidas en la capa de mucus limitando el acceso de los microorganismos hacia el epitelio.

Otra proteína con función protectora que limita el acceso de las bacterias al epitelio es la inmunoglobulina secretora IgA. Las células dendríticas son capaces de reconocer las bacterias en la superficie e inducir la diferenciación de células B en *plasma cells IgA*, las cuales secretan dímeros de IgA que atraviesan la lámina propia y finalmente recubren a los microorganismos (Hooper and Macpherson, 2010).

En condiciones normales, la estimulación del sistema inmune por parte de la microbiota comensal mantiene un bajo grado de inflamación fisiológica. La homeostasis de la mucosa intestinal requiere un continuo balance entre componentes pro y antiinflamatorios. En los últimos años se ha estudiado la correlación entre disbiosis (desbalance en la composición de la microbiota) y enfermedades intestinales como el síndrome de colon irritable y enfermedades inflamatorias intestinales (colitis y enfermedad de Crohn), así como con enfermedades extra-intestinales como son obesidad, alergias o enfermedades autoinmunes (Scaldaferri et al., 2013).

### **1.1.3 COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA HUMANA.**

Hasta hace poco el conocimiento sobre la diversidad bacteriana en el intestino era sesgada debido al desconocimiento de los requerimientos nutricionales de estas bacterias y a la incapacidad de cultivarlas por métodos tradicionales. La aplicación de nuevas técnicas de biología molecular y secuenciación de DNA han permitido identificar los componentes de la microbiota. Hay estudios en los que se amplifican y secuencian regiones variables, localizadas entre secuencias altamente conservadas en el RNA ribosomal 16S, lo que ha llevado a la identificación de dominios, phyla y

especies bacterianas. Más recientemente la aplicación de técnicas de secuenciación masiva ha permitido obtener la secuencia de la totalidad de genes bacterianos presentes en muestras intestinales. Cerca de dos millones de alineamientos están disponibles en la base de datos <http://rdp.cme.msu.edu/>. El análisis de estos datos ha desarrollado el concepto de “metagenómica” que es el estudio del material genético aislado de diferentes muestras, y constituye el colectivo genético de bacterias simbióticas de un huésped. A parte de la clasificación taxonómica es posible definir propiedades funcionales, metabólicas y relación con enfermedades. Dos grandes proyectos, uno el *MetaHIT* financiado por la Unión Europea <http://www.metahit.eu/> y el otro el *Human Microbiome Project* subvencionado por el *National Institute of Health* de los Estados Unidos. <http://hmpdacc.org/> trabajan actualmente en descifrar esta información (Robles Alonso and Guarner, 2013a).

Estos estudios han evidenciado que existen 55 phyla correspondientes a bacterias, pero en muestras fecales sólo se encuentran presentes entre 7-9 phyla. Más del 90% de las bacterias pertenecen a Bacteroidetes y Firmicutes. Otros phyla en abundancia son Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia. Cada individuo presenta un perfil bacteriano único. La edad y factores externos como la dieta, ingesta de fármacos, viajes, estrato social, hábitos, estrés y ubicación geográfica introducen variables en la composición bacteriana a lo largo del tiempo. Sin embargo la comparación de genes asociados a funciones biológicas es bastante estable entre individuos sanos. Entre estos genes se encuentran aquellos relacionados con las principales rutas metabólicas (metabolismo de hidratos de carbono); expresión génica (DNA polimerasas) y otros relacionados con su supervivencia en el tracto gastrointestinal como los genes de proteínas relacionadas con procesos de adhesión o aprovechamiento de azúcares (Robles-Alonso and Guarner, 2013a).

Estudios recientes basados en la composición de la microbiota humana de diferentes poblaciones europea, americana y japonesa han permitido agrupar a los individuos en grupos denominados enterotipos en función del tipo de bacterias que predominan (Enterotipo-1 *Bacteroides*, Enterotipo-2 *Provetella* y Enterotipo-3 *Ruminococcus*). Tal clasificación es independiente del género, edad, masa corporal y nacionalidad. El enterotipo parece estar asociado al uso de diferentes rutas para generar energía desde sustratos fermentables disponibles en el colon; así *Bacteroides* utiliza carbohidratos, *Provetella* mucinas y *Ruminococcus* mucinas y azúcares (Arumugam et al., 2011). Por otra parte otros investigadores apoyan la teoría que sí podrían estar asociados a la dieta ya que hay estudios que asocian al enterotipo-1 a dietas ricas en proteínas y grasas y al enterotipo-2 al consumo de carbohidratos (Wu et al., 2012).

Las nuevas tecnologías del tipo “ómicas” metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica que analizan RNA, proteínas y metabolitos respectivamente nos permiten estudiar claramente el concepto de “perfil metabólico global” (Robles Alonso

and Guarner, 2013b). El microbioma humano es altamente dinámico y tal plasticidad abre nuevas estrategias de aplicaciones terapéuticas dirigidas a modular la composición de la microbiota asociada a determinadas patologías. Una de las aproximaciones terapéuticas basada en la intervención sobre la composición de la microbiota es la administración de probióticos.

#### 1.1.4 PROBIÓTICOS.

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando se administran en concentraciones adecuadas confieren un beneficio a la salud del consumidor (FAO WHO, 2001). La sociedad española de probióticos y prebióticos (SEPyP) reconoce a los prebióticos como aquellos compuestos no digeribles, presentes en la dieta, que estimulan el crecimiento o la actividad de los microorganismos autóctonos, resultando en un beneficio para la salud. Los productos simbióticos son aquellos constituidos por una mezcla de uno o más organismos probióticos con uno o varios compuestos prebióticos. Los productos simbióticos fueron diseñados para mejorar la supervivencia de los microorganismos probióticos administrados y mejorar la colonización en el intestino (Ohland and Macnaughton, 2010). La función de los probióticos es modular la composición de la microbiota intestinal, y los efectos están mediados por múltiples mecanismos que incluyen citoprotección, proliferación celular, resistencia a la apoptosis, síntesis de proteínas y expresión de genes (Rao and Samak, 2013).

El primer modo de acción de los probióticos es por el efecto “barrera”, previniendo o limitando la colonización por parte de agentes patógenos. Esta acción la realizan a través de secreción de bacteriocinas y biosurfactantes con acción antibacteriana, o generando ácidos grasos de cadena corta que disminuyen el pH, inhibiendo el crecimiento de microorganismos que no toleran ciertos grados de acidez. Un segundo modo de acción es sobre la mucosa, estimulando vías que incrementen la producción de mucus o síntesis de defensinas. Además, ciertas especies de probióticos son capaces de interactuar a nivel de las *tight junctions* aumentando la función de barrera y disminuyendo la permeabilidad. El tercer mecanismo está relacionado con la modulación de la respuesta inmune y la capacidad de estimular ciertas citoquinas (Butel, 2014).

Entre las patologías asociadas al uso de probióticos podemos encontrar el tratamiento y prevención de diarreas causadas por rotavirus, aparición de *Clostridium difficile* tras el uso de antibióticos, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de colon irritable, alergias, infección por *Helicobacter pylori*, obesidad, diabetes tipo 2, ciertos tipos de cánceres generados en el tracto gastrointestinal, infecciones respiratorias del tracto superior (Suzuki, 2013), estimulación de la maduración del sistema inmune en neonatos (Butel, 2014) y patologías hepáticas (Sharma et al., 2013).

Entre los microorganismos probióticos se encuentran principalmente bacterias gram-positivas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y algunas especies de *Enterococcus* y levaduras como *Saccharomyces boulardii* (Didari et al., 2014). En cuanto a las bacterias gram-negativas la única cepa utilizada por sus características probióticas es *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), objeto de estudio en este trabajo.

#### **1.1.4.1 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN).**

*Escherichia coli* Nissle 1917 (O6:K5H1) fue descrita por el doctor Alfred Nissle, de ahí su nombre. Esta bacteria fue aislada de las heces de un soldado en la primera guerra mundial que sobrevivió a un brote de diarreas causado por *Shigella*. El probiótico es comercializado con el nombre de Mutaflor y es utilizado desde aproximadamente el año 1920 para tratar varias disfunciones y enfermedades del tracto intestinal. Este probiótico es efectivo en la remisión de la colitis ulcerosa, constipación y diarrea en niños (Hancock, et al., 2010a; Rund et al., 2013).

Estudios genómicos han demostrado que EcN proviene de un ancestro patógeno, la cepa de *E. coli* CFT073, y que por procesos evolutivos (inserciones o deleciones y mutaciones en el genoma) ha perdido su carácter patógeno y ha ganado genes que le confieren el carácter probiótico (Vejborg et al., 2010). El genoma de EcN contiene 166 secuencias de DNA codificante que están ausentes en la cepa CFT073 y cerca de 903 secuencias adicionales si la comparamos con la cepa de *E. coli* K-12 MG1655. Los genes específicos de EcN se encuentran localizados en 4 islas génicas y algunas agrupaciones menores (Grozdanov et al., 2004; Hancock et al., 2010b).

##### **1.1.4.1.1 Mecanismos responsables de los efectos probióticos de la cepa EcN.**

Los mecanismos que utiliza EcN para ejercer su efecto beneficioso en el hospedador es la utilización de factores *fitness*, factores de interferencia y factores moduladores.

Respecto a los factores *fitness*, estos comprenden una gran variedad de proteínas y moléculas que promueven la competitividad bacteriana y contribuyen a la colonización del intestino. Entre estos factores se encuentran varias adhesinas (FimA, F1C, curli). La adhesina tipo 1 FimA y la fimbria F1C son requeridas para la formación de *biofilms*, adherencia a células epiteliales, colonización intestinal y persistencia en el tracto intestinal. EcN además posee seis sistemas de captación de hierro diferentes que le permiten competir por la adquisición de este metal. El hierro es esencial para la viabilidad de las bacterias en un entorno limitante como es el tracto gastrointestinal. Para dicha captación de hierro las bacterias sintetizan de moléculas sideróforas como: yersiniabactina, aerobactina, salmochelina, receptores Chu, entre otros. Como factores *fitness*, posiblemente implicados en la mejora de la colonización, encontramos

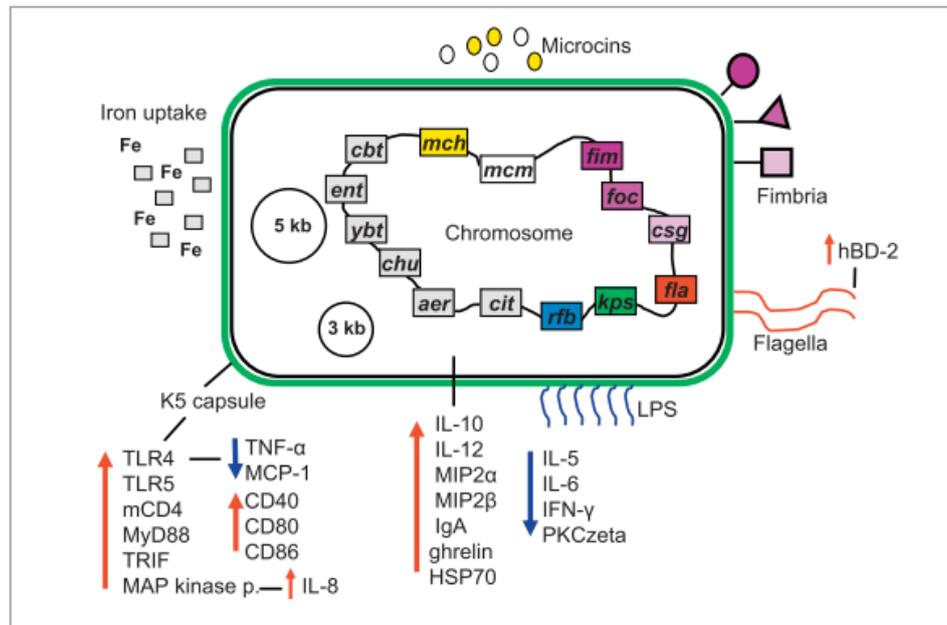
proteasas secretadas al medio, entre ellas Sat y Tsh, posiblemente relacionadas con mejorar el proceso de colonización. Algunas de estas proteasas están consideradas factores de virulencia en patógenos sin establecerse aún un papel claro en el contexto de la cepa probiótica EcN (Grozdanov et al., 2004; Vejborg et al., 2010). Otro factor *fitness* es el tipo de lipopolisacárido (LPS) de EcN, que contiene una mutación que se traduce en un codón de parada en el gen del antígeno O6, por lo que presenta cadenas más cortas lo que contribuye a sensibilizar proteínas del sistema del complemento que lo inactivan. Tal inactivación de LPS es una de las propiedades de EcN para ser administrada como una bacteria segura (Guttsches et al., 2012). Por último, el polisacárido capsular extracelular (capsula K5) está implicado en la inducción de la expresión de receptores TLR5 y de ciertas citoquinas en células del epitelio intestinal (Behnsen et al., 2013). La composición de los polisacáridos capsulares que componen K5 son capaces de inducir la expresión de mCD14, un componente del sistema inmune innato anclado a la membrana que potencia la actividad de los receptores TLR4 y TLR5 para incrementar una respuesta antiinflamatoria. Además, el aumento de adaptadores moleculares como MyD88 y TRIF en células en cultivo está directamente relacionado con la dosis de K5 ensayada (Jacobi and Malferttheiner, 2011).

Respecto a los factores de interferencia cabe decir que EcN invierte gran cantidad de energía para mantener sus mecanismos antibacterianos. Las bacterias comensales también utilizan varios mecanismos para excluir otras bacterias. Entre estos mecanismos encontramos producción de bacteriocinas, depleción intracelular de ATP, incremento en la permeabilidad de membrana, sensibilización de las membranas a la acción lítica, bloqueo de la motilidad flagelar y prevención de la internalización bacteriana (Trebichavsky et al., 2010).

Las cepas intestinales de *E. coli* producen colicinas y microcinas que proporcionan un efecto barrera contra otras cepas de *E. coli* patógenas. EcN sintetiza y secreta las microcinas denominadas MccH47 y MccM. Estas proteínas actúan contra bacterias genéticamente relacionadas a la cepa productora (Jacobi and Malferttheiner, 2011). En esta misma línea, la flagelina, una proteína estructural del flagelo de EcN, es capaz de activar en células de epitelio intestinal la síntesis de un péptido antibacteriano denominado  $\beta$ -defensina-2. Esta activación se produce a través de vías de señalización que implican los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1.  $\beta$ -defensina-2 posee un gran espectro de acción actuando sobre microorganismos gram-negativos, gram-positivos, levaduras y virus (Behnsen et al., 2013; Jacobi and Malferttheiner, 2011).

Finalmente, respecto a los factores moduladores, EcN es capaz de modular diferentes parámetros de la homeostasis intestinal. Promueve la inducción de citoquinas proinflamatorias (IL-8), inducción de receptores de reconocimiento (TLR5), mantenimiento de la barrera (*tight junctions*) y efectos antiinflamatorios e inmunoestimuladores. El mecanismo de acción principal de este probiótico es la

modulación del balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias en favor de las anti-inflamatorias. La flagelina es reconocida por receptores TLR5 de los enterocitos e induce la secreción de IL-8. IL-8 es una de las citoquinas antibacterianas más importantes ya que actúa como quimio-atrayente de neutrófilos asegurando la fagocitosis bacteriana *in situ*. Otras citoquinas y moléculas moduladoras secretadas por el epitelio intestinal en presencia de EcN se presentan en la Figura 1.8.



**Figura 1.8. Mecanismos básicos de interacción de la cepa EcN.** Imagen extraída de Jacobi and Malfertheiner (2011).

La capacidad de EcN de restaurar las *tight junctions* a nivel de células epiteliales es mediante la reorganización de proteínas de la zonula ocludens. Se ha descrito, que la incubación de células epiteliales con EcN provoca un aumento de TER de aproximadamente un 20% como consecuencia de un aumento a nivel de membrana plasmática de la proteína ZO-2, que ayuda a reforzar las *tight junctions*. Por el contrario, la incubación de células epiteliales con la cepa de *E. coli* enteropatógena (EPEC) produce una disminución de hasta un 70% en los niveles de TER de una monocapa de células epiteliales. La infección con EPEC produce un aumento de la proteína quinasa PKC $\xi$ , que promueve la fosforilación de ZO-2. La proteína ZO-2 fosforilada es reconocida y retirada de la membrana provocando la ruptura de las *tight junctions*. Es de destacar que EcN es capaz de restaurar el daño provocado por EPEC, probablemente debido a una mayor expresión de ZO-2 y un silenciamiento de PKC $\xi$  (Zyrek et al., 2007). Recientemente, se ha descrito que EcN es capaz de secretar la proteína TcpC, responsable de la sobre-expresión de la proteína claudina-14 a través de la vía de señalización de PKC $\xi$  y ERK1/2, lo que lleva a un aumento de la TER en cultivos celulares (Hering et al., 2013).

Es importante señalar que a pesar de las diversas propiedades probióticas, EcN es capaz de sintetizar proteínas que pueden inducir daño celular, como es el caso de la proteína colibactina. Esta proteína es una genotoxina capaz de inducir roturas en el DNA. Esta proteína se ha encontrado en casos esporádicos de cáncer colorectal, sin embargo, estudios *in vivo* realizados con un mutante de EcN deficiente en colibactina han mostrado que esta proteína es necesaria para la correcta funcionalidad de EcN como probiótico (Olier et al., 2012). Otra de las proteínas codificada en el genoma de EcN con propiedades citotóxicas en cepas uropatógenas es la proteasa Sat (*Serin Autotransporter Toxin*), que pertenece a la familia de las serin proteasas autotransportadoras de enterobacterias. No se conoce cuál es la función que cumple Sat en el contexto de la cepa probiótica, siendo este el tema central de estudio de esta tesis.

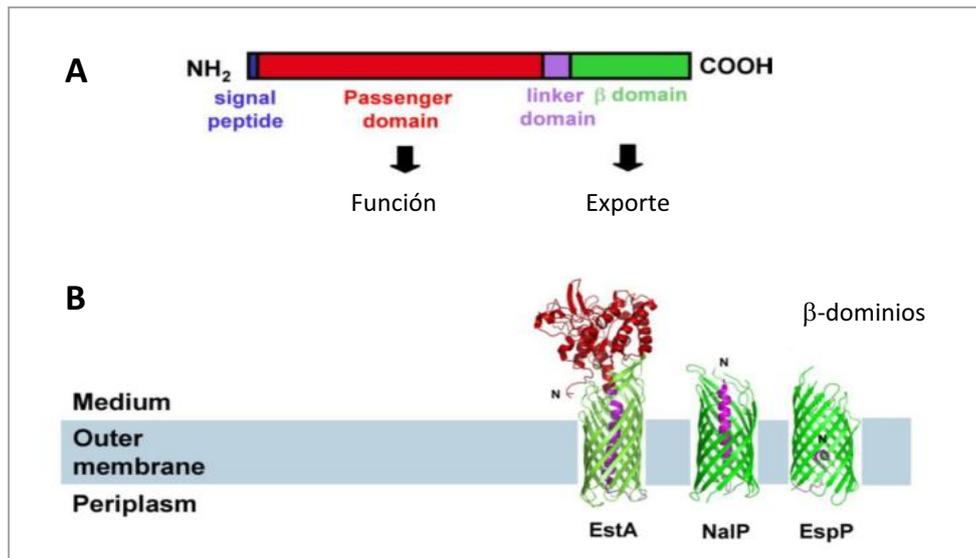
## 1.2. FAMILIA SERIN PROTEASAS AUTOTRANSPORTADORAS DE ENTEROBACTERIACIAE.

Los autotransportadores representan una superfamilia de proteínas producidas por una gran variedad de bacterias patógenas gram-negativas. Algunas de estas proteasas son toxinas y provocan efectos nocivos en las células del huésped.

La familia de las Serin Proteasas Autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATE) constituye una gran familia que engloba proteínas con actividad serin proteasa. Se ha visto que las proteínas que pertenecen a esta familia tienen una baja homología de secuencia (entre el 25 y el 55%) pero todas conservan la organización en dominios y un cierto grado su estructura tridimensional. Los miembros de esta familia, que tienen múltiples funciones, comparten el mismo sistema de secreción de tipo Va (autotransportadores monoméricos). Este es un subtipo del sistema de secreción V o de autotransporte, asociado generalmente al exporte de factores de virulencia en enterobacterias (Henderson et al., 2004).

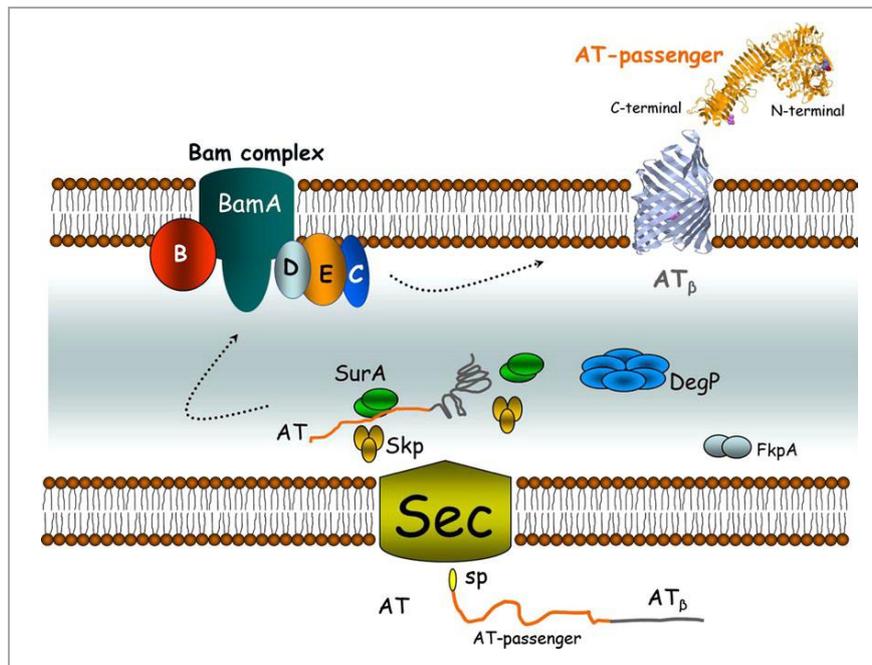
En general la estructura de las proteínas autotransportadoras posee una característica común. Estas proteínas presentan varios dominios: (i) un péptido señal en el extremo N-terminal necesario para dirigir y exportar la proteína a través de la membrana interna hacia el periplasma; (ii) un *passenger domain*, denominado también dominio  $\alpha$  que corresponde a la parte de la proteína que será secretada. Se trata en realidad del dominio funcional de la proteína. Estas proteínas pueden actuar como adhesinas, toxinas o enzimas digestivas que ayudarán o facilitarán la invasión del huésped durante la infección bacteriana. También se ha descrito que pueden actuar como esterases o lipasas. (iii) un dominio translocador, conocido como dominio  $\beta$ , con estructura de  $\beta$ -barrel en el extremo C-terminal capaz de formar un poro en la membrana externa, a través del cual se procesa la porción de la proteína catalítica y su

exporte al medio extracelular (Figura 1.9A). Se trata por lo tanto de un dominio necesario para la translocación del *passenger domain* a través de la membrana externa. Además, existe una zona intermedia entre el dominio C-terminal y el *passenger domain* que es denominada dominio de unión o *linker domain* y es requerido para ayudar a formar los pliegues del poro y estabilizar la estructura de  $\beta$ -barrel (Dautin, 2010; Ruiz-Perez and Nataro, 2013). Existen tres autotransportadores con dominio  $\beta$  cristalizado en la actualidad y se ha visto que la totalidad de ellos están conformados por 12 hélices en  $\beta$ -barrel (Figura 1.9B).



**Figura 1.9. Estructura de las proteínas de la familia SPATE.** A) estructura general de las proteínas y sus dominios. B) Representación del dominio  $\beta$  de tres proteasas de esta familia (EstA, NAIP y EspP). Este dominio conforma el poro a nivel de la membrana externa. Imagen extraída de Dautin (2010).

El sistema de secreción de las proteínas autotransportadoras es Sec-dependiente. El péptido señal del extremo N-terminal es reconocido por proteínas del sistema Sec. Este sistema evita que la proteína se pliegue completamente y la dirige hacia el periplasma. Una vez en el periplasma y ya sin péptido señal, las proteínas autotransportadoras adoptan una forma intermedia estable por interacción con chaperonas periplasmáticas (Skp, SurA, y DegP) y con el complejo Omp85/Bam de la membrana externa (Figura 1.10). Este complejo ayuda al plegado e inserción del dominio  $\beta$  en la membrana externa. En este punto el *passenger domain* parcialmente desplegado inicia la translocación a través del poro hidrofílico constituido por el dominio  $\beta$  en un proceso asistido también por un complejo denominado complejo Bam. Una vez que el *passenger domain* accede a la superficie de la bacteria, adquiere su conformación tridimensional. Dependiendo del tipo de proteínas autotransportadoras, este dominio puede quedar anclado a la membrana o ser escindido entre el dominio  $\alpha$  y  $\beta$ , liberando así la proteína al medio (Ruiz-Perez and Nataro, 2013).



**Figura 1.10. Mecanismo de autotransporte de proteínas mediante el sistema de secreción Sec.** Biogénesis de las proteínas autotransportadoras con participación del sistema Sec, chaperonas y el complejo Bam a través de la membrana. Imagen extraída de Ruiz-Perez and Nataro (2013).

En bacterias gram-negativas las serin proteasas de la familia SPATE están normalmente implicadas en virulencia. Estas proteasas son producidas no sólo por patógenos entéricos, sino también por uropatógenos, englobando especies de *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Los genes que codifican estas proteínas se encuentran en elementos móviles como plásmidos, pro-fagos o islas genómicas de patogenicidad. Muchos de estos genes están flanqueados por secuencias ricas en GC lo que sugiere que fueron incorporados al genoma por transferencia horizontal (Ruiz-Perez and Nataro, 2013). Con la información obtenida de la secuenciación de genomas se ha visto que estos genes también se encuentran presentes en cepas comensales, aunque con menor frecuencia.

La familia SPATE está constituida actualmente por unas 25 proteasas diferentes (Tablas 1.2 y 1.3) que tienen en común los siguientes elementos: (i) un larga secuencia del péptido señal (48-59 aa), (ii) una tríada catalítica formada por residuos de His, Asp y Ser, en la que el motivo GDSGS contiene la serina catalítica, y (iii) la presencia de dos asparraginas consecutivas (*N-N*) que conectan los dominios  $\alpha$  (*passenger domain*) y  $\beta$  (*translocator domain*). Con muy pocas excepciones, las proteínas de la familia SPATE son procesadas dentro del poro mediante una reacción autocatalítica poco común y liberadas al medio extracelular.

Las 25 proteínas que componen la familia SPATE se han clasificado en función de criterios filogenéticos según la estructura y actividad de la toxina en:

**Clase I:** esta incluye proteínas citotóxicas *in vitro* que al penetrar en las células eucariotas causan daños en el citoesqueleto y actividad enterotóxica en tejidos intestinales (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2. Serin Proteasas autotransportadoras de Clase I.** Extraída de Ruiz-Perez and Nataro (2013)

| Protein  | Species   | Disease  | Function/effect  | Biological substrate                      |
|--|---|--|--|---|
| Class-1 SPATEs   |   |  |  |   |
| EspP/PssA<br>EcM863-C1sp   | EHEC<br>Swine-EPEC  | Bloody diarrhea, hemorrhagic colitis/HUS   | Cytotoxin, adherence, biofilm                                    | Factor V<br>C3/C3b,C5                     |
| Sat *  | UPEC<br><i>Shigella</i><br>EAEC, DAEC                       | Cystitis, pyelonephritis<br>Bloody, mucoid diarrhea<br>Watery diarrhea           | Cytotoxin, enterotoxin, impairment of tight junctions, autophagy | $\alpha$ spectrin<br>Factor V             |
| Pet  | EAEC  | Watery diarrhea  | Cytotoxin<br>Enterotoxin   | $\alpha$ spectrin<br>FAK<br>Factor V      |
| SigA   | <i>Shigella</i> , EAEC                                      | Bloody, mucoid diarrhea<br>Watery diarrhea                                       | Cytotoxin<br>Enterotoxin   | $\alpha$ spectrin                         |
| EspC   | EPEC  | Watery diarrhea  | Cytotoxin,<br>Enterotoxin  | $\alpha$ spectrin<br>Factor V haemoglobin |
| <i>EspC-like:</i><br>CrC1sp<br>RE22-C1sp<br>EcPCN033-C1sp<br>EcNA114-C1sp<br>EcM605-C1sp | <i>C. rodentium</i><br>REPEC<br>Swine-ExPEC<br>UPEC<br>AIEC | Diarrhea<br>Diarrhea<br>Meningitis, Septicemia<br>Prostatitis<br>Crohn's Disease | Unknown<br>EspC-like effects?                                    | Unknown<br>EspC-like substrates?          |

\* Proteína Sat, motivo de estudio en este Trabajo en el contexto de la cepa probiótica EcN.

**Clase II:** Esta comprende aquellas proteínas sin actividad citotóxica conocida, pero que deben ser importantes en la patogénesis porque producen su efecto en dianas extracelulares (Tabla 1.3). En este caso, también se desconocen sus sustratos biológicos y su mecanismo de acción. Muchas de las proteasas del tipo 2 estudiadas hasta ahora presentan la capacidad de degradar mucinas y utilizarlas como sustrato, lo que confiere una ventaja en la colonización (Ruiz-Perez et al., 2011). Sin embargo estudios recientes señalan que las dianas de estas proteínas son glicoproteínas extracelulares presentes no sólo en las células intestinales, sino también en la superficie de casi todas las líneas celulares hematopoyéticas (Ruiz-Perez and Nataro, 2013).

**Tabla 1.3. Serin Proteasas autotransportadoras de Clase II.** Imagen extraída de Ruiz-Perez and Nataro (2013)

| Class-2 SPATEs  |  |   |  |   |
|---|--|---|--|---|
| Pic   | <i>Shigella</i><br>EAEC  | Bloody, mucoid diarrhea<br>Watery Diarrhea  | Mucinase<br>Immunomodulation<br>Colonization<br>Lectin-like hemagglutinin<br>Mucus secretion activity<br>Serum resistant | Mucin<br>-O-linked glycoproteins:<br>CD43, CD44, CD45,<br>CD93,<br>CD162, CX3CL1    |
| <i>Pic-like:</i><br>PicU<br>EcTA206-C2sp<br>Cr-C2sp   | UPEC<br>Swine-EPEC<br><i>C. rodentium</i>                            | Cystitis, pyelonephritis<br>Diarrhea<br>Diarrhea  | Mucinase<br>Pic-like effects?<br>Unknown<br>Pic-like effects?  | Mucin<br>Pic-like substrates?<br>Pic-like substrates?                               |
| Tsh/Hbp   | Septic <i>E. coli</i><br>APEC  | Wound Infections<br>Septicemia  | Mucinase<br>Immunomodulation<br>Iron sequestering<br>Lectin-like hemagglutinin<br>ECM proteins binding                   | Mucin<br>Hemoglobin<br>O-linked glycoproteins: CD43,<br>CD45, CD93,<br>CD162, CXCL1 |
| Vat   | APEC   | Septicemia, respiratory disease,<br>cellulitis  | Vacuolating agent<br>Tsh/Hbp-like effects?   | Unknown<br>Tsh/Hbp-like substrates?   |
| <i>Vat-like:</i><br>Vat-ExEc  | UPEC<br>Septicemic<br><i>E. coli</i>                                 | Cystitis, pyelonephritis<br>Septicemia, meningitis  | Tsh/Hbp-like effects?  | Unknown<br>Tsh/Hbp-like substrates?   |
| Boa<br><i>Boa like:</i><br>Sea-C2sp<br>Etarda-sp  | <i>Salmonella</i><br><i>Salmonella</i><br>Edwardsiella               | Diarrhea<br>Diarrhea<br>Septicemia  | Tsh/Hbp-like effects?  | Unknown<br>Tsh/Hbp-like substrates?   |
| AdcA<br><i>AdcA-like:</i><br>RE22-C2-sp<br>EcNA114-C2-sp<br>EcPCN033-C2-sp<br>Eaa-STECC<br>RpeA | <i>C. rodentium</i><br>REPEC<br>UPEC<br>Swine ExPEC<br>STEC<br>REPEC | Diarrhea<br>Diarrhea<br>Prostatitis<br>Meningitis, septicemia<br>Diarrhea/HUS<br>Diarrhea | Adherence<br>Tsh/Hbp-like effects?<br>Intestinal colonization  | Unknown<br>Tsh/Hbp-like substrates?   |
| SepA<br>EcRN587-C2sp  | <i>Shigella</i><br>EAEC<br>EPEC                                      | Bloody, mucoid diarrhea<br>Watery diarrhea  | Enterotoxin<br>SepA-like effects?  | Unknown   |
| EatA<br><i>EatA-like:</i><br>EcB7A-C2sp<br>EpeA<br>Espl   | ETEC<br>STEC   | Watery diarrhea<br>Diarrhea, HUS  | Enterotoxin<br>EatA-like effects?<br>Mucinase<br>Pic-like effects?   | EtpA adhesin<br>EatA-like substrates?<br>Mucin<br>Pic-like substrates?              |

### 1.2.1 SERIN AUTOTRANSORTER TOXINA (Sat).

La serin proteasa Sat se ha estudiado en el contexto de cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), *E. coli* enteropatógenas del tipo enteroagregativas (EAEC) y *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), así como en *Shigella sp* (Tabla 1.2). No existen actualmente estudios sobre la expresión y función de esta proteína en cepas comensales, tampoco en la cepa probiótica EcN, aunque la presencia del gen *sat* en su genoma fue descrita ya en

el año 2004 (Grozdanov et al., 2004). Por este motivo a continuación se hará referencia a los mecanismos conocidos de patogenicidad asociados a Sat.

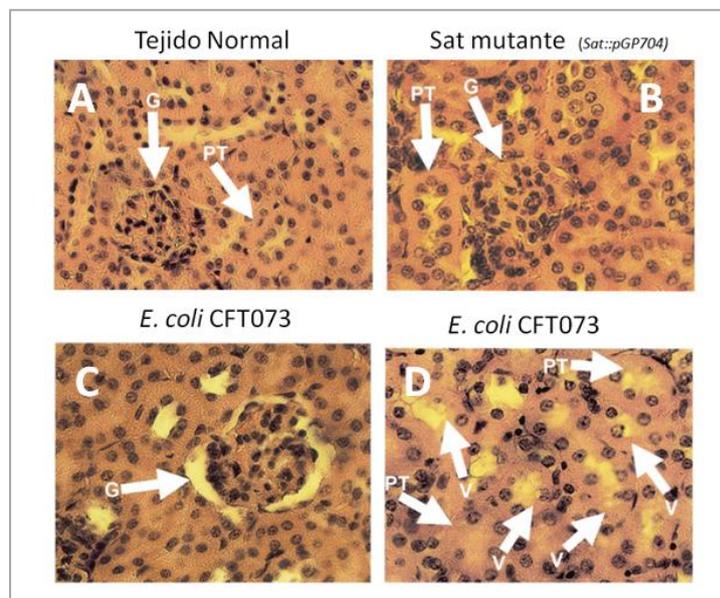
Sat fue descrita como un nuevo factor de virulencia en la cepa uropatógena *E. coli* CFT073 en el año 2000. A nivel estructural, su secuencia amino terminal mostró alta similitud con la de otras SPATEs conocidas, como las proteínas Pet y EspC. El peso molecular de la proteína completa, conteniendo los tres dominios es de aproximadamente 142kDa, siendo la fracción liberada, el *passenger domain*, de 107kDa. Este dominio presenta la secuencia consenso (GDSGSG) característica de las serin proteasas de la familia SPATE. La proteína Sat de la cepa uropatógena mostró actividad citotóxica en células VERO y HK-2 (líneas celulares de riñón) y sobre la línea HEp-2 (línea celular de vejiga). La actividad citotóxica sobre estas líneas celulares conduce a la elongación de las mismas, a la desunión de su soporte, así como a fenómenos de vacuolización, siendo esta citotoxicidad dependiente de la actividad proteasa (Guyer et al., 2000).

Estudios del mismo grupo, encaminados a comprender el mecanismo de acción de Sat, demostraron que Sat induce una marcada vacuolización de células del tracto urinario *in vitro*. Además, estudios *in vivo* de colonización del tracto urinario demostraron histológicamente el daño provocado por esta proteína, tanto a nivel del glomérulo como en los túbulos proximales, confirmando el rol de la misma en la patogenicidad de la bacteria CFT073. El posible rol de Sat en la colonización quedó descartado ya que mutantes *knockout* del gen *sat* podían colonizar de igual forma el tracto urinario. Estos resultados llevaron a considerar Sat como un factor de virulencia con capacidad de dañar los tejidos del huésped, facilitando su entrada a la circulación sanguínea. Además, Sat induce una fuerte reacción inmune con alta producción de anticuerpos en ratones infectados con la cepa tipo *wild type* (Guyer et al., 2002).

El efecto citotóxico de Sat en células uroepiteliales está asociado a su capacidad de producir daños en la actina del citoesqueleto o en proteínas asociadas a él. Se ha descrito su capacidad de degradar tanto las cadenas  $\alpha$  como las  $\beta$  de la fodrina (espectrina no eritrocitaria). Fodrina es la proteína encargada de estabilizar la estructura de la membrana, mantener la forma celular y unir filamentos de actina con proteínas de membrana. Otra proteína blanco de Sat es una proteína con similitud estructural a las fodrinas llamada *leukocyte function-associated molecule 1* (LFA-1) (Ruiz-Perez and Nataro, 2013). LFA-1 es miembro de la familia de las integrinas- $\beta_2$  de receptores de superficie celular y se encuentra presente en la membrana de células de riñón (Maroncle et al., 2006), así como también en la superficie de leucocitos. El principal ligando de LFA-1 es la molécula de adhesión ICAM. La interacción LFA-1/ICAM modula importantes funciones, incluyendo, presentación de antígenos, extravasación linfocítica y migración celular (Zhang et al., 2002). Otras proteínas que son degradadas por Sat, son la caseína y el Factor V de la coagulación y no posee actividad sobre

mucina, ni sobre pepsina (Dautin, 2010). En la figura 1.11 se presenta el efecto citotóxico de Sat, en un modelo murino.

Recientemente se ha descrito la capacidad de Sat de producir autofagia. Estudios en células HeLa a una confluencia de 80-90% (células no polarizadas) y expuestas a sobrenadantes concentrados de Sat, provenientes de una cepa recombinante de *E. coli*, dieron como resultado el desensamblaje de la F-actina del citoesqueleto y a la deformación de la célula. La presencia de Sat lleva a la activación y translocación de proteínas asociadas a microtúbulos (*protein light chain LC3*), con la aparición de pequeñas vacuolas (LC3 positivas). La formación de estas vacuolas conlleva a una aceleración del flujo autofágico, que es el proceso encargado de degradar y reciclar componentes celulares. La acumulación de grandes vacuolas lleva, con el tiempo, a superar los mecanismos de degradación celular y conlleva a la muerte de la célula (Liévin-Le Moal et al., 2011).



**Figura 1.11. Cortes histológicos de riñón de ratones CBA infectados con la cepa CFT073<sup>wt</sup> o el mutante derivado *knockout* de Sat.** A) y B) Imágenes correspondientes a cortes de riñón sin alteraciones en glomérulos (G) Túbulos proximales (PT); C) Corte de riñón infectado con CFT073 tipo *wild type* donde se observan glomérulos con pérdida de células epiteliales; D) Visualización de la vacuolización en tejidos infectados con CFT073. Imagen extraída de Guyer et al. (2002).

El mecanismo citotóxico utilizado por Sat es el mecanismo típico de las SPATEs de clase I que incluye además las proteínas Pet y EspC. Estas tres proteínas producen una desorganización del citoesqueleto de las células huésped caracterizada por la pérdida de filamentos de actina. Tal citotoxicidad estaría asociada a un proceso de virulencia, para dañar las células del huésped, a través de un mecanismo de exfoliación de células epiteliales durante la infección del tracto urinario (Liévin-Le Moal et al., 2011).

Sat no sólo está presente en cepas que infectan el tracto uroepitelial. Se ha encontrado también asociada a cuadros diarreicos en los que están implicadas cepas de *E. coli* de adherencia difusa (Guignot et al., 2007). En este patógeno se ha estudiado el efecto de Sat sobre las *tight junctions*. La proteína Sat provoca un reordenamiento de las proteínas asociadas a *tight junctions* (ZO-1, ZO-3 y ocludinas) en monocapas polarizadas de células Caco2/TC7, sin producir efectos citotóxicos. La reorganización no altera significativamente los valores de TER, pero sí produce un incremento de la permeabilidad paracelular. Esto se pudo constatar por el aumento en el número de domos formados en la placa, producto del paso de fluidos bajo la mono-capa celular, y por el aumento de la permeabilidad medida a través de paso de <sup>3</sup>H-manitol (Guignot et al., 2007). La desorganización del citoesqueleto y la vacuolización inducida por Sat, no se observaron en cultivos de células intestinales polarizadas.

### 1.3. VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

Las bacterias gram-negativas, al igual que todas las células, interactúan con el medio ambiente. Sin embargo, esta interacción muchas veces no se hace por contacto directo, sino que a menudo se consigue mediante los efectos distales de las moléculas secretadas. La secreción permite a las células bacterianas interactuar con una amplia área de superficie de su medio ambiente sin gasto de energía en su desplazamiento. El material secretado es más pequeño y no viable, por lo que puede alcanzar e influir en entornos inaccesibles para la bacteria. El material secretado se considera generalmente soluble, sin embargo, las células bacterianas cuentan con mecanismos específicos para secretar también material insoluble. En el caso de las bacterias gram-negativas una vía de secreción insoluble es la secreción de vesículas de membrana externa (OMVs) (Kulp and Kuehn, 2010).

En el tracto intestinal no existe contacto directo entre microbiota y epitelio. Ambos tipos celulares se encuentran separados por la capa de mucina más interna. La propia estructura de la mucina y factores solubles secretados por el huésped contribuyen a esta separación entre la microbiota y el epitelio intestinal (Johansson et al., 2008; Juge, 2012; (McDermott and Huffnagle, 2014). Todos ellos actúan como componentes de un sistema regulador *feedback* que detecta la densidad bacteriana cerca de la superficie intestinal. Estos mecanismos son críticos en el control de la activación inmunitaria y en el mantenimiento de las asociaciones mutualistas entre bacterias y el huésped. En este contexto, es importante identificar los factores microbianos capaces de difundir a través de la capa de mucina, acceder al epitelio y modular su función. A parte de las proteínas secretadas por la microbiota, las OMVs pueden contribuir en este aspecto.

La visualización de pequeñas vesículas en bacterias de tipo gram-negativo se remonta hacia los años 40. El contenido, función y composición de estas estructuras fue durante mucho tiempo desconocido, creyendo que correspondían a restos celulares producto de la lisis celular (Knox et al., 1966). Hoy sabemos que estas vesículas son producto de un proceso evolutivo que también han desarrollado las bacterias gram-positivas y especies de arqueobacterias, aunque en este caso no reciben el mismo nombre por poseer una envoltura celular diferente. En este trabajo nos referiremos específicamente a las vesículas de tipo OMVs, derivadas de bacterias gram-negativas.

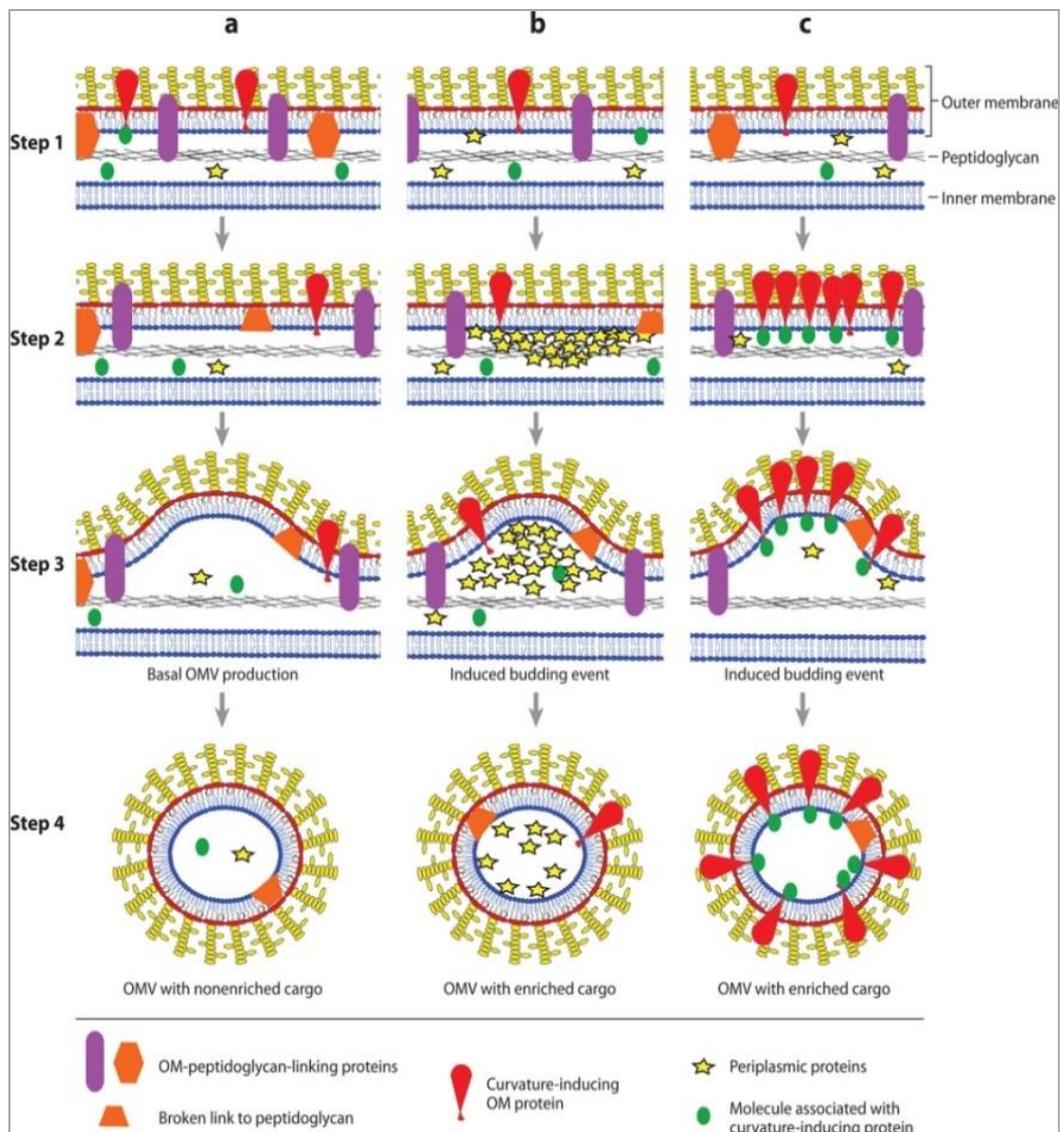
La estructura de las OMVs es consecuencia de la envoltura celular de los organismos gram-negativos. La envoltura celular consta de dos membranas, la membrana interna y la externa entre las que se localiza una fina capa de peptidoglicano y el periplasma. Las membranas difieren en la composición de lípidos y de proteínas. En la mayoría de bacterias gram-negativas, la capa externa de la membrana externa (OM) se compone principalmente de lipopolisacárido (LPS), mientras que la parte interior y las dos partes de la membrana interna se componen de fosfolípidos. El espacio periplásmico viscoso entre las dos membranas constituye entre un 7 a un 40 % del volumen total de la célula. Se trata de un entorno oxidante desprovisto de cualquier fuente de energía conocida como ATP o NADPH. Dentro del periplasma hay una capa delgada de peptidoglicano, rígida, unida a ambas membranas la externa y la interna, a través de proteínas ancladas a la membrana como son la lipoproteína de Braun (LPP) y OmpA. La envoltura celular contiene un gran número de proteínas y desempeña funciones importantes para la célula. Permite la adquisición de nutrientes, la adhesión, la secreción, la señalización, y la protección frente al medio ambiente.

Las OMVs son estructuras membranosas, esféricas, formadas por una bícapa lipídica cuyo tamaño oscila entre 10 y 300 nm. En su composición encontramos componentes de la membrana externa como fosfolípidos, LPS y algunas proteínas ancladas a la membrana externa, así como determinadas proteínas del espacio periplasmático o citosólicas, RNA y DNA. Las OMVs producidas por cepas patógenas transportan además toxinas, enzimas digestivas y otros factores de virulencia. Las adhesinas presentes en las vesículas u otras proteínas de superficie asociadas a la virulencia del patógeno permiten dirigir las OMVs a células blanco específicas, derivando en una acción también específica (MacDonald and Kuehn, 2012; Bonnington and Kuehn, 2013).

### **1.3.1. BIOGÉNESIS DE LAS OMVs.**

Tres procesos diferentes podrían favorecer la formación de vesículas, a) La pérdida del contacto entre la membrana externa y el peptidoglicano subyacente, b) Un aumento local de proteínas periplasmáticas que hace que el peptidoglicano ejerza presión y empuje la membrana externa hacia el exterior, con la concomitante formación de

OMVs que llevan consigo grandes cantidades de la proteína en cuestión, c) Proteínas integrales de membrana o posiblemente pequeñas moléculas dentro de la membrana externa inducen la curvatura de la misma, y por tanto la vesiculación (ver Figura 1.12).



**Figura 1.12. Modelo de formación de OMVs.** a) por rotura entre de las uniones entre la membrana externa y el péptidoglicano, bien por movimiento de las proteínas de unión (en rosa) o por ruptura de las conexiones (naranja). b) por acúmulo de proteínas periplásmicas. c) Por acúmulo de proteínas de la membrana externa que inducen la curvatura de la misma. Imagen extraída de Kulp and Kuehn (2010).

### 1.3.2 REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OMVs.

Las OMVs se producen de forma constitutiva durante el crecimiento en fase exponencial y estacionaria, tanto en cultivos sólidos como líquidos, dentro del *biofilm*, en tejidos del huésped y durante la infección intracelular. Sin embargo su formación y composición pueden verse modificadas dependiendo del nicho ecológico o las condiciones del cultivo. Así, situaciones de estrés provocadas por tratamiento con

antibióticos, limitación de lisina,  $Mg^{2+}$ , o infecciones por fago, entre otras, pueden provocar una sobreproducción de OMVs (Unal et al., 2011). El crecimiento a altas temperaturas incrementa generalmente la producción de OMVs, aunque este efecto puede ser indirecto ya que en estas condiciones un mayor número de proteínas se encuentran desnaturalizadas. Este hecho induce un estrés a la célula que incrementa el proceso de vesiculación, a la vez que las membranas se vuelven más fluidas facilitando la curvatura de la membrana externa y la liberación de OMVs. También en estas condiciones se incrementa la velocidad de división, con un incremento en la velocidad de crecimiento de la pared celular y en su recambio. El número de OMVs también incrementa al final de la fase exponencial.

Se ha demostrado que la producción de OMVs también puede estar regulada por determinados genes. Así se ha descrito que una mutación en el gen *tolR* comporta un incremento en la producción de OMVs en *E. coli*. Por el contrario, mutaciones en los genes *ypjA* y *nlpA* disminuyen drásticamente la producción de las mismas.

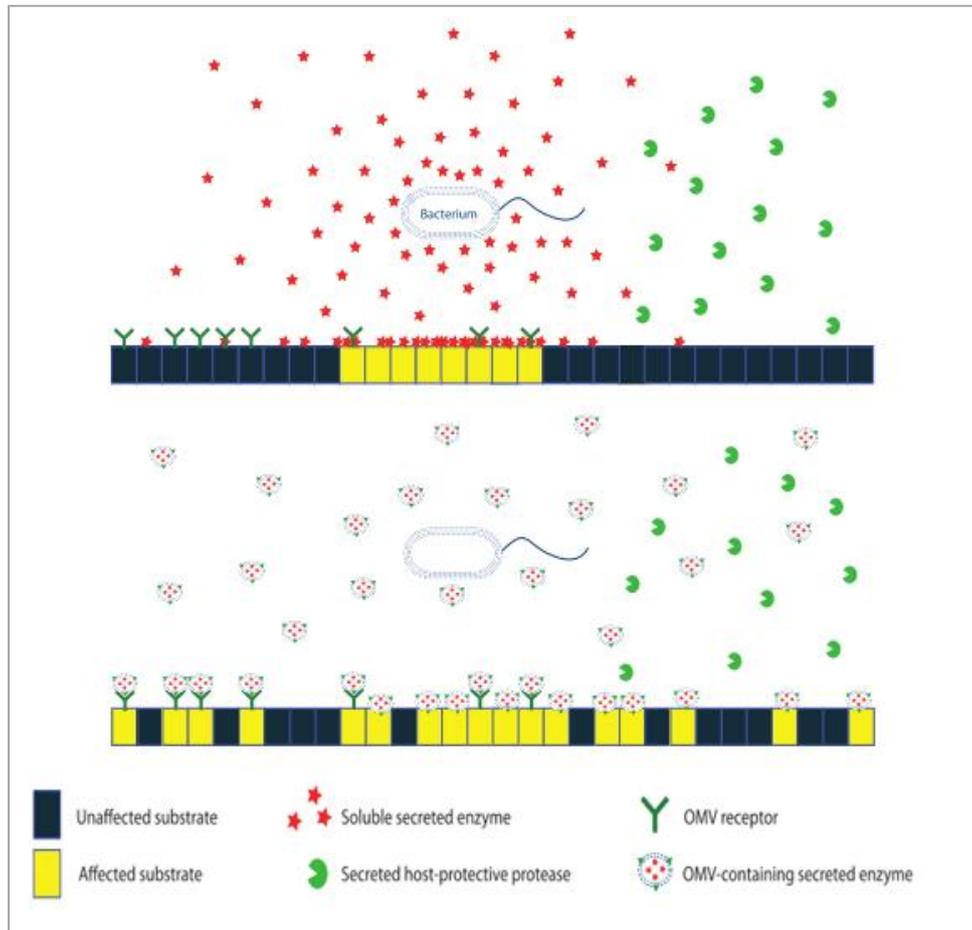
### **1.3.3. LAS OMVs COMO SISTEMA DE SECRECIÓN Y LIBERACIÓN DE FACTORES MICROBIANOS.**

Las OMVs constituyen un mecanismo de liberación a distancia de factores microbianos. Esta liberación se produce en una envuelta protectora y por tanto en un entorno más estable que la secreción de proteínas solubles. Estas estructuras permiten además la interacción a distancia con el entorno y con otras células evitando el contacto intercelular directo (Figura 1.13).

Las OMVs permiten la secreción de lípidos bacterianos, proteínas de membrana, y otros compuestos insolubles. Muchas de las proteínas integrales de la membrana externa de patógenos son adhesinas, importantes para la colonización de los tejidos del huésped ya que participan en la agregación celular. De hecho, las OMVs de *Porphyromonas gingivalis* causan la agregación celular y ayudan al desarrollo de *biofilms* de la placa dental. La proteína de *quorum-signaling* (PQS) es otra molécula de señalización altamente hidrofóbica secretada en las OMVs de *P. aeruginosa*. Su asociación en OMVs permite la dispersión de esta molécula muy hidrofóbica en un entorno acuoso.

Las OMVs representan un medio por el cual, las proteínas solubles pueden ser liberadas al medio ya sean englobadas en el lumen o asociadas a la superficie de vesículas. Las proteasas extracelulares a menudo degradan las proteínas secretadas, sin embargo, las moléculas presentes en OMVs, y las proteínas solubles asociadas a la superficie externa son altamente resistentes a las proteasas. Por tanto, el transporte mediado por OMVs puede permitir que las moléculas menos estables, tales como toxinas puedan llegar a más destinos o puedan liberarse a largo plazo, proporcionando

una actividad más tardía. Las OMVs permiten además que las proteínas se liberen a altas concentraciones y en estrecha proximidad a otros factores. Mediante el uso de OMVs, las bacterias pueden liberar moléculas efectoras a una concentración superior y a mayor distancia. Además, facilitan que varios efectores puedan llegar a un mismo sitio a la vez y de forma dirigida a través de la especificidad de unión entre adhesinas bacterianas expuestas a la superficie y receptores de la célula huésped (Figura 1.13).



**Figura 1.13. Mecanismo de liberación de proteínas en bacterias.** A) Mecanismo de liberación de material soluble B) Mecanismo de liberación de material insoluble como las OMVs. Imagen extraída de Kulp and Kuehn, (2010).

En relación con la liberación del contenido de OMVs se han propuesto diversos mecanismos. El contenido soluble puede llegar a su destino a través de dos vías. En la primera, se propone que la vesícula lise espontáneamente, permitiendo que el contenido difunda. En la segunda, las OMVs se unirían a una proteína diana y cederían su contenido por lisis proximal, internalización o fusión. Existen pocas evidencias de lisis espontánea de OMVs, sin embargo se ha visto que estas vesículas lisan en contacto con algunas especies bacterianas gram-positivas o gram-negativas. Se ha propuesto que las OMVs se rompen al interactuar con cargas positivas del peptidoglicano de bacterias gram-positivas, mientras que se produciría fusión de membrana externa en el caso de contacto con bacterias gram-negativas. La fijación de

las OMVs y posterior fusión de la membrana permite liberar el contenido de las OMVs directamente a las células diana. La combinación de la fusión de membranas mediada por OMVs y la capacidad de estas vesículas de contener DNA implican a las OMVs en la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas de bacterias gram-negativas, incluso entre diferentes especies. La internalización mediada por endocitosis en células del huésped se ha observado también en OMVs de varios patógenos.

#### 1.3.4. FUNCIONES DE LAS OMVs.

Las principales funciones de las OMVs se detallan en la Figura 1.14. Las OMVs pueden mediar la respuesta bacteriana a estrés, resistencia a antibióticos u otros tóxicos, formación de *biofilms*, *quorum sensing*, cooperación inter-especies, modulación de la respuesta inmune del huésped, mecanismos de patogenicidad, virulencia, etc.

Se sabe que las OMVs son importantes para la supervivencia bacteriana ya que pueden captar y eliminar del medio grandes cantidades de agentes dañinos para la célula, tanto intrínsecos como extrínsecos. La liberación de autolisinas a organismos gram-negativos a través de un mecanismo de fusión de membranas puede permitir la competencia bacteriana por un nicho ambiental. También pueden ayudar a la captación de nutrientes bien porque llevan enzimas que permiten la captación o porque transportan nutrientes esenciales que pueden ser captados por las células. Ayudan también a la nucleación y mantienen la cohesión de comunidades de *biofilms*. En condiciones de estrés en que la envoltura de la célula se afecta por acumulación de agregados de proteínas o por exposición a agentes que dañan la envoltura, las OMVs se encargan de retirar moléculas mal plegadas o tóxicas (Lee et al., 2008).

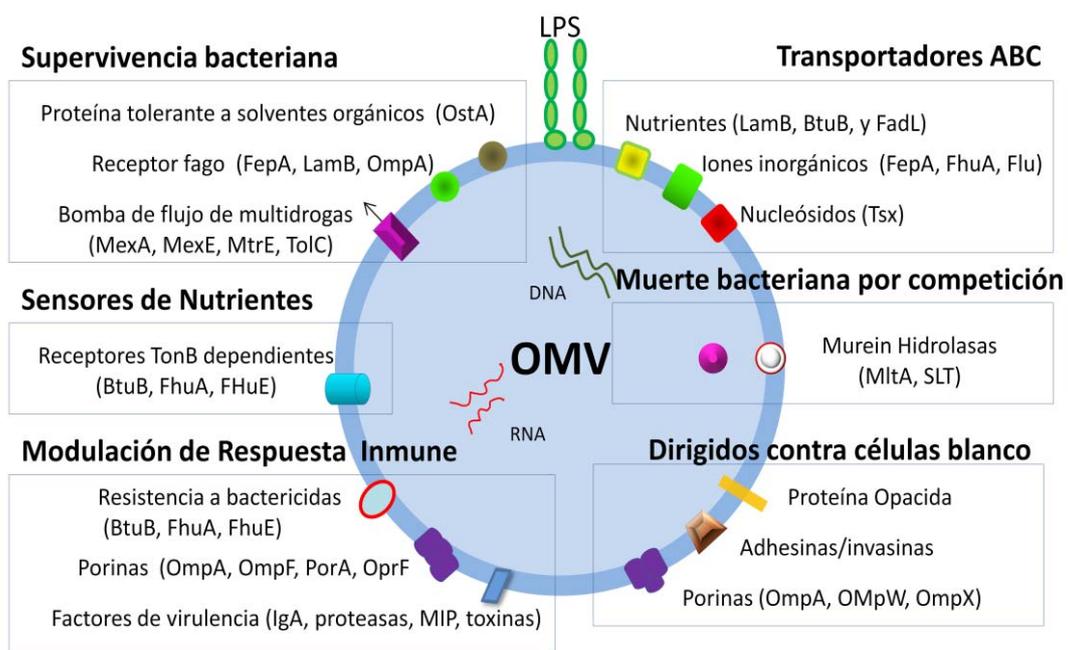


Figura 1.14. Principales funciones de OMVs. Imagen extraída de Lee et al. (2008).

Las OMVs también están relacionadas con patogénesis ya que pueden contener toxinas que pueden ser transferidas al interior de la célula huésped utilizando una gran diversidad de mecanismos. En los tejidos del huésped, las OMVs pueden interactuar con células epiteliales o con células del sistema inmunitario.

Diversos estudios muestran la interacción con células epiteliales y posterior internalización de OMVs producidas por diversos patógenos a través de adhesinas específicas presentes en estas estructuras (Unal et al., 2011). Así, las OMVs de *Helicobacter pylori* se unen e invaden células del epitelio gástrico mediante endocitosis mediada por clatrina, donde modulan apoptosis y estimulan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Parker et al., 2010). Otro ejemplo de OMVs internalizadas por células epiteliales se ha descrito para *Moraxella catarrhalis*. En este caso la internalización tiene lugar a través de *lipids rafts* (balsas lipídicas) y conduce a una respuesta pro-inflamatoria con expresión incrementada de IL-8 e ICAM-1 (Sharpe et al., 2011). Un estudio realizado en *P. gingivalis* demuestra la unión de OMVs a células epiteliales humanas a través de fimbrias y su internalización a través de *lipids rafts* y vías que implican caveolina. Si bien las OMVs son conducidas al compartimento lisosomal para su degradación, estas persisten intracelularmente durante 24 horas (Furuta et al., 2009). Otros ejemplos de OMVs internalizadas en células epiteliales son los de los patógenos *Haemophilus influenzae* (Sharpe et al., 2011) y *E. coli* enterotoxigénica (Kesty et al., 2004) donde son capaces de alterar diversas funciones celulares.

Tal como se ha comentado, las OMVs también son capaces de interactuar con células del sistema inmune. En este contexto se han descrito interacciones de OMVs de patógenos gram-negativos con células del sistema inmune innato y adaptativo (Unal et al., 2011). Un ejemplo lo constituyen las OMVs de *M. catarrhalis* que interactúan directamente y activan linfocitos B a través de un mecanismo independiente de células T. La interacción tiene lugar a través de un superantígeno presente en las OMVs y el receptor antigénico de las células B, lo que agrupa receptores en *lipids rafts* y promueve la internalización de las OMVs (Vidakovics et al., 2010). En el caso de *M. catarrhalis* las OMVs interactúan con la vía alternativa del sistema del complemento, una parte central de la inmunidad innata. La interacción tiene lugar a través de los factores de virulencia UspA1/A2 presentes en las OMVs con el factor C3 del complemento, lo que disminuye la activación de este sistema (Unal et al., 2011). Las OMVs de *Salmonella typhimurium* estimulan macrófagos y células dendríticas activando la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-12. Activan también células B y T helper (Alaniz et al., 2007)

A pesar de la importancia de las OMVs como mediadores de la comunicación intercelular, apenas existen estudios funcionales relacionados con las OMVs de bacterias gram-negativas presentes en la microbiota intestinal y sus efectos sobre la

salud y la homeostasis intestinal. Muy recientemente se ha publicado un estudio sobre la cepa comensal *Bacteroides fragilis*, esta bacteria libera un polisacárido capsular en vesículas que induce efectos inmunomoduladores siendo capaz de prevenir la colitis en un modelo experimental. Las células dendríticas detectan la asociación OMVs-polisacárido a través de TLR2, resultando en una mayor regulación de células T y la producción de citoquinas antiinflamatorias, demostrando que bacterias comensales son capaces de prevenir enfermedades a través de las OMVs (Shen, Torchia, et al., 2012).

### 1.3.5. ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE LAS OMVs.

Los estudios proteómicos de OMVs pueden ser de gran ayuda para entender el mecanismo de su formación, así como para profundizar en las funciones fisiopatológicas de estas vesículas. Este tipo de estudios ha incrementado en los últimos años en el ámbito de patógenos (Schaar et al., 2011; Sharpe et al., 2011; Galka et al., 2008; Pierson et al., 2011; Mullaney et al., 2009; Choi et al., 2011). Al inicio de este trabajo, los estudios proteómicos en *E. coli* estaban limitados a la cepa de laboratorio DH5 $\alpha$  (Lee et al., 2007), y al patógeno extraintestinal IHE3034 (Berlanda Scorza et al., 2008). Nuestro grupo ha publicado recientemente el proteoma de las OMVs producidas por la cepa probiótica EcN en medio LB (Aguilera et al., 2014). Mediante separación de las proteínas presentes en las OMVs a través de geles de poliacrilamida-SDS y posterior análisis por espectrometría de masas se han identificado un total de 192 proteínas en tres replicados biológicos independientes. Entre estas proteínas, 18 son específicas de la cepa probiótica y 57 están también presentes en las OMVs derivadas de patógenos. Según la información disponible en bases de datos sobre predicción de función, las proteínas identificadas estarían implicadas en transporte y detección de nutrientes (como por ejemplo BtuB, FhuA, FadL or FepA), competición y destrucción de otras bacterias (como las murein hidrolasas MltS, MltB o EmtA), eliminación de compuestos tóxicos (como TolB), resistencia a factores bactericidas (como OmpT), unión a células huésped y modulación de la respuesta inmune (porinas OmpA, OmpX, NmpC) y adhesión (como las fimbrias FimA o Fim1C). Estas proteínas contribuyen a la capacidad de este probiótico de colonizar el tracto intestinal, ya que en general desempeñan funciones relacionadas con la adhesión, modulación de la respuesta inmune o supervivencia de la bacteria en los tejidos del huésped.

### 1.3.6. IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LAS OMVs.

La vesiculación es probablemente un proceso esencial para la célula altamente conservado. La formación de vesículas es un proceso regulado que permite el empaquetamiento heterogéneo de proteínas y lípidos y no requiere ATP u otra fuente de energía en el lugar de formación de la vesícula. Un aspecto muy interesante a

resaltar de las OMVs es su capacidad inmunogénica. Por ello, las OMVs están siendo utilizadas como base para el desarrollo de vacunas frente a varios patógenos (Schwechheimer et al., 2013; Manning and Kuehn, 2013). Además, por sus características están siendo también explotadas como vehículos para el transporte de drogas anticancerosas u otros fármacos (Gujrati et al., 2014). Estas son algunas de las múltiples aplicaciones biotecnológicas de las OMVs en el campo de la investigación biomédica, por lo que el conocimiento más profundo de las mismas pueden ayudar a utilizarlas como medios de comunicación selectivos con el huésped y para la liberación de compuestos de interés farmacológico.

Por tanto, aunque la inducción de la secreción de vesículas es un proceso energéticamente costoso para la célula, el hecho de que sean secretadas hace pensar que el beneficio que comportan es superior a los costos. Además su posible utilización para la administración de fármacos de forma más dirigida, o su utilización como vacunas, hacen que también sean beneficiosas para su utilización en biomedicina, por lo que es de interés un conocimiento más profundo de las mismas. En este trabajo analizaremos las OMVs secretadas por la cepa probiótica EcN en medio DMEM.



## 2. OBJETIVOS



---

## 2. OBJETIVOS.

El objetivo global de este proyecto es identificar y caracterizar proteínas secretadas por la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (EcN) y determinar su contribución en la interacción/comunicación de este probiótico con el epitelio intestinal. A partir del análisis de las proteínas secretadas por este probiótico se pretende seleccionar proteínas de interés para abordar su caracterización funcional. En este trabajo se ha seleccionado la proteína Sat.

Los objetivos específicos son:

1. Análisis proteómico de las proteínas secretadas por la cepa EcN:
  - Análisis del secretoma global
  - Análisis proteómico de vesículas de membrana externa (OMVs)
  
2. Caracterización de la serin proteasa Sat de la cepa EcN:
  - Análisis de la expresión de Sat mediante fusiones de promotor
  - Análisis funcional de Sat en modelos *in vitro*
  - Análisis funcional de Sat en modelos *in vivo* de colonización intestinal



# 3. MATERIALES



### 3. MATERIALES.

#### 3.1 CEPAS BACTERIANAS.

Las características más importantes de las cepas bacterianas usadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.** Para cada cepa se indica su nombre, descripción del genotipo o fenotipo y su referencia.

| CEPAS DE LABORATORIO |  |                      |
|----------------------|--|----------------------|
| CEPA                 | DESCRIPCIÓN  | REFERENCIA           |
| EcN                  | Probiótico, aislado natural de humanos serotipo (O6:K5:H1A1)   | Ardeypharm, Alemania |
| EcN <i>sat::cm</i>   | Mutante knockout del gen <i>sat</i> derivado de EcN  | Este estudio         |
| DH5αF'               | φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 <i>recA1 endA1</i> λ <sup>-</sup> <i>gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE44 relA1 deoR</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 | Gibco BRL            |
| MC4100               | F' <i>araD</i> ( <i>argF-lac</i> ) <i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>relA flhD deoC ptsF rbs</i>  | Casadaban (1976)     |
| TE2680               | Fλ <sup>-</sup> IN( <i>rrnD<sup>-</sup>rrnE</i> ) 1Δ( <i>lac</i> )X7 <i>rpsL galk2 recD1903::Tn10d-Tet trpDC700::putPA1303::[Kn<sup>S</sup>-Cm<sup>R</sup>-lac]</i>  | Elliot (1992)        |
| XL1-Blue             | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac1<sup>q</sup>ΔM15Tn10(Tc<sup>R</sup>)</i> ]  | Invitrogen           |
| E2348/69             | EPEC, <i>wild type</i> , serotipo (O127:H6)  | Donnenberg (1990)    |
| EcoR41               | Aislada natural de Humano  | Ochman (1984)        |
| EB6193               | RP4-2 <i>tet: Mu -1 kan::Tn7 leu-63::IS10 recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA(ΔMul):pir+ thi Sp<sup>R</sup>/Sm<sup>R</sup></i>   | R. A Bender          |
| S17(λpir)            | Tp <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> <i>recA thi pro hsdR hsdM<sup>+</sup></i> RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 λ  | Biomedal             |

### 3.2 VECTORES.

Para la realización de este trabajo se han utilizado diferentes tipos de vectores, tanto plasmídicos como fágicos. Los vectores plasmídicos fueron utilizados principalmente para el clonaje de genes, la expresión y purificación de proteínas, así como en la construcción de fusiones transcripcionales entre otros. Por otro lado, los vectores fágicos han sido utilizados para la transducción de material genético entre cepas bacterianas.

**Tabla 3.2. Vectores utilizados en este trabajo.** Para cada vector se indica su nombre, la descripción de sus principales características y su origen o referencia.

| VECTOR                       | Aplicación   | Descripción   | Referencia                  |
|------------------------------|--|---|-----------------------------|
| pBR322                       | Clonación del gen <i>sat</i>   | Amp <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup>  | BioLabs                     |
| pUC18 Not                    | Plásmido auxiliar para clonación con dianas <i>NotI</i>                          | Amp <sup>R</sup> , $\alpha$ - <i>LacZ</i> ; región de clonación flanqueada por dianas <i>NotI</i> . | Biomedal                    |
| pCAT19                       | Mutagénesis dirigida.  | Gen <i>Tn9CAT</i> del pB325 clonado en pUC18  | Fuqua (1992)                |
| pUTminiTn5Tc                 | Mutagénesis dirigida.  | Amp <sup>R</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>tnp*</i> , mini-Tn5 Tc.                       | Biomedal                    |
| pRS551                       | Fusión del promotor de <i>sat</i> al gen reportero <i>lacZ</i> .                 | Amp <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup> <i>lacZYA</i>   | Simons <i>et al.</i> (1987) |
| pFU34                        | Fusión del promotor de <i>sat</i> al gen reportero <i>gfpmut3.1</i> .            | Amp <sup>R</sup> gen reportero <i>gfpmut3.1</i>   | (Uliczka 2011)              |
| PLÁSMIDO RECOMBINANTE        | Aplicación   | Descripción   | Referencia                  |
| pSAT                         | Expresión de la proteína mutada Sat-S256I.                                       | Gen <i>sat</i> clonado en pBR322  | Este estudio                |
| pSAT(S256I)                  | Expresión afuncional de Sat  | Mutación de la Serina 256 del sitio catalítico de Sat.  | Este estudio                |
| (PFU34- $\phi$ <i>sat</i> )  | Clonación del promotor de <i>sat</i> fusionado al gen reportero <i>gfpmut3.1</i> | Promotor de <i>sat</i> clonado en pFU34   | Este estudio                |
| (PRS551- $\phi$ <i>sat</i> ) | Clonación del promotor de <i>sat</i> fusionado al gen reportero <i>lacZ</i>      | Promotor de <i>sat</i> clonado en pRS551  | Este estudio                |
| FAGOS                        | Aplicación   | Descripción   | Referencia                  |
| P1                           | Transducción   | P1 <i>vir</i>   | Miller (1992)               |

### 3.3. LÍNEAS CELULARES.

- Caco-2: Células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colón humano. American Type Culture Collection; ATCC HTB-37.
- HT29-MTX E12: Células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colón humano resistentes a metrotexato y productora de mucus. Línea celular cedida por la Dra. Theclá Lesuffleur, Hospital Robertt Debré, Paris.

### 3.4. ANIMALES.

En este estudio fueron utilizados ratones machos CD-1 de entre 5 a 8 semanas.

### 3.5. OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación de fragmentos de DNA fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Como norma general, los oligonucleótidos fueron diseñados 100% homólogos a la secuencia a la que debían hibridar, excepto en algunos casos en que se añadieron al extremo 5' secuencias reconocidas por endonucleasas de restricción, de tal forma que se facilitase la posterior clonación del producto de PCR resultante.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en ANEXO.1.

### 3.6. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la máxima pureza. La conservación (temperatura, humedad, efecto de la luz) y manipulación (esterilidad, toxicidad, preparación extemporánea) se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los *kits* utilizados han sido suministrados por diferentes casas comerciales, según se detallará oportunamente y salvo que se indique lo contrario, se siguieron los protocolos en ellos incluidos.

### 3.7. SOPORTE INFORMÁTICO.

#### 3.7.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.

- **Omiga v2.0**: Programa desarrollado por Oxford Molecular Ltd (GCG, Madison, WI. USA). Este programa permite acceder a bases de datos para recuperar secuencias, conocer posibles marcos de lectura, elaborar mapas de restricción, alinear secuencias, etc. Se ha empleado para analizar secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos.
- **Chromas Lite v2.01**: Este programa ha sido utilizado para analizar los resultados de las reacciones de secuenciación del DNA. Se encuentra disponible en la *web* [http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul et al. (1997): Este programa se encuentra disponible a través de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, y permite hacer un estudio comparativo de las secuencias obtenidas con las descritas en las bases de datos.
- **WEBCUTTER 2.0**: Este programa ha sido utilizado para localizar dianas de restricción en las secuencias de DNA. Está disponible a través de la página web <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2> (Webcutter 2.0, copyright 1997 Max Heiman).
- **PASW Statistics 17**: Este programa se ha utilizado para analizar la significación estadística de los resultados.

### 3.7.2. BASES DE DATOS.

Las principales bases de datos utilizadas en este trabajo han sido:

- **GENBANK**: Es una base de datos de ácidos nucleicos que está producida y mantenida por el NCBI en colaboración con otros organismos como el EMBL Benson et al., (1998) Se puede acceder en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- **SWISS-PROT**: Base de datos de proteínas que incluye información de diferentes fuentes. Se puede acceder en la dirección <http://www.expansy.ch>.
- **UniPRO**: Es una base de datos de libre acceso de secuencias de proteína e información funcional. Disponible a través de la página web en <http://www.uniprot.org/>
- **GenProtecEC**: este sitio web caracteriza el genoma y funciones de proteínas codificadas en el genoma de *Escherichia coli* K-12 (cepa MG1655) definida en GenBank Acceso NC\_000913.2. Disponible a través de la página web en <http://genprotec.mbl.edu/>

# 4. MÉTODOS



## 4. MÉTODOS.

### 4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.

#### 4.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Los crecimientos bacterianos se realizaron utilizando distintos medios de cultivo, completos o mínimos, a diferentes condiciones de temperatura, en función de la cepa utilizada y del tipo de experimento a realizar. Se utilizaron medios de cultivo líquidos y sólidos. Para los cultivos líquidos se usaron tubos de ensayo o matraces *Erlenmeyers*. El volumen del cultivo fue normalmente un 10% del volumen total del recipiente utilizado. En este caso, las cepas bacterianas se cultivaron siempre a una temperatura óptima y en agitación constante a 250 rpm, en un agitador orbital. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la absorbancia de los cultivos a una  $\lambda$  de 600nm ( $DO_{600}$ ), en un espectrofotómetro Shimadzu UV240. Para la preparación de los cultivos sólidos se adicionó al medio líquido 1,5% (p/v) de agar bacteriológico. Estos cultivos se realizaron en placas de Petri y el crecimiento se llevó a cabo en un incubador termostatzado a la temperatura deseada. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C y una atmosfera de presión durante 30 minutos. Los compuestos termo-sensibles, fueron esterilizados mediante filtración (tamaño de poro: 0,22 $\mu$ m).

##### 4.1.1.1. Composición de los medios de cultivo.

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se han utilizado dos tipos de medio de cultivo. El medio completo o rico (medio LB) y el medio mínimo (medio SM).

El medio completo contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la mayoría de cepas, por lo que no requiere la adición de fuentes de carbono o nitrógeno exógenas. Para este trabajo se utilizó el medio LB (Bertani, 2004).

El medio mínimo utilizado es un medio mineral basal (SM) (Boronat and Aguilar, 1979). Este fue suplementado con glucosa a una concentración final de 60 mM de Carbono. En el caso de la cepa EcN se adicionó además 0,02% de hidrolizado de caseína.

| Medio LB (%p/v)      |     | Medio SM (mM)                                   |       |
|----------------------|-----|---|-------|
| Triptona             | 1,0 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | 34    |
| Extracto de levadura | 0,5 | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 64    |
| NaCl                 | 0,5 | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 20    |
|                      |     | FeSO <sub>4</sub>                               | 0,001 |

Cuando al medio de cultivo se adicionaban antibióticos para el crecimiento de cepas bacterianas, estos se preparaban a una concentración 1000X, en solución acuosa o en solución de etanol al 100% (cloramfenicol) o metanol 100% (rifampicina). Las soluciones stock fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las concentraciones finales utilizadas, se detallan en la tabla.

| Antibióticos  | ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---------------|----------------------|
| Ampicilina    | 100                  |
| Tetraciclina  | 12,5                 |
| Kanamicina    | 50                   |
| Cloramfenicol | 20                   |
| Rifampicina   | 25                   |
| Estreptomina  | 100                  |

Para la selección de mutantes espontáneos de estreptomina se aumentó la concentración hasta 2 mg/ml de dicho antibiótico, según protocolo que se detallará más adelante.

#### **4.1.1.2. Mantenimiento de cepas bacterianas.**

Las cepas bacterianas fueron crecidas hasta fase exponencial en medio LB con su correspondiente antibiótico y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en presencia de una concentración final de glicerol al 15%.

#### **4.1.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.**

Las células competentes son aquellas que han estado sometidas a un tratamiento que aumenta su capacidad para incorporar DNA exógeno. Se pueden obtener células competentes mediante métodos químicos o físicos.

Para la realización de este trabajo se obtuvieron células competentes de distintas cepas de *Escherichia coli*, mediante diferentes métodos: dos métodos químicos, uno que utiliza un tampón de transformación (TFB), un segundo que utiliza cloruro cálcico y un método físico por electroporación.

##### **4.1.2.1. Métodos químicos.**

###### **A) Método del TFB.**

Este método descrito por Hanahan et al. (1995), se basa en la permeabilización de la membrana celular mediante el catión divalente  $\text{Mn}^{+2}$  presente en la solución de TFB, así como por la presencia de DMSO y DTT.

Las células competentes obtenidas por este método presentan una eficiencia elevada de transformación. Se recomienda utilizarlas inmediatamente después de su obtención, no siendo viable su almacenamiento.

Procedimiento:

1. Inocular la cepa que se quiere hacer competente en 2 ml de LB e incubar durante 16 horas a 37°C en constante agitación.
2. Realizar una dilución 1/50 de este cultivo en medio LB hasta un volumen final de 10 ml. Incubar en agitación constante a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,5.
3. Detener el crecimiento enfriando las células a 4°C durante 10 minutos. (A partir de este punto las células han de mantenerse siempre a esta temperatura).
4. Recoger las células mediante centrifugación a 4.500xg durante 10 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 3 ml de TFB.
6. Dejar 10 minutos en hielo.
7. Centrifugar 10 minutos a 4.500xg.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 0,8ml de TFB.
9. Añadir 28  $\mu$ l de DMSO/DTT. Dejar 10 min en hielo.
10. Adicionar otros 28  $\mu$ l de DMSO/DTT y dejar en hielo un mínimo de 10 min. A partir de este momento las células ya son competentes.

| Tampón TFB (mM)   |     | Solución DMSO/DTT                   |          |
|-------------------|-----|-------------------------------------|----------|
| MES-K pH 6,2      | 10  | Acetato potásico pH 7,5             | 10 mM    |
| KCl               | 100 | DTT                                 | 1 M      |
| MnCl <sub>2</sub> | 10  | DMSO                                | 90 % p/v |
|                   |     | <i>Guardar en alícuotas a -20°C</i> |          |

**B) Método del CaCl<sub>2</sub>**

Este procedimiento se basa en el método descrito por Ausubel (1994), en el que la membrana celular se permeabiliza mediante iones Ca<sup>2+</sup>. Este método tiene la ventaja adicional de que las células competentes pueden conservarse a -80°C hasta su utilización.

Procedimiento:

1. Inocular la cepa a tratar en LB. Incubar durante 16 horas a 37°C en constante agitación.
2. Reinocular 1 ml de este cultivo en 100 ml de LB. Incubar a 37°C en constante agitación hasta que el cultivo alcance una  $DO_{600}$  igual a 0,4 (por encima de este valor disminuye la eficacia de transformación).
3. Mantener el cultivo durante 10 minutos en hielo para detener el crecimiento
4. Recoger las células por centrifugación a 4.500xg durante 10 minutos a 4°C. A partir de este momento las células han de permanecer a esta temperatura.

5. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 20 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> atemperada a 4°C.
6. Centrifugar a 4.500xg durante 5 minutos a 4°C.
7. Resuspender de nuevo el sedimento celular en 20 ml de solución de CaCl<sub>2</sub>. Incubar las células resuspendidas durante 30 minutos en hielo.
8. Centrifugar a 4.500xg durante 5 minutos a 4°C. Resuspender finalmente el sedimento celular en 4 ml de solución de CaCl<sub>2</sub>. Incubar durante un mínimo de 1 hora en hielo.
9. Distribuir en alícuotas de 200 µl. Guardar a -80°C hasta el momento de su utilización.

| Solución de CaCl <sub>2</sub> |         |
|-------------------------------|---------|
| Tris-HCl pH 7.0               | 10 mM   |
| CaCl <sub>2</sub>             | 60 mM   |
| Glicerol                      | 15% v/v |

#### 4.1.2.2 Métodos físicos.

##### A) Mediante electroporación.

En este caso a la vez que las células se hacen competentes, el DNA se introduce al interior del compartimiento celular de la bacteria. Más detalle de este proceso se dará en el apartado (Métodos 4.1.3.2).

#### 4.1.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.

El objetivo de la transformación de células competentes es la internalización de DNA circular exógeno a la célula bacteriana para que este pueda replicarse utilizando la maquinaria celular. Las células que incorporan el DNA circular de interés se seleccionan mediante resistencia al antibiótico que confiere el plásmido.

En este trabajo las células competentes obtenidas por métodos químicos, mediante TFB o CaCl<sub>2</sub> (Métodos 4.1.2.1), se transformaron por choque térmico.

##### 4.1.3.1. Mediante choque térmico.

Este proceso consiste en provocar la entrada de DNA exógeno al someter las células competentes a cambios bruscos de temperatura.

Procedimiento:

1. Poner en contacto 200  $\mu$ l de células competentes con 1-500 ng del DNA a transformar contenidos en un volumen máximo de 20  $\mu$ l. Mantener la mezcla en hielo durante 30 minutos.
2. Someter la mezcla a un choque térmico por incubación a 37°C durante 5 minutos o 42°C durante 2 minutos, seguido de una nueva incubación de 2 minutos en hielo.
3. Añadir medio de cultivo LB (800 $\mu$ l LB/200  $\mu$ l células). Mezclar suavemente por inversión e incubar durante 1 hora a 37°C sin agitación.
4. Sembrar en placas de LB a las que se les ha añadido el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes. Incubar 12-16 horas a 37°C.

#### **4.1.3.2 Por electroporación.**

En este caso las células se procesan antes de someterlas al proceso de electroporación. Esta metodología se utilizó según la técnica descrita por Zabarovsky and Winberg, (1990).

Procedimiento:

1. Hacer crecer las células en 10 ml de medio LB hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,5.
2. Recoger las células por centrifugación a 4.500xg durante 10 minutos a 4 °C.
3. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 1 ml de glicerol estéril al 10%.
4. Poner en contacto en una cubeta de electroporación fría (Bio-Rad) 100  $\mu$ l de las células obtenidas anteriormente en glicerol al 10% y el DNA a transformar.
5. Realizar el choque eléctrico en el equipo Gene Pulser (Bio-Rad) por unos segundos.
6. Agregar rápidamente 1 ml de LB a la suspensión anterior y traspasarlo a un tubo Eppendorf.
7. Incubar durante 1 hora a 37°C.
8. Sembrar en placas de LB a las que se les ha añadido el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes. Incubar 12-16 horas a 37°C.

#### **4.1.4. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERIÓFAGO P1.**

Este proceso permite la transferencia de material genético de una cepa donadora a una receptora a través de la acción de un bacteriófago o fago. El método utilizado para la transducción generalizada con el bacteriófago P1 está basado en el método descrito por Goldberg et al. (1974).

#### **4.1.4.1. Preparación de un lisado P1.**

Los lisados se obtuvieron por crecimiento de la cepa donadora en presencia del fago P1 y  $\text{Ca}^{2+}$ . Este catión permite la adsorción del fago a la pared bacteriana y la posterior penetración del mismo en la célula huésped. El fago se replica en el interior de la cepa donadora incorporando en su genoma fragmentos de DNA de ésta y produciendo la lisis bacteriana.

##### Procedimiento:

1. Inocular la cepa donadora en un tubo con 2 ml de LB suplementado con el antibiótico apropiado e incubar a 37°C durante 12-16 horas en agitación.
2. Transferir 200  $\mu\text{l}$  de este cultivo a varios matraces con 10 ml de LB +  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Adicionar a cada matraz diluciones diferentes del bacteriófago P1 salvaje obtenidas a partir de una solución de concentración aproximada  $10^9$  PFU/ml e incubar a 37°C en agitación. Mantener un cultivo sin adición de fago como control.
3. Escoger el cultivo que haya lisado por completo en un periodo de 5 a 6 horas y adicionar a este cultivo unas gotas de cloroformo. Mantener en agitación a 37°C durante 30 minutos.
4. Centrifugar el cultivo durante 15 minutos a 12.000xg a 4°C.
5. Transferir el sobrenadante, que constituye el lisado P1, a un tubo estéril, adicionar unas gotas de cloroformo y guardar a 4°C.

#### **4.1.4.2. Transducción a genoma.**

Para llevar a cabo el proceso de transducción se sigue un proceso análogo al desarrollado para la obtención del lisado pero impidiendo, en este caso, que se produzca la lisis bacteriana. La infección se detiene mediante la adición de un agente quelante, citrato sódico, que secuestra el catión  $\text{Ca}^{2+}$ . De esta forma se favorece la lisogenia (incorporación del material fágico al cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga).

##### Procedimiento:

1. Inocular la cepa receptora en 2ml de LB +  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Incubar a 37°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial.
2. Mezclar en un tubo estéril células receptoras y la solución del fago P1 (obtenida sobre la cepa donadora de interés) en proporción 2:1 (v/v).
3. Incubar a 37°C sin agitación durante 30 minutos.
4. Añadir citrato sódico (concentración final de 20 mM). Mezclar y sembrar diferentes volúmenes en placas selectivas a las que se ha añadido citrato sódico 20 mM.
5. Incubar las placas a 37°C durante 12-16 horas.

6. Purificar los transductantes obtenidos usando el mismo tipo de placa (3 veces).

#### 4.1.5 CONJUGACIÓN.

La conjugación bacteriana es el proceso mediante el cual se transfiere material genético desde una bacteria donadora (HFr) a otra bacteria receptora (F<sup>-</sup>), promovido por determinados tipos de plásmidos y que requiere contacto directo entre ambas, con intervención de estructuras largas y delgadas denominadas pilis sexuales. Es a través de estas estructuras por donde tiene lugar la transferencia de material genético a la cepa receptora F<sup>-</sup>. Para que este proceso tenga lugar, las células donadoras han de contener las funciones implicadas en esta transferencia. En este trabajo se han utilizado las cepas donadoras *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* y *E. coli* EB6193  $\lambda$  *pir* en los procesos de conjugación llevados a cabo para la construcción de mutantes *knockout* mediante recombinación homóloga en la cepa receptora EcN.

Para seleccionar los transconjugantes se han de tener en cuenta dos factores. En primer lugar, disponer de un marcador contenido en el material que se transfiera (Ej. resistencia a antibióticos). En segundo lugar, un marcador de la cepa receptora que no se encuentre en la donadora (Ej. resistencia a antibióticos o capacidad de metabolizar determinados compuestos).

El protocolo de conjugación aplicado en este trabajo está basado en el propuesto por Biomedal. Se utilizó la cepa *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* que es termo-sensible, por lo que ha de ser incubada a 30°C. Se recomienda emplear esta cepa solamente para la conjugación, por lo que los plásmidos a transferir se han de mantener en otra cepa, como EB6193.

##### Procedimiento:

1. Inocular una colonia de *E. coli* S17  $\lambda$  *pir*, transformada con el plásmido que será transferido, y una colonia de la cepa receptora en 2 ml de LB suplementados con el antibiótico adecuado. Incubar los dos cultivos durante 12-16 horas, en constante agitación a temperatura adecuada.
2. Mezclar en 1ml de MgSO<sub>4</sub> 10mM los siguientes volúmenes de ambas cepas:
  - i. 25  $\mu$ l Donadora y 25  $\mu$ l Receptora (Proporción 1 Donadora: 1 Receptora)
  - ii. 50  $\mu$ l Donadora y 25  $\mu$ l Receptora (Proporción 2 Donadora: 1 Receptora)
  - iii. 25  $\mu$ l Donadora y 50  $\mu$ l Receptora (Proporción 1 Donadora: 2 Receptora)
3. Centrifugar a 5.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Resuspender el sedimento celular en 20  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y depositarlo, sin extenderlo, sobre una placa de LB. Incubar durante 12-16 horas a 30°C.
5. Recoger la mezcla de conjugación y resuspenderla en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
6. Centrifugar a 5.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

7. Resuspender el sedimento celular en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y extender 100 µl de diferentes diluciones en placas de selección. La mezcla de conjugación puede conservarse durante varias semanas a 4°C y durante varios meses a -80°C en glicerol 15% v/v.
8. Incubar las placas durante 12-16 horas a la temperatura adecuada.
9. Purificar las colonias de los transconjugantes en el mismo medio de selección.

En este trabajo el mayor número de transconjugantes se obtuvo siguiendo la proporción 2 Donadora: 1 Receptora.

#### **4.1.6 OBTENCIÓN DE MUTANTES.**

##### **4.1.6.1 Selección de mutantes espontáneos.**

La obtención de cepas bacterianas con resistencia a determinados antibióticos puede ser generada de forma espontánea cuando las bacterias son expuestas en su fase de crecimiento al antibiótico de interés. Es así que podemos obtener cepas bacterianas con dos o más resistencias, manteniendo siempre en las fases de crecimiento el antibiótico inicial.

Con la finalidad de realizar estudios de colonización bacteriana se seleccionaron mutantes espontáneos resistentes a estreptomina o a rifampicina. Las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron 100 µg/ml inicial hasta obtener cepas que toleraran los 2 mg/ml para la resistencia a estreptomina y 25 µg/ml para rifampicina. El procedimiento se detalla a continuación.

##### Procedimiento:

1. Crecer la cepa bacteriana en 2 ml de medio LB O/N en presencia del antibiótico de interés.
2. Centrifugar el cultivo 2 minutos a velocidad máxima.
3. Resuspender el sedimento bacteriano en 500 µl de medio LB.
4. Sembrar en placas de LB con el antibiótico.
5. Seleccionar las colonias y amplificar mediante PCR las cepas con resistencia a estreptomina con primers específicos para el gen *rpsL* y secuenciar el DNA para identificar el tipo de mutación incorporada.

##### **4.1.6.2 Mutantes knockout por disrupción génica.**

Para la construcción de un mutante *knockout* de *sat* se utilizó la metodología de disrupción génica mediante la introducción de un *cassette* de resistencia a cloramfenicol (Cm).

La región del gen *sat* que codifica el dominio secretado (3 kb) fue amplificada por PCR. El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pUC18Not utilizando las dianas *EcoRI* y *BamHI*. Por otra parte el gen *cat* que confiere resistencia a cloramfenicol (*cassette* Cm) fue obtenido a partir del plásmido pCAT19 mediante digestión con *SmaI* (enzima que deja extremos romos). Este fragmento fue purificado y clonado en la diana *SwaI* interna al gen *sat* clonado en pUC18Not, produciendo así la interrupción del marco de lectura del gen *sat*. El gen *sat* mutado por inserción del *cassette cat* fue obtenido partir de este plásmido recombinante mediante digestión con *NotI*. El fragmento resultante se subclonó en el plásmido suicida pUT-miniTn5 Tc y se transfirió a la cepa *E. coli* EB6193.

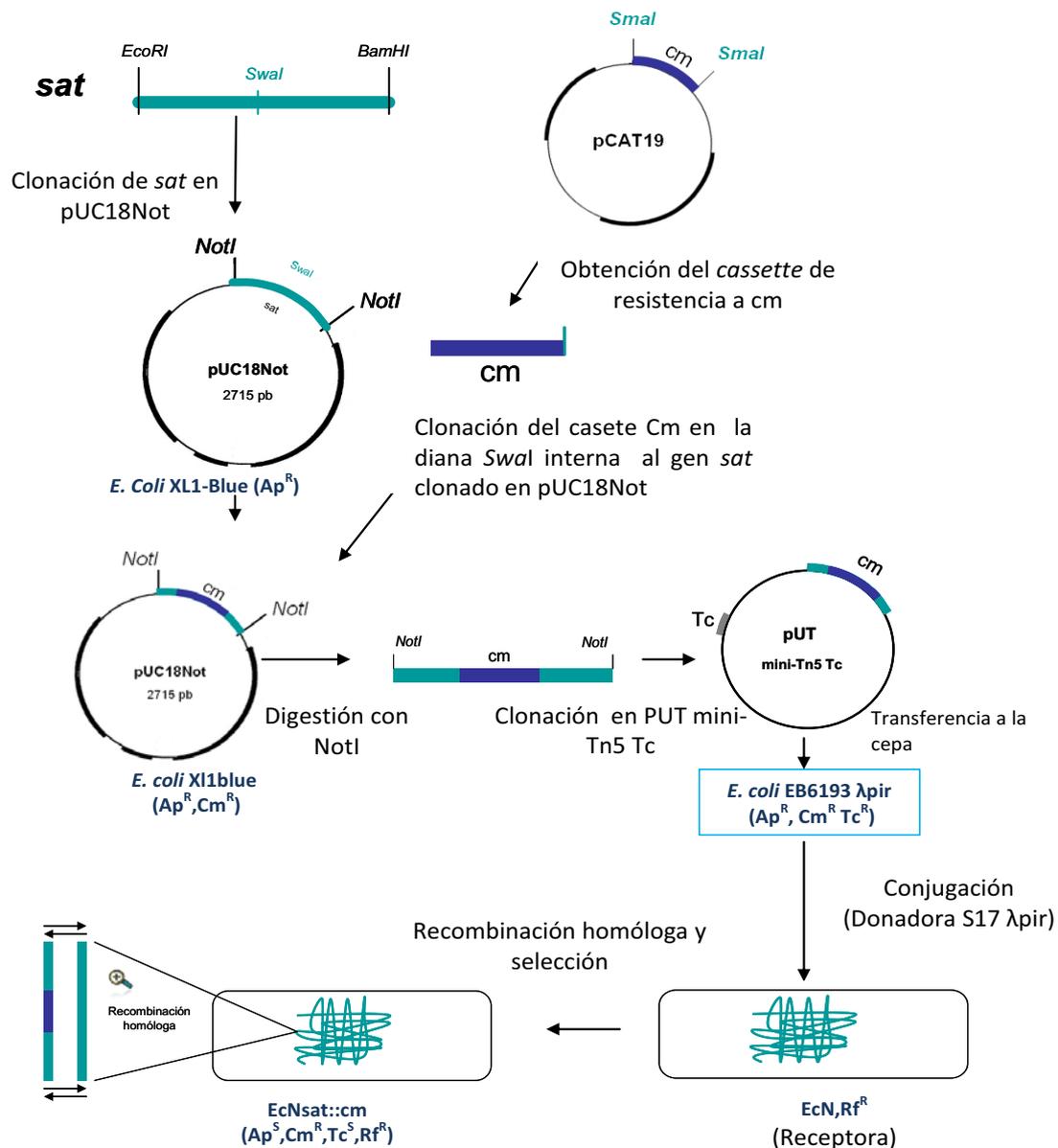
El inserto *sat::cm* fue transferido a la cepa EcN rifampicina resistente mediante conjugación, donde por recombinación homóloga se generó el mutante *knockout* EcN*sat::cm*. Después de la purificación de los transconjugantes, la correcta construcción del mutante *knockout* fue confirmada mediante PCR con *primers* que flanquean el gen *sat* y *primers* específicos del *cassette* Cm. El procedimiento general de este proceso se detalla a continuación.

#### Procedimiento:

1. Clonar el gen que se desea mutar en pUC18Not.
2. Digerir el vector pCAT19 utilizando enzimas que reconozcan dianas del *polykinker*. Estas dianas han de localizarse sólo una vez dentro del gen clonado, de tal manera que al interrumpir dicho gen queden, al menos, 500 bp a ambos lados del gen *cat*.
3. Clonar el gen *cat* en el plásmido recombinante que contiene el gen a mutar utilizando la/s enzima/s de restricción específicas de las dianas que se especifican en el punto 2.
4. Una vez construido el *cassette*, clonarlo en el vector pUTminiTn5Tc utilizando la diana *NotI*.
5. Transformar la cepa EB6193 con el producto de la ligación y sembrar la transformación en placas de LB suplementadas con Cm 20 µg/ml.
6. Identificar mediante PCR un clon que haya insertado el *cassette* de Cm y obtener su DNA plasmídico. Comprobar por digestiones enzimáticas y secuenciación la correcta inserción y orientación del *cassette* de Cm.
7. Transformar la cepa *E. coli* S17 λ *pir* con el plásmido circular pUTminiTn5Tc CAT y sembrar en placas de LB suplementadas con Cm 20 µg/ml y Tc 12,5 µg/ml.
8. Purificar una colonia de *E. coli* S17 λ *pir* pUTminiTn5Tc CAT en placas de LB suplementadas con Cm 20 µg/ml y Tc 12,5 µg/ml.
9. Realizar un proceso de conjugación entre *E. coli* S17 λ *pir* pUTminiTn5Tc CAT y EcN rifampicina resistente (Rif<sup>r</sup>). La mezcla de conjugación se siembra en placas de medio LB suplementadas con Cm 20 µg/ml y Rif 25 µg/ml. Incubar durante 48 horas a 30°C.
10. Purificar las colonias transconjugantes en las mismas placas de selección. Incubar durante 48 horas a 30°C.

11. Sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Cm 20  $\mu\text{g/ml}$  y Rif 25  $\mu\text{g/ml}$ . Incubar durante 12-16 horas a 30°C.
12. De nuevo sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Cm 20  $\mu\text{g/ml}$  y Rif 25  $\mu\text{g/ml}$ . Incubar durante 12-16 horas a 30°C. Repetir este proceso una vez más.
13. Comprobar la correcta recombinación del *cassette* mediante fenotipo y por PCR ( $\text{Ap}^S$ ,  $\text{Cm}^R$ ,  $\text{Tc}^S$ ,  $\text{Rif}^R$ ).

A continuación se presenta un esquema donde se explica la construcción del mutante *knockout* de *sat* por interrupción génica mediante inserción de un *cassette* de resistencia a cloramfenicol.



#### 4.1.6.3 Mutagénesis dirigida de DNA por PCR.

La técnica de PCR ha sido utilizada para la introducción de mutaciones puntuales de ciertos nucleótidos de una secuencia de DNA subclonada en un vector, lo que da como resultado un cambio de aminoácidos en la secuencia proteica.

El proceso básico utiliza un vector de DNA de doble cadena con el inserto de interés y dos oligonucleótidos cebadores complementarios entre sí, ambos con la mutación deseada en la región central de su secuencia. Cada uno de los cebadores es complementario a una hebra opuesta del vector. La enzima *PFU* Turbo DNA polimerasa es la encargada de extender la secuencia a partir de cada cebador durante los ciclos de amplificación por PCR. Los productos, al ser complementarios hibridarán entre sí formando un producto circular de doble cadena que contiene la mutación. La incorporación de los oligonucleótidos genera un plásmido mutado con mellas.

Tras la amplificación por PCR, el producto es tratado con la endonucleasa *DpnI*, que es específica para DNA metilado y hemimetilado, y es utilizada para digerir el DNA molde original. El DNA aislado de la mayoría de las cepas de *E. coli* esta *Dam* metilado y por ello es susceptible de digestión con *DpnI*. Sin embargo el DNA amplificado no esta metilado, así se selecciona el DNA sintetizado conteniendo la mutación. El vector con la mutación es introducido en células XL1-Blue competentes. Tras la transformación, las propias células repararán las mellas en el plásmido mutado.

Posteriormente, cuatro de los clones obtenidos de la transformación fueron crecidos en medio líquido LB con el antibiótico adecuado. Se obtuvo el DNA plasmídico, para secuenciar la cadena de DNA y confirmar la mutación esperada y la ausencia de otras mutaciones en dicha secuencia.

A la hora de diseñar los cebadores, se ha de tener una serie de consideraciones adicionales para este método en particular.

- Ambos cebadores deben contener la mutación deseada e hibridar a la misma secuencia en hebras opuestas del plásmido.
- La longitud de los cebadores debe ser próxima a las 20 bases.
- La mutación ha de estar en el centro de los oligonucleótidos.
- El contenido de G+C ha de ser del 40% aproximadamente.

#### Procedimiento:

1. Amplificar la región del DNA correspondiente al vector pBR322 y al gen *sat* completo con los cebadores que contienen la mutación deseada.
2. Verificar el producto de amplificación en un gel de agarosa al 1%. Debe verse una banda con el tamaño del producto de PCR deseado.

3. Purificar el producto de PCR desde el gel según el protocolo descrito en Métodos (4.8.9.2).
4. Digerir 5  $\mu$ l de DNA purificado con 1  $\mu$ l de enzima *DpnI* y el buffer adecuado a un volumen final de 15  $\mu$ l, incubar a 37 °C durante 2 horas.
5. Transformar la cepa XL1-Blue con la preparación anterior.
6. Seleccionar colonias en placas de LB, con el antibiótico adecuado.
7. Obtener DNA plasmídico.
8. Secuenciar el DNA y seleccionar aquellas colonias que presenten sólo la mutación deseada.

## 4.2. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

Las diferentes líneas celulares utilizadas en este trabajo se cultivaron a 37°C, en atmosfera humidificada y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el mantenimiento de los cultivos se utilizaban placas de 100 mm de diámetro (Corning TC) y cuando los cultivos alcanzaban un 80-90% de confluencia se procedía a su expansión por tripsinización. Para algunos ensayos en los que se requería la diferenciación celular, se utilizaron placas de 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup> (Corning TC). En este caso, una vez que los cultivos llegaban a completa confluencia, se procedía a renovar el medio de cultivo cada dos días, durante 21 días.

En los estudios de permeabilidad e integridad de la barrera celular con células diferenciadas, se utilizaron placas *Transwell* de 12 pocillos de 1,12 cm<sup>2</sup>, de tamaño de poro 0,4  $\mu$ m (Corning). El sistema *Transwell* está compuesto por dos compartimentos, la zona apical, donde se sembraban 0,1 ml de la suspensión celular en un volumen final de 0,5 ml de medio, a una densidad aproximada de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, para garantizar la formación de una monocapa, y la zona basolateral, donde se adicionaban 1,5 ml de medio de cultivo. Los cultivos se mantenían también durante 21 días post-confluencia, mediante renovación del medio cada dos días.

Para ensayos que debían ser analizados por microscopia óptica las células se sembraban sobre cubreobjetos de 20 mm de diámetro, depositados previamente en placas de 6 o 12 pocillos (Corning TC).

### 4.2.1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento y diferenciación de las células fue el medio DMEM GlutaMAX (GIBCO) convenientemente suplementado, tal como se describe en la tabla siguiente. La función principal del suero que se adiciona al medio es suministrar hormonas y factores de crecimiento necesarios para el cultivo. Puesto que en el suero se encuentra presente el sistema del complemento, constituido por 20 glicoproteínas con alta actividad proteolítica, era necesaria la inactivación por calor a

56°C, durante 1 hora, para no alterar la viabilidad celular. El suero inactivado se conservaba a -20°C hasta el momento de su utilización.

| MEDIO DMEM GLUTAMAX                    |      |
|--|------|
| Reactivo                               | ML   |
| DMEM GlutaMAX (Gibco)                  | 500  |
| Suero Fetal Bovino FBS (Gibco)         | 50   |
| Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco) | 5    |
| Penicilina-Estreptomicina 100X (Gibco) | 5    |
| Hepes 100X (Gibco)                     | 12,5 |

Para los ensayos de infección bacteriana, se utilizó un medio de infección que no contenía FBS, ni antibióticos, pero al que se le adicionaba manosa al 1% para prevenir la adhesión bacteriana (Guignot et al., 2000).

| MEDIO DE INFECCIÓN                     |      |
|--|------|
| Reactivo                               | ML   |
| DMEM GlutaMAX (Gibco)                  | 500  |
| Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco) | 5    |
| Manosa 1 % (Sigma)                     | 12,5 |

#### 4.2.2. EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS TRAS TRIPSINIZACIÓN.

Cuando las células cultivadas en placas alcanzaban una confluencia del 80-90% se subcultivaban tras el tratamiento con tripsina/EDTA al 0,05% (Sigma).

##### Procedimiento:

1. Atemperar la solución de tripsina/EDTA a 37°C durante 15 minutos.
2. Aspirar el medio de cultivo de la placa y lavar con 5ml de PBS.
3. Agregar 2 ml de la solución de tripsina e incubar a 37°C durante 5-10 minutos hasta lograr que las células se desprendan de la superficie de la placa.
4. Adicionar a la placa 4 ml de medio de cultivo, y mediante aspiración con una pipeta, facilitar que las células se separen y se visualicen al microscopio como entidades aisladas.
5. Depositar en una placa nueva 8 ml de medio de cultivo y adicionar el volumen necesario de la suspensión celular ( $4 \times 10^6$  células aproximadamente) para obtener un volumen final de 10 ml totales en la placa.
6. Agitar cuidadosamente las placas para que las células se distribuyan homogéneamente en la superficie.
7. Incubar las placas hasta que se alcance nuevamente la confluencia de 80-90%.

#### 4.2.3. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS.

El número de veces que se puede subcultivar una línea celular es limitado, por lo tanto es importante disponer de un *stock* de células, con un bajo número de subcultivos. Con este fin se procedió a la criopreservación de cultivos confluentes. Los pases de células para los ensayos fueron: Caco-2 (pases 10-20), HT29-MTX (pases 23-26).

##### Procedimiento:

1. Tripsinizar una placa al 80-90% de confluencia (Método 4.2.2.).
2. Diluir con medio de cultivo la resuspensión celular hasta un volumen final de 10 ml y traspasar a un tubo *Falcon*.
3. Centrifugar a 1.300 rpm durante 3 minutos para que sedimenten las células.
4. Aspirar el sobrenadante evitando arrastrar el sedimento celular.
5. Resuspender el sedimento celular con 1,5 ml de medio de cultivo y adicionar DMSO al 10% (150 $\mu$ l), homogenizando la mezcla con una pipeta.
6. Traspasar la mezcla a un tubo de criopreservación.
7. Congelar inmediatamente las células mediante gradiente de frío en un *criobox*, que al contener isopropanol permite un descenso de temperatura de -1 °C por minuto.
8. Mantener a -80°C un mínimo de 2 horas y transferir al tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

#### 4.2.4. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.

Para iniciar los cultivos a partir de alícuotas celulares criopreservadas se utilizó el siguiente procedimiento.

##### Procedimiento:

1. Descongelar gradualmente las células y diluir con medio de cultivo el contenido del criotubo hasta un volumen de 10 ml.
2. Centrifugar inmediatamente a 1.300 rpm durante 3 minutos a 4°C, y eliminar el sobrenadante, que contiene DMSO, ya que a temperatura ambiente es muy tóxico para las células.
3. Diluir el sedimento celular en 5 ml de medio de cultivo.
4. Depositar en una placa (100 mm de diámetro) 5 ml de medio y adicionar los 5 ml de la resuspensión celular.
5. Agitar cuidadosamente las placas para que las células se depositen homogéneamente en su superficie.
6. Incubar la placa a 37°C, durante 24 horas.
7. Aspirar el medio para retirar las células no viables y adicionar 10 ml de medio de cultivo convenientemente atemperado.
8. Incubar la placa a 37°C hasta que alcance una confluencia del 80-90%.

#### 4.2.5. RECUENTO DE CÉLULAS.

Para el recuento de células se utilizó un contador automático *Countes® Automated cell counter*. El principio de este equipo es similar al de un hemocitómetro y permite realizar recuentos de células viables al mezclarlas con una solución de *Tripán blue*.

##### Procedimiento:

1. Tripsinizar una placa al 80-90% de confluencia con 2 ml de solución de tripsina/EDTA.
2. Agregar 4 ml de medio de cultivo una vez que las células estén desprendidas de la placa y homogenizar la suspensión celular.
3. Mezclar en un tubo tipo eppendorf 10  $\mu$ l de diferentes diluciones de esta suspensión celular con 10  $\mu$ l del reactivo *Tripán blue*.
4. Depositar 10  $\mu$ l de la mezcla en el soporte de recuento del contador y determinar la concentración de células vivas, siguiendo las instrucciones del fabricante.
5. La viabilidad celular siempre fue superior al 90%.

#### 4.3. INFECCIÓN BACTERIANA DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

En este estudio se utilizó, como modelo *in vitro* de epitelio intestinal, cultivos en monocapa de células Caco-2 diferenciadas durante 21 días post-confluencia. Estos cultivos se infectaron con distintas cepas bacterianas para estudiar los efectos sobre las uniones estrechas intercelulares.

La infección bacteriana se llevaba a cabo con una multiplicidad (MOI) de 100 (1 célula: 100 bacterias). Para ello, fue necesario establecer una relación entre el crecimiento de los cultivos, medido por su  $DO_{600}$  y el número de UFC/ml de cultivo para las diferentes cepas. En la tabla siguiente se muestra dicha relación, obtenida en fase exponencial, a una  $DO_{600}$  de 0,5.

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| EcN        | = $1 \times 10^8$ UFC/ml |
| EcNsat::cm | = $1 \times 10^8$ UFC/ml |
| EPEC       | = $3 \times 10^8$ UFC/ml |

##### Tratamiento de los cultivos de células diferenciadas

1. Aspirar el medio de cultivo de las placas.
2. Lavar 3 veces con PBS para eliminar el medio residual y los restos de antibióticos que podrían interferir en el crecimiento bacteriano.

3. Adicionar a las placas *transwell* 1,5 ml de medio de infección ver (Método 4.2.1) en la zona basolateral y 0,5 ml en la zona apical con la suspensión bacteriana.

#### Tratamiento de los cultivos bacterianos

1. Cultivar las bacterias en 10 ml de medio LB (o DMEM en el caso de EPEC), suplementado con el antibiótico de selección al que las cepas presentan resistencia, hasta que alcancen una  $DO_{600}$  de 0,5.
2. Sedimentar las células por centrifugación a 4.500xg durante 10 minutos, a 4°C.
3. Resuspender cuidadosamente el sedimento bacteriano en 5 ml de medio de infección y calcular la dilución necesaria para que con 100  $\mu$ l de la suspensión se obtenga una MOI de 100.
4. Infectar las células eucariotas con la suspensión bacteriana durante 3 horas a 37°C en estufa con atmosfera humidificada y un 5% de  $CO_2$ .

## 4.4. ANÁLISIS DE LA PERMEABILIDAD PARACELULAR DE CÉLULAS Caco-2 DIFERENCIADAS.

La permeabilidad paracelular de monocapas de células Caco-2 diferenciadas se analizó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial y los flujos unidireccionales apical-basolateral de D-manitol en placas *transwell* (Martín-Venegas et al., 2011).

### 4.4.1. MEDIDA DE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL.

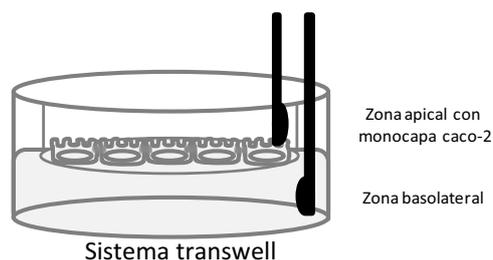
La capacidad de las células de formar uniones estrechas intercelulares da como resultado la llamada resistencia eléctrica transepitelial (TER) que es un indicador de confluencia y de integridad de la monocapa celular. La TER es medida a partir de la diferencia eléctrica que se genera entre el compartimiento apical y el basolateral, en un sistema de placas *transwell*. La TER aumenta a medida que las células crecen y forman uniones, y disminuye cuando dichas uniones son alteradas, como por ejemplo, por infección con patógenos entero-invasivos como *Salmonella sp.*

La TER se determinó mediante un voltímetro Millicell-ERS (Millipore, Bredford, MA) y se expresaba como  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  de área, de la superficie de la monocapa. A este valor se le tenía que sustraer la TER determinada en ausencia de la monocapa celular.

#### Procedimiento:

1. Tratar los cultivos de células diferenciadas en placas *transwell*, tal como se ha descrito en Métodos 4.3.
2. Medir la TER inicial procurando que el electrodo no toque las superficies de la placa ni la monocapa celular. La TER inicial debe ser superior a  $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Infectar los cultivos adicionando 0,1 ml de la suspensión bacteriana en la zona apical conteniendo  $2 \times 10^7$  bacterias.

3. Incubar a 37°C durante 3 horas.
4. Lavar 3 veces con PBS 1X y rellenar nuevamente la zona apical con 0,5 ml de medio DMEM.
5. Medir nuevamente la TER.



#### 4.4.2. MEDIDA DE LOS FLUJOS UNIDIRECCIONALES APICAL-BASOLATERAL DE D-MANITOL.

El paso de determinados compuestos, como el radiactivo  $^3\text{H}$ -Manitol, a través de la monocapa, se emplea para evaluar la integridad de la misma, ya que si ha ocurrido algún daño en las uniones intercelulares este daño permitirá el paso del compuesto radioactivo desde la zona apical del sistema transwell hacia la zona basolateral.

##### Procedimiento:

1. Extraer los pocillos de las placas transwell que contienen las monocapas de células diferenciadas y sumergirlos brevemente en un vaso de precipitados con tampón modificado de Krebs, a temperatura ambiente.
2. Depositar los pocillos sobre papel de filtro para eliminar el exceso de tampón y volver a introducirlos en una placa nueva.
3. Rellenar con tampón los compartimentos apical y basolateral con 0,5 ml y 1,5 ml, respectivamente.
4. Preincubar unos minutos la placa sobre una fuente de calor a 37°C.
5. Vaciar el compartimento apical y adicionar a cada pocillo, a intervalos de 10 segundos, 0,5 ml de una solución 0,2 mCi/ml de D-[2- $^3\text{H}$ ] manitol.
6. Incubar 15 minutos sobre la fuente de calor y traspasar alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  del compartimento basolateral de cada pocillo, a viales conteniendo 3 ml de líquido de centelleo. El contaje de la radioactividad se realizó en un contador de centelleo líquido (1500 Tri-Carb<sup>®</sup>, Packard, Downers Grove, IL).

| Medio de Krebs modificado(mmol/L)<br>pH7.4 |     |
|--|-----|
| NaCl                                       | 137 |
| KCl  | 5,4 |
| CaCl <sub>2</sub>                          | 2,8 |
| MgSO <sub>4</sub>                          | 1,0 |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>           | 0,3 |
| D-Glucosa                                  | 10  |
| Hepes/Tris                                 | 10  |

## 4.5. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

### 4.5.1 OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES CONCENTRADOS DE CULTIVOS BACTERIANOS.

La proteína Sat es una serin proteasa que se procesa en el interior de la célula y es secretada al medio extracelular. Para su estudio se obtuvieron sobrenadantes concentrados de cultivos bacterianos tal como se describe seguidamente.

#### Procedimiento:

1. Cultivar la cepa de estudio en matraces de 250 ml de medio LB, en presencia del correspondiente antibiótico de selección, hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,5.
2. Centrifugar los cultivos a 4.500g x10 minutos, a 4°C, y extraer los sobrenadantes.
3. Esterilizar los sobrenadantes mediante filtración a través de filtros de 0,22  $\mu$ m de poro.
4. Concentrar los sobrenadantes hasta un volumen de 1 ml, mediante filtros concentradores (Centricon-plus70) con un límite de exclusión de 100.000 Daltons.
5. Distribuir los sobrenadantes en alícuotas y conservar a -80°C hasta su uso.

### 4.5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.

Los extractos celulares se obtuvieron mediante disrupción por ultrasonidos según el procedimiento descrito por Boronat and Aguilar (1979).

#### Procedimiento

1. Cultivar la cepa de estudio en las condiciones que requiera el ensayo.
2. Sedimentar las bacterias por centrifugación a 4.500xg a 4°C durante 10 minutos.
3. Resuspender el sedimento bacteriano en un volumen de solución tampón equivalente a 4 veces su peso húmedo. La composición del tampón varía en función del ensayo.
4. Someter 1 ml de la suspensión celular a una descarga ultrasónica, a una amplitud de onda de 12-14 micrones, durante 20 segundos (sonicador MSE, de 150W). Repetir 4 veces a intervalos de 10 segundos.
5. Durante el proceso, mantener la muestra sumergida en una mezcla refrigerante compuesta de agua, hielo y NaCl.
6. Centrifugar el homogenizado a 12.000xg a 4°C durante 30 minutos.
7. Separar la fracción sobrenadante, que constituye el extracto celular o extracto crudo, y que corresponde a los compartimentos periplasmático y citosólico.

### 4.5.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY.

La cuantificación de proteínas en los extractos celulares y en los sobrenadantes de cultivos se determinó siguiendo una modificación del método descrito por Lowry et al.

(1951) que permite determinar la concentración de proteínas en el rango de 20-200  $\mu\text{g/ml}$ . Las determinaciones se hicieron por duplicado y a partir de diferentes diluciones de la muestra problema. El valor de concentración era la media de los valores obtenidos, siempre que éstos no se diferenciassen de la media en más de un 10%.

Procedimiento:

1. Preparar diferentes diluciones de albúmina (BSA) en el rango 20-200  $\mu\text{g/ml}$  con NaCl 0,9%. Estas muestras servirán para elaborar la recta patrón.
2. Realizar diferentes diluciones de la muestra problema con NaCl 0,9%.
3. Preparar alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de cada dilución patrón y muestra problema.
4. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de reactivo alcalino. Agitar y dejar en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 800  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin Ciocalteu 0,1 N y agitar vigorosamente.

| Reactivo alcalino   |           | Folin Ciocalteu   |  |
|---|-----------|---|--|
| Tartrato sódico potásico  | 10% p/v   | ½ del volumen final de Folin-Ciocalteu 2N                           |  |
| $\text{CuSO}_4$   | 0,05% p/v | ½ del volumen final de $\text{H}_2\text{O}$ destilada y desionizada |  |
| NaOH  | 0,5 M     |   |  |
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$  | 10% p/v   |   |  |
| *Preparar añadiendo los reactivos en el orden establecido en su composición para evitar la formación de un precipitado. |           |   |  |

#### 4.5.4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR PRECIPITACIÓN.

Cuando los niveles de proteína de los sobrenadantes de los cultivos no eran suficientemente elevados para realizar los ensayos, éstos se concentraban por precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

Procedimiento:

1. Precipitar las proteínas de la muestra de interés mediante la adición de TCA al 10%.
2. Incubar a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 hora como mínimo.
3. Centrifugar las proteínas precipitadas a 16.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.
4. Descartar el sobrenadante, lavar las proteínas con acetona fría al 90% y centrifugar a 16.000 rpm durante 30 minutos. Repetir el proceso.
5. Descartar el sobrenadante y eliminar la acetona residual por evaporación a  $37^\circ\text{C}$ .
6. Resuspender las proteínas precipitadas con el tampón adecuado para cada experimento.

#### 4.5.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

La determinación de actividades enzimáticas se hizo utilizando métodos espectrofotométricos o colorímetros empleando un espectrofotómetro termostatzado Shimadzu UV 1603 y un espectrómetro Tecan SunSise™, para la longitud de onda de 505 nm.

##### 4.5.5.1. Actividad $\beta$ -galactosidasa.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó según el método descrito por Miller (1992). El método se basa en el incremento de la absorbancia a 420 nm producido cuando la enzima, expresada por células en medio de cultivo, hidroliza el sustrato O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranoside (ONPG).

##### Procedimiento:

1. Obtener extractos celulares según Métodos 4.5.2.
2. Realizar una dilución 1/100 de los extractos con PBS 1X.
3. Mezclar 100  $\mu$ l de la dilución anterior con 900  $\mu$ l de tampon Z.
4. Añadir a la mezcla de reacción anterior 200  $\mu$ l de una solución de ONPG 4 mg/ml e Incubar a 28°C durante un período máximo de 20 minutos.
5. Detener la reacción por adición de 500  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Anotar el tiempo de reacción.
6. Determinar la absorbancia de la muestra a 420nm y 550nm.
7. Calcular la actividad enzimática de los extractos y expresarlos como nmol/min/mg proteína.

| Tampón Z                         |      |
|----------------------------------|------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 60mM |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 40mM |
| KCl                              | 10mM |
| MgSO <sub>4</sub>                | 1mM  |
| $\beta$ -mercaptoetanol          | 50mM |
| Ajustar a pH 7.0                 |      |

##### 4.5.5.2. Actividad Serin proteasa Sat.

Para determinar la actividad proteasa de la proteína Sat utilizamos el método de la p-nitroanilida (Benjelloun-Touimi et al., 1998). Este método utiliza un sustrato artificial el metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilida que al ser hidrolizado por la proteína a 37°C produce un compuesto cromógeno, cuya formación puede ser cuantificada por medida de la absorbancia a 405nm.

La reacción se llevó a cabo en placas multipocillos de 96 pocillos y se utilizó una concentración 0,1mM del sustrato en el tampón de reacción, cuya composición se describe a continuación:

| Tampón de reacción pH7.2 |        |
|--------------------------|--------|
| MOPS                     | 0,1M   |
| NaCl                     | 0,2M   |
| ZnSO4                    | 0,01mM |

Procedimiento:

1. Diluir con tampón de reacción hasta un volumen final de 200  $\mu$ l, alícuotas de los sobrenadantes concentrados (Método 4.5.1) conteniendo 200  $\mu$ g de proteína total.
2. Adicionar 10  $\mu$ l del sustrato preparado con tampón de reacción.
3. Incubar a 37°C durante 18 horas.
4. Determinar la DO<sub>505</sub>.
5. Determinar en igualdad de condiciones (control negativo) sobrenadantes previamente incubados, durante 30 minutos, con una concentración 1 mM del inhibidor de proteasas, PMSF.
6. Expresar la actividad enzimática en pmoles/ $\mu$ g de proteína, considerando que el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del compuesto sintético (p-nitroanilida) es:  

$$\epsilon = 8800 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

#### 4.5.6. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

##### 4.5.6.1 *Electroforesis Monodimensional.*

Se realizaron electroforesis monodimensionales en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) (Laemmli, 1970). Esta técnica se utiliza para separar proteínas en función de su masa molecular. Las proteínas en presencia del detergente aniónico SDS son desnaturalizadas y cargadas negativamente por lo que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico.

Para romper las interacciones no covalentes y los puentes disulfuro que pueden formar las proteínas, previo a su aplicación en el gel, se adiciona a las muestras el tampón de carga, que entre otros componentes contiene SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor. Seguidamente, se incuban las muestras a 95°C durante 5 minutos para que ocurra el proceso de desnaturalización.

En este trabajo se han utilizado geles con un porcentaje de acrilamida entre 8-12% en función del peso molecular de la proteína de interés. Para la preparación de los geles se empleó el *kit Mini PROTEAN® 3 Electrophoresis cell* (Bio-Rad).

Como marcador de peso molecular se ha utilizado el BENCHMARK™ *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) formado por una mezcla de proteínas de masa molecular comprendida entre 9.3 y 172.6 kDa. Para los geles teñidos tanto por nitrato de plata como por *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* se utilizó como marcador de proteínas el BENCHMARK™ *Protein Ladder* (Invitrogen) que abarca un intervalo comprendido entre 10 y 220kDa.

La composición de las soluciones utilizadas se muestra a continuación:

| Gel apilador                      |             | Tampón de carga para proteínas (4x) |             |
|-----------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| Tris-HCl pH 6.8                   | 0,13M       | Tris-HCl pH 6.8                     | 0,25M       |
| SDS                               | 0,1%        | SDS                                 | 8%          |
| Acrilamida:Bisacrilamida (37.5:1) | 4%          | Glicerol                            | 40%         |
| Persulfato amónico                | 0,16%       | β-mercaptoetanol                    | 20%         |
| TEMED                             | 0,075%(v/v) | Azul de bromofenol                  | 0,08% (p/v) |

| Gel separador                     |             | Tampón de electroforesis |       |
|-----------------------------------|-------------|--------------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8.9                   | 0,375M      | Tris-HCl pH 8.3          | 25mM  |
| SDS                               | 0,1%        | Glicina                  | 192mM |
| Acrilamida:Bisacrilamida (37.5:1) | 8-15%       | SDS                      | 0,1%  |
| Persulfato amónico                | 0,08%       |                          |       |
| TEMED                             | 0,075%(v/v) |                          |       |

La electroforesis se realiza a temperatura ambiente y se aplica un voltaje de 20 mA por cada gel de 0.75mm de grosor. Las proteínas se visualizan mediante tinción con azul brillante de *Coomassie*, colorante que permite detectar bandas proteicas a partir de 1 µg. Los geles pueden ser deshidratados al vacío mediante un desecador *SCIE-PLAS Gel Dryer Model GD4534*.

#### Procedimiento de tinción con azul de *Coomassie*

1. Separar el gel de los vidrios utilizados para la electroforesis.
2. Sumergir el gel en la solución de tinción. Mantener en agitación durante 10 minutos.
3. Desteñir el gel sumergiéndolo secuencialmente en la solución I y II, mediante agitación, durante 20 minutos.
4. Depositar el gel sobre papel de filtro y deshidratarlo al vacío.

|  | Tinción | Solución I | Solución II |
|--|---------|------------|-------------|
| Ácido acético glacial:Metanol:Agua destilada | 1:5:5   | 1:5:5      | 1:1:18      |
| Azul brillante de <i>Coomassie</i>           | 0,10%   | --         | --          |

En algunos casos las bandas fueron reveladas mediante tinción con nitrato de plata (*PlusOne Silver Staining Kit, GE Healthcare*) o *Sypro<sup>®</sup> Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes), siguiendo la instrucciones de cada fabricante. En otros casos, los geles se procesaron para posterior inmunodetección por *blot* (Método 4.5.7).

#### 4.5.6.2 Electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional (2D) es una técnica que permite analizar mezclas complejas de proteínas. La separación se hace en dos etapas consecutivas. En la primera etapa, o dimensión, las proteínas son separadas en función de su punto isoeléctrico (pI) a lo largo de un gel con gradiente de pH. Cada proteína avanza bajo la acción del campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH igual a su punto isoeléctrico. En una segunda etapa o dimensión, las proteínas son separadas entre sí en función de su masa molecular, en un gel de SDS-PAGE.

##### Procedimiento:

1. Preparar las muestras a analizar en tampón de rehidratación (RHB). La cantidad de proteína de la muestra aplicada puede variar de acuerdo con su procedencia y naturaleza.
2. Aplicar la muestra (125  $\mu$ l) en una tira de IPG (*Immobilized pH Gradiente*) (Bio-Rad) de 7 cm, de diferentes rangos de pH según cada experimento. Cubrir la tira con aceite mineral e hidratar a 20°C durante 12-16 sobre la placa *Peltier* (Bio-Rad).
3. Desarrollar el isoelectroenfoque utilizando el sistema *Protean IEF-Cell* (Bio-Rad), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.
4. Sumergir seguidamente la tira IPG en un tampón de equilibrado 1 durante 15 minutos.
5. Incubar la tira en el tampón de equilibrado 2 durante 15 minutos más.
6. Aplicar la tira equilibrada a un gel de poliacrilamida (el porcentaje de acrilamida varía según el experimento) y sellar el gel con solución de agarosa.
7. Visualizar las proteínas mediante métodos de tinción adecuados o por inmunodetección.

| Tampón de equilibrado 1 |         | Tampón de equilibrado 2 |         |
|-------------------------|---------|-------------------------|---------|
| Tris-HCl pH 8.8         | 0,375M  | Tris-HCl pH 8.8         | 0,375M  |
| DTT                     | 130mM   | Iodoacetamida           | 135mM   |
| Urea                    | 6M      | Urea                    | 6M      |
| Glicerol                | 20% v/v | Glicerol                | 20% v/v |
| SDS                     | 2% p/v  | SDS                     | 2% p/v  |

| Tampón de rehidratación (RHB)       |      | Solución de agarosa          |      |
|-------------------------------------|------|------------------------------|------|
| Urea                                | 9M   | Tampón de Electroforesis     | 25ml |
| CHAPS                               | 4%   | Agarosa                      | 0,5% |
| DTT                                 | 50mM | Trazas de azul de bromofenol |      |
| 100x Bio-lyte 3-10 <i>Ampholyte</i> | 5%   |                              |      |
| Trazas de azul de bromofenol        |      |                              |      |

#### 4.5.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN BLOT*.

Esta técnica permite detectar proteínas presentes en muestras biológicas mediante el empleo de anticuerpos específicos. El anticuerpo primario específico para Sat fue fabricado por GenScript: Anticuerpo policlonal de conejo, dirigido contra un péptido inmunogénico perteneciente a la fracción catalítica.

##### Procedimiento:

1. Someter la muestra a una separación electroforética.
2. Transferir las proteínas a una membrana *HyBond-P Polyvinylidene Difluoride* (PVDF) (GE Healthcare) a 4°C en un aparato de transferencia *Bio-Rad MiniTransblot Cell* (Bio-Rad), con tampón de transferencia durante 1 hora 40 minutos a 400mA y en constante agitación.
3. Bloquear la membrana con solución de bloqueo (PBS-Tween-20 al 0,05% y leche desnatada al 5%) a temperatura ambiente durante 40 minutos como mínimo.
4. Incubar la membrana con el anticuerpo primario específico (dilución 1/5000) para la proteína de interés a 4°C durante 12-16 horas. Diluir el anticuerpo en la misma solución de bloqueo. La dilución del anticuerpo puede variar según su pureza y especificidad.
5. Eliminar el exceso de anticuerpo primario, lavando la membrana con solución de lavado (PBS-Tween<sub>20</sub> 0,1%) durante 4 minutos, 4 veces.
6. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario, conjugado a peroxidasa. Diluir el anticuerpo en solución de bloqueo (dilución 1/15.000).
7. Eliminar el exceso de anticuerpo secundario lavando la membrana durante 4 minutos, 4 veces.
8. Finalmente, detectar el complejo proteína-anticuerpo por el *kit ECL™ Plus Western blot Detection System* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

| Tampón de transferencia |      |
|-------------------------|------|
| Tris-HCl                | 25mM |
| Glicina                 | 0,2M |

#### 4.5.8. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Las vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles*, OMVs) son liberadas al medio extracelular desde donde se pueden aislar según el protocolo descrito por Kadurugamuwa and Beveridge (1995). A partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos filtrados, las proteínas y vesículas del sobrenadante son concentradas y las vesículas son separadas a través de procesos de ultracentrifugación.

##### Procedimiento:

1. Cultivar la cepa a estudiar en el medio de interés según el experimento a realizar.
2. Recoger las bacterias por centrifugación a 4.500xg, 10 minutos a 4°C y reservar el sobrenadante, descartando las bacterias.
3. Esterilizar los sobrenadantes mediante filtración a través de filtros de 0,22 µm de poro.
4. Concentrar los sobrenadantes hasta un volumen de 3 ml, mediante filtros concentradores (Centricon-plus70) con un límite de exclusión de 10.000 Daltons. Una parte de este concentrado fue precipitado por TCA para el análisis de *Western blot*.
5. Ultracentrifugar los sobrenadantes concentrados a 150.000xg durante 3 horas a 4°C.
6. Recoger el sobrenadante que corresponde a las proteínas solubles secretadas al medio.
7. Resuspender el sedimento de que corresponde a la fracción de vesículas, en tampón TBS para volver a centrifugar.
8. Las fracciones de vesículas obtenidas fueron resuspendidas en Tris-HCL 20 mM pH 7,2.

#### 4.5.9. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Después de la electroforesis y la visualización de proteínas mediante el método de tinción adecuado, se recortaron las bandas o *spots* de interés y se enviaron a la Plataforma de Proteómica en el *Parc Científic* de Barcelona para su posterior identificación.

#### Procedimiento:

##### *Digestión en gel.*

Primeramente se realizó una limpieza de la muestra con tampón de bicarbonato de amonio (25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) y acetonitrilo. A continuación, la muestra fue sometida a reducción (DTT 10mM; 30 minutos, 56°C) y alquilación (iodoacetamida 55mM; 21°C, 15 min, en oscuridad). Finalmente las muestras se digirieron con tripsina porcina (Tripsina Gold, Promega; 80 ng/muestra; 37°C, O/N, 12horas, en el robot automático *Investigator Progest* (Genomic Solutions)). Los péptidos resultantes fueron extraídos de la matriz del gel mediante ácido fórmico al 10% y acetonitrilo, y fueron llevados a sequedad mediante el sistema *speed vac*.

##### *Análisis por LC-MS/MS.*

Los péptidos extraídos de las muestras resultantes del experimento de *cross-linking* con formaldehído fueron analizados por cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). Los datos generados en archivos PKL fueron enviados para su análisis en las bases de datos en un servidor MASCOT.

Para el resto de experimentos, la identificación de los péptidos se realizó mediante un sistema de HPLC *nanoAcquity* (Waters) acoplado a espectrómetro de masas *OrbitrapVelos* (Thermo Scientific). Mediante el análisis del archivo generado *raw data* se realizó la identificación a través del software *Proteome Discoverer* (v.1.2.0.208) y el motor de búsqueda *Sequest*.

## **4.6. COLONIZACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATONES CON CEPAS BACTERIANAS.**

Para estudiar el efecto *in vivo* que la expresión de la proteína Sat de la cepa probiótica EcN ejerce sobre la capacidad de colonización intestinal, se administraron por vía orogástrica suspensiones bacterianas de la cepa EcN estreptomicina resistente y del mutante *knockout* (EcN*sat::cm*) estreptomicina resistente a ratones machos CD-1, de 5-8 semanas de edad.

Después del tratamiento se determinó el número de bacterias de cada cepa, en las heces y en el mucus intestinal de los ratones.

Con el fin de aumentar la eficiencia de la infección, previamente los ratones eran tratados con estreptomicina para eliminar los microorganismos anaerobios facultativos de la microbiota, que competirían con las cepas administradas (Leatham et al., 2009). Además, previa infección, las heces de los ratones eran analizadas para descartar la

presencia de flora intestinal resistente a estreptomicina. Para el caso de estudios de expresión de fusiones de promotor, el procedimiento anterior fue modificado cambiando el antibiótico por ampicilina.

El procedimiento utilizado para este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del Departamento de agricultura, ramadería y pesca, de la Generalitat de Catalunya, con el número de orden DAAM6585.

#### Procedimiento de inoculación:

1. Adicionar 5 g/l de estreptomicina o ampicilina (según el experimento) en el agua de bebida de los ratones 24 horas antes de la infección.
2. Retirar el alimento de las jaulas durante 3 horas previa infección.
3. Administrar a los ratones, mediante sonda orogástrica, 200µl de las correspondientes cepas bacterianas resuspendidas en PBS, conteniendo  $1 \times 10^6$  UFC/ml.
4. Distribuir los ratones en sus jaulas reponiendo el alimento y manteniendo el antibiótico en el agua de bebida durante todo el proceso.

#### Procedimiento de obtención y tratamiento de heces

1. Agrupar y mantener los ratones durante 18 días después de la infección en sus correspondientes jaulas.
2. Separar los ratones en jaulas individuales durante 3 horas, cada dos días, a lo largo de estos 18 días, privados de agua y alimento.
3. Recolectar las heces de manera individual para cada ratón en tubos de ensayo previamente tarados y determinar su peso.
4. Homogenizar las heces en medio mínimo en una proporción de 1g/10 ml de SM, mediante agitación y la ayuda de una varilla de cristal.
5. Realizar diluciones seriadas y sembrar alícuotas de 100 µl en placas de LB conteniendo respectivamente los antibióticos de selección: estreptomicina y rifampicina para EcN, y estreptomicina, rifampicina y cloramfenicol para el mutante *knockout*.

#### Procedimiento de obtención y tratamiento del mucus intestinal

1. Sacrificar los ratones, transcurridos 18 días de la infección (para estudios de colonización) y 4 días (para estudios de expresión del promotor) mediante asfixia por CO<sub>2</sub>. Diseccionar los animales para extraer el tejido intestinal.
2. Lavar 3 veces la luz del tracto intestinal con 10 ml de PBS, mediante una jeringa.
3. Cortar una porción de 3 cm del íleon distal y otra porción del colon, de las zonas más próximas al ciego.
4. Depositar los tejidos sobre un cristal y con un portaobjetos raspar su superficie para extraer el mucus.
5. Transferir el mucus a tubos eppendorf estériles, previamente tarados, y determinar su peso. Mantener los tubos en hielo.

6. Resuspender el mucus en 1 ml de medio SM y proceder al recuento.

## 4.7. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.

### 4.7.1. TINCIONES DE CÉLULAS Y VESÍCULAS.

#### 4.7.1.1 *Tinción de Gram para células bacterianas.*

La tinción de Gram se aplica principalmente para identificar las bacterias en dos grupos según la composición de su pared celular: gram-positivos y gram- negativos.

La tinción de Gram requiere agua desionizada y cuatro soluciones diferentes: un colorante básico (cristal violeta), un mordiente (lugol), un decolorante (alcohol o una mezcla de alcohol y acetona) y un colorante de contraste (safranina).

Un mordiente es una sustancia que incrementa la afinidad entre la célula y el colorante y por tanto mejora la fijación del colorante a la célula.

El colorante de contraste es un colorante básico con un color distinto al del primer colorante empleado. Se utiliza para teñir las células que no han retenido el primer colorante después de ser desteñidas con alcohol.

#### Procedimiento:

1. Cultivar las células bacterianas en las condiciones de interés.
2. Para cultivos sólidos, poner una gota de agua en el portaobjetos, transferir una pequeña cantidad de cultivo con el asa de Kolle estéril y extender la suspensión. Para cultivos líquidos poner dos o tres gotas de cultivo con el asa en el portaobjetos y extender.
3. Sujetar el portaobjetos a un extremo con una pinza y fijar la preparación pasando el portaobjetos rápidamente por la llama de Bunsen diversas veces hasta que se observe que la preparación este completamente seca.
4. Empezar la tinción cubriendo la muestra con el colorante cristal violeta durante 1 minuto. Lavar con agua.
5. Cubrir la muestra con lugol durante 1 minuto. Lavar con agua.
6. Decolorar con etanol (10-20 segundos). Lavar con agua.
7. Teñir con safranina durante 1 minuto. Lavar nuevamente con agua.
8. Secar la preparación.
9. Analizar las preparaciones mediante microscopia.

#### 4.7.1.2 *Tinción de Giemsa para células eucariotas y bacterias.*

La tinción de Giemsa es una de las tinciones derivadas de la tinción de Romanowsky. El colorante está constituido por azul de metileno, eosina y varios azules en solución

acuosa y es utilizada generalmente para tinción de frotis sanguíneos ya que es capaz de teñir de diferentes tonalidades las estructuras celulares. El núcleo se observa de un color azul intenso mientras que el citoplasma de un azul claro. Esta técnica también permite identificar bacterias coloreadas de color azul intenso.

Procedimiento:

1. Fijar las células con 0,2 ml de metanol al 70% (v/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Aspirar el metanol y teñir con el colorante Giemsa diluido al 10% durante 15 minutos.
3. Lavar con abundante agua destilada hasta que el sobrenadante se vea limpio y sin restos de colorante.
4. Secar la preparación y observar en microscopio óptico con aceite de inmersión.

| Stock Giemsa concentrado |        | Giemsa 10%   |       |
|--------------------------|--------|--------------|-------|
| Giemsa                   | 3,8 g  | Giemsa Stock | 10 ml |
| Glicerol                 | 250 ml | Glicerol     | 10 ml |
| Metanol                  | 250 ml | Metanol      | 80 ml |

Diluir el colorante en metanol y calentar a 60°C, agregar el glicerol y filtrar.

#### **4.7.1.3 Tinción negativa para observación de vesículas.**

La tinción negativa se basa en la observación de la muestra por adición de metales pesados, que tienen la capacidad de ocupar las regiones hidratadas de la superficie y el interior de la muestra pero no se une a esta.

Procedimiento:

1. Preparar una rejilla con 15 µl de la muestra a observar y dejar secar.
2. Depositar 50 µl de H<sub>2</sub>O dejar secar
3. Incubar la rejilla con 50 µl de acetato de uracilo durante un minuto, retirar el exceso de colorante y guardar en un desecador, hasta el momento de la observación al microscopio.

#### **4.7.2. VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS, FUSIONADAS A GFP POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.**

La expresión de las fusiones transcripcionales de *sat* al gen reportero *gfp* fue analizada utilizando un microscopio de fluorescencia (Modelo Leica D1000), a una longitud de excitación de 460-470nm.

Procedimiento:

1. Recoger las bacterias crecidas en fase exponencial en diferentes medios de cultivos (LB, DMEM o SM-glucosa) y a diferentes temperaturas (25°C y 37°C). Las bacterias también podían ser aisladas de heces o raspado de mucus de ratones infectados.
2. Centrifugar las bacterias a máxima velocidad a 12.000 rpm durante 2 minutos.
3. Depositar el pellet bacteriano entre un portaobjeto y cubreobjeto.
4. Visualizar las muestras directamente en el microscopio de fluorescencia.

## 4.8. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.

Se siguieron los protocolos estándar descritos por Sambrook and Russell (2001).

### 4.8.1 OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Para la obtención de DNA genómico se ha utilizado el *kit* comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). La obtención del DNA genómico fue efectuada partiendo de 2 ml de cultivo de la cepa de interés, en fase estacionaria, siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial para bacterias gram-negativas.

### 4.8.2 OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

Para obtener DNA plasmídico a pequeña y media escala se utilizaron respectivamente, el *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* y el *kit Wizard™ Plus SV Midipreps DNA Purification System* (Promega), tal como se describe en el protocolo de la casa comercial.

### 4.8.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA.

La digestión del DNA se llevó a cabo mediante enzimas de restricción siguiendo las indicaciones de las casas comerciales y utilizando tampones específicos para cada enzima. Se recomienda la utilización de 1U de enzima por 1 µg de DNA, incubando como mínimo durante 1 hora a la temperatura adecuada para cada enzima. Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo son termosensibles por lo que se inactivaron a 65°C durante 15 minutos.

Los productos de la reacción se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

### 4.8.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.

La reacción de ligación consiste en la unión de los fragmentos de DNA mediante una reacción enzimática. Se utiliza DNA ligasa del bacteriófago T4, enzima que cataliza la

formación de enlaces fosfodiéster entre los grupos 5'-fosfato y el grupo 3'-hidroxilo terminales de fragmentos de DNA, en presencia de ATP y  $Mg^{2+}$ .

Procedimiento:

1. Preparar convenientemente tanto el vector como el inserto para la ligación (digestión).
2. Determinar la concentración de vector e inserto.
3. Preparar la reacción de ligación según las siguientes proporciones:

| Mezcla de reacción                  |
|-------------------------------------|
| DNA vector variable <sup>(1)</sup>  |
| DNA inserto variable <sup>(2)</sup> |
| T4 DNA ligasa 1U                    |
| Tampón de ligación 1x               |

<sup>(1)</sup>Normalmente 100ng

<sup>(2)</sup>La cantidad de inserto a ligar se calcula según la siguiente fórmula:

$$ng \text{ inserto} = \text{tamaño de inserto}(kb) \times \frac{ng \text{ vector}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

(Habitualmente se utilizó una relación molar vector: inserto de 1:3)

4. Incubar la mezcla de reacción durante toda la noche a temperatura ambiente.

#### 4.8.5. REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR).

La técnica de PCR desarrollada en 1983 por Kary Mullis y posteriormente publicada por Saiki et al. (1985), se utiliza para amplificar fragmentos de DNA a partir de un DNA molde. La región de DNA a amplificar queda limitada por la secuencia de los dos oligonucleótidos utilizados que son complementarios a cada una de las cadenas de DNA. Estos oligonucleótidos funcionan como cebadores para la síntesis del DNA por la DNA polimerasa.

La secuencia de los cebadores utilizados depende del fragmento que se desea amplificar. De forma general, los cebadores han de ser específicos, deben de tener de 18 a 25 nucleótidos, presentar entre 50-70% de residuos G/C y no formar dímeros o estructuras secundarias. En algunos casos, para facilitar la clonación dirigida del fragmento de PCR, los cebadores contenían en su extremo 5', la secuencia específica de reconocimiento para una enzima de restricción.

Se utilizan polimerasas termoestables. En este trabajo se ha utilizado de forma general la *taq Biotools DNA Polymerase* (Biotools), excepto cuando se requería una alta

fidelidad o que los fragmentos de DNA amplificados tuviesen los extremos romos; en estos casos se utilizó la *Pfu Turbo™ DNA Polymerase* (Stratagene). Las reacciones de PCR son muy susceptibles al tipo de DNA molde utilizado, así como a la concentración de  $Mg^{2+}$ , cebadores y dNTPs. Por este motivo, no existe un protocolo generalizado, sino que cada reacción necesita ser puesta a punto. Básicamente se siguió el protocolo descrito por Sambrook and Russell (2001).

Procedimiento:

Preparar la mezcla de reacción en tubos de 0,5 ml de capacidad y colocar en el termociclador.

| Mezcla de reacción           |                         |
|------------------------------|-------------------------|
| DNA molde                    | variable <sup>(1)</sup> |
| <i>Primer forward</i>        | 0,025 mM                |
| <i>Primer reverse</i>        | 0,025 mM                |
| DNTPs                        | 0,2 mM                  |
| DNA polimerasa               | 2,5U                    |
| Tampón de amplificación      | 1x                      |
| $Mg^{2+}$ <sup>(2)</sup>     | 1,5-4 mM                |
| H <sub>2</sub> O desionizada | csp <sup>(3)</sup>      |

<sup>(1)</sup> 2ng de DNA genómico, 50ng de DNA plasmídico o una colonia bacteriana.

<sup>(2)</sup> Siempre y cuando no estuviere incluido en el tampón de reacción.

<sup>(3)</sup> Volumen final de 100µl para la obtención de fragmentos de DNA y 20µl para el análisis de clones recombinantes.

1. Desnaturalizar el DNA molde a 94°C (1 minuto para DNA plasmídico y 5 minutos para DNA genómico libre o si se utiliza directamente colonia bacteriana).
2. Aplicar un número variable de ciclos (20-30) con los siguientes pasos:
  - i. Desnaturalización del DNA: 94°C, durante 45 segundos.
  - ii. Unión de los cebadores: 45 segundos a la  $T_m$  óptima (específica para cada pareja de cebadores).
  - iii. Extensión: 72°C durante el tiempo necesario (1 minuto por cada 1Kb excepto cuando se utiliza la enzima *Pfu* (enzima altamente termoestable) que amplifica 1Kb cada 2 minutos aproximadamente).
3. Aplicar un último ciclo de extensión durante 10 minutos y a 72°C.
4. Purificar el DNA obtenido.

Las reacciones se realizaron en dos modelos diferentes de termociclador: *Eppendorf Mastercycler 5330* (Eppendorf) y *MiniCycler™* (MJ Research).

#### 4.8.6. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.

La técnica de PCR se utilizó para la obtención de fragmentos de DNA que posteriormente fueron clonados en diferentes plásmidos. Para comprobar que durante el proceso de amplificación la DNA polimerasa no hubiese introducido mutaciones, todos los fragmentos obtenidos mediante esta técnica fueron secuenciados (Método 4.8.8).

#### 4.8.7. SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES.

La técnica de PCR también permite la selección de clones recombinantes que provienen de la ligación entre un fragmento de DNA y un vector de clonación. Para ello se puede utilizar una pareja de cebadores pertenecientes al vector de clonación, o bien, un cebador del vector y otro del fragmento clonado.

Esta técnica no requiere la obtención previa del DNA plasmídico recombinante, ya que es posible llevarla a cabo directamente utilizando colonias bacterianas.

#### 4.8.8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA.

Para la secuenciación automática de los fragmentos de DNA se ha seguido el protocolo descrito en el *kit ABI Prism Big Dye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (PE Biosystems). En este sistema, se añaden cuatro ddNTPs a la mezcla de PCR, dónde cada ddNTPs está marcado con un fluoróforo que emite a diferente longitud de onda. La fluorescencia incorporada a las cadenas de DNA sintetizadas fue determinada por el secuenciador *377 DNA Sequencer, ABI Prism de Perkin Elmer (Serveis Científic-tècnics de la Universitat de Barcelona)*.

| Condiciones de PCR |              | Mezcla de reacción           |               |
|--------------------|--------------|------------------------------|---------------|
| 1. 96°C            | 1 min 30 seg | <i>Mix terminator (Kit)</i>  | 1.5µl         |
| 2. 96°C            | 30 seg       | Oligonucleótidos (10µM)      | 0.5µl (5pmol) |
| 3. 50°C            | 30 seg       | DNA a secuenciar             | 0.5µg         |
| 4. 60°C            | 4 min        | H <sub>2</sub> O desionizada | csp 10µl      |
| 5. 30 ciclos       | (Paso 2 a 4) |                              |               |

#### 4.8.9. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.

##### 4.8.9.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa mediante electroforesis.

La electroforesis en geles de agarosa permite la separación de fragmentos de DNA en función de su tamaño. El DNA es una molécula cargada negativamente y se desplaza

hacia el ánodo en la matriz de agarosa al aplicar una corriente eléctrica. La concentración de agarosa del gel determina la resolución de los fragmentos de DNA a separar. La movilidad del DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño. En este trabajo se han utilizado geles de agarosa preparados al 1% (p/v).

La visualización de los fragmentos de DNA se ha llevado a cabo mediante la incorporación de bromuro de etidio (1 µg/ml; Sigma Aldrich) al gel de agarosa y la posterior detección en un transiluminador con luz UV. Como marcador de tamaño se utilizó DNA del fago λ digerido con *HindIII* (MBI Fermentas) para bandas mayores de 2 Kb, o el marcador de 100 pb (Invitrogen Life Technologies) para tamaños inferiores.

Antes de aplicar las muestras se les adicionaba tampón de carga que contiene glicerol y que aporta la densidad adecuada para depositarlas en los pocillos del gel. Además, contiene un colorante que permite seguir el frente de la electroforesis. La electroforesis se desarrolló a 80-90V y a temperatura ambiente.

| Tampón de electroforesis (TAE 50x) |      | Tampón de carga    |    |
|------------------------------------|------|--------------------|----|
| Tris base                          | 5M   | Glicerol           | 5% |
| Ácido acético glacial              | 1M   | Azul de bromofenol | 5% |
| EDTA                               | 50mM |                    |    |
| Ajustar pH a 8.0                   |      |                    |    |

#### **4.8.9.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.**

Las bandas de interés separadas en un gel de agarosa eran recortadas y el DNA purificado con el *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (QIAGEN) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

#### **4.8.9.3. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.**

Para eliminar los cebadores, nucleótidos, sales y DNA polimerasa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR se empleaba el *kit QIAquick™ PCR Purification Kit* (QIAGEN), tal como describe el fabricante.

#### **4.8.10. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA (OBTENCIÓN DE DNA RECOMBINANTE).**

El primer paso consiste en la obtención del vector de clonación y del inserto que se desea clonar. El inserto puede obtenerse mediante la técnica de PCR o por digestión a partir de otro plásmido recombinante y posterior purificación. A continuación, inserto y vector, deben ser digeridos con las enzimas de restricción adecuadas para la obtención de moléculas con extremos compatibles. Seguidamente se procede a la

ligación de ambos DNAs por acción de la T4 DNA ligasa (*Fast-Link™ Ligase*) y posteriormente, el producto de ligación es introducido en células de *E. coli* competentes preparadas a partir de la cepa adecuada. Entre las colonias crecidas en placas de selección, se identifican los clones recombinantes mediante PCR y posteriormente se aísla el DNA plasmídico para su posterior análisis.

## 4.9 CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES.

### 4.9.1. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN *lacZ*.

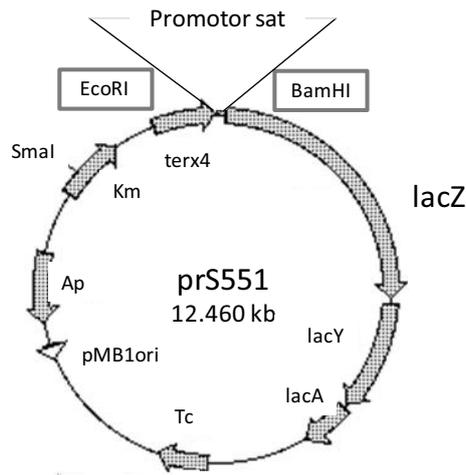
La fusión de promotores al gen *lacZ* es una técnica que permite estudiar la regulación de la transcripción de genes. Mediante esta técnica es posible analizar la expresión del gen o genes en estudio a través de la expresión del gen marcador *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cuantificable mediante un ensayo sencillo y sensible.

En este trabajo, se procedió a obtener fusiones del promotor del gen *sat* al gen *lacZ* ( $\phi(\textit{sat-lacZ})$ ) con la finalidad de estudiar *in vitro* la expresión del gen en condiciones que simulen las del tracto gastrointestinal. En primer lugar se obtuvieron las fusiones de promotor en forma de multicopia en los vectores de la familia pRS (Simons et al., 1987) y a continuación se transfirieron al genoma de diferentes cepas  $\Delta\textit{lac}$  en forma de monocopia (Elliott, 1992).

#### 4.9.1.1 Obtención de la fusión de promotor *sat-lacZ* en vector multicopia.

El vector utilizado para obtener la fusión del promotor *sat* al gen *lacZ* ( $\phi(\textit{sat-lacZ})$ ) pertenece a la familia pRS descrita por Simons et al. (1987). En concreto se utilizó el plásmido multicopia pRS551.

El fragmento de DNA correspondiente al promotor de *Sat* (-939 a +60, posiciones respecto al ATG) fue amplificado mediante PCR, utilizando una pareja de cebadores que incorporaban las dianas para las endonucleasas de restricción *BamHI* y *EcoRI* en sus respectivos extremos 5'. De esta forma se facilitaba la posterior clonación que podía realizarse de forma dirigida. El plásmido recombinante fue secuenciado para descartar mutaciones introducidas durante el proceso de amplificación.



Construcción de la fusión del promotor del gen *sat* en el plásmido prS551.

#### 4.9.1.2 Transferencia de fusiones de promotor al genoma bacteriano.

Las  $\phi$ (*sat-lacZ*) fueron transferidas de plásmido a genoma bacteriano según el método descrito por Elliott (1992). En primer lugar la fusión se transfirió al genoma de la cepa TE2680 para a continuación, mediante un lisado P1, transferirla a la cepa en cuyo fondo genómico se quería estudiar la actividad promotora.

La cepa TE2680 contiene una mutación en el gen *recD*. La deficiencia del gen *recD* permite una eficiente recombinación de DNA lineal con regiones homólogas presentes en su cromosoma. En concreto, la cepa TE2680 contiene, insertado a nivel del operón triptófano, el gen de resistencia al antibiótico cloramfenicol, flanqueado en 5' por el gen de resistencia a kanamicina (aunque con una mutación que produce un fenotipo kanamicina<sup>S</sup>) y en 3' por los genes *lacZ* y *lacY*. De esta forma, cuando se transforma la cepa TE2680 con DNA de un plásmido recombinante derivado de prS551, previamente linealizado, se produce la recombinación homóloga entre los genes *kan* y *lacZ* del plásmido y del cromosoma bacteriano, de manera que el gen de resistencia a cloramfenicol es sustituido por la fusión de promotor presente en el vector. La selección de las cepas recombinantes se lleva a cabo analizando su fenotipo según la siguiente pauta:

**Kanamicina<sup>R</sup>:** Las cepas recombinantes son resistentes al antibiótico kanamicina ya que el gen *kan* mutado presente en la cepa TE2680 ha sido sustituido por el gen funcional procedente del plásmido pRS.

**Cloramfenicol<sup>S</sup>:** Puesto que el gen que codifica la resistencia al antibiótico cloramfenicol se ha perdido al producirse la recombinación homóloga, las cepas recombinantes son sensibles a este antibiótico.

Ampicilina<sup>S</sup>: Las cepas recombinantes son sensibles al antibiótico ampicilina ya que el gen *bla* presente en el plásmido pRS551 no recombina.

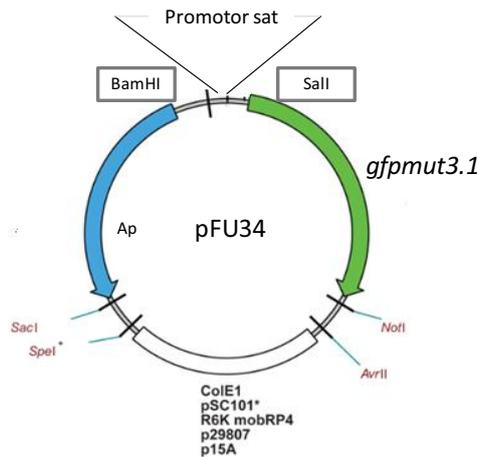
Hemos tenido en cuenta que todas las cepas portadoras en su genoma de la  $\phi$ (*sat-lacZ*) presentaban auxotrofia para triptófano, ya que la construcción se localiza interrumpiendo la región cromosómica donde se localizan los genes implicados en la biosíntesis de este aminoácido.

Para la obtención de la fusión monocopia, primeramente se linealizó el DNA del plásmido que contiene la  $\phi$ (*sat-lacZ*) con la endonucleasa de restricción *XhoI*. La secuencia reconocida por esta enzima de restricción está situada fuera de la región delimitada por los genes *kan* y *lacZ* (la región donde ha sido clonado el promotor objeto de estudio y que ha de recombinar con el cromosoma de la cepa TE2680). Se transformó la cepa TE2680 con el DNA lineal (Método 4.1.3.1) y se sembró en placas de LB-kanamicina. Se comprobó el fenotipo de las colonias recombinantes en placas conteniendo ampicilina y cloramfenicol. Se seleccionaron colonias con fenotipo kanamicina<sup>R</sup>, cloramfenicol<sup>S</sup>, ampicilina<sup>S</sup>. A partir de una de estas colonias se realizó un lisado P1 (Método 4.1.4.1) para poder transferir la fusión a la cepa en cuyo fondo genómico se pretendía estudiar la actividad del promotor, concretamente en las cepas EcN  $\Delta$ *lacZ* y MC4100.

#### 4.9.2. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN *gfpmut3.2*.

Para estudiar la expresión de *sat* en modelos *in vivo* se clonó el promotor de este gen en un plásmido de la serie PFU. Esta serie de plásmidos contienen un *polilinker* con múltiples dianas de restricción y se diferencia en el gen reportero. En este caso se utilizó el plásmido pFU34, que lleva como marcador el gen de resistencia a ampicilina y como gen reportero el gen *gfpmut3.1*. Este gen expresa una versión mutada de la proteína *Green fluorescent protein (GFP)* que emite más fluorescencia que la proteína no mutada, adecuada para el análisis en células bacterianas (Uliczka et al., 2011).

El promotor amplificado correspondió a un fragmento de 349 pb por delante del codón ATG, conteniendo en sus extremos las dianas de restricción para las enzimas *BamHI* y *Sall* respectivamente.



Fusión del promotor de *sat*, en el plásmido PFU34 para expresión de la proteína GFP.

#### Procedimiento:

1. Amplificar la región promotora de *sat* por PCR.
2. Purificar el fragmento amplificado con el kit Qiagen.
3. Digerir el inserto y el vector con las dos enzimas de restricción seleccionadas.
4. Inactivar las enzimas por incubación a 65°C durante 15 minutos.
5. Purificar los productos de digestión y proceder a su ligación utilizando el kit Fastlink
6. Transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue con el producto de la ligación e incubar en placas de LB-Ampicilina.
7. Seleccionar las colonias que contienen el plásmido recombinante mediante PCR.
8. Obtener el DNA plasmídico y secuenciar.

#### **4.10. FORMACION DE BIOFILMS.**

*Biofilms* o biopelículas puede ser definido como una comunidad de microorganismos unidos de forma irreversible a una superficie y que producen una sustancia polimérica extracelular exhibiendo un estado metabólico alterado comparado con el crecimiento planctónico. (Lindsay and von Holy, 2006).

Este método de crecimiento aumenta la obtención de nutrientes favoreciendo la colonización, permitiendo la cooperación entre las cepas bacterianas y aportando protección frente a los mecanismos de defensa del huésped o a sustancias antimicrobianas (Jefferson, 2004)

En este trabajo se evaluó la capacidad productora de *biofilms* entre las cepas probióticas EcN y EcN*sat::cm*.

La formación de *biofilms* en este trabajo se estudió en presencia o ausencia de mucina Tipo II (Sigma) para evaluar si la presencia de este compuesto aumenta la adherencia

bacteriana a células Caco-2. Para ello se incubaron las células Caco-2 a confluencia de 90% con una solución de PBS1X en presencia o ausencia de mucina a 0.5 mg/ml durante 1 hora a 37°C previo a la infección bacteriana. En el caso de superficies abióticas la mucina fue adicionada directamente sobre los soportes a estudiar a igual concentración, temperatura y tiempo a los anteriormente señalados.

#### 4.10.1 FORMACIÓN DE *BIOFILMS* EN SUPERFICIES ABIÓTICAS.

Para evaluar la formación de *biofilms* en superficies abióticas utilizamos:

Placas de poliestireno de 96 pocillos (Microlon), con un volumen de ensayo de 150µl totales.

##### Procedimiento:

1. Inocular la cepa a estudiar en 2 ml de medio LB a 37°C O/N.
2. Las DO<sub>600</sub> de los cultivos fue igualada para obtener similares concentraciones de las cepas EcN y la cepa EcNsat::cm.
3. Realizar una dilución 1/100 de las cepas en LB y adicionar 150 µl a cada soporte tratado o no con mucina.
4. Incubar los soportes con el cultivo bacteriano durante 24 horas a 37°C sin agitación.
5. Determinar la DO<sub>600</sub> del crecimiento bacteriano en lector de placas Modulus microplate (Biosystems).
6. Aspirar el medio, lavar los pocillos tres veces con agua destilada y secar las placas a 37°C durante 20 minutos.
7. Teñir los *biofilms* adheridos en los pocillos con 150 µl de cristal violeta al 1% (Panreac) durante 5 minutos.
8. Retirar el colorante y lavar 4 veces con agua destilada.
9. Secar las placas a temperatura ambiente durante 1 hora, y diluir el cristal violeta adherido a las bacterias con 150 µl de etanol absoluto (Panreac).
10. Leer la DO<sub>570</sub> transcurridos 5 minutos. El color desarrollado será proporcional a la cantidad de bacterias adheridas al pocillo.

La formación específica de *biofilms* fue determinada según la metodología descrita por Niu and Gilbert (2004) según la siguiente fórmula:

$$FEB = (DO_{570} \text{ bacterias} - DO_{570} \text{ control}) / DO_{600} \text{ Cultivo}$$

FEB= índice de formación específica de biopelícula o *biofilms*. DO<sub>570</sub> bacterias adheridas. DO<sub>570</sub> control (sólo medio de cultivo sin bacterias) para eliminar valores inespecíficos o abióticos. DO<sub>600</sub> cultivo del crecimiento bacteriano en el medio.

#### 4.10.2 FORMACIÓN DE *BIOFILMS* EN SUPERFICIES BIÓTICAS.

Para estudiar la formación de *biofilms* en superficies bióticas se utilizaron células Caco-2 y mezclas celulares en proporción 9:1 de células Caco-2 y HT29-MTX respectivamente.

Las células fueron sembradas a una concentración final de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 12 pocillos. Las células llegaron a confluencia y fueron diferenciadas durante 21 días.

##### Procedimiento:

1. Lavar las placas de los cultivos celulares diferenciados con o sin tratamiento de mucina 3 veces con PBS.
2. Adicionar las bacterias a una MOI de 100 e incubar durante 3 horas a 37°C.
3. Aspirar los cultivos para eliminar las bacterias no adheridas y lavar 3 veces con PBS.
4. Tripsinizar con 1ml de Tripsina/EDTA durante 10 minutos a 37°C.
5. Recoger las células tripsinizadas en un tubo eppendorf.
6. Centrifugar a 1.300xg durante 15 minutos para separar las células de las bacterias.
7. Recuperar el sobrenadante y realizar diluciones seriadas en medio mínimo SM.
8. Sembrar las diferentes diluciones en placas de selección para realizar los recuentos bacterianos.

#### 4.11 ENSAYOS DE COMPETICIÓN BACTERIANA EN CRECIMIENTO PLANCTÓNICO.

Los ensayos de competición bacteriana fueron realizados en crecimiento planctónico y en agitación. Siempre las mezclas fueron de dos bacterias en competencia y mezcladas en proporción 1:1 según el siguiente protocolo.

##### Procedimiento:

1. Preparar un preinóculo de cada cepa en 2 ml de medio LB, incubar O/N a 37°C.
2. Reinocular 100 µl de cada cepa en 10 ml de medio LB y crecer hasta  $DO_{600}$  de 0,5.
3. Ajustar la  $DO_{600}$  de cada cepa y reinocular 100 µl de cada suspensión bacteriana en un matraz de medio LB con el antibiótico adecuado. Este tiempo corresponde al tiempo cero.
4. Tomar una alícuota del cultivo, realizar diluciones seriadas y sembrar en placas (por triplicado) para realizar el recuento bacteriano y confirmar la proporción 1:1.
5. Incubar los cultivos bacterianos 24 horas a 37 °C en agitación y realizar un recuento bacteriano total.

#### 4.12 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

Células Caco-2 se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos (Corning TC) a una concentración de  $1 \times 10^5$  células. Las células fueron diferenciadas durante 21 días (células polarizadas). Los ensayos se realizaron con 200  $\mu\text{g}$ /pocillo de proteínas de los sobrenadantes concentrados de cultivos obtenidos a partir de las diferentes cepas a analizar (Método 4.5.1) y con cepas bacterianas con una MOI de 100 (Método 4.3)

##### Procedimiento:

1. Adicionar a los cultivos de células Caco-2 polarizadas, los sobrenadantes de cultivos o 100  $\mu\text{l}$  del cultivo bacteriano a una MOI de 100.
2. Incubar 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en estufa de cultivo celular con 5% de  $\text{CO}_2$ .
3. Aspirar el medio y realizar tres lavados con PBS 1X.
4. Realizar la tinción de Giemsa ver (Método 4.7.1.2).
5. Observar al microscopio con aumento mayor.

#### 4.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa PASW *Statistic* 17. La diferencia entre dos grupos se analizó mediante el test de la *t* de Student. Los análisis de las diferencias entre más de dos grupos, se llevaron a cabo mediante el análisis de la varianza “one-way ANOVA” seguido del test de Tukey. Un valor de  $P < 0.05$  ha sido considerado estadísticamente significativo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar (SE).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

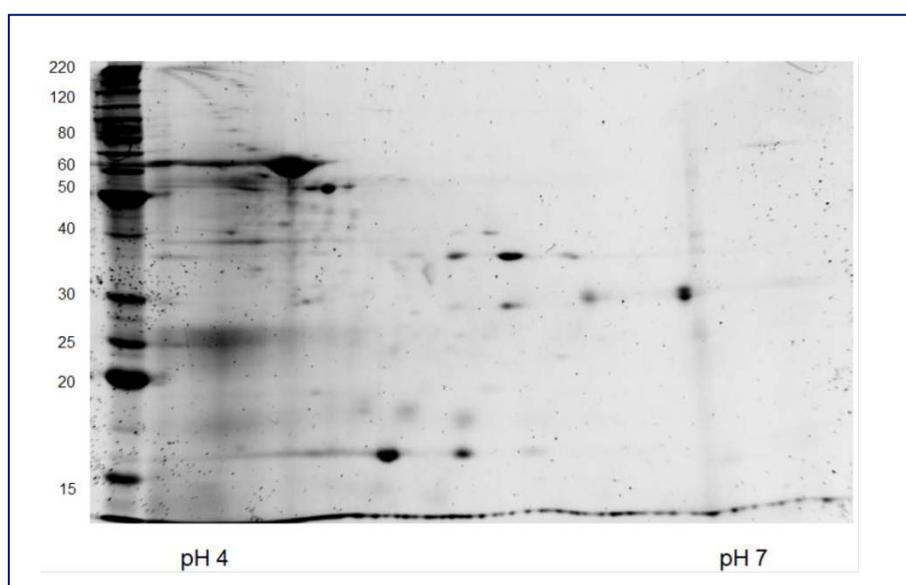


## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR LA CEPA EcN.

Puesto que las proteínas secretadas por las bacterias tienen un papel clave en la interacción con el huésped, nos planteamos abordar estudios proteómicos encaminados a caracterizar el secretoma de la cepa EcN. En el contexto de un probiótico, las proteínas extracelulares codificadas por genes específicos de esta cepa son dianas de interés para realizar estudios funcionales ya que estas proteínas pueden tener un papel determinante en los efectos beneficiosos y específicos del probiótico.

La identificación de las proteínas secretadas por la cepa probiótica EcN se llevó a cabo a partir de sobrenadantes de cultivos de esta cepa en LB. Las bacterias fueron separadas por centrifugación y el sobrenadante filtrado para eliminar cualquier bacteria presente. Este filtrado constituye la fracción de proteínas secretadas y comprende tanto las proteínas secretadas de manera soluble como las asociadas a vesículas de membrana externa (OMVs). Las proteínas de esta fracción fueron precipitadas con TCA, resuspendidas y sometidas a separación por electroforesis bidimensional (Figura 5.1).



**Figura 5.1. Separación por electroforesis bidimensional de las proteínas secretadas por la cepa EcN.** La muestra corresponde al sobrenadante de cultivos de esta cepa en medio LB sometidos a precipitación con TCA. La separación se llevó a cabo por isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 4-7 (primera dimensión), seguido de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Las proteínas fueron visualizadas tras tinción con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain*. Como marcador de proteínas se utilizó el *BENCHMARK™ Protein Ladder* (Invitrogen) que abarca un intervalo comprendido entre 10 y 220kDa.

Como ya se ha comentado esta fracción contiene las proteínas secretadas de manera soluble y las asociadas a OMVs. Sin embargo el número de *spots* visualizados en el gel fue bajo. Cabe destacar que aunque se realizaron separaciones por isoelectroenfoque en diferentes rangos de pH (3-10, 4-7, 5-8) no se consiguió obtener una buena resolución en la separación bidimensional de esta muestra. La zona del gel que contenía las proteínas con pI entre 3-5 aparecía siempre difusa. La dificultad en obtener una buena resolución de muestras de secretoma total de bacterias gram-negativas puede deberse a varios factores. Quizás el factor más importante puede ser atribuido a la presencia de OMVs en esta fracción. Las OMVs tienen una elevada hidrofobicidad dado su alto contenido en lípidos. Muchas de las proteínas presentes en estas estructuras vesiculares son también hidrofóbicas lo que las hace refractarias a los protocolos normales de solubilización y conduce a su precipitación en los tampones para isoelectroenfoque. Se reduce así su transferencia al gel de electroforesis de la segunda dimensión (Lee et al., 2008). Otro factor a considerar en este caso podría ser la interferencia en la separación por isoelectroenfoque debida a un exceso de péptidos procedentes de la triptona, uno de los componentes del medio LB utilizado en el cultivo de partida.

Si bien este análisis debe tomarse como preliminar por los problemas de solubilización y resolución de las proteínas, 21 *spots* fueron recortados del gel, las proteínas extraídas y digeridas con tripsina e identificadas por espectrometría de masas en la Plataforma de Proteómica del *Parc Científic de Barcelona*. La separación e identificación de los péptidos se realizó mediante HPLC nanoAcquity (Waters) acoplado al espectrofotómetro de masas OrbitrapVelos (Thermo Scientific) (Métodos 4.5.9).

El análisis de los péptidos permitió identificar 22 proteínas, detalladas en la Tabla 5.1. Algunas de estas proteínas han sido identificadas en el proteoma de OMVs aisladas de la cepa de laboratorio *E. coli* DH5 $\alpha$  (Lee et al. 2007) o de varios patógenos gram-negativos (Sharpe et al., 2011; Choi et al., 2011).

Entre las proteínas identificadas en este estudio encontramos proteínas implicadas en motilidad y adhesión como FimC1, FliC, FliD, FlgE, FlgG y FlgK. La adhesión a las células epiteliales es un paso esencial para la colonización de los tejidos del huésped y está normalmente mediada por estructuras fibrilares tales como pili, flagelo, fimbria o curli. Estas estructuras juegan un papel importante en la formación de *biofilms*, un proceso que contribuye a la colonización del intestino (Houdt and Michiels, 2005). Fim1C está codificada en la isla genómica I de EcN. Esta fimbria se ha asociado con la colonización del tracto urinario y virulencia en cepas de *E. coli* uropatógenas, mientras que en la cepa EcN Fim1C es requerida para la formación de *biofilms*, adhesión a superficies abióticas y bióticas así como también en la colonización intestinal.

**Tabla 5.1. Proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de la separación bidimensional de sobrenadantes de cultivos de la cepa EcN en medio LB.**

| Gen                                    | Acceso Uniprot | Proteína  | KDa  | pI   | Función                            |
|--|----------------|---|------|------|------------------------------------|
| <b>Procesos celulares</b>              |                |   |      |      |                                    |
| <i>fliC</i>                            | P04949         | <i>Flagellin</i>  | 51.3 | 4.73 | Motilidad celular                  |
| <i>flgK</i>                            | P33235         | <i>Flagellar hook-associated protein 1</i>                | 57.9 | 4.47 | Motilidad celular                  |
| <i>fliD</i>                            | P24216         | <i>Flagellar hook-associated protein 2</i>                | 48.4 | 5.08 | Motilidad celular                  |
| <i>flgE</i>                            | P75937         | <i>Flagellar hook protein FlgE</i>                        | 42   | 4.68 | Motilidad celular                  |
| <i>flgG</i>                            | P0ABX5         | <i>Flagellar basal-body rod protein</i>                   | 27.7 | 4.68 | Motilidad celular                  |
| <i>focA</i>                            | P62606         | <i>Type-1 fimbrial protein, C chain</i>                   | 18.3 | 6.52 | Adhesión                           |
| <i>ompC</i>                            | Q8CVW1         | <i>Outer membrane protein C</i>                           | 41.2 | 4.83 | Biogénesis de membrana externa     |
| <i>ompA</i>                            | P0A911         | <i>Outer membrane protein A</i>                           | 37.2 | 6.42 | Biogénesis de membrana externa     |
| <i>ompX</i>                            | P0A919         | <i>Outer membrane protein X</i>                           | 18.6 | 7.17 | Biogénesis de membrana externa     |
| <i>groEL</i>                           | A1AJ51         | <i>60 kDa chaperonin 1</i>                                | 57.3 | 4.94 | Chaperonas                         |
| <i>Sat</i>                             | Q8FDW4         | <i>Serine protease sat autotransporter</i>                | 140  | 6.24 | Degradación de macromoléculas      |
| <b>Metabolismo</b>                     |                |   |      |      |                                    |
| <i>glnH</i>                            | P0AEQ5         | <i>Gln-binding periplasmic protein</i>                    | 27.2 | 8.44 | Transporte de aminoácidos          |
| <i>malE</i>                            | P0AEY0         | <i>Maltose-binding periplasmic protein</i>                | 43.4 | 5.71 | Transporte de carbohidratos        |
| <i>rbsB</i>                            | P02925         | <i>Ribose-binding periplasmic protein</i>                 | 30.9 | 7.47 | Transporte de carbohidratos        |
| <i>ansB</i>                            | P00805         | <i>L-asparaginase 2</i>                                   | 36.8 | 6.38 | Metabolismo de aminoácidos         |
| <i>Mdh</i>                             | A7ZSD0         | <i>Malate dehydrogenase</i>                               | 32.3 | 5.77 | Producción y conversión de energía |
| <i>gapA</i>                            | P0A9B4         | <i>GAPDH</i>  | 35.5 | 7.11 | Metabolismo de carbohidratos       |
| <i>tpiA</i>                            | P0A858         | <i>Triosephosphate isomerase</i>                          | 27   | 5.64 | Metabolismo de carbohidratos       |
| <i>osmY</i>                            | P0AFH8         | <i>Osmotically-inducible protein Y</i>                    | 21.1 | 6.81 | Adaptación al stress               |
| <i>hdhA</i>                            | P0AET8         | <i>7-<math>\alpha</math>-hydroxysteroid dehydrogenase</i> | 26.8 | 5.22 | Metabolismo secundario             |
| <b>Transferencia de la información</b> |                |   |      |      |                                    |
| <i>tuf1</i>                            | A7ZSL4         | <i>Elongation factor Tu 1</i>                             | 43.3 | 5.45 | Traducción                         |

Otras proteínas citadas en este grupo son componentes del flagelo. El flagelo actúa como una importante adhesina que permite la unión al mucus del epitelio intestinal a través de su interacción con gluconato (Troge et al., 2012), y además induce la producción por parte del epitelio del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina 2 (Schlee et al., 2007). Las proteínas FlgE y FlgK están implicadas en el ensamblaje del flagelo. Estas proteínas han sido identificadas en las OMVs de *Pseudomonas* y se ha descrito su capacidad de activar la inmunidad innata del huésped a través de su interacción con receptores TLR5 (Choi et al., 2011).

En el secretoma de EcN encontramos también porinas del tipo OmpC, OmpA y OmpX. Estas porinas representan una fracción abundante dentro de las proteínas de membrana externa (aproximadamente un 2% del total) y forman canales de gran tamaño que permiten la difusión pasiva de iones y moléculas hidrofílicas a través de la membrana. Algunas de estas porinas (OmpA y OmpX) están implicadas en la interacción con la célula huésped y la inducción de la respuesta inmune (Lee et al., 2008).

RbsB, MalE, GlnH son proteínas periplasmáticas que forman parte de sistemas de transporte ABC de los carbohidratos ribosa y maltosa o del aminoácido glutamina respectivamente. Estas proteínas se han descrito localizadas en vesículas de patógenos gram-negativos y pueden ser de gran importancia para la supervivencia de las bacterias en un hábitat hostil.

OsmE es una proteína de membrana que se induce por estrés. Su expresión se ve incrementada cuando la osmolaridad es elevada o cuando la célula finaliza su crecimiento para entrar en fase estacionaria (Gutierrez et al., 1987; Conter et al., 1997).

HdhA es una proteína con actividad 7- $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa que participa en el metabolismo de ácidos biliares. La capacidad de metabolizar ácidos biliares permite a la bacteria sobrevivir en el tracto intestinal, sobre todo en la parte superior del intestino delgado, donde dichas sales son secretadas desde la vesícula biliar, y por tanto se encuentran en más elevada concentración (Pumbwe et al., 2007).

Otras proteínas identificadas en este estudio son proteínas *moonlighting* o multifuncionales. Estas proteínas, inicialmente clasificadas como citoplasmáticas, con funciones bien definidas en este compartimento celular, son también secretadas al medio ya sea en forma libre o asociadas a OMVs. En este grupo encontramos enzimas de la glicólisis (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, triosa-fosfato isomerasa), del ciclo de Krebs (malato deshidrogenasa), metabolismo de aminoácidos (L-asparaginasa), chaperonas (GroL), o factores implicados en la síntesis de proteínas (EF-Tu). Estas proteínas, además de su función básica en el metabolismo, son secretadas por patógenos y probióticos y juegan un papel clave en la adhesión con el

huésped y/o en virulencia. Como se ha comentado en la introducción, una vez en el espacio extracelular estas proteínas interactúan con componentes del huésped o directamente con las células del huésped para activar vías de transducción de señal, contribuyendo así a la colonización por parte del patógeno, o incluso a la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped. Una de las proteínas *moonlighting* identificada es gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Esta proteína posee la habilidad de interactuar con varios componentes del huésped como transferrina, plasminógeno y componentes de la matriz extracelular (Egea et al., 2007; Schaumburg et al., 2004; Jin et al., 2005). Nuestro grupo ha demostrado que la forma extracelular de GAPDH puede actuar como diana de oxidación y proteger a la bacteria frente a la respuesta oxidativa del huésped (Aguilera et al., 2009).

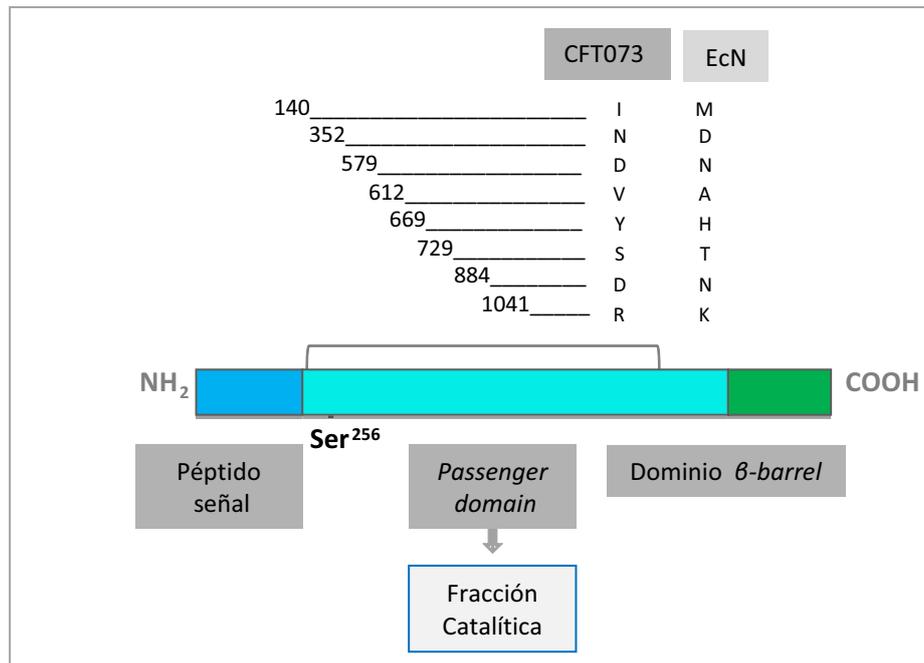
Entre las proteínas identificadas en este estudio proteómico 2D se encuentra la proteasa Sat (*secreted autotransporter toxin*). Esta proteína, junto con la fimbria Fim1C, son las únicas proteínas codificadas por genes presentes en islas genómicas de la cepa EcN. Sat está codificada por un gen localizado en la isla II. Dada su actividad proteolítica, esta serin proteasa autotransportadora podría contribuir a la colonización y persistencia del probiótico en el tracto intestinal.

El gen *sat* está presente también en el genoma de la cepa uropatógena CFT073, y de algunos patógenos del tracto intestinal (introducción, Tabla 1.2). La actividad proteasa parece estar implicada en los efectos citopáticos mediados por esta proteína en células uroepiteliales en cultivo, aunque existen discrepancias en los resultados obtenidos por diversos grupos en cuanto a su capacidad de alterar la permeabilidad paracelular o de desestructurar el citoesqueleto de actina en diferentes modelos de epitelio intestinal (Guyer et al., 2002; Guignot et al., 2007). El efecto observado depende en gran medida de la expresión simultánea de adhesinas específicas que permiten el acercamiento de Sat a su receptor todavía desconocido.

A parte de su presencia en patógenos, el gen *sat* ha sido identificado en el genoma de dos cepas de *E. coli* consideradas probióticas, las cepas EcN y 83972 (Vejborg et al., 2010). Ambas cepas están relacionadas genéticamente con la uropatógena CFT073. No se conoce cuál es la función de Sat en el contexto de las cepas probióticas. Destacar que la proteína Sat de la cepa EcN difiere sólo en 8 residuos de aminoácidos de la proteína Sat de la cepa uropatógena CFT073. Estas diferencias podrían determinar perfiles funcionales distintos en el contexto de su interacción con proteínas sustrato (Figura 5.2).

Puesto que Sat es considerada un factor de virulencia con elevada prevalencia en cepas uropatógenas, la caracterización funcional de la proteína Sat de la cepa EcN, así como el estudio de las condiciones que determinan su expresión en el entorno intestinal, son necesarios para establecer si esta proteína es de hecho un factor de

virulencia o ha de ser considerada un factor de competitividad que contribuye a la colonización intestinal.



**Figura 5.2** Diferencias en la secuencia aminoacídica de Sat codificada por la cepa uropatógena CFT073 o por la cepa probiótica EcN. Se muestra la estructura general en dominios de la proteína Sat. En la parte superior se indica la posición de los ocho residuos aminoacídicos diferenciales entre ambas proteínas, así como el cambio de aminoácido.

Por tanto, analizados los resultados de este estudio preliminar sobre el secretoma de la cepa probiótica EcN nos hemos planteado: (i) utilizar metodologías específicas para el aislamiento y análisis proteómico de las OMVs producidas por este probiótico en diferentes condiciones de cultivo y (ii) abordar el estudio funcional de Sat en la cepa probiótica

## 5.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS OMVs GENERADAS POR LA CEPA PROBIÓTICA EcN EN MEDIO DMEM.

Tal como se ha presentado anteriormente, el análisis del secretoma global de la cepa EcN mediante electroforesis bidimensional generó una información parcial debido a la baja solubilidad de las proteínas presentes en estructuras vesiculares. En un intento de profundizar más en el estudio de los factores secretados por esta cepa probiótica, nos planteamos identificar las proteínas secretadas a través de OMVs. El análisis proteómico de las OMVs de la cepa EcN se realizó a partir de dos medios de cultivo, medio LB y medio DMEM.

El análisis proteómico de las OMVs de EcN obtenidas a partir de cultivos en LB estaba ya en desarrollo al inicio de este trabajo de tesis doctoral. Mi participación en este

proyecto fue parcial, colaborando en los procesos de obtención de preparaciones de OMVs y su cuantificación. Por este motivo no se presentan en esta memoria los resultados de este análisis en medio LB. Tal como se presenta en la introducción se identificaron un total de 192 proteínas, 18 de ellas específicas de esta cepa probiótica y 57 forman parte de proteomas de OMVs derivadas de patógenos. Las proteínas identificadas pueden contribuir a la capacidad de este probiótico de colonizar el tracto intestinal, ya que en general desempeñan funciones relacionadas con la adhesión, modulación de la respuesta inmune o supervivencia de la bacteria en los tejidos del huésped (Aguilera et al. 2014).

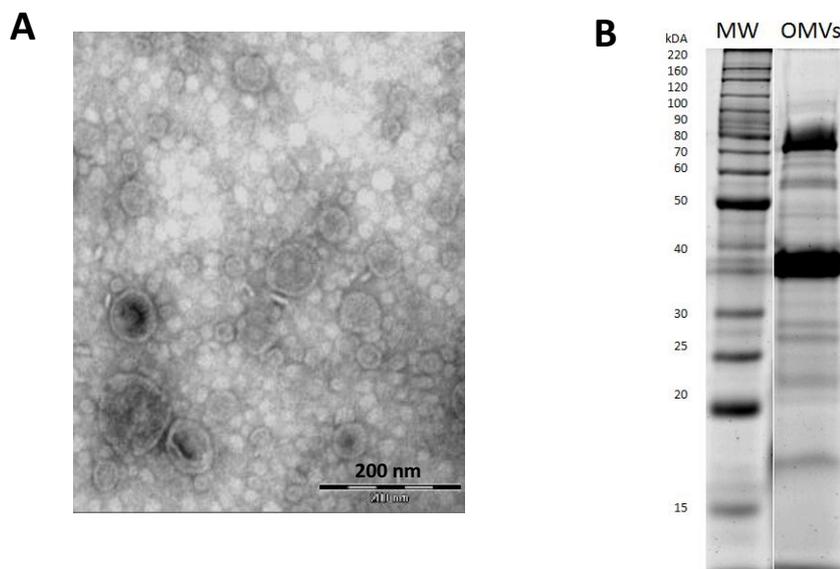
En bacterias gram-negativas la formación de vesículas es universal y tiene lugar tanto en medios líquidos, sólidos o en *biofilms*. Normalmente, las OMVs contienen proteínas recién sintetizadas y no engloban productos de lisis. La producción de OMVs y su composición parece depender de diversos factores, entre los que se encuentran las condiciones medioambientales, patogenicidad y todas las condiciones que puedan afectar al metabolismo de la célula. Por ello ni la velocidad de producción de vesículas entre especies diferentes, ni la composición de las mismas dentro de una misma especie son siempre las mismas.

El medio DMEM mimetiza las condiciones de crecimiento de las células eucariotas y contiene bicarbonato sódico, un componente presente en el tracto gastrointestinal. Este medio es habitualmente utilizado para el cultivo de líneas celulares de epitelio intestinal como son las células Caco-2, utilizadas en este trabajo. A partir de cultivos de la cepa probiótica EcN en DMEM se obtuvo el sobrenadante por centrifugación. El sobrenadante fue filtrado para la eliminación de las bacterias, concentrado y sometido a ultracentrifugación. La fracción sedimentada (OMVs) fue resuspendida en Tris-HCl 20 mM pH 7,2 (Métodos 4.5.8). Una alícuota de esta fracción fue utilizada para la visualización de las OMVs mediante microscopía electrónica (Métodos 4.7.1.3). La separación de las proteínas presentes en las OMVs se llevó a cabo mediante electroforesis mono-dimensional en geles de poliacrilamida-SDS y las bandas fueron visualizadas por tinción con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* (Biorad). Las diferentes bandas fueron extraídas del gel y analizadas mediante LC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución Orbitrap Velos (Métodos 4.5.9).

El análisis por microscopía de transmisión electrónica de las muestras obtenidas reveló vesículas de un tamaño variable comprendido entre 20-120 nm de diámetro (Figura 5.3A) y por tanto de un tamaño más disperso que las OMVs obtenidas en medio LB (OMVs de 20 a 60 nm en diámetro).

La separación de las proteínas presentes en OMVs a través de electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS se presenta en la Figura 5.3B. El gel fue recortado en 22 trozos para el análisis total de las proteínas mediante espectrofotometría de masas (Métodos

4.5.9). La identificación de las proteínas fue realizada con el software *Proteoma Discover* (v.1.3.0.339) utilizando una base de datos que contenía la información del genoma de EcN disponible en DDBJ/EMBL/GenBank en enero de 2013 (CAPM01000000). Los resultados obtenidos fueron comparados con las proteínas identificadas en las OMVs a partir de cultivos de la cepa EcN en medio LB (Aguilera et al., 2014). Las funciones fueron clasificadas según las bases UniProt y GenProtEC.

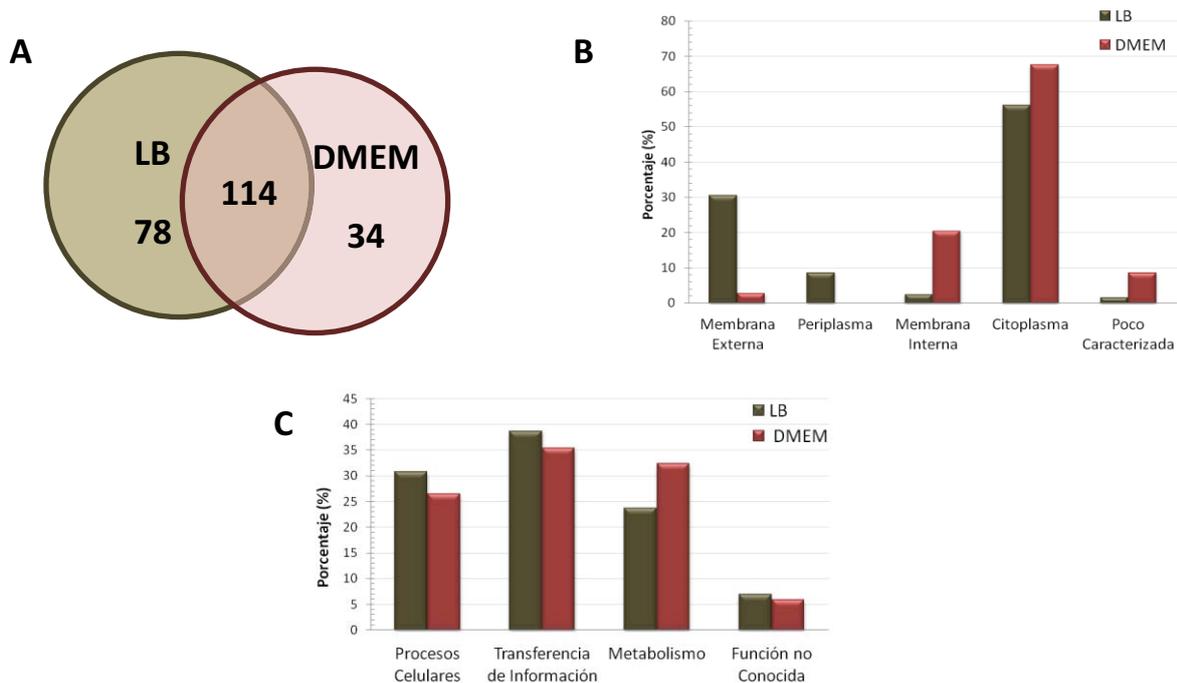


**Figura 5.3. Obtención de OMVs secretadas por la cepa EcN en medio DMEM.** A) Imagen de las OMVs aisladas, obtenida por microscopía electrónica tras tinción negativa. B) Electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS al 10%. Se aplicaron 10  $\mu$ g de la fracción de OMVs y las proteínas fueron visualizadas tras tinción con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain*. Como referencia de peso molecular se utilizó como marcador de proteínas el *BENCHMARK™ Protein Ladder* (Invitrogen) que abarca un intervalo comprendido entre 10 y 220kDa.

El análisis de las OMVs obtenidas de cultivos de la cepa EcN en medio DMEM identificó 148 proteínas en total. De estas, 114 habían sido identificadas también en las OMVs obtenidas de cultivos en LB (Fig. 5.4A) y corresponden en su gran mayoría a proteínas que contribuyen a los procesos de colonización y supervivencia en el tracto intestinal por su implicación en procesos de adhesión (fimbrias), sistemas captadores de hierro o enzimas de tipo proteasa. El listado total de estas proteínas se presenta en el apartado Anexo 2.

La distribución subcelular de las 148 proteínas del proteoma vesicular en DMEM se presenta en la Figura 5.4B. Al comparar los datos con los obtenidos del proteoma de las OMVs producidas en medio LB, se observó una buena correlación en las proteínas de origen citoplasmático, siendo estas las más abundantes. Con respecto a las proteínas restantes se observa una clara diferencia ya que mientras en las vesículas de la cepa EcN en DMEM la mayoría de las proteínas identificadas son de membrana

interna, en LB son de membrana externa. Asimismo, el porcentaje de proteínas de origen periplasmático es muy reducido, menor que el descrito en el proteoma de las OMVs obtenidas de medio LB. Estos resultados sugieren que la preparación de vesículas obtenidas a partir de cultivos en medio DMEM puede estar más enriquecida en un tipo de vesículas recientemente descritas que se origina a partir de la membrana interna y engloba componentes citoplasmáticos (Pérez-Cruz et al. 2013). Estas vesículas tienen un tamaño medio superior al de las originadas a partir de membrana externa, lo que estaría de acuerdo con la dispersión de tamaño de las vesículas obtenidas de cultivos en DMEM (Fig. 5.3A).



**Figura 5.4. Análisis de las 148 proteínas identificadas en las OMVs de la cepa EcN en medio de cultivo DMEM y su comparación con las 192 proteínas presentes en las OMVs obtenidas de la misma cepa en medio LB.** A) Diagrama de Venn de las proteínas vesiculares identificadas a partir de cultivos en los medios indicados. B) Ubicación subcelular de las proteínas identificadas en las preparaciones de OMVs obtenidas a partir de cultivos en los medios indicados. C) Clasificación funcional de las proteínas identificadas en las preparaciones de OMVs obtenidas a partir de cultivos en los medios indicados. Las funciones fueron clasificadas según la base de datos UniProt y GenProtexEC.

La clasificación de las proteínas en grupos según su función biológica se presenta en la Figura 5.4C, se observa una distribución muy similar en las OMVs obtenidas a partir de cultivos en ambos medios. En ningún caso la diferencia dentro de cada grupo funcional fue superior al 10%.

Entre las 114 proteínas que también fueron identificadas en el proteoma de las OMVs en medio LB (Tabla 9.1 en Anexos) encontramos varias proteínas asociadas a la membrana externa implicadas en adhesión como son la proteína denominada

Antígeno 43 o las subunidades de la fimbria F1C (FocF, FocG, FocA y FocH), codificada específicamente en el genoma de la cepa EcN y de cepas uropatógenas. La formación de fimbrias es un requisito indispensable para la formación de *biofilms* sobre la superficie intestinal. Estas fimbrias, expresadas tanto en medio LB como DMEM, contribuyen a la adhesión de la cepa probiótica a la mucosa intestinal. Otras proteínas comunes a ambos proteomas son componentes de sistemas de captación de hierro como *lutA*, *IroN*, *FhuA*. La presencia de proteínas transportadoras de nutrientes e iones inorgánicos en las OMVs de bacterias gram-negativas es un hecho común. Se ha sugerido que en esta localización vesicular, estos transportadores actuarían como sensores de estas moléculas esenciales contribuyendo así a la supervivencia de la bacteria en ambientes con limitación de estos nutrientes. El hierro es un metal esencial para todas las bacterias, patógenas y no patógenas. Este metal es bastante insoluble y se encuentra preferentemente unido a proteínas en los tejidos del huésped. La presencia de múltiples sistemas de transporte de hierro en la cepa EcN le confieren a este probiótico una gran adaptabilidad y potencial para competir con otras bacterias comensales y enteropatógenos por la colonización del tracto intestinal. Dentro del grupo de proteínas transportadoras de nutrientes se han identificado componentes periplasmáticos de sistemas de transporte de aminoácidos como *MetQ* en las OMVs obtenidas de la cepa EcN en cultivos tanto en medio LB como DMEM. Además, en la relación de las 114 proteínas vesiculares comunes a ambos proteomas existen varias proteínas *moonlighting* como gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. La función de estas proteínas en la interacción con el huésped ha sido ya comentada en el apartado anterior (resultados 5.1).

Las 34 proteínas identificadas de manera selectiva en proteoma de las OMVs aisladas de cultivos de la cepa EcN en medio DMEM se presentan en Tabla 5.2.

En esta relación encontramos proteínas descritas como proteínas multifuncionales o *moonlighting* asociadas al catabolismo de carbohidratos como piruvato quinasa, glucosa 6-fosfato isomerasa, triosa fosfato isomerasa y uronato isomerasa (denominada también glucuronato isomerasa). La mayoría de estos enzimas participan en la glicólisis. El medio DMEM contiene una elevada concentración de glucosa (25 mM) por lo que la presencia de estas enzimas en las OMVs obtenidas a partir de cultivos de la cepa EcN en este medio de cultivo podría deberse a la inducción de su expresión en estas condiciones de crecimiento. La menor expresión de estas enzimas en la cepa EcN crecida en medio LB (no contiene glucosa) podría limitar su detección en las vesículas aisladas en estas condiciones.

**Tabla 5.2. Proteínas identificadas en el proteoma de las OMVs aisladas de cultivos de la cepa EcN en medio DMEM, no presentes en el proteoma vesicular en LB.**

| ACCESO (EcN)            | NOMBRE DE LA PROTEÍNA   | GEN EN <i>E. COLI</i> | FUNCIÓN BIOLÓGICA   |
|-------------------------|---|-----------------------|---|
| <b>CITOPLASMA</b>       |   |                       |   |
| 442606841               | <i>Alkyl hydroperoxide reductase protein C</i>  | <i>ahpC</i>           | Procesos celulares - Adaptación a estrés  |
| 442606843               | <i>Universal stress protein G</i>   | <i>uspG</i>           | Procesos celulares - Adaptación a estrés  |
| 442605838               | <i>Excinuclease ABC subunit A</i>   | <i>uvrA</i>           | Procesos celulares - Adaptación a estrés  |
| 442604783               | <i>DNA-binding protein stpA</i>   | <i>stpA</i>           | Cellular processes - Posttranslational modification, protein turnover, chaperones |
| 442607403               | <i>DNA-binding protein HU-alpha</i>   | <i>hupA</i>           | Transferencia de Información – Condensación cromosomal                            |
| 442608008               | <i>DNA gyrase subunit A</i>   | <i>gyrA</i>           | Transferencia de Información – Replicación , reparación y recombinación de DNA    |
| 442606441               | <i>Leucine-responsive regulatory protein, regulator for leucine (or lrp) regulon and high-affinity branched-chain amino acid transport system</i> | <i>Lrp</i>            | Transferencia de información - Traducción   |
| 442607455               | <i>LSU ribosomal protein L24p (L26e)</i>  | <i>rplX</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442605390               | <i>LSU ribosomal protein L21p</i>   | <i>rplU</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442605374               | <i>Translation initiation factor 2</i>  | <i>infB</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442607864               | <i>Methionyl-tRNA synthetase</i>  | <i>metG</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442607452               | <i>LSU ribosomal protein L29p (L35e)</i>  | <i>rpmC</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442606169               | <i>RNA-binding protein Hfq</i>  | <i>hfq</i>            | Transferencia de información - Traducción   |
| 442604376               | <i>Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain</i>  | <i>pheT</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442604761               | <i>SSU ribosomal protein S16p</i>   | <i>rpsP</i>           | Transferencia de información - Traducción   |
| 442605021               | <i>Lysyl-tRNA synthetase (class II)</i>   | <i>lysS</i>           | Transferencia de información – Traducción   |
| 442607019               | <i>Carbamoyl-phosphate synthase large chain</i>   | <i>carB(pyrA)</i>     | Metabolismo - Transporte y metabolismo de aminoácidos                             |
| 442604338               | <i>Pyruvate kinase</i>  | <i>pykF</i>           | Metabolismo - Producción y conversión de energía                                  |
| 442606014               | <i>Cytosine deaminase</i>   | <i>codA</i>           | Metabolismo - Transporte y metabolismo de nucleótidos                             |
| 442607396               | <i>IMP cyclohydrolase</i>   | <i>purH</i>           | Metabolismo - Transporte y metabolismo de nucleótidos                             |
| 442606786               | <i>Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit</i>   | <i>purE</i>           | Metabolismo - Transporte y metabolismo de nucleótidos                             |
| 442606247               | <i>Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain (PyrI)</i>   | <i>pyrI</i>           | Metabolismo - Transporte y metabolismo de nucleótidos                             |
| 442605889               | <i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>  | <i>pgi</i>            | Metabolismo - Producción y conversión de energía                                  |
| <b>MEMBRANA INTERNA</b> |   |                       |   |
| 442603845               | <i>FIG002903: a protein of unknown function perhaps involved in purine metabolism</i>   | <i>hflD</i>           | Procesos celulares - Adaptación a estrés  |

|                          |  |                    |   |
|--------------------------|--|--------------------|---|
| 442606674                | <i>Protein-export membrane protein SecD (TC 3.A.5.1.1)</i> | <i>secD</i>        | Procesos celulares - Transporte de Proteínas                |
| 442606673                | <i>Preprotein translocase subunit YajC (TC 3.A.5.1.1)</i>  | <i>yajC</i>        | Procesos celulares - Transporte de Proteínas                |
| 442607422                | <i>Preprotein translocase subunit SecE (TC 3.A.5.1.1)</i>  | <i>secE</i>        | Procesos celulares - Transporte de Proteínas                |
| 442605807                | <i>Methionine ABC transporter permease protein</i>         | <i>metI</i>        | Metabolismo - Transporte y metabolismo de aminoácidos       |
| 442607473                | <i>Large-conductance mechanosensitive channel</i>          | <i>mscL</i>        | Metabolismo - Transporte y metabolismo de iones inorgánicos |
| 442606244                | <i>Mg(2+) transport ATPase, P-type</i>                     | <i>mgtA</i>        | Metabolismo - Transporte y metabolismo de iones inorgánicos |
| <b>MEMBRANA EXTERNA</b>  |  |                    |   |
| 442605964                | <i>CFA/I fimbrial major subunit</i>                        | <i>matB (yagZ)</i> | Procesos celulares - adhesión celular                       |
| <b>NO CARACTERIZADAS</b> |  |                    |   |
| 442605961                | <i>CFA/I fimbrial minor adhesin</i>                        | <i>yagW</i>        | Función no conocida   |
| 442605636                | <i>FIG136845: Rhodanese-related sulfurtransferase</i>      | <i>yibN</i>        | Función no conocida   |
| 442605304                | <i>Uronate isomerase</i>                                   | <i>uxaC</i>        | Metabolismo- transporte y metabolismo de Carbohidratos      |

Dentro de las 34 proteínas identificadas exclusivamente en vesículas aisladas de cultivos en DMEM se encontraron varias proteínas que responden a procesos de adaptación a estrés como son UspG, la excinucleasa ABC y la alquil hidroperóxido reductasa. A continuación se comenta la función de estas proteínas.

*Proteína universal de estrés G (UspG):* A pesar de su amplia distribución en distintas especies, la mayoría de la información sobre las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las proteínas USPs derivan del estudio de UspA en *E. coli*, primer miembro de esta familia en ser descrito (O'Toole and Williams, 2003). La síntesis de esta pequeña proteína citoplasmática (144 aminoácidos) aumenta cuando el crecimiento de la bacteria es inhibido por falta de nutrientes tales como carbono, nitrógeno, fosfato, sulfato, aminoácidos o en presencia de agentes tóxicos como metales pesados, oxidantes, ácidos, antibióticos, así como por exposición al calor y daño en el DNA (O'Toole and Williams, 2003; Nyström and Neidhardt, 1992). Debido a la capacidad de conferir resistencia a un amplio rango de condiciones de estrés se le dio el nombre de proteína universal del estrés A, o UspA. El genoma de *E. coli* codifica seis USPs, las cuales se dividen en tres clases según la similitud de su regulación y en la secuencia de aminoácidos. Una de estas clases agrupa a UspF y UspG. Se sabe que UspG se induce en condiciones de estrés y que es capaz de autofosforilarse y autoadenilarse. Se trata de una proteína con un elevado número de cargas negativas en su superficie y a la cual no se le ha atribuido todavía una función determinada. Se desconoce cuál es la señal para su expresión en medio DMEM. Este medio contiene bicarbonato sódico, un compuesto que induce la expresión de determinados genes de virulencia en enteropatógenos (Abe et al., 2002). Se podría especular que esta fuera la señal que

---

induce la expresión de UspG y su secreción a través de OMVs en cultivos de la cepa EcN en medio DMEM.

*Exinucleasa ABC*: se trata de un complejo enzimático que reconoce la zona lesionada en el DNA y corta la cadena a una distancia de 4 ó 5 nucleótidos hacia el lado 3' de la lesión y a 8 nucleótidos hacia el lado 5', generándose de esta forma un fragmento de 12 ó 13 nucleótidos que tiene en los extremos un grupo 3' hidroxilo y uno 5'fosfato. Esta descrito que las OMVs contienen DNA, el cual puede ser transferido a bacterias de la misma especie o de distinta especie mediante fusión de las vesículas con la membrana de las bacterias receptoras. Mediante este mecanismo las OMVs contribuyen a los procesos de transferencia horizontal de genes (Kulp and Kuehn, 2010). La presencia en OMVs de proteínas de este tipo, probablemente asociadas al DNA vesicular, podría favorecer el procesado y recombinación del material genético entre bacterias. Recientemente, se ha descrito que las OMVs aisladas de varias cepas de *E. coli* tienen actividad genotóxica sobre células de epitelio intestinal (Tyrer et al., 2014). La excinucleasa identificada en las OMVs de la cepa EcN podría contribuir a este efecto. De hecho, otras proteínas con actividad genotóxica son expresadas por esta cepa probiótica. Una de estas proteínas es colibactina. Estudios realizados con un mutante de EcN deficiente en colibactina han mostrado que esta proteína, a pesar de su potencial tóxico, es necesaria para la correcta funcionalidad de EcN como probiótico (Olier et al., 2012).

*Alquil hidroperóxido reductasa*: es una proteína que participa en la eliminación del agua oxigenada transformándola en agua y oxígeno. En el contexto de las bacterias que colonizan el intestino es importante tener en cuenta la producción intracelular de peróxido de hidrógeno y especies reactivas de oxígeno por parte del huésped como mecanismo de defensa y destrucción frente a patógenos invasivos. Además de este mecanismo dirigido contra patógenos invasivos, los enterocitos también liberan estos compuestos al espacio intersticial de la mucosa. Se ha descrito que las células epiteliales del intestino producen peróxido de hidrógeno por acción de NAPDH oxidasas (Duox) y lo liberan al medio intersticial de la mucosa estableciendo un gradiente de baja concentración que no destruye a las bacterias del tracto intestinal, sino que ejerce un efecto repelente como mecanismo para prevenir su adhesión e infección (Boncompain et al., 2010; Botteaux et al., 2009). En este contexto, tal como se ha propuesto para las OMVs de *F. novicida*, la presencia de enzimas capaces de degradar peróxido de hidrógeno como la alquil hidroperóxido reductasa o la catalasa (identificada en las vesículas de EcN obtenidas a partir de medio LB) ejercerían un papel protector frente a la respuesta oxidativa del huésped (Pierson et al., 2011).

Dentro de este grupo de 34 proteínas identificadas sólo en las OMVs aisladas de cultivos en DMEM se destaca como relevante la aparición de proteínas codificadas por

genes crípticos o pseudogenes en cepas de laboratorio o en cepas de *E. coli* no patógenas, como la proteína CFA/1 codificada por el gen *yagW*.

En base a los datos obtenidos del análisis por espectrometría de masas, una de las proteínas más abundantes en el proteoma vesicular de la cepa EcN en DMEM fue la proteína CFA/1 (*colonization factor antigen*). Esta proteína presenta la estructura de fimbrias o adhesinas asociadas a procesos de colonización intestinal. Las proteínas CFA son capaces de asociarse con diferentes tipos de pili y proporcionan una fijación específica de la bacteria sobre la superficie epitelial (Caron and Scott, 1990). Se han caracterizado más de 20 antígenos CFA. Específicamente, se ha descrito que CFA/1 esta presente en el 75% de los casos de diarreas producidas por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Estos antígenos con alto potencial inmunogénico han sido considerados por sus características como candidatos para el uso de vacunas para prevenir diarreas (Lüdi et al., 2006). Mutaciones en el gen que codifica esta fimbria anulan la expresión de la proteína CFA/1 funcional en las cepas de *E. coli* no patógenas. La expresión de esta fimbria en la cepa EcN confiere a este probiótico una ventaja para la colonización del tracto intestinal frente bacterias comensales, a la vez que le permite competir con patógenos por la adhesión. Por ello, la fimbria CFA/1 debe ser considerada uno de los factores *fitness* de EcN.

El resto de proteínas identificadas participan en la síntesis de proteínas. Por un lado están las proteínas ribosomales. Este tipo de proteínas aparecen en gran número en las OMVs de todas las bacterias gram-negativas estudiadas. Por otro lado se han identificado varias aminoacil-tRNA sintetasas. Esto podría estar de acuerdo con la composición del medio DMEM ya que la mayoría de las enzimas identificadas están asociadas a aminoácidos presentes en este medio de cultivo, como fenilalanina o metionina.

Los resultados de los estudios proteómicos de las OMVs obtenidas de cultivos de la cepa probiótica EcN en LB (Aguilera et al., 2014) o en medio DMEM, presentados en este trabajo, permiten evidenciar que, a pesar de compartir muchas de las proteínas, el medio de crecimiento determina la composición de estas vesículas. Este hecho debería de ser considerado en los estudios funcionales de OMVs generadas por microorganismos gram-negativos.

Si bien no se conocen todavía los mecanismos de formación de OMVs y muchas de las implicaciones fisiológicas y/o patológicas de estas estructuras vesiculares, el número de estudios funcionales y proteómicos de OMVs está creciendo de manera exponencial en los últimos años, sobretodo de patógenos. Este es un campo de investigación emergente que está aportando datos relevantes sobre la biogénesis, composición y funciones de las OMVs. Estudios recientes han demostrado la formación de dos tipos de vesículas por parte de bacterias gram-negativas: (i) las convencionales, originadas a

---

partir de la membrana externa, están formadas por una bicapa lipídica con el periplasma atrapado en el interior, y (ii) un tipo mucho más complejo de vesículas que en su formación arrastra la membrana interna y material citoplasmático, incluido proteínas y DNA. Este estudio realizado en *Shewanella vesiculosa* M7 (T), una bacteria aislada de la Antártida y adaptada a vivir en condiciones extremas de temperatura, libera los dos tipos de OMVs. Este estudio sugiere que la amplia diversidad de OMVs requiere un análisis mucho más profundo en cuanto a morfología y composición de estas vesículas que pueden determinar perfiles funcionales distintos (Pérez-Cruz et al., 2013).

El conocimiento más profundo de las vesículas producidas por patógenos o bacterias comensales ha de sentar las bases para el futuro desarrollo de vacunas y antibióticos efectivos contra bacterias patógenas, o contribuir a la generación de cepas probióticas más eficientes, con mayor capacidad de adhesión y de desplazamiento de patógenos.

En la actualidad son muchas las evidencias científicas sobre la implicación de la microbiota intestinal en el estado de salud de un individuo. Puesto que alteraciones en la composición de la microbiota pueden llevar al desarrollo de patologías intestinales o metabólicas, la microbiota está siendo explotada como diana terapéutica. En este sentido actúa la administración de probióticos. Sin embargo, los factores responsables de los efectos probióticos y las bases moleculares de su mecanismo de acción son en muchos casos desconocidos. Nuestro estudio sobre el proteoma de las OMVs de la cepa EcN representa el primer análisis proteómico de vesículas producidas por un probiótico. Nuestros resultados evidencian que las OMVs de cepas probióticas contienen proteínas que pueden dirigir estas vesículas hacia células y estructuras extracelulares del huésped y mediar, al menos en parte, los efectos beneficiosos sobre la homeostasis intestinal.

Además, este estudio representa un punto de partida para el desarrollo de estudios proteómicos de vesículas producidas por otros probióticos o cepas comensales. Hay que destacar que la producción de vesículas no está restringida a las bacterias gram-negativas. Diversos estudios han evidenciado la producción de vesículas por bacterias gram-positivas. En este caso, las vesículas derivan de la membrana citoplasmática y son diferentes en composición y estructura, pero parecen ejercer funciones similares a las vesículas de membrana externa (MacDonald and Kuehn, 2012). En conclusión, estudios proteómicos similares a los desarrollados por nuestro grupo en el contexto de las OMVs producidas por el probiótico gram-negativo EcN podrían ser aplicados a probióticos gram-positivos, entre ellos los de mayor uso, pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*.

### 5.3. ANALISIS FUNCIONAL DE Sat EN LA CEPA PROBIÓTICA EcN.

#### 5.3.1. LA PROTEÍNA Sat ES AUTOTRANSPORTADA Y SU DOMINIO FUNCIONAL LIBERADO AL MEDIO EXTRACELULAR EN CULTIVOS DE LA CEPA EcN.

Sat pertenece a la subfamilia de serin proteasas autotransportadoras de enterobacterias (SPATEs). En esta proteína se localizan los tres dominios típicos de los miembros de esta familia (Figura 5.5) que determinan su síntesis en forma de precursor (142 kDa), el cual es procesado en el extremo N-terminal en su paso hacia el espacio periplasmático a través del sistema de secreción Sec (residuos 1-49). Esta proteína se autotransporta después al medio a través de la membrana externa y sufre otro procesamiento proteolítico que libera el dominio funcional (dominio  $\alpha$  o *passenger domain*) con actividad proteasa (residuos 50-1018, 107 kDa) y deja anclado su dominio C-terminal en la membrana externa (residuos 1019-1295, 31 kDa).

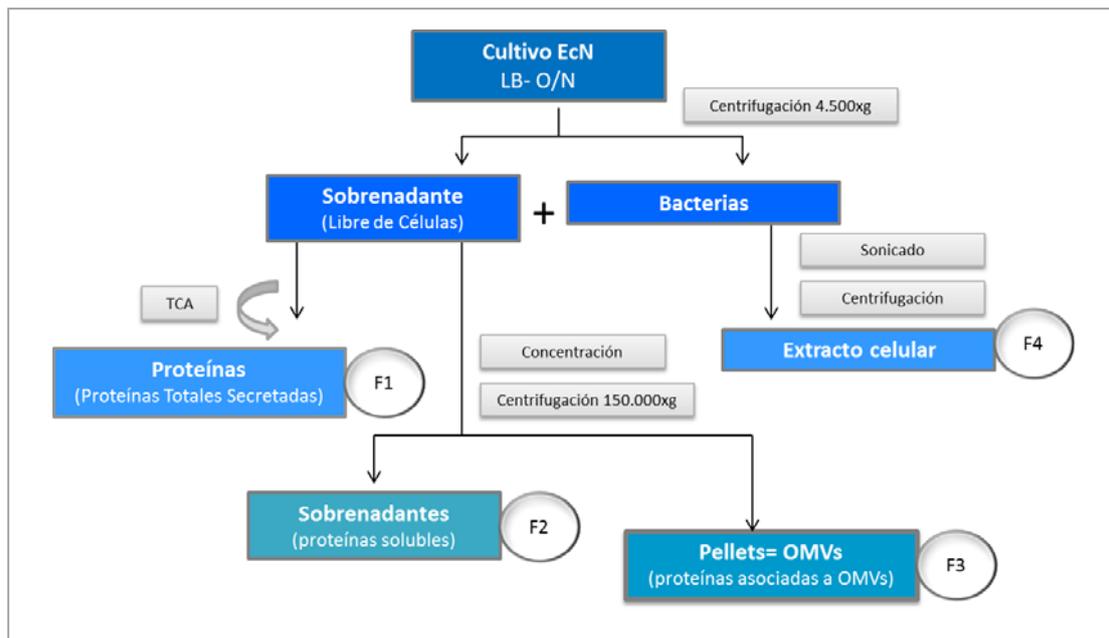
El análisis del secretoma presentado en el apartado anterior había sido realizado con sobrenadantes de un cultivo de la cepa EcN en medio LB, donde estaban presentes tanto las proteínas libres en el medio de cultivo como las asociadas a OMVs. El análisis de los péptidos de Sat identificados por espectrometría de masas nos permitió evidenciar que todos ellos correspondían a péptidos del dominio secretado funcional (Figura 5.5).

Para confirmar que la proteasa Sat es autotransportada y liberada al medio de cultivo en forma soluble procedimos al fraccionamiento del sobrenadante de un cultivo de la cepa EcN en medio LB siguiendo el esquema detallado en la Figura 5.6. Un cultivo de la cepa EcN crecido en medio LB durante 16-18 horas fue centrifugado para separar las bacterias de los componentes secretados presentes en el sobrenadante del cultivo. A partir del sedimento bacteriano se procedió a obtener el extracto celular que contiene las proteínas intracelulares y de membrana plasmática (F4, Figura 5.6).

El sobrenadante del cultivo fue filtrado a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar cualquier bacteria presente en el mismo después de la etapa de centrifugación (sobrenadante libre de células). Una alícuota de este sobrenadante fue precipitada con TCA (F1, Fig. 5.6) generando la fracción total de proteínas secretadas (contiene las proteínas secretadas de manera soluble y las OMVs). Otra alícuota del cultivo fue sometida a ultracentrifugación (150.000xg, 90 min). En este paso las proteínas secretadas de manera soluble permanecen en solución (F2, Fig. 5.6), mientras que la fracción sedimentada corresponde a las OMVs (F3, Fig. 5.6). La presencia de Sat en estas fracciones se analizó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo policlonal de conejo (anticuerpo anti-Sat). Este anticuerpo fue obtenido por Genscript a través de un protocolo de inmunización de conejos con un péptido inmunogénico del dominio  $\alpha$  de Sat. El péptido utilizado fue CKSNNQQTsFDQPDW (Fig. 5.5).

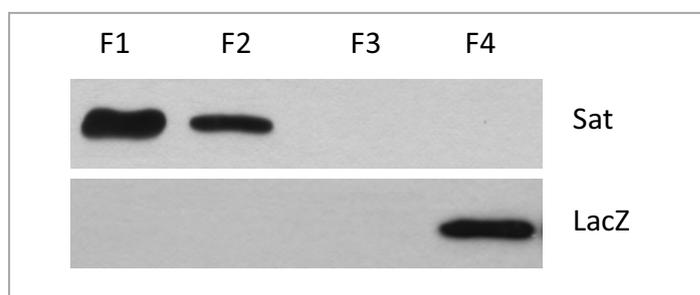
MNKIYSLKYSAATGGLIAVSELAKRVSGKTRKLVATMLSLAVA  
 GTVNAANIDISNVWARDYLDLAQNKGIFQPGATDVTITLKNQDKFSFHNLSIPDFSGA  
 AASGAATAIGGSYSVTVAHNKKNPQAAETQVYAQSSYKVVDRRNSNDFEIQRLNKFVV  
 ETVGATPAETNPPTYSDALERYGIVTSDGSKKIIGFRAGSGGTSFINGESKISTNSAY  
 SHDLLSASLFEVTOQWDSYGMMIYKNDKTFRNLEIF<sup>256</sup>**GD**SGSGAYLYDNKLEKWWLVGTT  
 HGIASVNGDQLTWTIKYNDKLVSELKDTYSHKINLNGNNVTIKNTDITLHQNNADTTG  
 TQEKITKDKDIVFTNGGNVLFKDNLDGSGGIIIFDEGHEYNINGQGFTFKGAGIDIGK  
 ESIVNWNALYSSDDVLHKIGPGLNVQKKQGANIKIGEGNVILNEEGTFNNIYLASGN  
 GKVILNKDNSLGNQYAGIFFTKRGGTLDLNGHNQTFTRIAATDDGTTITNSDTTKEA  
 VLAINNEDSYIYHGNINGNIKLTHNINSQDKKTNAKLILDGSVNTKNDVEVSNASLTM  
 QGHATEHAIFRSTANHCSSLVFLCGTDWVTVLKETESSYNKKFNSDHKSNNQOTSFDQP  
 DWKTGVFKFDLHLNNADFSISRANVEGNI SANKSAITIGDKNAYIDNLAGKNITNN  
 GFDFKQTIISTNLSIGETKFTGGITAHNSQIAIGDQAVVTLNGATFLNNTPI SIDKGA  
 VIAQNSMFTTKGIDISGELTMMGIPEQNSKTVTPGLHYAADGFRLSGGNANFIARMA  
 SVTGNIYADDAATITLGPETETPTISSAYQAWAETLLYGFDAYRGAITAPKATVSM  
 NNAIWHLSQSSINRLETKDSMVRFTGDNGKFTTLTVDNLTIDDSAFVLRANLAQADQ  
 LVVNKSLSGKNNLLLVDFIEKNGNSNGLNIDLVSAPKGTAVDVFKATTRSIGFSDVTP  
 VIEQKNDTDKATWTILIGYKSVANADAACKATLLMSGGYKAFLAEVNNLNKRMGDLRDI  
 NGESGAWARIMSGTGSAGGGFSDNYTHVQVGADNKHELDGLDLFTGVTMTYTD SHAGS  
 DAFSGETKSVGAGLYASAMFESGAYIDLIGKYVHHDNEYTATFAGLGTRDYSSHSWYA  
 GAEVGYRYHVTD SAWIEPQAEELVYGAVSGKQFSWKDQGMNLTMKDKDFNPLIGRTGVD  
 VGKSFSGKDWKVTARAGLGYQFDL FANGETVLRDASGEKRIKGEKDGRMLMNVGLNAE  
 IRDNLRFGLFEKSAFGKYNVDNAINANFRYSF

**Figura 5.5. Secuencia aminoacídica de la proteína Sat de EcN.** La secuencia señal de dirección a periplasma y el dominio que queda anclado en la membrana externa (domino  $\beta$ ) después del proceso de autotransporte y secreción de la proteína al medio extracelular se indican en color gris. En rojo y azul se muestran los péptidos identificados por espectrometría de masas en el estudio del secretoma de EcN. En amarillo se resalta la secuencia consenso típica de las serin proteasas y la posición de la Ser<sup>256</sup> marcada en negrita en la secuencia. El péptido seleccionado para la obtención de anticuerpos anti-sat se muestra subrayado.



**Figura 5.6. Fraccionamiento de un cultivo de la cepa EcN.** F1= Sobrenadante del cultivo filtrado y precipitado con TCA (contiene todos los componentes secretados por la bacteria); F2=Proteínas secretadas de manera soluble obtenidas por ultracentrifugación del sobrenadante del cultivo a 150.000xg; F3= OMVs sedimentadas por ultracentrifugación del sobrenadante del cultivo a 150.00xg; F4=Extractos celulares obtenidos por sonicación de las bacterias recogidas por centrifugación del cultivo.

El resultado de este análisis por *Western blot* se presenta en el Figura 5.7. Como control de que no se había producido lisis celular, las diferentes fracciones fueron analizadas en paralelo con un anticuerpo específico frente a la  $\beta$ -galactosidasa (LacZ), una proteína citosólica no secretada. Dicha proteína fue inmunodetectada en la muestra F4 (proteínas celulares) pero no en las demás fracciones, lo que descarta fenómenos de lisis en estas condiciones.



**Figura 5.7. Análisis mediante *Western blot* de la secreción de Sat en cultivos de EcN en medio LB.** Las muestras analizadas corresponden a las diferentes fracciones obtenidas tras aplicar el proceso de separación presentado en la Figura 5.6: F1= Proteínas secretadas totales; F2=Proteínas secretadas de manera soluble; F3=Proteínas secretadas a través de OMVs; F4=Extractos celulares (5  $\mu$ g). La inmunodetección se llevó a cabo usando anticuerpos anti-Sat, o anti-LacZ como control para descartar lisis celular.

Se observa la presencia de Sat en la fracción F1 correspondiente al precipitado total de las proteínas secretadas. Esta fracción es equivalente a la muestra utilizada en los estudios del secretoma de EcN presentados anteriormente (apartado 5.1). La presencia de Sat en la fracción F2 demuestra que esta proteína es liberada al medio en forma soluble. La ausencia de Sat en la fracción F3 indica que Sat no es secretada a través de OMVs. La ausencia de banda reactiva frente a los anticuerpos anti-Sat en la muestra F4 correspondiente al extracto celular es compatible con la localización de una proteína autotransportadora, cuyo destino es su liberación al medio extracelular.

Si bien no hemos localizado Sat en la fracción de vesículas, estudios proteómicos de las OMVs aisladas de cultivos de la cepa EcN en LB han identificado péptidos del dominio  $\beta$ -barrel de Sat (Aguilera et al., 2014). Este es el dominio que queda anclado a la membrana externa y por tanto puede quedar englobado en la formación de la vesícula. La ausencia de detección de este dominio en nuestro análisis por *Western blot* queda justificada ya que los anticuerpos utilizados fueron obtenidos frente a un péptido del dominio catalítico secretado.

### 5.3.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE *sat*.

Nuestros resultados sobre el secretoma de la cepa EcN indicaban que Sat se expresa en cultivos en LB. Cabe destacar que no existen estudios sobre las condiciones de inducción del gen *sat* en el contexto de la cepa probiótica EcN que pudieran favorecer su expresión en el entorno intestinal.

Un estudio transcriptómico reciente identificó *sat* como uno de los genes inducibles por crecimiento en orina tanto en la cepa uropatógena CFT073 como en la cepa probiótica Nissle 1917 (Hancock et al., 2010b). Si bien Sat es considerada un factor de virulencia con elevada prevalencia en cepas uropatógenas, el hábitat natural de la cepa probiótica es el tracto intestinal. Es por ello que el estudio de las condiciones que determinan la expresión de Sat en el entorno intestinal resulta de interés para establecer si esta proteína es un factor de virulencia o ha de ser considerada un factor de competitividad que contribuye a la colonización intestinal. Por ello, nos propusimos analizar la expresión del gen *sat* en la cepa EcN tanto en cultivos bacterianos en presencia de diferentes compuestos del tracto intestinal (análisis *in vitro*), como en el intestino de ratones (análisis *in vivo*).

Para abordar el análisis de la expresión de *sat* se optó por la construcción de fusiones de promotor a genes reporteros. En este trabajo se han construido y analizado dos tipos de fusiones transcripcionales: (i) fusiones del promotor de *sat* al gen *lacZ* transferidas al genoma de la cepa EcN (utilizadas para los análisis de expresión *in vitro*) y (ii) fusiones del promotor de *sat* al gen que codifica GFP en plásmidos multicopia (diseñadas específicamente para los análisis de expresión *in vivo*).

### 5.3.2.1. Análisis de fusiones del promotor del gen *sat* al gen reportero *lacZ*.

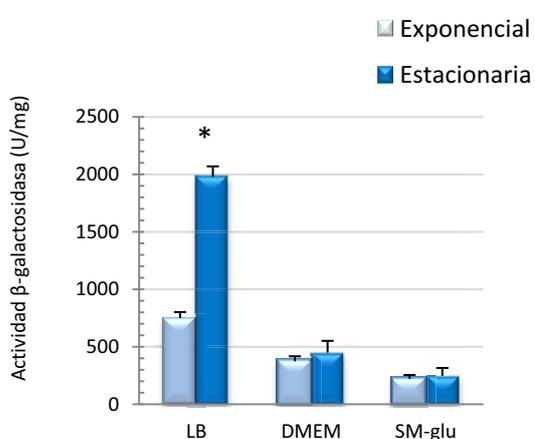
En primer lugar se construyó la fusión transcripcional  $\phi(\textit{sat-lacZ})$  para analizar la expresión de *sat* a través del ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos de la cepa EcN.

Para obtener dicha construcción se amplificó por PCR, a partir de DNA genómico de la cepa EcN, un fragmento de 999 pb comprendido entre las posiciones -939 pb respecto al codón de inicio ATG del gen *sat* y +60 dentro de la región codificante del gen. Este fragmento comprende toda la región intergénica entre el gen *sat* y el gen *iutA* precedente en la isla genómica II de la cepa EcN, por lo que con toda probabilidad contiene todos los elementos de regulación transcripcional. Este fragmento fue clonado en el plásmido pRS551 (Simons et al., 1987). Este plásmido contiene el gen *lacZ* carente de promotor y genes que le confieren resistencia a kanamicina y ampicilina. Los plásmidos recombinantes que habían incorporado el promotor de *sat*, fueron seleccionados como colonias azules en placas de medio LB que contenían X-Gal, kanamicina y ampicilina. La presencia del inserto correspondiente al promotor de *sat* en las colonias seleccionadas fue confirmada por PCR, utilizando un *primer forward* que contenía secuencias del promotor y un *primer reverse* correspondiente a secuencias del gen *lacZ* presente en el plásmido pRS551. De todas las colonias obtenidas se seleccionaron 4 para su posterior análisis. A partir de ellas se extrajo el DNA plasmídico de (Método 4.8.2) y la región del promotor de *sat* fue secuenciada para descartar mutaciones (Método 4.8.8). El DNA plasmídico de una de ellas fue linealizado e incorporado en el fondo genómico de la cepa TE2680 por recombinación homóloga (Elliott, 1992) y posteriormente en el fondo genómico de las cepas EcN $\Delta$ *lacZ* y MC4100 mediante transducción generalizada con el fago P1. Los transductantes fueron seleccionados por su resistencia a kanamicina y sensibilidad a ampicilina y cloramfenicol.

La cepa MC4100 es una cepa  $\Delta$ *lac* muy utilizada en el laboratorio como fondo para estudios de expresión de fusiones de promotor al gen *lacZ*, de la cual disponíamos en nuestra colección de cepas. La cepa EcN $\Delta$ *lacZ* fue obtenida en este trabajo a partir de la cepa EcN por transferencia de la mutación presente en la cepa CAG18439 (*lacZ118 lacI42::Tn10*) (Singer et al., 1989) mediante transducción generalizada con el bacteriófago P1. Los mutantes EcN $\Delta$ *lacZ* se seleccionaron por el fenotipo tetraciclina<sup>R</sup> y fueron confirmados por la formación de colonias blancas en placas de agar MacConkey en presencia de lactosa.

Una vez obtenidas las construcciones monocopia integradas en el genoma de las cepas de interés, EcN $\Delta$ *lacZ*  $\phi(\textit{sat-lacZ})$  y MC4100  $\phi(\textit{sat-lacZ})$ , se procedió a establecer las condiciones óptimas de expresión de Sat por medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Método 4.5.5.1) en extractos celulares obtenidos a partir de dichas cepas crecidas en

diferentes medios de cultivo. Los medios utilizados fueron: (i) LB, medio bacteriológico rico con alta concentración de proteínas del tipo caseína, (ii) DMEM medio de cultivo de células eucariotas que contiene glucosa, bicarbonato sódico (3.7 g/l) y una mezcla de aminoácidos esenciales y (iii) SM-glucosa, medio mínimo con glucosa 0.2% como fuente de carbono suplementado con hidrolizado de caseína 0.02% y triptófano 0.2% (las cepas que contienen integrada la fusión  $\phi(\text{sat-lacZ})$  presentan auxotrofia para este aminoácido). Los cultivos fueron incubados a 37°C hasta fase exponencial (6-8 horas) o hasta fase estacionaria (16-18 horas) y las bacterias fueron procesadas para la obtención de los extractos celulares, donde se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.8. Los valores de actividad enzimática se expresan en U/mg, donde una unidad de actividad  $\beta$ -galactosidasa corresponde a la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de ONPG por minuto.

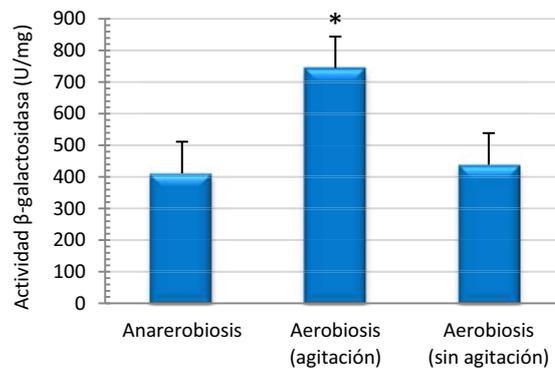


**Figura 5.8. Análisis de la expresión de  $\phi(\text{sat-lacZ})$  en el fondo genómico de la cepa EcN $\Delta$ lacZ en diferentes medios de cultivo.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada por triplicado en extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de esta cepa en los medios indicados. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa (expresados en U/mg) corresponden a la media  $\pm$ SE de tres experimentos independientes. \* $P=0.000$ , vs LB exponencial.

Se puede observar que la mayor expresión de *sat* tiene lugar en medio rico LB y además esta actividad se ve incrementada unas 3 veces en fase estacionaria respecto a la observada en fase exponencial. Los resultados también indican que *Sat* se expresa en medio DMEM y SM-glucosa, pero a un nivel mucho más bajo (entre 5-10 veces inferior) al observado en medio LB, no existiendo en ambos casos diferencias significativas de expresión entre la fase exponencial y la estacionaria. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión del gen *sat*, al menos en medio LB, es dependiente de la fase de crecimiento.

El análisis de expresión de  $\phi(\text{sat-lacZ})$  en el fondo genómico de la cepa de laboratorio MC4100 mostró el mismo patrón de expresión que el obtenido con la cepa EcN $\Delta$ lacZ (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que la expresión del gen *sat*, así como su posible regulación por fase de crecimiento no es específica de la cepa probiótica EcN, sino que en ella participan reguladores generales codificados en el genoma base de *E.coli*.

Las condiciones óptimas de oxigenación fueron evaluadas en cultivos de *EcN*  $\phi$ (*sat-lacZ*) en medio LB crecidos hasta fase exponencial a 37°C. Se prepararon cultivos en ausencia de oxígeno (anaeróbicos) o en presencia de oxígeno, bien con agitación en *shaker* orbital (aeróbicos) o incubados en condiciones estáticas (microaerófilicos). Los resultados se muestran en la Figura 5.9.

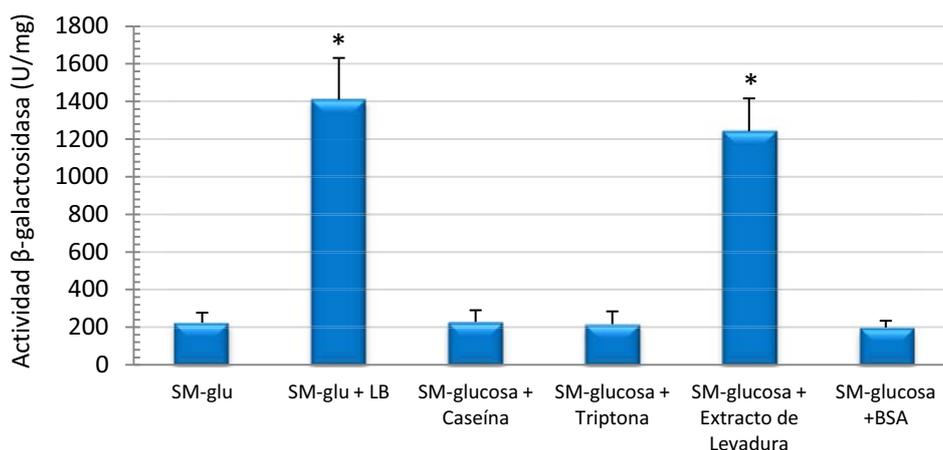


**Figura 5.9. Análisis de la expresión de  $\phi$ (*sat-lacZ*) en el fondo genómico de la cepa *EcN* $\Delta$ *lacZ* en diferentes condiciones de oxigenación.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada por triplicado en extractos celulares obtenidos a partir de cultivos en LB incubados en las condiciones indicadas. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa (expresados en U/mg) corresponden a la media  $\pm$ SE de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$ .

Los resultados muestran una máxima expresión de *Sat* en condiciones de aerobiosis. Los cultivos de la cepa crecidos en anaerobiosis y de forma estática presentaron una menor expresión del gen, del orden del 50% inferior.

Puesto que la máxima expresión de *sat* se obtuvo en medio LB (Figura 5.8), cuyo componente mayoritario es la triptona (caseína digerida con enzimas pancreáticas), nos planteamos analizar si el gen *sat* es inducible por proteína. Para este estudio se prepararon cultivos de la cepa *EcN* $\phi$ (*sat-lacZ*) en medio SM-glucosa al que se adicionaron diferentes proteínas (albúmina de suero bovino o caseína nativa), así como cada uno de los componentes presentes en el medio LB por separado (triptona o extracto de levadura). Como control se adicionó LB completo al medio basal SM-glucosa. Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, las bacterias fueron recogidas por centrifugación y procesadas para la obtención de los extractos celulares donde se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se presentan en la Figura 5.10.

La expresión de *sat* es inducida unas 7 veces por la adición de LB al medio basal SM-glucosa. Este resultado indica que la glucosa no ejerce represión catabólica sobre la expresión de *sat* ya que los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa observados en presencia de SM-glucosa-LB son del mismo orden que los observados en LB.



**Figura 5.10. Análisis de la expresión de  $\phi(sat-lacZ)$  en el fondo genómico de la cepa *EcN $\Delta$ lacZ* en presencia de diferentes fuentes de proteína.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada por triplicado en extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de esta cepa en medio SM-glucosa en presencia de las proteínas indicadas a la concentración de 0.3%. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa (expresados en U/mg) corresponden a la media  $\pm$ SE de tres experimentos independientes. \* $P=0.000$ , vs SM-glu.

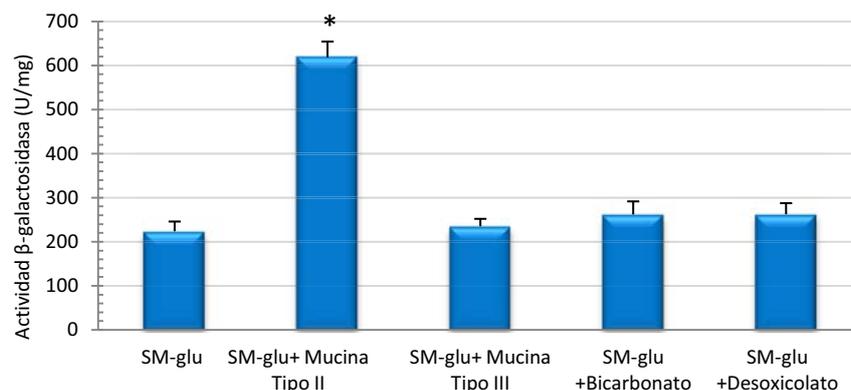
Al analizar los componentes del LB por separado observamos que la triptona (caseína digerida por acción de enzimas pancreáticas) no ejerce ningún efecto en la expresión de *sat* con respecto a los niveles basales obtenidos en SM-glucosa. Tampoco se observó efecto alguno por la adición de otras fuentes de proteína como caseína o albúmina. Sin embargo, el extracto de levadura produjo una marcada inducción en la expresión de *sat*. Los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en este caso eran próximos a los obtenidos por la adición del medio LB completo. Estos resultados indican que la presencia de proteínas (en general) no es un factor de inducción para la expresión de *sat* en la cepa probiótica *EcN*. La elevada expresión del gen *sat* observada en LB se debe a algún componente presente en el extracto de levadura. Este extracto consiste en un extracto concentrado producto de autólisis de *Saccharomyces cerevisiae*. Este producto es rico en vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento. Es probable que algún componente producto de la digestión de las levaduras o presente en las membranas celulares sean los responsables de la inducción del gen *sat*.

A continuación se procedió a analizar la inducción de  $\phi(sat-lacZ)$  por compuestos presentes en el tracto gastrointestinal con la finalidad de simular el ambiente al que se expone una bacteria en el interior del intestino. La inducción del gen en presencia de estos compuestos podría sugerir una posible implicación de *Sat* en la adaptación /interacción de este probiótico con el huésped en su entorno habitual. Como condiciones base para este estudio se seleccionó el medio mínimo SM-glucosa al que se adicionaron los siguientes compuestos: bicarbonato sódico a una concentración de 3.7 g/l, desoxicolato sódico (sal biliar) a concentraciones entre 0.1-0.5 mg/ml o mucinas denominadas de Tipo II y de Tipo III al 0.3%. Estas mucinas comercializadas

por Sigma (Referencias M2378 y M1778) corresponden a mucina de estómago de cerdo cuya diferencia entre ellas radica en el grado de purificación. La mucina Tipo II corresponde a la fracción en bruto obtenida por digestión del estómago de cerdo, mientras que la Tipo III es obtenida mediante purificación a partir de la mucina Tipo II aplicando el procedimiento descrito por Glenister et al. (1988). En concreto, la mucina Tipo II es disuelta (10% p/v) en una solución de NaCl 0.1 M (pH 7.0) y se mantiene en agitación O/N. Las impurezas o restos celulares se eliminan por centrifugación a 10.000xg y la mucina recuperada en el sobrenadante es precipitada con etanol al 60% (v/v). El precipitado obtenido por centrifugación es resuspendido en NaCl 0,1M y el producto obtenido es liofilizado y comercializado. Según este protocolo, la mucina Tipo III correspondería a la fracción de mucina secretada en el estómago, mayoritariamente MUC5A (Tabla 1.1).

El análisis se llevó a cabo en cultivos en fase estacionaria de la cepa EcN  $\phi(\text{sat-lacZ})$  en SM-glucosa en presencia de los citados compuestos. En paralelo se procesó un cultivo en SM-glucosa como control. Los resultados se presentan en la Figura 5.11.

La expresión de *sat* no es inducida por bicarbonato sódico ni tampoco por sales biliares (desoxicolato sódico). El bicarbonato sódico actúa como inductor de la expresión de determinados genes de virulencia presentes en islas genómicas de cepas enteropatógenas de *E. coli* (Abe et al., 2002). Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa presentados en la Figura 5.11, así como los obtenidos en medio DMEM (Fig. 5.8) descartan que este compuesto sea inductor de la expresión de *sat* en la cepa EcN.



**Figura 5.11. Análisis de la inducción de  $\phi(\text{sat-lacZ})$  en el fondo genómico de EcN en presencia de compuestos que podrían actuar como señales intestinales.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada por triplicado en extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de la cepa EcN en los medios indicados. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa (expresados en U/mg) corresponden a la media  $\pm$ SE de tres experimentos independientes. \* $P=0.000$  respecto a SM-glu.

Sólo se observa una clara inducción significativa con mucina Tipo II. La expresión de  $\phi(\text{sat-lacZ})$  en presencia de esta mucina comercial supera 3 veces aproximadamente

los valores basales del control. Sin embargo, la mucina Tipo III no ejerce ningún efecto sobre la expresión de *sat*. Estos resultados sugieren que la preparación de mucina Tipo II contiene algún compuesto inductor que ha sido eliminado durante el proceso de purificación de la mucina Tipo III.

Tal como refleja la Tabla 1.1 del apartado introducción, en el estómago podemos encontrar diferentes tipos de mucinas: mucinas secretadas como MUC5AC y MUC6 y mucinas de superficie celular, ancladas a la membrana plasmática, como MUC1, MUC4, MUC12, MUC13 y MUC17. El proceso de purificación seguido para la obtención de la mucina Tipo III elimina los restos celulares por centrifugación y con ellos las mucinas asociadas a la membrana. El factor inductor de la expresión de *Sat* ha de estar en esta fracción. De todas las mucinas presentes en el estómago, MUC1, MUC12 y MUC13 también se encuentran presentes en la membrana plasmática de células del riñón. Teniendo en cuenta la estrecha relación filogenética existente entre la cepa uropatógena CFT073 y la cepa probiótica EcN se puede especular que alguna de estas mucinas comunes a ambos epitelios (renal e intestinal) puede estar implicada en la inducción de *Sat*. En este caso la mucina, o algún componente derivado de su estructura (oligosacárido) activarían la expresión del gen *sat* de cepas uropatógenas en el riñón, así como la expresión de la cepa EcN en su paso por el estómago.

A nivel del intestino hay que considerar que MUC1 está presente en células del sistema inmune como células dendríticas, en linfocitos T activados y en células B (Linden et al., 2008; Wykes et al., 2002; Mukherjee et al., 2005), y las mucinas MUC12 y MUC13 se encuentran también en células epiteliales del intestino delgado y colon (Tabla 1.1). Un estudio proteómico del mucus de las diferentes partes del tracto gastrointestinal de ratones ha identificado la mucina MUC13 en el mucus raspado de todas las partes del mismo: estómago, yeyuno, íleon, colon proximal y distal. La presencia de esta mucina transmembrana en la capa mucosa secretada es debida a su exporte vía vesículas exocíticas (McConnell et al., 2009). De hecho, se ha descrito que los enterocitos de las microvellosidades intestinales, así como las *globet cells* generan gran cantidad de vesículas exocíticas que son liberadas a la capa de mucus. Estas vesículas contienen además proteínas intracelulares, las cuales acceden al mucus a través de este mecanismo. Entre estas proteínas se encuentran componentes del citoesqueleto o proteínas asociadas al mismo (McConnell et al., 2009; McDole et al., 2012). La identificación de fodrina, una de las proteínas sustrato de la serin proteasa *Sat*, en el proteoma del mucus de diferentes partes del tracto intestinal de ratones (Rodríguez-Piñeiro et al., 2013) abre nuevas especulaciones en relación a la inducción del gen *sat* en el tracto gastrointestinal. La presencia de mucina MUC13 o de proteínas diana de *Sat* (como fodrina o espectrina) en las vesículas exocíticas liberadas a la capa de mucus por células epiteliales del intestino mantendrían la expresión del gen *sat* a lo largo del tracto gastrointestinal.

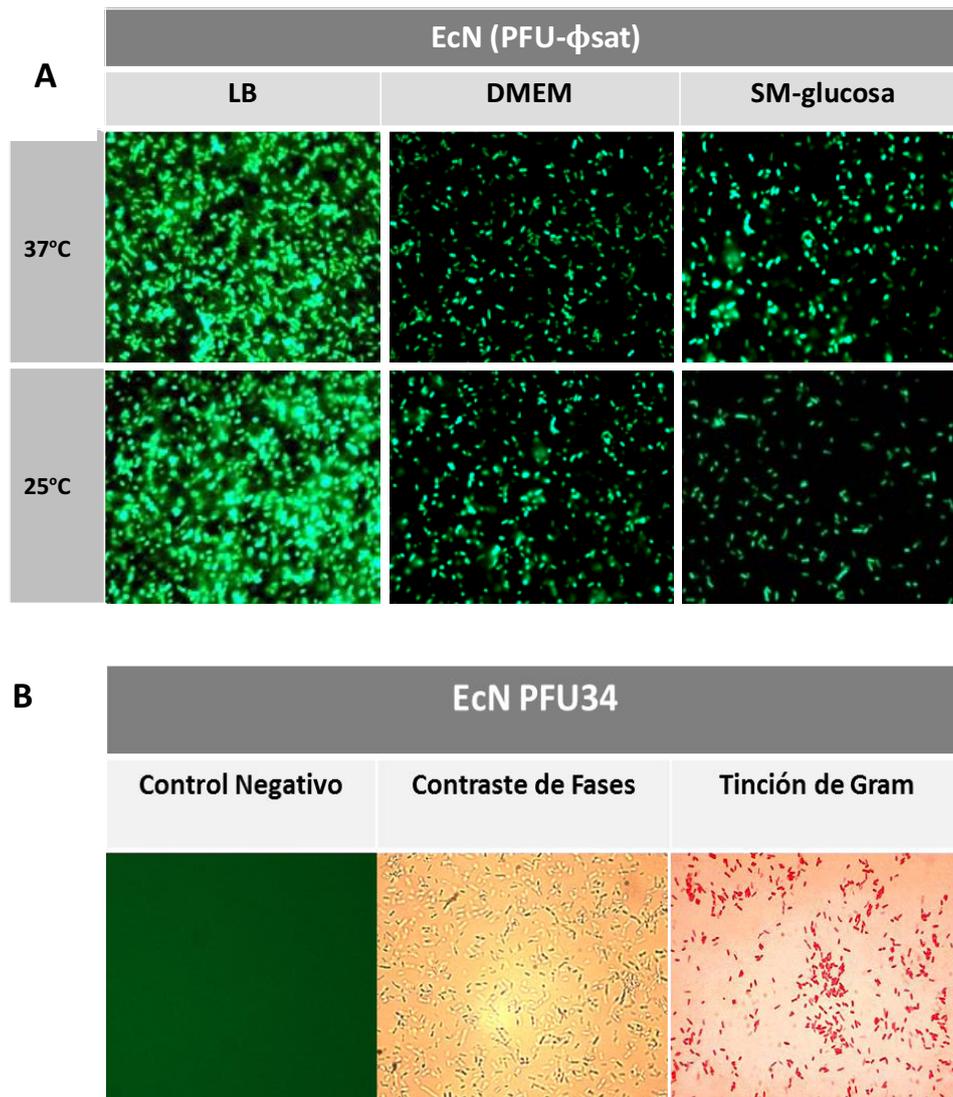
### 5.3.2.2. Análisis de fusiones del promotor del gen *sat* al gen reportero *gfp*.

Para confirmar la expresión de *sat* en el tracto intestinal nos planteamos llevar a cabo estudios *in vivo* en modelos murinos. Con esta finalidad se obtuvieron fusiones de promotor al gen reportero *gfp*. Las proteínas reporteras fluorescentes o luminiscentes son muy útiles para el estudio de la expresión de genes de virulencia en los tejidos infectados en diferentes etapas de colonización (Uliczka et al., 2011).

El fragmento utilizado para la construcción de la fusión del promotor de *sat* al gen *gfp* se obtuvo por PCR a partir de DNA genómico de la cepa EcN. Este fragmento de 349 pb se extendía 349 pb corriente arriba del codón ATG. Esta región contiene los elementos necesarios para dirigir la expresión del gen *sat* de cepas patógenas de *E. coli*, cuando es clonado en el plásmido pACYC184 (Guignot et al., 2007). Los *primers* utilizados en la reacción de PCR contenían en su extremo 5' la diana de restricción para la enzima *Bam*HI (*primer forward*) y para *Sal*I (*primer reverse*). El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido PFU34 que lleva como marcador el gen de resistencia a la ampicilina y que contiene como gen reportero el gen *gfpmut3.1* que expresa una versión mutada de la proteína *Green fluorescent protein* (GFP). Esta proteína es capaz de emitir mayor intensidad de fluorescencia que la proteína GFP *wild type*. El plásmido recombinante se seleccionó después de transformar células competentes de la cepa XL1-Blue, obtener el DNA plasmídico de los transformantes y comprobar por PCR la presencia del fragmento clonado, así como la ausencia de mutaciones por secuenciación del mismo. El plásmido recombinante obtenido (PFU34- $\phi$ sat) se utilizó para transformar células competentes de la cepa EcN mediante electroporación. Como control negativo se transformó la cepa EcN con el vector (PFU34) en el que el gen *gfpmut3.1* carece de promotor. Los clones recombinantes fueron seleccionados en placas de LB-ampicilina. (Método 4.9.2).

#### 5.3.2.2.1. Análisis *in vitro*.

En primer lugar se procedió al análisis *in vitro* de la expresión de la construcción  $\phi$ (*sat-gfpmut3.1*) en cultivos de la cepa EcN transformada con el plásmido PFU34- $\phi$ sat o con el vector PFU34 como control. Los cultivos fueron estandarizados para evaluar las condiciones óptimas de emisión de fluorescencia. Los medios de cultivo utilizados fueron LB, DMEM y SM-glucosa. Las condiciones de temperatura analizadas fueron 25°C y 37°C (Método 4.9.2).



**Figura 5.12. Análisis de la expresión de *sat* a partir de la construcción PFU34- $\phi$ sat y PFU34 en la cepa EcN en diferentes condiciones de cultivo.** A) La cepa EcN (PFU34- $\phi$ sat) fue crecida en los medios de cultivo y temperatura indicados y las bacterias del cultivo visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. B) La cepa EcN (PFU34) fue crecida en medio LB a 37°C como control negativo. Las bacterias del cultivo fueron procesadas para observación mediante microscopía de fluorescencia, microscopía de contraste de fases y microscopía óptica después de realizar Tinción de Gram.

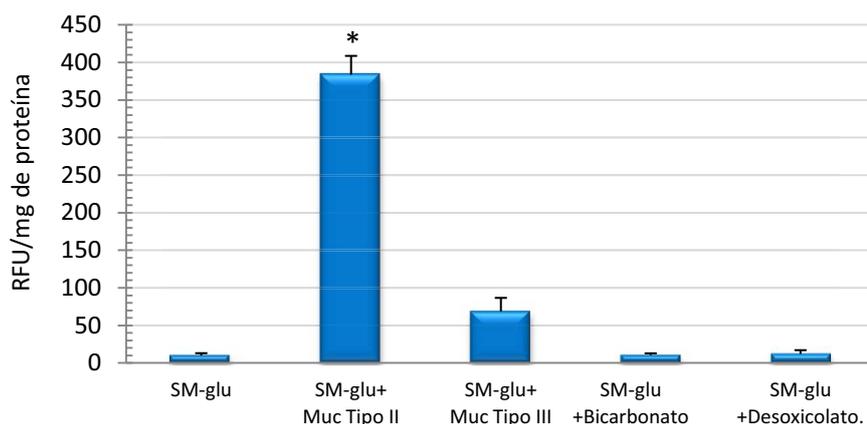
Los resultados obtenidos muestran la expresión de la proteína GFP a partir del promotor de *sat* (bacterias verdes) tanto a 25°C como a 37°C en los diferentes medios de cultivos ensayados (Fig. 5.12.A). Se observa una mayor intensidad de fluorescencia en medio LB con respecto a los medios SM-glucosa y DMEM. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el análisis de la expresión de la fusión del promotor  $\phi$ (*sat-lacZ*) integrada en el genoma, presentado en el apartado anterior. La expresión de *sat* no depende de la temperatura de crecimiento. Determinados genes de virulencia están sujetos a regulación transcripcional por temperatura. En estos casos, la expresión del gen tiene lugar a la temperatura a la cual el patógeno se encuentra en los tejidos del huésped. Un ejemplo es el gen de virulencia de *Yersinia*

*pseudotuberculosis yadA* que se expresa a 37°C pero no a 25°C (Uliczka et al., 2011). Nuestros resultados indican que la expresión de *sat* no está sujeta a este tipo de regulación típica de genes de virulencia.

Los resultados obtenidos con la cepa EcN transformada con el plásmido PFU34 (control negativo) confirman la funcionalidad del promotor de *sat* clonado y validan la construcción PFU34- $\phi$ sat para estudios de expresión *in vivo*. El crecimiento en medio LB a 37°C es el que proporciona una mayor expresión de *sat*, sin embargo no se observa emisión de fluorescencia por parte de las bacterias transformadas con el plásmido vector PFU34 (Fig. 5.12.B). La presencia de bacterias en el cultivo fue evidenciada por microscopía por contraste de fases y por tinción Gram.

La región promotora clonada en la construcción PFU34- $\phi$ sat es menor que la utilizada para la construcción de la fusión  $\phi$ (*sat-lacZ*). Por ello nos planteamos analizar con esta nueva construcción la expresión de *sat* en presencia de los compuestos del tracto intestinal mucina de Tipo II, mucina de Tipo III, bicarbonato sódico y desoxicolato sódico. La cepa EcN (PFU34- $\phi$ sat) fue crecida en medio SM-glucosa a 37°C en ausencia o presencia de los citados compuestos durante 16-18 horas. A continuación se obtuvo los extractos celulares (Métodos 4.5.2). La concentración de proteína en estas muestras fue determinada por el método de Lowry (Métodos 4.5.3) y la medición de unidades de fluorescencia relativa (RFU) se realizó con el equipo Turner BioSystems Modulus Microplate en placas negras de 96 pocillos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.13.

Estos resultados confirman los resultados obtenidos con la cepa EcN  $\phi$ (*sat-lacZ*). Se observa inducción de *sat* en presencia de mucina Tipo II mientras que los otros compuestos no ejercen ningún efecto sobre el valor basal en medio SM-glucosa. Es importante destacar que las RFU obtenidas en este ensayo corresponden a la expresión de la fusión transcripcional clonada en un plásmido multicopia, en cambio las unidades de actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron obtenidas de la expresión de la fusión monocopia integrada en el genoma por recombinación homóloga.



**Figura 5.13. Análisis de la expresión de *sat* a partir de construcción PFU34- $\phi$ *sat* en la cepa EcN en presencia de diferentes compuestos ensayados como inductores.** Las muestras ensayadas por triplicado corresponden a los extractos celulares obtenidos a partir de cultivos en SM-glucosa de la cepa EcN (PFU34- $\phi$ *sat*) en ausencia o presencia de los compuestos indicados. Los valores de actividad promotora, expresados como unidades relativas de fluorescencia RFU/mg de proteína, corresponden a la media  $\pm$ SE de dos experimentos independientes. \* $P=0.000$ , respecto a SM-glu.

#### 5.3.2.2.2. Análisis *in vivo*

Para analizar la expresión del gen *sat* en el intestino, 2 ratones CD-1 fueron inoculados por sonda orogástrica con 0.2 ml de una solución que contenía  $10^6$  UFC/ml de la cepa EcN (PFU34- $\phi$ *sat*) y otros 2 ratones fueron inoculados con 0.2 ml de una solución que contenía  $10^6$  UFC/ml de la cepa EcN (PFU34) (control negativo) según (Métodos 4.6.) 24 horas antes se administró ampicilina a los ratones en el agua de bebida con la finalidad de eliminar las cepas resistentes a este antibiótico y facilitar la colonización con las cepas en estudio. La ampicilina fue mantenida en el agua de bebida durante todo el experimento. Al tercer día de la inoculación se procedió al sacrificio de los ratones para obtener por raspado el mucus de íleon y colon y realizar los recuentos bacterianos en placas de LB-ampicilina. Horas previas al sacrificio, las heces de los ratones fueron recogidas y tratadas según el protocolo descrito en el apartado de Métodos 4.6, para proceder al recuento bacteriano y observación por microscopía de fluorescencia. La expresión de *sat* en el intestino daría como resultado la expresión de GFP a partir de la construcción (PFU34- $\phi$ *sat*), lo que permitiría visualizar las bacterias a partir de la fluorescencia emitida (Métodos 4.7.2).

Los recuentos bacterianos obtenidos tanto en heces como en mucus (íleon y colon) se muestran en la Tabla 5.3.

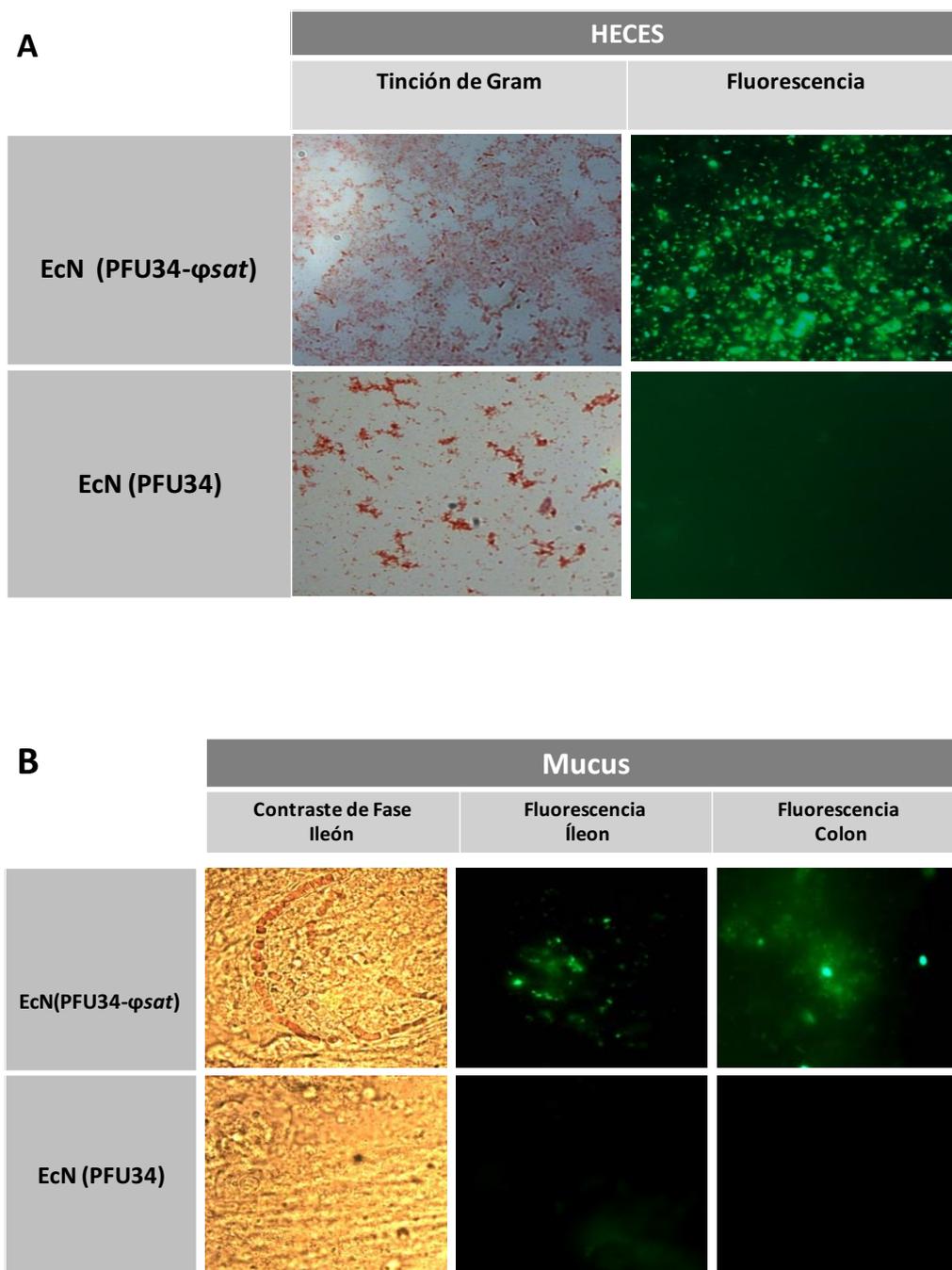
**Tabla 5.3. Recuento bacteriano en heces y mucus de ratones colonizados.** Cada muestra fue procesada por triplicado.

| Número de ratón | Cepa utilizada          | HECES<br>UFC/g Heces | MUCUS (Íleon)<br>UFC/g Mucus | MUCUS (Colon)<br>UFC/g Mucus |
|-----------------|-------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1               | EcN (PFU34- $\phi$ sat) | $1,37 \times 10^9$   | $3,37 \times 10^4$           | $4.12 \times 10^4$           |
| 2               | EcN (PFU34- $\phi$ sat) | $1,2 \times 10^9$    | $4,1 \times 10^4$            | $3.85 \times 10^4$           |
| 3               | EcN (PFU34)             | $1,1 \times 10^9$    | $2,35 \times 10^4$           | $2.96 \times 10^4$           |
| 4               | EcN (PFU34)             | $1,8 \times 10^9$    | $5,2 \times 10^4$            | $3.41 \times 10^4$           |

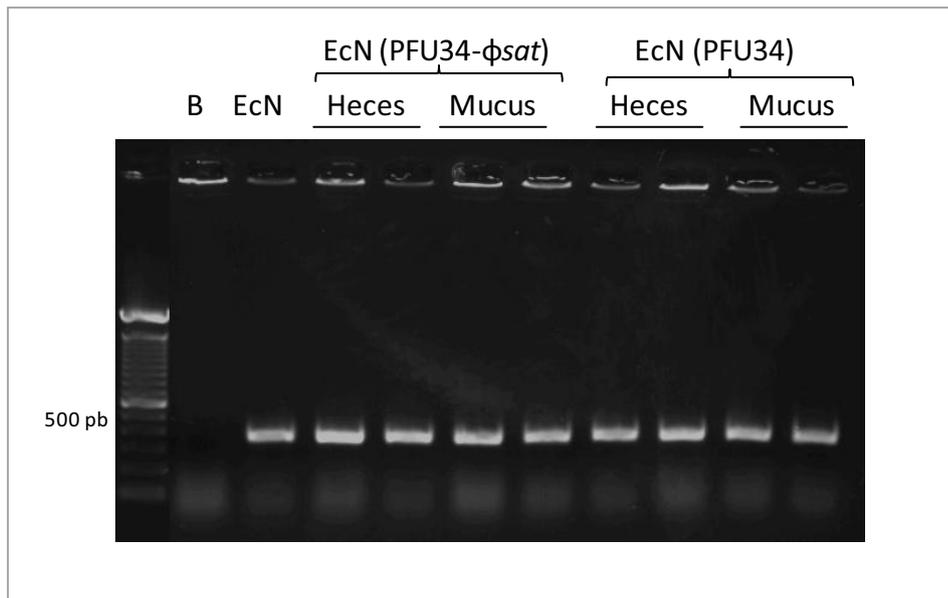
Los recuentos bacterianos en heces mostraron un nivel de colonización equivalente en todos los ratones. La observación mediante microscopía de fluorescencia de las suspensiones bacterianas obtenidas de las heces mostró emisión de fluorescencia sólo en las cepas que portaban la fusión de promotor (PFU34- $\phi$ sat) (ratones 1 y 2). Las suspensiones de heces obtenidas de los ratones control, inoculados con la cepa probiótica transformada con el vector (PFU34), no mostraron emisión de fluorescencia (ratones 3 y 4) (Figura 5.14A).

En el mucus aislado de fracciones correspondiente a íleon y colon de los ratones, el recuento de bacterias adheridas expresados como UFC/g mucus), mostró resultados similares en todos los ratones (Tabla 5.3). Sin embargo, sólo se observaron bacterias fluorescentes en el mucus obtenido a partir de ratones inoculados con la cepa EcN (PFU34- $\phi$ sat) tanto a nivel de íleon como colon (Figura 5.14B).

De las colonias seleccionadas en placas de LB-ampicilina utilizadas para los recuentos bacterianos de heces y mucus, se seleccionaron al azar un par de cada condición. Para confirmar que estas colonias correspondían a la cepa EcN inoculada a los ratones, se llevó a cabo una reacción de PCR con *primers* que permitían amplificar un fragmento de aproximadamente 500pb, correspondiente a la región codificante del gen *sat* presente en el cromosoma de la cepa EcN, cepa portadora de los plásmidos PFU34 o (PFU34- $\phi$ sat) (Figura 5.15). La amplificación mediante PCR demostró que todas las colonias seleccionadas tanto de heces como de mucus correspondían a EcN. Estos resultados corroboran que las tasas de colonización estimadas se deben a las cepas inoculadas a los ratones y no a componentes de la microbiota intestinal resistentes a ampicilina.



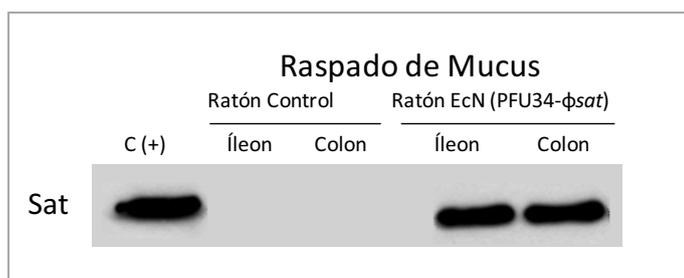
**Figura 5.14.** Estudios de expresión de *sat* *in vivo* en muestras de ratones CD-1 colonizados con las cepas indicadas. A) Heces y B) Raspado de mucus de ratones inoculados con las cepas indicadas, observadas por diferentes técnicas de microscopía. Las imágenes presentadas corresponden a muestras procedentes del ratón 1 (inoculado con EcN (PFU34- $\phi$ sat)) y del ratón 3 inoculado con EcN (PFU34).



**Figura 5.15. Comprobación mediante PCR de las colonias aisladas de muestras de los ratones inoculados con las cepas indicadas.** Mediante PCR se amplificó una región interna del gen *sat* a partir de colonias aisladas en placas de LB-ampicilina a partir de heces y mucus de ratones inoculados con las cepas EcN (PFU34-φ*sat*) o EcN (PFU34). Como control positivo se utilizó la cepa EcN. B, blanco de la reacción de PCR (sin DNA).

La construcción de la fusión del promotor de *sat* al gen reportero que codifica GFP en el plásmido PFU34 ha resultado eficaz para el análisis de la expresión del *sat* *in vivo* en el tracto gastrointestinal de ratones. Este estudio demostró una colonización en todos los ratones con similar número de recuentos bacterianos, del orden de  $10^9$  UFC/g de heces y de  $10^4$  UFC/g mucus. Las imágenes de la fluorescencia emitida por bacterias aisladas de heces y mucus (íleon y colon) de ratones inoculados con la cepa EcN (PFU34-φ*sat*) demuestran la expresión de *sat* en el tracto intestinal de ratones. La expresión es independiente de su ubicación dentro del nicho intestinal, ya que se observa tanto en las bacterias en tránsito presentes en las heces, como en las bacterias adheridas al mucus.

La expresión de Sat a partir del gen cromosómico en el intestino de ratones fue confirmada mediante análisis de *Western blot* de las muestras de mucus de íleon y colon obtenidas a partir de los ratones inoculados con la cepa EcN (PFU34-φ*sat*) o con la cepa EcN (PFU34). Como control se procesaron en paralelo muestras de mucus de las mismas regiones del intestino obtenidas de ratones no inoculados tratados con ampicilina (ratones control). Estas muestras fueron resuspendidas en PBS, precipitadas con TCA y analizadas mediante inmunodetección con anticuerpos anti-Sat. En la Figura 5.16 se presenta el resultado de una muestra procedente de un ratón inoculado y de un ratón control (no inoculado).



**Figura 5.16. Inmunodetección de la proteína Sat en el mucus intestinal de ratones.** Raspado de mucus de íleon y colon de ratones CD-1 inoculados con EcN (PFU34- $\phi$ sat) o no inoculados como control. Como control positivo de la inmunodetección se utilizó un sobrenadante concentrado de un cultivo de la cepa EcN en LB. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-Sat.

La presencia de Sat en el mucus de ratones inoculados con las cepa EcN (PFU34) o EcN (PFU34- $\phi$ sat) demuestra la expresión del gen *sat* presente en la isla II del genoma de la cepa EcN y la secreción de la proteína Sat que permanece asociada a la mucosa intestinal.

Ya que el gen *sat* de la cepa probiótica EcN se expresa en el intestino, es importante estudiar cual es la función de la serina proteasa Sat en este entorno, así como establecer su contribución a los procesos de colonización intestinal.

Hasta el momento se han presentado estudios que demuestran la expresión de Sat codificada en el genoma de EcN. Simulando condiciones presentes en el entorno intestinal se ha determinado que la expresión de Sat es inducible por mucina Tipo II y que el gen se expresa también en el intestino tanto en íleon (intestino delgado) como en colon (intestino grueso). Con el fin de aproximarnos a conocer las funciones de Sat se realizaron una serie de construcciones tales como la clonación del gen *sat*, la mutagénesis dirigida de la serina catalítica o la obtención de mutantes *knockout* para ser ensayadas *in vitro*, en cultivos celulares o en modelos murinos.

### 5.3.3 OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES Y MUTANTES PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE Sat.

#### 5.3.3.1 Clonación del gen *sat* en el vector pBR322.

El gen *sat* de EcN fue amplificado mediante PCR con *primers* que contenían dianas de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Nru*I. El segmento amplificado de 4.395 pb (-435 y +3960) comprende la secuencia codificante de la proteína Sat y la región corriente arriba que dirige su transcripción. La proteína expresada a partir de este constructo corresponde a la proteína completa de 142 kDa con los 3 dominios típicos de las proteínas de la familia SPATE. El procesamiento de esta proteína en células de *E. coli* dará como resultado la secreción del dominio catalítico de 107 kDa.

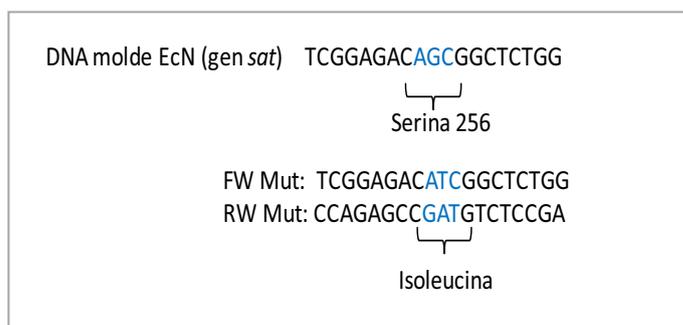
El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pBR322 entre las dianas de restricción *Bam*HI y *Nru*I. Se seleccionó para esta clonación el plásmido pBR322 de bajo número de copias debido a que la sobreexpresión de Sat podría resultar tóxica para los cultivos bacterianos. Células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el producto de ligación. Los clones recombinantes fueron seleccionados por resistencia a ampicilina y comprobados por PCR. A partir de 4 colonias recombinantes se purificó el DNA plasmídico para proceder a la secuenciación del fragmento clonado y confirmar la ausencia de mutaciones. Se seleccionó así un clon, al que se denominó pSAT.

### 5.3.3.2 Mutagénesis dirigida de la serina catalítica de Sat.

Con la finalidad de analizar la implicación de la actividad proteasa de Sat en los efectos mediados por esta proteína nos planteamos la construcción de una variante de esta proteasa catalíticamente inactiva.

Todas las proteínas con actividad serin proteasa poseen un sitio o centro activo formado por tres aminoácidos absolutamente conservados: serina, histidina y aspartato, conjunto que recibe el nombre de tríada catalítica. La serina catalítica está contenida en el motivo GDSGS conservado en las proteínas de la familia SPATE. El centro catalítico de Sat contiene dos serinas en posiciones 256 y 258. Estudios previos dirigidos a evaluar la actividad de Sat de cepas de *E. coli* enteropatógenas habían introducido mutaciones en las posiciones señaladas. La mutación en la serina 256 (S256I) inhibía completamente la actividad proteasa de Sat sobre sustratos específicos como fodrina y factor V de la coagulación, mientras que una mutación en la posición 258 (S258A) produjo una disminución de la actividad hasta un 60% (Maroncle et al., 2006). Por esta razón nos propusimos mutar la serina 256 del gen *sat* de la cepa EcN.

La mutagénesis dirigida de la serina catalítica de Sat (S256) se realizó según el procedimiento descrito en Métodos 4.1.6.3. Para ello se utilizaron *primers* complementarios que contenían un cambio en el codón de la serina de manera que el nuevo codón especificaba isoleucina (S256I) (Figura 5.17). El producto de la amplificación (8778 pb) a partir del plásmido recombinante pSAT fue incubado con la endonucleasa *Dpn*I que es específica para DNA metilado y hemimetilado. Esta enzima es capaz de reconocer el DNA parental molde y digerirlo dejando sólo el DNA recién amplificado que contiene la mutación introducida (Figura 5.17). Después de realizar la transformación en células XL1-Blue, los plásmidos recombinantes fueron seleccionados en placas de LB-ampicilina. Cuatro colonias fueron seleccionadas, se obtuvo el DNA plasmídico y la correcta incorporación de la mutación fue comprobada mediante secuenciación. Se descartó así también la posible incorporación de otras mutaciones en el DNA durante el proceso de amplificación del fragmento por PCR. Se seleccionó de esta manera el plásmido recombinante pSAT (S256I).



**Figura 5.17. Secuencia nucleotídica de la región que contiene el codón de la serina catalítica (S256) de la proteína Sat codificada en el genoma de la cepa EcN.** Debajo de esta secuencia se indican los *primers* utilizados en la mutagénesis dirigida del gen clonado en pSAT para cambiar este codón por un triplete que determina Isoleucina.

### 5.3.3.3 Construcción de un mutante EcN *knockout* del gen *sat*.

La construcción de una cepa mutante deficiente en Sat, se construyó con la finalidad de estudiar como la deficiencia en Sat afectaba al comportamiento de la cepa probiótica EcN.

Para la construcción del mutante *knockout* de *sat* se utilizó la metodología de interrupción génica mediante introducción de un *cassette* de resistencia a cloramfenicol (Cm) (Métodos 4.1.6.2). Brevemente, la región del gen *sat* que codifica el dominio secretado (3 kb) fue amplificada por PCR y clonada en el plásmido pUC18Not utilizando las dianas *EcoRI* y *BamHI*. Por otra parte el gen que confiere resistencia a cloramfenicol (*cassette* Cm) fue obtenido a partir del plásmido pCAT19 mediante digestión con *SmaI* (enzima que deja extremos romos). Este fragmento fue purificado y clonado en la diana *SwaI* interna al gen *sat* clonado en pUC18Not, produciendo así la interrupción del marco de lectura del gen *sat*. El gen *sat* mutado por inserción fue obtenido partir de este plásmido recombinante mediante digestión con *NotI* y subclonado en el plásmido suicida pUT-miniTn5 Tc. Este plásmido fue introducido en la cepa *E.coli* S17  $\lambda$ pir, y posteriormente mediante conjugación transferido a la cepa EcN rifampicina<sup>R</sup>, donde tras recombinación homóloga se seleccionó el mutante *knockout* EcN*sat::cm*. Después de la purificación de los transconjugantes, la correcta construcción del mutante *knockout* fue confirmada mediante PCR con primers que flanquean el gen *sat* y primers específicos del *cassette* Cm.

### 5.3.4 ENSAYOS *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD PROTEASA DE Sat DE LA CEPA EcN.

A continuación se abordaron ensayos de actividad enzimática encaminados a confirmar que la proteína Sat de la cepa EcN presenta actividad proteasa y que esta actividad depende de la S256. En paralelo, para comprobar la expresión de Sat a partir de los clones recombinante pSAT y pSAT(S256I), así como para confirmar la interrupción del gen *sat* en el mutante *knockout*, se abordaron ensayos de *Western blot*.

Para este estudio se seleccionaron las siguientes cepas: (i) la cepa de laboratorio HB101 (carente de gen *sat*) transformada con los plásmidos recombinantes pSAT o pSAT(S256I), (ii) el mutante *EcNsat::cm*, (iii) la cepa mutante *EcNsat::cm* transformada con los plásmidos pSAT o pSAT(S256I) y (iv) la cepa probiótica *EcN* como control.

La determinación de la actividad proteasa y el análisis por *Western blot* fueron realizados a partir de cultivos en fase estacionaria de cada cepa en medio LB en presencia de los antibióticos adecuados. Después de centrifugar los cultivos, los sobrenadantes fueron filtrados y concentrados unas 500 veces con dispositivos Centricon-plus70, con un tamaño de poro de exclusión de 100 KDa.

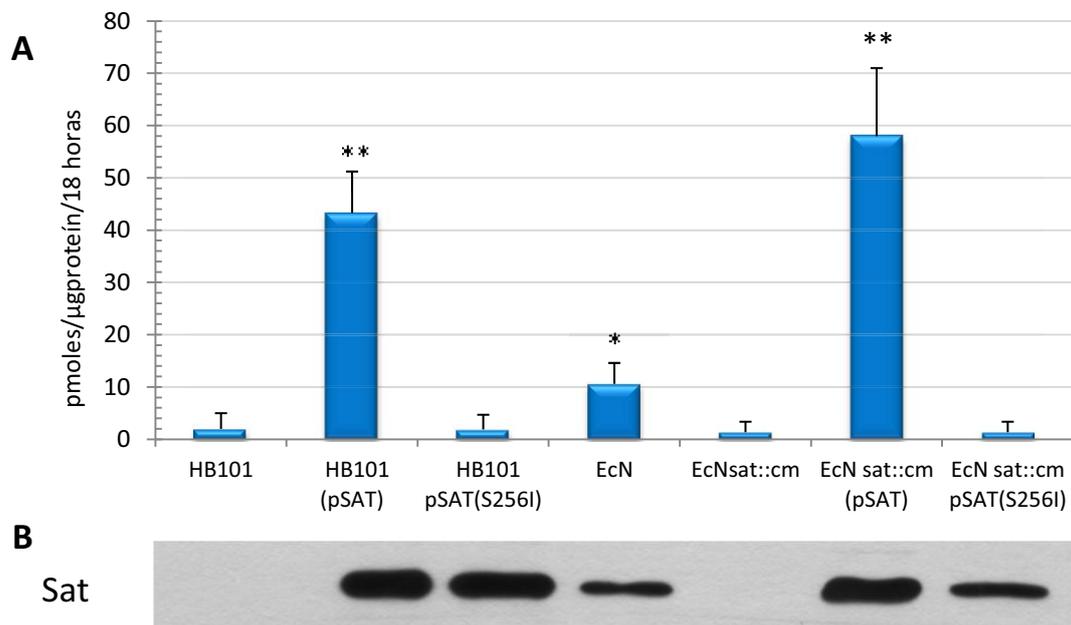
La actividad proteasa de las fracciones concentradas fue determinada a través de la hidrólisis del sustrato N-Metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-Nitroanilida (Sigma). Este sustrato fue seleccionado en base a resultados publicados sobre la actividad y especificidad de diversas proteasas de la familia SPATE (Dutta et al., 2002). La hidrólisis de este sustrato artificial por acción de proteasas libera el cromóforo *p-Nitroanilida* que absorbe a 505 nm. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 multipocillos en un volumen final de 100  $\mu$ l, conteniendo 200  $\mu$ g de proteína (Métodos 4.5.5.2). Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C (Figura 5.18A). Como control, la actividad proteasa de las muestras fue determinada también en presencia del inhibidor de la actividad proteasa PMSF a concentración de 1mM. En este caso los sobrenadantes concentrados (200  $\mu$ g totales de proteína) fueron incubados con el inhibidor durante 30 minutos previos a la determinación de la actividad. En todos los casos se observó que la actividad proteasa se inhibía por PMSF.

La inmunodetección de la proteína Sat en estas muestras (200  $\mu$ g) fue evaluada mediante análisis por *Western blot* con anticuerpos anti-Sat. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 5.18B.

La ausencia de banda inmunoreactiva así como de actividad proteasa en el sobrenadante de la cepa HB101 es concordante con la ausencia del gen *sat* en su genoma. La ausencia de Sat (proteína y actividad) en el mutante *EcNsat::cm* confirma la correcta disrupción del gen. En consecuencia este mutante resulta un buen modelo para abordar estudios funcionales basados en la deficiencia en Sat.

La actividad proteasa así como la inmunodetección de Sat en los sobrenadantes de la cepa HB101 y del mutante *knockout* transformadas con el plásmido pSAT confirman que el gen *sat* de la cepa probiótica *EcN* codifica una serin proteasa funcional. Estos resultados confirman además el correcto procesado y secreción de la proteína expresada a partir del gen clonado. Este resultado avala la utilización del plásmido recombinante pSAT para analizar los efectos de la expresión Sat en el fondo de la cepa

probiótica y de cepas de laboratorio. El plásmido pSAT deriva del plásmido pBR322, el cual se mantiene dentro de las células transformadas en unas 20 copias por célula.



**Figura 5.18. Actividad proteolítica de Sat sobre el Sustrato Artificial: *p-nitroanilida-Ala-Ala-Pro-Val*.**

(A) La actividad proteasa de Sat fue evaluada en sobrenadantes concentrados, obtenidos a partir de cultivos en LB de las cepas indicadas. Los valores de actividad proteasa (expresados en pmoles/μg de proteína) corresponden a la media  $\pm$ SE de puntos dobles de tres experimentos independientes. (B) Correlación con los niveles de proteína Sat detectados por *Western blot*. Para la inmunodetección de Sat se utilizaron anticuerpos específicos anti-Sat. Para normalizar los resultados, las muestras ensayadas correspondían en todos los casos a 200 μg de proteína total. \* $P < 0.05$ , \*\* $P = 0.000$ .

En las muestras que contienen una proteína Sat activa, los niveles de actividad enzimática se correlacionan con los de la proteína detectada mediante anticuerpos específicos. Así, los sobrenadantes de las cepas transformadas con el plásmido pSAT presentan niveles superiores de actividad y de proteína inmunoreactiva en comparación con los valores de la cepa probiótica EcN *wild-type*.

La presencia de proteína Sat en los sobrenadantes de la cepa HB101 y en el mutante *knockout* transformadas con el plásmido pSAT(S256I) demuestra la expresión y secreción de la proteína mutada. Sin embargo, dicha proteína Sat S256I no presenta actividad proteasa lo que confirma la funcionalidad de la S256 en el mecanismo catalítico. Esta construcción será de utilidad para valorar la implicación de la actividad proteasa de Sat en los efectos mediados por esta proteína sobre monocapas de células Caco-2 en cultivo.

En conjunto estos resultados demuestran que el gen *sat* de la cepa probiótica EcN codifica una serin proteasa funcional. Recordar que la proteína Sat de la cepa EcN difiere en 8 residuos de aminoácidos de la proteína Sat de la cepa uropatógena

CFT073. Nuestros resultados indican que estas diferencias no anulan la actividad proteasa de Sat de EcN, ni el autotransporte y secreción de la proteína. En las cepas que expresan una proteína Sat activa (a partir del gen cromosómico o clonado en plásmido) los niveles de actividad enzimática se correlacionan con los niveles de proteína Sat sintetizada y secretada.

### 5.3.5 EFECTO DE LA SERIN PROTEASA Sat SOBRE LA PERMEABILIDAD PARACELULAR DE MONOCAPAS DE EPITELIO INTESTINAL EN CULTIVO.

Las uniones estrechas o *tight junctions* son complejos de uniones intercelulares que mantienen la integridad de los epitelios. Según algunos autores la cepa probiótica EcN reforzaría estas uniones en el epitelio intestinal, estimulando la inducción y/o reorganización de proteínas ZO de la *zonula occludens* (Zyrek et al., 2007). Sin embargo, está descrito que la expresión de Sat en cepas enteropatógenas contribuye a la desestabilización de estas uniones en células Caco-2 en cultivo (Guignot et al., 2007).

Para determinar el efecto de la proteína Sat sobre las *tight junctions* utilizamos el modelo de células Caco-2 polarizadas incubadas con suspensiones bacterianas (cepas que expresan Sat o cepas deficientes en Sat) o con sobrenadantes concentrados obtenidos a partir de sus cultivos en LB. Después de un período de incubación, la integridad de la monocapa fue evaluada mediante determinación de la TER y por ensayos de permeabilidad al manitol.

Las células Caco-2 fueron descongeladas y sembradas en placas de cultivo en medio DMEM suplementado con 25 mM HEPES, aminoácidos no esenciales, penicilina-G/estreptomicina y 10% de suero bovino fetal. Se realizaron 3 pases de tripsinización antes de proceder a la siembra y diferenciación de las células en placas Transwell. Las células Caco-2 fueron sembradas en la membrana de policarbonato de placas transwell de 12 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C para su diferenciación durante 21 días en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> cambiando el medio en días alternos durante todo el proceso.

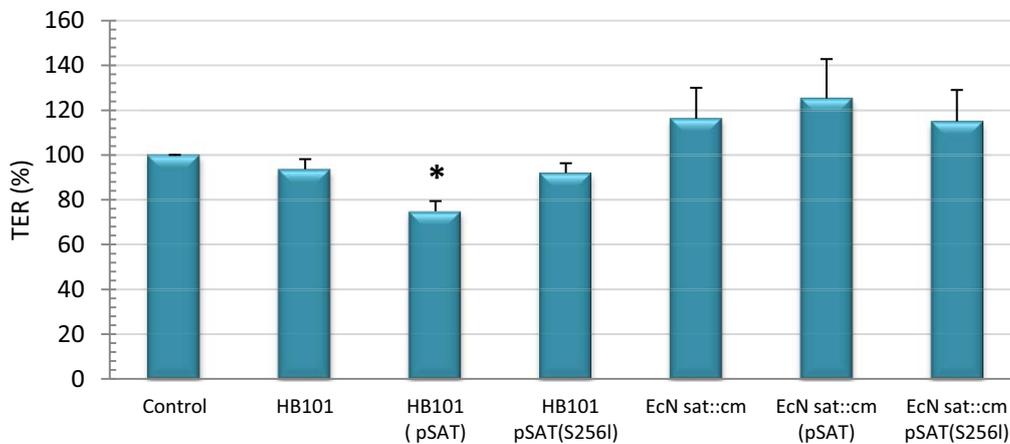
La resistencia transepitelial (TER,  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) generada por las células en cultivo fue utilizada como parámetro para evaluar la confluencia e integridad de la monocapa de células Caco-2 diferenciadas. Estas mediciones se realizaron empleando el voltímetro Millicell®-ERS siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A los 21 días, una vez diferenciadas las células Caco-2, se llevó a cabo la incubación con las suspensiones bacterianas (Métodos 4.3). Como cepas en estudio se seleccionaron la cepa de laboratorio HB101 y la cepa mutante EcN*sat::cm*, ambas deficientes en la síntesis de proteína Sat. Las mismas cepas transformadas con el plásmido recombinante pSAT fueron incluidas como modelo de cepas que expresan y secretan Sat catalíticamente activa. Finalmente, estas cepas transformadas con el plásmido

pSAT(S256I) fueron utilizadas para evaluar si el efecto producido por Sat en la integridad de la monocapa depende de su actividad proteasa. De esta forma, las bacterias ensayadas expresan niveles similares de proteína Sat, ya sea la proteína *wild-type* o la proteína mutada Sat-S256I.

Las diferentes cepas bacterianas en estudio fueron cultivadas a 37°C, O/N, en medio LB en presencia del antibiótico requerido. Al día siguiente fueron re-inoculadas en matraces de 10 ml del mismo medio y crecidas hasta alcanzar la fase exponencial (DO<sub>600</sub> alrededor de 0.6). Después, los cultivos fueron centrifugados y el sedimento bacteriano fue resuspendido en medio de infección al que se adicionó D-manosa 1%. El volumen de medio para la resuspensión fue calculado para ajustar la concentración de la suspensión bacteriana (UFC/ml) para que, una vez adicionada a la parte apical de la monocapa de células Caco-2 se obtuviera una MOI de 100.

Previo a la adición de las suspensiones bacterianas se realizó la medición inicial de la TER en todos los pocillos de la placa como control de la integridad de la monocapa de partida. El tiempo de incubación con las suspensiones bacterianas fue de 3 horas a 37°C, concluido el cual se volvió a medir la TER para evaluar el impacto de los diferentes cultivos sobre las *tight junctions*. Como control se analizaron en paralelo pocillos de células Caco-2 sin tratar. Los resultados se presentan en el Figura 5.19.



**Figura 5.19. Resistencia Transepitelial (TER) de monocapas de células Caco-2 después de incubar durante 3 horas con suspensiones de las cepas indicadas (MOI 1:100).** Los valores, expresados como porcentaje del valor de TER respecto al valor determinado antes de la adición de las suspensiones bacterianas, corresponden a la media  $\pm$ SE puntos dobles y de tres experimentos independientes. \*  $P < 0,05$  vs control. Como control se representan los valores de células Caco-2 no tratadas.

La cepa de laboratorio HB101 no altera la TER de la monocapa de células Caco-2. Sin embargo, cuando esta cepa expresa la proteína Sat a partir del clon pSAT produce una disminución de un 20% de la TER de la monocapa. Esta disminución no se observa con la cepa HB101 que expresa proteína Sat-S256I, catalíticamente inactiva. Este resultado

sugiere que la proteína Sat de la cepa probiótica tiene un efecto desestabilizador de la estructura de las *tight junctions*, y que este efecto depende de su actividad proteasa. Es de destacar que la disminución en la TER de la monocapa no se observa en las incubaciones realizadas con suspensiones de la cepa *EcNsat::cm* transformada con el plásmido pSAT. Este resultado sugiere que el efecto desestabilizador de la proteína Sat sobre las *tight junctions* no se manifiesta en el contexto de la cepa probiótica; probablemente es contrarrestado por otros factores producidos por la cepa *EcN*.

Una vez concluida la medición de la TER, las monocapas de células Caco-2 fueron lavadas con tampón de *Krebs* pH 7,4 y mantenidas a 37°C en este tampón con volúmenes de 1,5 ml en la zona basolateral y 0,5 ml en la zona apical. Con el fin de determinar el paso del radioisótopo  $^3\text{H}$ -manitol a través de la monocapa de células Caco-2, la parte apical de las placas fue vaciada y se agregó a cada pocillo, a intervalos de 10 segundos, 0,5 ml de una solución de  $^3\text{H}$ -manitol a una concentración de 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ . A los 15 minutos de exposición con el radioisótopo se transfirieron alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  de cada pocillo desde la zona basolateral a un vial que contenía 3 ml de líquido de centelleo.

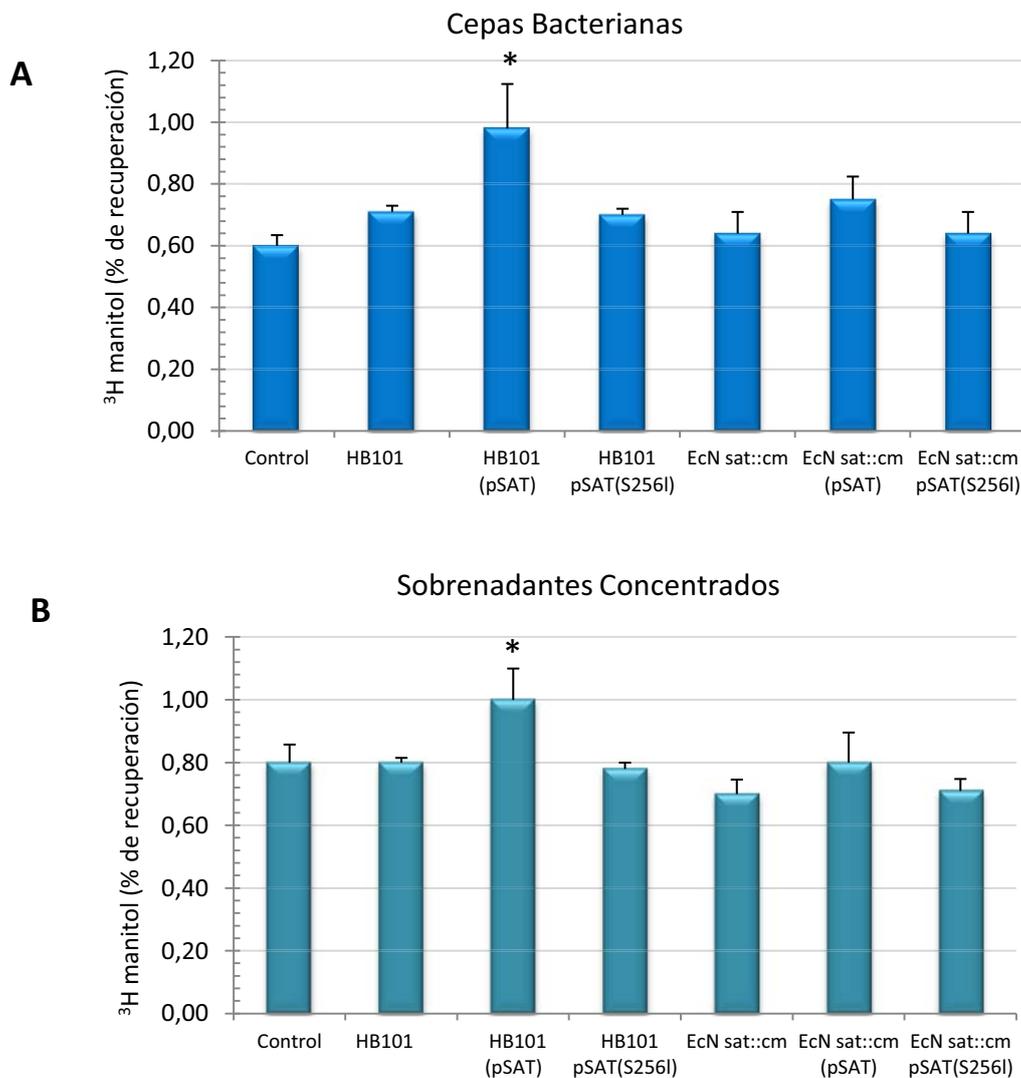
Los resultados se presentan en la Figura 5.20A y se expresan como porcentaje de recuperación del radioisótopo a través de la capa celular desde la zona apical a la zona basolateral, respecto a las células control.

Los resultados son congruentes con los valores de TER determinados para estos mismos cultivos (Fig. 5.19). Así, sólo se observa un incremento significativo de la permeabilidad paracelular al manitol en monocapas incubadas con la cepa de laboratorio HB101 (pSAT) que expresa la proteína Sat a partir del clon recombinante. Este incremento depende de la actividad proteasa de la proteína expresada. Cabe destacar que los valores de permeabilidad obtenidos son bajos, pero similares a los descritos por otros autores cuando la proteína Sat de cepas enteropatógenas es expresada a partir del plásmido pACYC184 en la cepa HB101 (Guignot et al., 2007). De hecho, el daño producido por la proteasa Sat de estas cepas patógenas altera la permeabilidad al manitol (182 Da) pero no afecta el paso de moléculas de mayor tamaño como el ácido sulfónico fluoresceína-5 (478 Da) lo que indica que Sat sólo produce una ligera desestructuración de las uniones entre enterocitos.

La expresión de Sat a partir plásmido pSAT en la cepa *EcNsat::cm* no altera la permeabilidad de la monocapa al manitol. Este resultado es consistente con el efecto protector de la cepa *EcN* sobre la integridad de la barrera intestinal. Por tanto, las cepas que no expresan Sat (*EcNsat::cm*) o las que expresan la forma mutada Sat-S256I no producen efecto alguno sobre la integridad de la monocapa.

El ensayo de flujo de manitol fue validado reproduciendo el experimento anterior, pero reemplazando el inóculo bacteriano por los sobrenadantes concentrados

obtenidos a partir de cultivos en LB de las mismas cepas, ajustando la concentración de proteína a 200  $\mu\text{g}$  por pocillo. Al igual que en el experimento descrito anteriormente las células diferenciadas fueron incubadas con los sobrenadantes concentrados durante 3h y posteriormente se realizó el estudio de permeabilidad por medida de flujo de  $^3\text{H}$ -manitol en las mismas condiciones descritas anteriormente (Figura 5.20B).



**Figura 5.20. Flujo de  $^3\text{H}$ -manitol a través de monocapas de células Caco-2.** A) Flujo de  $^3\text{H}$ -manitol después de incubar durante 3 horas con suspensiones de las cepas indicadas (MOI 1:100). B) Flujo de  $^3\text{H}$ -manitol después de incubar durante 3 horas con sobrenadantes concentrados (200  $\mu\text{g}$  de proteína/pocillo) obtenidos a partir de cultivos de las cepas bacterianas indicadas. Los valores, expresados como porcentaje de recuperación del radioisótopo en la zona basolateral con respecto a células control no tratadas, corresponden a la media  $\pm$ SE calculada a partir de duplicados de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$  vs control.

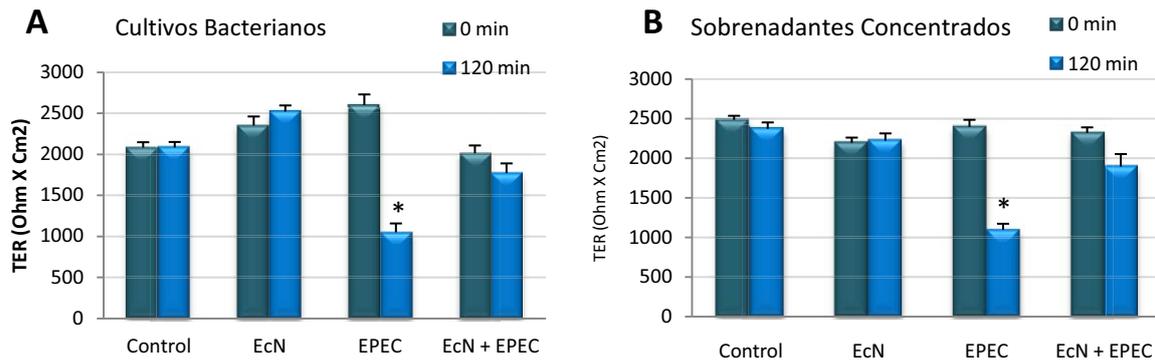
Los resultados de este ensayo son consistentes con los obtenidos en las incubaciones con suspensiones bacterianas. La presencia de Sat en el sobrenadante de la cepa de

laboratorio produce un incremento en la permeabilidad paracelular asociado a su actividad proteasa, sin embargo, la presencia de Sat en el sobrenadante de la cepa probiótica no produce tal efecto (5.20B).

En conjunto estos resultados indican que la proteína Sat, aunque posee actividad proteasa, no produce alteraciones en las *tight junctions* del epitelio intestinal en el contexto de la cepa probiótica EcN. Está descrito que la cepa EcN regula positivamente la formación de las *tight junctions*, incluso es capaz de proteger y restaurar el daño producido por enteropatógenos en monocapas de células epiteliales de intestino. Por tanto, otros factores producidos por esta cepa pueden contrarrestar el efecto destabilizador de la proteasa Sat sobre estas uniones intercelulares. Entre estos factores está la proteína TpcC. Esta proteína, secretada por la cepa probiótica, induce en células HT-29/B6 la expresión de Claudina 14 y promueve su localización a nivel de la membrana de la célula epitelial, lo que se traduce en un aumento de TER (Hering et al., 2013). Otros autores describen que EcN provoca en células Caco-2 una redistribución de la proteína ZO-2 movilizándola hacia la periferia y contribuyendo así al refuerzo entre las *tight junctions* (Zyrek et al., 2007). Este efecto está mediado por la activación de la PKC $\xi$ , si bien se desconoce cuál es el factor producido por la cepa EcN responsable de este efecto.

En este estudio realizado por Zyrek et al. (2007) se describe que la cepa EcN es capaz de aumentar en un 20% el valor de TER en monocapas de células T84, una línea celular de epitelio intestinal. Además, dicha cepa probiótica evita la destrucción de la barrera causada por *E. coli* enteropatógena (EPEC). Así, la disminución del 70% en el valor de TER determinada en monocapas de células T84 infectadas con EPEC durante 2 horas no se producía cuando EPEC era coincubada en presencia de EcN (la suspensión de bacterias correspondía a una MOI de 100, en la que cada cepa contribuía en un 50%). Este efecto protector de EcN fue observado también sobre monocapas de células Caco-2. Estos estudios habían sido realizados con suspensiones bacterianas, por lo que nos planteamos analizar en este trabajo si el sobrenadante concentrado de la cepa probiótica era igualmente capaz de ejercer este efecto protector. Se pretendía así evaluar si el efecto protector de EcN sobre las *tight junctions* era mediado por componentes extracelulares.

Para ello se sembraron células Caco-2 en placas transwell de 12 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Después de su diferenciación durante 21 días, las células Caco-2 polarizadas fueron incubadas con el patógeno EPEC (MOI 1:100) en ausencia o presencia de sobrenadantes concentrados (200  $\mu$ g de proteína) obtenidos de cultivos de la cepa EcN en medio LB. El mismo ensayo se llevó a cabo co-incubando EPEC con suspensiones de la cepa EcN como control (MOI 50:50). Los resultados se presentan en la Figura 5.21.



**Figura 5.21. Análisis del efecto protector de EcN sobre la disminución de la TER causada por el patógeno EPEC en células Caco-2 polarizadas.** A) Valores de TER de monocapas de células Caco-2 incubadas con las cepas EcN o EPEC (MOI 100) o con co-cultivos de EcN y EPEC (MOI 50:50) a los tiempos indicados. B) Valores de TER de monocapas de células Caco-2 incubadas con la cepa EPEC (MOI 100) en ausencia o presencia de sobrenadante concentrado (SN) de la cepa EcN (200 µg de proteína) a los tiempos indicados. Se presenta el valor de TER de células Caco-2 polarizadas incubadas con sobrenadante concentrado de EcN (200 µg de proteína) en ausencia de EPEC. Como control se presenta la TER de monocapas de células Caco-2 no tratadas. Los resultados corresponden a la media  $\pm$ SE calculada a partir de duplicados de tres experimentos independientes. \* $P < 0.005$  vs EPEC-0min.

La TER de las células control se mantuvo estable durante el tiempo del ensayo, mientras que las células Caco-2 incubadas con suspensiones de la cepa probiótica EcN mostraron un aumento de TER de alrededor del 15%, después de 2 horas de incubación. La infección con EPEC produjo una disminución de aproximadamente un 60% en la TER. Este efecto quedó compensado cuando el patógeno fue añadido en co-incubación con suspensiones de la cepa EcN. En este caso la disminución de TER fue solo del 17.4% (Fig. 5.21A). Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Zyrek et al. (2007). Los resultados de los ensayos realizados utilizando el sobrenadante concentrado de cultivos de EcN demuestran que el efecto protector o beneficioso de EcN sobre las *tight junctions* es mediado por componentes secretados al medio extracelular. Así, después de 2 horas de incubación con suspensiones de EPEC en presencia del sobrenadante concentrado de EcN, la TER de la monocapa sólo disminuyó un 18%, mientras que en ausencia de esta fracción de medio extracelular de EcN, el patógeno provocó una disminución de la TER del 54% (Figura 5.21B).

Estos resultados muestran que algún componente presente en el sobrenadante de EcN es capaz de contrarrestar el daño causado por la cepa EPEC. Un estudio reciente describe un probable mecanismo asociado al efecto protector de EcN a través del bloqueo de los sistemas de secreción de factores de virulencia utilizados por los patógenos (Kleta et al., 2014). Estos autores describen que sobrenadantes de cultivos de EcN son capaces de inhibir la secreción de los factores de virulencia de EPEC EspA, EspB y Tir. Esto sugiere que el sistema de secreción T3SS utilizado por las bacterias patógenas para liberar estos componentes y translocarlos al interior de la célula

infectada se vería afectado por algún componente presente en el sobrenadante de cultivos de EcN (Kleta et al., 2014).

Del conjunto de estos resultados podemos concluir que el sobrenadante de cultivos de la cepa EcN, aún conteniendo proteasa Sat, es capaz de proteger a células Caco-2 polarizadas frente al daño causado sobre las *tight junctions* por cepas enteropatógenas como EPEC. El mismo factor o factores responsables de este efecto protector estarían compensando el efecto posible proteolítico de Sat sobre las *tight junctions*. El efecto tóxico de Sat parece depender de una combinación de factores producidos por la propia bacteria. Por ello, en el contexto de una cepa probiótica como EcN, Sat no ejercería ningún efecto nocivo sobre la barrera intestinal y por tanto no debería ser considerada un factor de virulencia en esta cepa.

### 5.3.6 ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE Sat EN LA FORMACIÓN DE *BIOFILMS* EN LA CEPA EcN.

El tracto gastrointestinal es un lugar altamente colonizado por microorganismos. La capacidad de formación de *biofilms* de una bacteria por lo tanto jugará un importante rol en el proceso de colonización. Se ha descrito que la cepa EcN es un excelente colonizador que puede competir con cepas comensales y establecerse en el tracto gastrointestinal (Leatham et al., 2009). Estudios *in vitro* han evidenciado que EcN es capaz de competir con cepas patógenas en su capacidad de formar *biofilms* sobre superficies abióticas. De ahí su utilización en el tratamiento de diarreas causadas por bacterias enteropatógenas (Hancock et al., 2010a). Debemos recordar que EcN expresa diferentes adhesinas relacionadas con los procesos de adhesión como son las fimbrias de tipo I, Ag 43, curli y celulosa (Hancock et al., 2010a).

De entre las serin proteasas de la familia SPATE, EspP (clase I) ha sido relacionada con la formación de *biofilms* (Tabla 1.2 apartado introducción). Con estos antecedentes, nos propusimos evaluar la capacidad de formación de *biofilms* de la cepa EcN y del mutante derivado EcN*sat::cm*. La finalidad de este estudio era evaluar si la deficiencia en la expresión y secreción de Sat podría modificar la capacidad de adhesión de la cepa probiótica sobre diferentes superficies. Para ello realizamos ensayos de formación de *biofilms* sobre superficies abióticas y superficies bióticas. Para simular las condiciones de adhesión y colonización en el intestino estas superficies fueron recubiertas con mucina comercial Tipo II.

#### 5.3.6.1 Formación de *biofilms* en superficies abióticas.

Para el estudio de la formación de *biofilms* sobre superficies abióticas se utilizaron placas de poliestireno (placas de 96 pocillos). Se analizó la capacidad de las cepas EcN y EcN*sat::cm* de adherirse a estas placas, bien sin tratar o con los pocillos recubiertos de mucina Tipo II. Las cepas fueron crecidas en medio LB y procesadas para la

cuantificación del índice de formación específica de biopelícula o *biofilm* (FEB) según se detalla en el apartado de Métodos 4.10. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.22A. No se observaron diferencias significativas entre ambas cepas en los índices de formación de *biofilms*. Ambas cepas son capaces de formar biopelículas sobre poliestireno. La formación del *biofilm* no se ve incrementada en presencia de mucina en ninguna de las cepas ensayadas. Estos resultados sugieren que la serin proteasa Sat no es determinante en los procesos de adhesión a superficies abióticas.

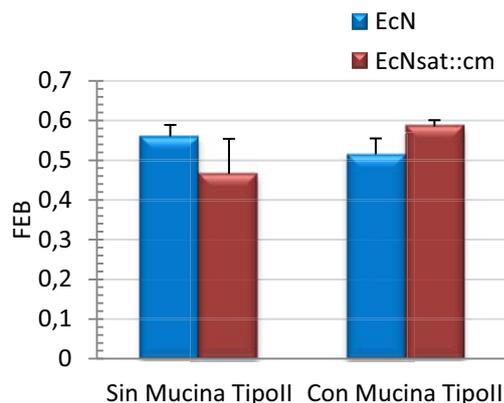
### 5.3.6.2 Formación de *biofilms* sobre superficies bióticas.

La capacidad de algunas cepas probióticas de inhibir la colonización por parte de patógenos se ha relacionado con su capacidad de adherirse al mucus y/o a las células epiteliales. Estas condiciones pueden simularse en modelos *in vitro* (Laparra and Sanz, 2009). Para ello utilizamos diferentes modelos: (i) células Caco-2 en cultivo, (ii) células Caco-2 recubiertas con mucina Tipo II y (iii) co-cultivos (90:10) de células Caco-2 y células HT29-MTX (línea de epitelio intestinal productora de mucinas). Se prepararon cultivos de estas líneas celulares en placas de 12 pocillos y se incubaron 21 días para su diferenciación. Estas células fueron incubadas durante 3 horas con suspensiones de la cepa probiótica *wild type* o con el mutante EcN*sat::cm* a una MOI de 100. Transcurrido este tiempo las bacterias no adheridas fueron retiradas y la monocapa de células epiteliales tripsinizada para la posterior recuperación y recuento de las bacterias adheridas (Método 4.10.2). Los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 5.22B.

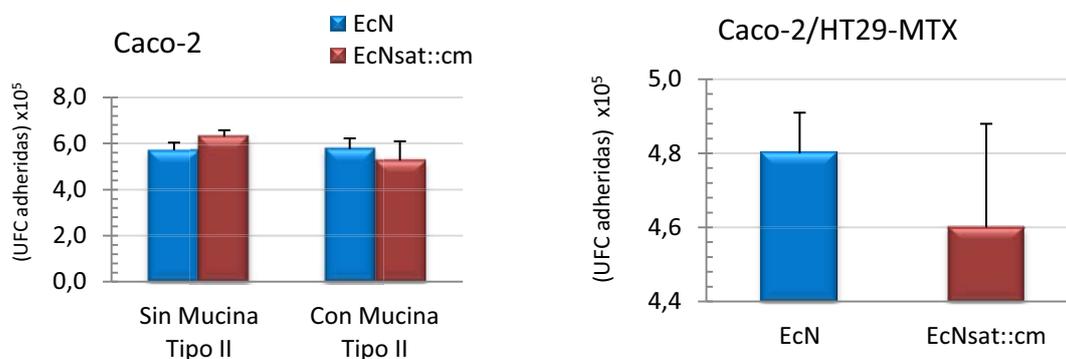
No se observaron diferencias significativas entre la cepa EcN y el mutante deficiente en Sat en ninguno de los modelos analizados. Ni la adición de mucina comercial (mucina Tipo II de Sigma) ni la secreción de mucina por las propias células HT29-MTX provocaron un incremento en la capacidad de adhesión de estas cepas. El origen y composición de estas mucinas son diferentes pero algunos componentes son comunes. La mucina comercial Tipo II (Sigma) derivada de estómago contiene las mucinas MUC5AC, MUC6, MUC1, MUC4, MUC12, MUC13 y MUC17. La línea HT29-MTX es una línea celular productora de mucina, obtenida a partir de la línea HT-29 mediante un tratamiento establecido con metotrexato. Los principales componentes de la mucina secretada por estas células son MUC5AC y MUC6 y en menor proporción MUC2 (Lesuffleur et al., 1993; Leteurtre et al., 2004). El hecho que la adición de mucina no mejore la formación de *biofilms* sobre células Caco-2 ha sido también descrito para otras cepas de *E. coli* (Laparra and Sanz, 2009).

En conjunto estos resultados indican que la serin proteasa Sat no está implicada en la formación de *biofilms* en modelos *in vitro*. Los factores de EcN implicados en la formación de estas biopelículas están presentes en ambas cepas, la tipo *wild type* y el mutante *sat::cm*, y la deficiencia en Sat no altera dicha capacidad.

### A. Formación de *biofilms* sobre una superficie abiótica



### B. Formación de *biofilms* sobre una superficie biótica

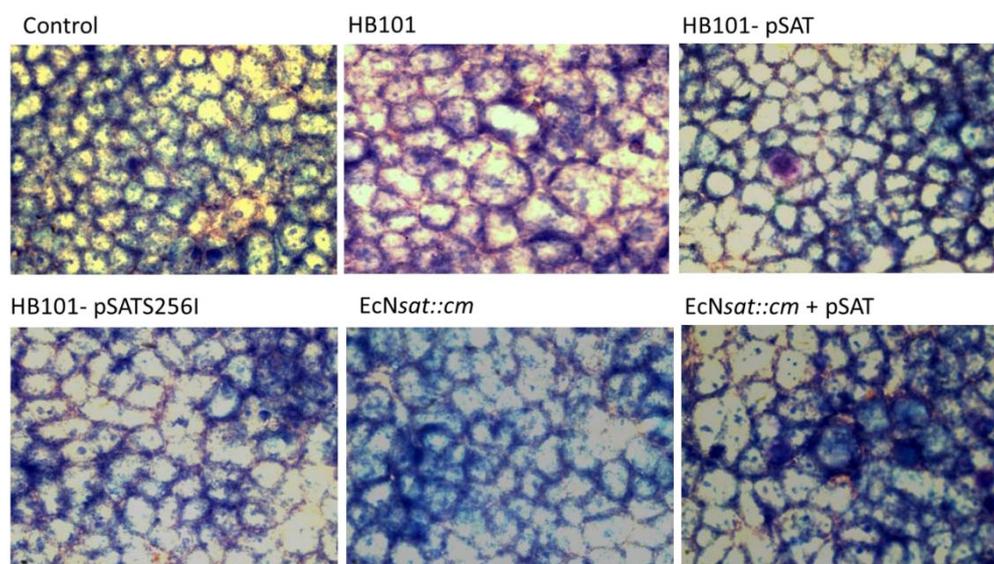


**Figuras 5.22. Formación de *biofilms* por las cepas EcN y EcNsat::cm.** A) *Biofilms* sobre superficies abióticas. Las cepas indicadas fueron crecidas sin agitación durante 18 horas a 37°C en placas de poliestireno (recubiertas o no con mucina Tipo II) que contenían medio LB. La capacidad de adhesión a estas superficies fue evaluada por tinción con cristal violeta. Los resultados, expresados en función del índice FEB, representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos. B) *Biofilms* sobre superficies bióticas. Se utilizaron células Caco-2 en cultivo (recubiertas o no con mucina Tipo II) y co-cultivos de células Caco-2/HT29MTX. Estos cultivos fueron incubados con suspensiones de las cepas indicadas (MOI 100) durante en 3 horas. Los resultados, expresados como nº de bacterias (UFC) adheridas, corresponden a la media  $\pm$ SE calculada a partir de triplicados de tres experimentos independientes.

#### 5.3.7 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE Sat EN MONOCAPAS DE CÉLULAS Caco-2.

En este estudio nos propusimos analizar el efecto citotóxico de Sat sobre células Caco-2 diferenciadas. Los ensayos se realizaron incubando cada pocillo con los sobrenadantes concentrados (200  $\mu$ g de proteína) de cultivos de las diferentes cepas a analizar (Método 4.12). Tras 3 horas de incubación, las células fueron lavadas, fijadas y teñidas con Giemsa para su visualización al microscopio.

Para este estudio se utilizaron sobrenadantes procedentes de cultivos de las cepas HB101, *EcNsat::cm*, las mismas cepas transformadas con el plásmido pSAT que expresa la serin proteasa Sat o transformadas con un plásmido que expresa la variante mutada de Sat-S256I. Los resultados se presentan en la Figura 5.23. Se puede observar como ninguno de los sobrenadantes produjo una alteración de la morfología de las células Caco-2 en las condiciones ensayadas.



**Figura 5.23. Análisis de citotoxicidad de Sat sobre células Caco-2 polarizadas.** Imágenes de la tinción Giemsa de células Caco-2 previamente incubadas durante 3 horas con 200 µg de sobrenadantes concentrados obtenidos a partir de cultivos en LB de las cepas indicadas.

Una de las funciones descritas para la proteína Sat de la cepa uropatógena CFT073 es su capacidad de producir citotoxicidad en varias líneas celulares. Concretamente se ha descrito la capacidad de Sat de inducir daño en líneas celulares derivadas de tejido uroepitelial, como son células Vero (primarias de riñón) y células epiteliales humanas de vejiga o riñón (Guyer et al., 2000). Estudios posteriores realizados por el mismo grupo confirmaron el efecto de Sat de la cepa uropatógena en un modelo animal de infección ascendente. En este modelo, Sat provocó daño tanto en glomérulos como en túbulos proximales, causando vacuolización y citotoxicidad (Guyer et al., 2002). Este daño es debido a la capacidad de la proteasa Sat de introducirse al interior de la célula del huésped y provocar la alteración del citoesqueleto y la desestructuración de los filamentos de actina.

También se demostró que la proteína Sat de la cepa uropatógena CFT073 es capaz de degradar una proteína tipo integrina presente en la superficie de la célula renal que presenta similitud a la proteína específica de membrana LFA-1 de leucocitos. Además de LFA-1, Sat también es capaz de degradar estructuras del citoesqueleto celular

(fodrina) y del núcleo (proteínas MAPs entre otras) de células epiteliales del tracto urinario (Maroncle et al., 2006; Guyer et al., 2000).

Estudios sobre Sat de cepas de *E. coli* entero-adherentes (DAEC) describen que esta proteína es capaz de inducir la redistribución de proteínas tales como ZO-1, ZO-3, ocludinas y claudinas-1, presentes en el citoplasma de células Caco-2/TC7 polarizadas, causando un incremento en la permeabilidad paracelular de manitol. Sin embargo, en este tipo y modelo de células diferenciadas Sat no es capaz de producir daños a nivel de filamentos de F-actina (Guignot et al., 2007). Por otra parte, la proteína Sat proveniente de la misma cepa desestabiliza los filamentos de actina y produce autofagia en células HeLa (Liévin-Le Moal et al., 2011). En conjunto estos estudios y nuestros resultados indican que la citotoxicidad de Sat a nivel intracelular (alteración del citoesqueleto, vacuolización y autofagia) no se observa en células polarizadas de epitelio intestinal, modelo celular que simula la barrera del tejido epitelial del intestino. Aun así, algunos resultados son contradictorios puesto que algunos autores describen que la proteína Sat proveniente de cepas DAEC presenta capacidad citotóxica y enterotóxica sobre tejido de íleon de conejo. En estos estudios se observó una pronunciada acumulación de fluidos en *loops* de íleon expuestos a Sat, aunque no se describe el mecanismo por el que se produce dicha acumulación de fluidos (Taddei et al., 2005).

De todo lo expuesto podríamos concluir que la acción de Sat depende de varios factores: (i) del tipo celular y estadio de diferenciación, probablemente porque la entrada de la proteína al citoplasma de las células del huésped sea a través de un receptor específico todavía no identificado, y (ii) de la capacidad de la bacteria que expresa Sat de contrarrestar el efecto de esta proteasa a través de la secreción de factores bacterianos, como por ejemplo TpcC, que modulan positivamente la expresión de proteínas de la *zonula occludens* involucradas en la formación y regulación de las *tight junctions* (Hering et al., 2013).

### **5.3.8 ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE Sat EN LA COLONIZACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATONES.**

Los resultados presentados hasta ahora descartaban la implicación de Sat en la formación de *biofilms in vitro* sobre monocapas de líneas celulares derivadas de epitelio intestinal. A continuación, nos planteamos abordar estudios *in vivo* con la finalidad de analizar la implicación de Sat en la colonización del tracto intestinal de ratones. Este modelo permite obtener una visión más real de su función en el hábitat natural del probiótico, donde coexisten otros actores y mediadores importantes en la interacción y comunicación con el huésped.

Para estos estudios se siguió el modelo de colonización en ratones tratados con estreptomycin, descrito en varias publicaciones (Leatham et al., 2009; Alteri and

Mobley, 2007; Harrington et al., 2009). Este modelo evita la resistencia a la colonización observada para algunas bacterias en animales convencionales y resulta muy adecuado para estudios de competición entre varias cepas de *E. coli*. La estreptomicina (5 g/l) es introducida en el agua de bebida de estos ratones entre 24-48 horas antes de la administración oral del probiótico y se mantiene durante todo el proceso. Este tratamiento elimina la gran mayoría de bacterias anaerobias facultativas, por lo que las diferencias en la colonización entre una cepa mutante deficiente en una determinada proteína respecto a la cepa parental son un reflejo de la función de esta proteína. Con esta aproximación se pretendía comparar la capacidad de colonización entre la cepa EcN *wild type* y el mutante deficiente en Sat, EcN*sat::cm*.

#### **5.3.8.1. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a estreptomicina derivados de la cepa EcN.**

Los mutantes resistentes a estreptomicina fueron seleccionados a partir de la cepa EcN-rifampicina<sup>R</sup>. Para ello se sembraron  $10^9 - 10^{10}$  UFC de esta cepa en placas de LB que contenían estreptomicina (100 µg/ml). Las placas fueron incubadas 18 horas a 37°C. La presencia de resistencia doble en la cepa permite descartar mutantes espontáneos resistentes a estreptomicina durante el protocolo de colonización. Para estos estudios de colonización las cepas seleccionadas han tolerar concentraciones de estreptomicina de 2 mg/ml. Una de las colonias capaz de crecer en presencia de esta alta concentración de estreptomicina fue analizada. Se amplificó la región correspondiente al gen *rpsL* (mutaciones en este gen confieren resistencia a estreptomicina) y el producto de la amplificación fue secuenciado para determinar el tipo de mutación. Se determinó que la mutación espontánea había afectado al codón 43 (AAA) que especifica lisina. Un cambio puntual en este codón (ATA) había cambiado el aminoácido 43 a isoleucina.

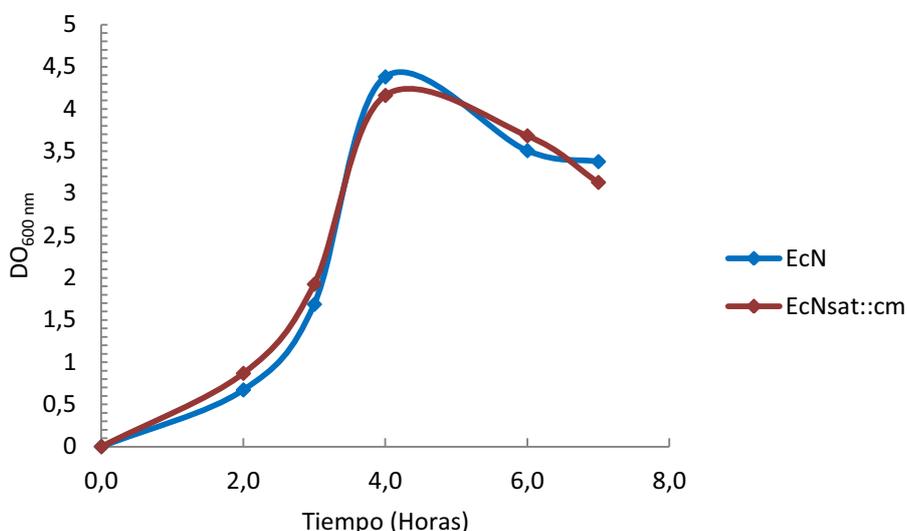
Una vez seleccionada la cepa EcN estreptomicina<sup>R</sup>-rifampicina<sup>R</sup>, se utilizó la metodología del plásmido suicida pUT-miniTn5-Tc para obtener, mediante recombinación homóloga, el mutante *knockout* EcN*sat::cm* tal como se describe en el apartado Métodos 4.1.6.2. De esta manera, la cepa mutante deficiente en Sat contiene la misma mutación que confiere resistencia a estreptomicina en la cepa EcN *wild type*. Este hecho es importante, ya que permite descartar que las posibles diferencias observadas en la colonización intestinal sean debidas a la diferente capacidad de estas cepas de tolerar la estreptomicina presente en el agua de bebida de los ratones.

Las cepas seleccionadas para este estudio presentaban el siguiente fenotipo:

EcN: Str<sup>R</sup>- Rf<sup>R</sup>

EcN*sat::cm*: Str<sup>R</sup>- Rf<sup>R</sup>- Cm<sup>R</sup>

A continuación se realizó una curva de crecimiento en medio LB en presencia de estreptomicina 2mg/ml para confirmar que no había diferencias en el tiempo de duplicación de ambas cepas a altas dosis de antibiótico (Figura 5.24)



**Figura 5.24. Curvas de crecimiento de las cepas EcN y EcNsat::cm en LB en presencia de estreptomicina 2 mg/ml.** EcN y EcNsat::cm en medio LB en presencia de 2 mg/ml de estreptomicina. Los cultivos fueron incubados a 37°C en condiciones aeróbicas.

### 5.3.8.2. Estudios de colonización en ratones CD-1.

Los estudios de colonización se llevaron a cabo en ratones CD-1 machos de entre 5-8 semanas. Dos días antes del inicio del experimento los ratones recibieron estreptomicina (5 g/l) en el agua de bebida y este antibiótico se mantuvo a lo largo de todo el período de estudio. Asimismo, antes del inicio del protocolo se comprobó la ausencia de microbiota resistente a estreptomicina en las heces de los ratones.

Los ratones fueron convenientemente marcados y separados en 4 grupos distintos. Cada ratón fue administrado por vía orogástrica con una dosis total de bacterias de  $2 \times 10^5$  UFC, previo ayuno de 3 horas. El número de animales en cada grupo, así como el protocolo de administración se detallan en la siguiente tabla:

| Nombre Grupo                | Dosis administrada                         |
|-----------------------------|--|
| Grupo Control (n=4)         | Solución de PBS estéril                    |
| Grupo Probiótico (n=4)      | $2 \times 10^5$ UFC (Cepa EcN)             |
| Grupo <i>knockout</i> (n=4) | $2 \times 10^5$ UFC (Cepa EcNsat::cm)      |
| Grupo Coinfección (n=6)*    | $2 \times 10^5$ UFC (Cepas EcN+EcNsat::cm) |

\*En este grupo se llevaron a cabo 2 experimentos biológicos independientes (n=6 en cada experimento)

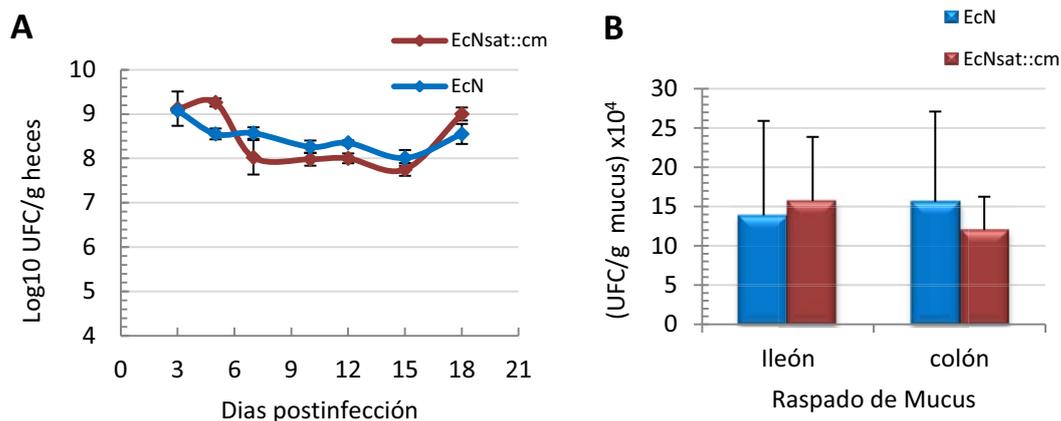
Una vez administradas las bacterias, los ratones fueron devueltos a sus respectivas jaulas. Transcurridos 3 días se separaron en jaulas individuales limpias para realizar la recogida de heces (Método 4.6) y proceder al posterior recuento bacteriano. Los recuentos fueron realizados en días alternos durante 18 días. Al final del experimento (día 18) los ratones fueron sacrificados por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>. Los ratones fueron diseccionados para la obtención de fragmentos correspondientes al íleon y colon (Método 4.6.) y realizar los recuentos de bacterias adheridas al mucus intestinal.

En las heces del grupo control no se seleccionaron cepas resistentes estreptomycinina a lo largo de los 18 días del protocolo (resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos a partir del recuento de heces de los grupos por separado con la cepa EcN *wild-type* (grupo probiótico) o con el mutante EcN*sat::cm* (grupo *knockout*) se presentan en la Figura 5.25. Se observa colonización en ambos grupos a partir del día 3 después de la administración, con recuentos del orden de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> UFC/g heces. La colonización se mantuvo estable y fue similar entre ambos grupos a lo largo de los 18 días que duró el experimento, no encontrándose diferencias significativas en los recuentos bacterianos de las heces entre ambos grupos de estudio. Estos resultados indican que tanto la cepa probiótica EcN como el mutante derivado EcN*sat::cm*, cuando son administradas de manera individual a ratones CD-1, son capaces de colonizar y mantenerse estable en el tiempo.

Los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos del raspado de mucus de íleon y colon tanto del grupo probiótico como del grupo *knockout* (Figura 5.24B) eran consistentes con los resultados obtenidos en sus heces. Cuando las cepas EcN y EcN*sat::cm* eran administradas por separado, ambas cepas se hallaron adheridas al mucus del íleon y colon, no observándose diferencias significativas entre sus recuentos bacterianos (Figura 5.25B).

Por tanto, podríamos concluir que la presencia de Sat no es requerida para la colonización del tracto intestinal. Estudios similares fueron llevados por Guyer et al. (2000) con cepas deficientes en Sat provenientes de cepas uropatógenas en modelos murinos de ascensión por el tracto urinario. Para ello un grupo de ratones CBA fueron sondados transuretralmente con la cepa CFT073*wt* o con la cepa CFT073 mutante en Sat. Al cabo de 4 días de la administración, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron muestras de vejiga, orina y riñón para determinar las UFCs. No se encontraron diferencias significativas en el número de colonias entre los grupos inoculados con la cepa *wild type* o con el mutante deficiente en Sat, hallándose solamente una fuerte producción de anticuerpos anti-Sat en el grupo de ratones infectados con la cepa *wild type*.

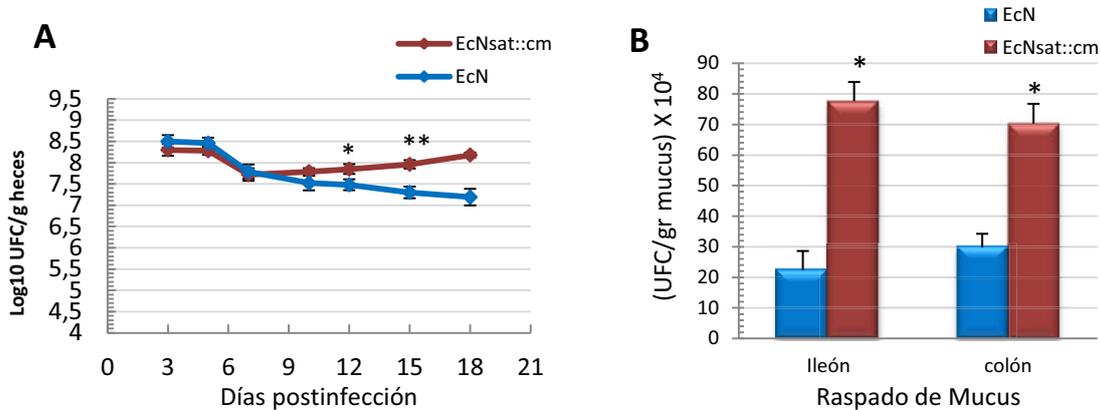


**Figura 5.25. Colonización de ratones CD-1 administrados por vía orogástrica con las cepas EcN (grupo Probiótico) o con la cepa EcNsat::cm (grupo knockout).** A) Recuento en Heces. Los recuentos de UFCs se llevaron a cabo para el grupo probiótico (n=4), en placas de LB suplementadas con estreptomicina y rifampicina y para el grupo *knockout* (n=4) en placas de LB suplementadas con estreptomicina y cloramfenicol. Los resultados, se expresan como Log<sub>10</sub> UFC/g heces. B) Recuento en Mucus. Los recuentos se realizaron a partir de raspado de mucus de los ratones CD-1 infectados con las diferentes cepas (n=4) en cada grupo. Los resultados se expresan como UFC/g de mucus. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SE de los datos obtenidos de cuatro ratones, para cada grupo.

Respecto al grupo de ratones administrados con una mezcla (1:1) de las cepas EcN y EcNsat::cm (grupo coinfección). Los resultados obtenidos a partir del recuento de heces se presentan en la Figura 5.26A. Se puede apreciar que a pesar de obtener recuentos similares al inicio del ensayo del orden de  $10^8$  UFC/g heces, a partir del día 10 los valores del recuento bacteriano mostraron un descenso de bacterias viables en el caso de la cepa EcN (alrededor de  $10^6$ - $10^7$  UFC/g heces) con respecto a la cepa mutante EcNsat::cm ( $10^8$ - $10^9$  UFC/g heces). El porcentaje final de los recuentos bacterianos en heces (día 18) mostró que la cepa EcNsat::cm representa el 70% del total de las bacterias aisladas de heces, mientras que la cepa EcN representa sólo el 30%. A los 22 días post-infección, el porcentaje de colonización por parte del mutante EcNsat::cm, estimado por recuento bacteriano en heces, alcanzó un 80-90% (datos no mostrados obtenidos del análisis de 3 ratones).

En este grupo "coinfección" el recuento de bacterias a partir del raspado del mucus de fragmentos de íleon y colon mostró una predominancia significativa de la cepa EcNsat::cm respecto a la cepa EcN tanto a nivel de colon como de íleon (Figura 5.25B). A partir de estos datos se puede estimar que la cepa EcNsat::cm representa entre el 70-80% del total de las bacterias adheridas a la mucosa intestinal, mientras que la cepa EcN representa sólo el 20-30%. Estos resultados están de acuerdo con los valores obtenidos del recuento de bacterias en las heces de estos ratones e indican una buena correlación entre las bacterias que transitan en el tracto intestinal (heces) y las

adheridas a la capa de mucus. La cepa deficiente en Sat consigue desplazar a la cepa tipo *wild type* tanto en el lumen del intestino como en la adhesión a mucosa intestinal.



**Figura 5.26. Colonización de ratones CD-1 coinfectados con las cepas EcN y *EcNsat::cm* (proporción 1:1).** A) Recuento bacteriano en heces. El recuento de UFCs se llevó a cabo en placas LB suplementadas con estreptomicina y rifampicina. Para diferenciar entre las cepas, 100 colonias de cada placa fueron repicadas en placas de LB suplementadas con estreptomicina y cloramfenicol. Los resultados, expresados como Log10 UFC/ g heces, representan la media  $\pm$  SE del conjunto de datos obtenidos en dos experimentos independientes (n=6 / experimento; n total=12). \* $P < 0,05$  *Knockout* vs Probiótico; \*\* $P = 0,000$  *knockout* vs probiótico. B) Recuento bacteriano en mucus. El recuento se llevó a cabo a partir del raspado de mucus. Los resultados, expresados como UFC/g mucus, representan la media  $\pm$  SE del conjunto de datos obtenidos en dos experimentos independientes (n=6 / experimento; n total=12). \* $P = 0,000$ , vs EcN.

Del conjunto de estos resultados podemos concluir que los ratones inoculados con las cepas bacterianas por separado no presentan diferencias de colonización ni de adhesión al mucus del tejido epitelial. Al igual que en los ensayos de formación de *biofilms* sobre superficies de células en cultivo recubiertas o no con mucina, en este estudio *in vivo* tampoco se observaron diferencias en el recuento de bacterias adheridas a mucus entre la cepa EcN y el mutante deficiente en Sat. Sin embargo cuando los ratones fueron inoculados con una suspensión mixta de ambas cepas, EcN y *EcNsat::cm*; la cepa deficiente en Sat fue capaz de sobrevivir más tiempo en el tracto gastrointestinal, logrando desplazar a la cepa EcN. Estos resultados nos llevan a plantear la cuestión si la eliminación del gen *sat* de la cepa EcN la convierte en un mejor colonizador.

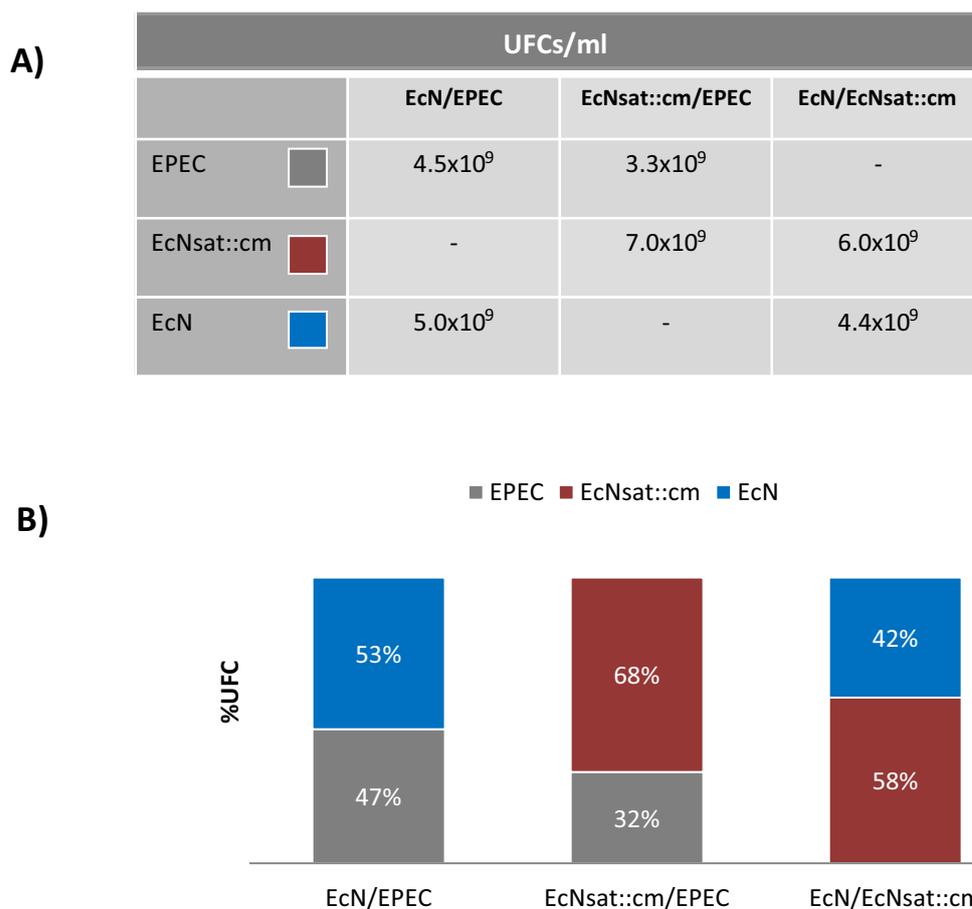
Suponiendo que la síntesis y procesado de la proteína Sat requiere un esfuerzo extra por parte de la bacteria productora, este gasto energético utilizado por la cepa EcN se traduciría en un mayor tiempo de duplicación celular lo que llevaría a su mutante a superarla en número. Siendo así, esta diferencia debería observarse también cuando se administran estas cepas por separado.

### 5.3.9. ENSAYOS DE COMPETICIÓN ENTRE CEPAS BACTERIANAS.

Con la finalidad de determinar si la competencia ejercida por el mutante deficiente en Sat sobre la cepa tipo *wild type* depende del entorno intestinal, donde pueden contribuir otros factores como por ejemplo el sistema inmune del huésped, nos planteamos llevar a cabo estudios de competición entre ambas cepas en condiciones *in vitro*. Para ello, se evaluó el crecimiento de las cepas EcN y EcN*sat::cm* en medio LB en cultivos individuales y en co-cultivo. En estos estudios se quiso también analizar si la deficiencia en Sat afecta a la capacidad de competición en estado planctónico de la cepa probiótica frente a un patógeno intestinal como es EPEC.

Con esta finalidad se partió de cultivos individuales de las cepas EcN, EcN*sat::cm* y EPEC en medio LB crecidos O/N a 37°C. Estos fueron utilizados como inóculo para cultivos en matraces de 10 ml de medio LB, que fueron incubados en agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5. A partir de estos cultivos en fase exponencial y teniendo en cuenta la relación entre el valor de la DO<sub>600</sub> y el número de UFCs/ml para estas cepas en medio LB (Métodos 4.3) se prepararon co-cultivos de 10 ml en medio LB con un inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  bacterias totales (1:1 de cada cepa). En estos estudios de competición se prepararon los siguientes co-cultivos: EcN/EcN*sat::cm*, EcN/EPEC, EcN*sat::cm*/EPEC. En este punto se separó una alícuota de cada cultivo para proceder al recuento de UFCs y confirmar que el cultivo se iniciaba con igual número de bacterias de cada cepa. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación durante 18h. A continuación se realizaron diluciones seriadas de los cultivos y los recuentos bacterianos se realizaron en placas de LB en presencia del antibiótico adecuado según cada caso. Los resultados de estos ensayos se presentan en la figura 5.27. En todos los co-cultivos se estimó una concentración de bacterias alrededor de  $1 \times 10^{10}$  UFCs totales/ml.

El análisis de los datos indica que en cultivos mixtos en LB el mutante deficiente en Sat, la cepa EcN*sat::cm*, consigue superar en número a la cepa EcN tipo *wild type*. Después de 18 horas de crecimiento en medio LB, la población del mutante deficiente en Sat representa cerca del 60% de la población bacteriana total. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en modelos *in vivo*. Cabe destacar que en cultivos individuales ambas cepas, EcN *wild type* y EcN*sat::cm*, presentan el mismo tiempo de duplicación y rendimiento final del cultivo. La capacidad de competición de la cepa mutante EcN*sat::cm* es todavía mayor frente a la cepa de *E. coli* enteropatógena EPEC. En este caso, al final de la fase de crecimiento en medio LB la cepa patógena ha sido desplazada por la cepa EcN*sat::cm* y representa sólo el 30% de la población bacteriana total.



**Figura 5.26. Competición entre la cepa probiótica EcN, su derivado EcNsat::cm y el patógeno intestinal EPEC en crecimiento planctónico en medio LB.** Los co-cultivos indicados fueron iniciados con un número igual de células de cada cepa e incubados a 37°C en agitación durante 18 horas. Transcurrido este tiempo las bacterias fueron sembradas en placas de selección para realizar el recuento de UFCs/ml (A) y estimar el porcentaje de UFCs de cada cepa (B). Los datos son la media de valores de dos experimentos independientes.

Sin embargo, la cepa probiótica EcN *wild type* no fue capaz de competir en crecimiento planctónico con la cepa patógena EPEC. En este caso el cultivo mixto mostró a las 18 horas una proporción cercana al 50% de cada cepa. Está descrito que en condiciones de formación de *biofilms* sobre diferentes superficies la cepa EcN es capaz de desplazar varios patógenos como *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Legionella*, *Listeria* y *E. coli* EPEC (Kleta et al., 2014), así como a otras cepas de *E. coli*, tanto estirpes no patógenas como patógenas del tipo *E. coli* enterotoxigénica (Hancock et al., 2010a). Nuestros resultados indican que esta capacidad de competencia de la cepa probiótica frente a la adhesión de estos patógenos no se manifiesta en condiciones de crecimiento planctónico.

Los resultados obtenidos con la cepa EcNsat::cm demuestran que la deficiencia en Sat no disminuye la capacidad del probiótico EcN de formar *biofilms* sobre diferentes superficies ni tampoco la de colonizar el tracto intestinal de ratones CD-1. Sin embargo, el mutante EcNsat::cm presenta una mayor capacidad de desplazar o

dificultar el crecimiento planctónico de cepas patógenas. En conjunto estos resultados podrían sugerir que la cepa deficiente en Sat podría ser incluso mejor probiótico que la cepa EcN *wild-type*.

### **5.3.10 APORTACIONES DE ESTE TRABAJO EN LA INTERACCIÓN DEL PROBIÓTICO EcN CON EL HUESPED A NIVEL INTESTINAL.**

Si bien EcN es uno de los probióticos muy estudiado por sus efectos antiinflamatorios, y por su acción positiva en la remisión de brotes de colitis ulcerosa, los determinantes genéticos y los factores microbianos responsables de su efecto probiótico no han sido todavía bien establecidos.

Sobre EcN, aunque se conoce bien su genoma, existe escasa información sobre los mecanismos utilizados por esta cepa para liberar y “entregar” las moléculas efectoras que median su acción sobre la homeostasis intestinal. Además, se sabe que esta cepa probiótica contiene en su genoma un gran número de genes e islas génicas presentes en estirpes de *E. coli* patógenas. De hecho, comparte un gran número de genes con cepas uropatógenas como CFT073. Muchos de estos genes codifican adhesinas y factores *fitness* que contribuyen a la colonización y supervivencia de la bacteria en el nicho intestinal. Sin embargo, algunos de ellos codifican proteínas consideradas factores de virulencia en patógenos y se desconoce en muchos casos cuál es su función en el contexto de la cepa probiótica.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha contribuido al conocimiento de las proteínas secretadas por EcN e identificar aquellas que son secretadas a través de OMVs, así como a la caracterización de la toxina Sat secretada por esta cepa probiótica.

#### ***5.3.10.1 Las OMVs de probióticos como vehículos de liberación de moléculas efectoras en la homeostasis intestinal***

Los estudios proteómicos desarrollados en este trabajo, en especial los relacionados con las OMVs aisladas de la cepa EcN a partir de dos medios de cultivo (LB y DMEM), han aportado evidencias sobre la función de estas vesículas en el transporte y liberación de proteínas efectoras a través de la mucosa intestinal. Estos estudios en conjunto han permitido identificar en el proteoma vesicular de la cepa EcN proteínas codificadas por genes específicos, codificadas por pseudogenes o genes crípticos en cepas no patógenas, así como proteínas exportadas selectivamente por patógenos a través de OMVs (Aguilera et al., 2014). Las proteínas identificadas pueden contribuir a la capacidad del probiótico de colonizar el intestino humano ya que desempeñan funciones relacionadas con la adhesión a los tejidos del huésped, a la supervivencia de la bacteria en el nicho intestinal así como a la modulación del sistema inmune del huésped.

A pesar de la importancia de las OMVs como mediadores de la comunicación intercelular, al inicio de este trabajo no existían estudios proteómicos ni funcionales sobre los efectos de estas vesículas producidas por componentes de la microbiota intestinal sobre el huésped. En el año 2012 se publicó el primer estudio funcional de las OMVs producidas por *Bacteriodes fragilis* (Shen et al., 2012).

Nuestro trabajo representa la primera descripción del proteoma de OMVs de una cepa probiótica y demuestra que las OMVs de probióticos contienen proteínas que pueden dirigir estas vesículas hacia las células diana del huésped y mediar los efectos beneficiosos sobre la función intestinal.

### **5.3.10.2 La proteína Sat no debe ser considerada un factor de virulencia en la cepa probiótica EcN.**

La serin proteasa Sat forma parte del conjunto de proteínas con actividad citotóxica codificadas en el genoma de la cepa EcN. Esta proteína está codificada en la isla genómica II de esta cepa probiótica. El gen *sat* presenta una elevada prevalencia en cepas de *E. coli* patógenas y hasta el inicio de este trabajo todos los estudios llevados a cabo con Sat habían sido realizados en el contexto de la cepa uropatógena CFT073, o de estirpes de *E. coli* de adhesión difusa (DAEC). En estos patógenos es considerada un factor de virulencia que contribuye, junto con otros factores, a los mecanismos de patogénesis. Aunque la experiencia acumulada con los años indica que la cepa EcN es un probiótico seguro, la presencia de posibles genes de patogenicidad en su genoma sugiere ciertos riesgos en su uso como probiótico y abre el debate sobre la idoneidad de esta cepa (Guignot et al., 2007; Taddei et al., 2005).

La identificación de Sat en el secretoma de la cepa EcN en medio LB indicaba su expresión en medios de cultivo bacteriológicos. Dado el posible carácter tóxico de esta proteína, estimamos oportuno llevar a cabo la caracterización funcional de la proteína Sat de la cepa EcN, así como el estudio de las condiciones que determinan su expresión en el entorno intestinal, con la finalidad de establecer si esta proteína es de hecho un factor de virulencia o debe ser considerada un factor de competitividad que contribuye a la colonización intestinal.

Hasta el presente no había estudios que demostraran la expresión de Sat en el intestino. Los resultados presentados en este trabajo indican que Sat se expresa en el tracto intestinal de ratones. La inducción del gen *sat* puede ser estar mediada por algún componente presente las membranas de las células epiteliales del tracto gastrointestinal.

La proteína Sat codificada en el genoma de la cepa probiótica es una serin proteasa funcional. Esta proteína cuando es expresada en una cepa de laboratorio a partir del gen clonado en un plásmido de bajo número de copias es capaz de alterar ligeramente la permeabilidad paracelular de monocapas de células Caco-2 polarizadas, a nivel del

mismo orden que los descritos para la proteína Sat de cepas DAEC. En estos patógenos, Sat no degrada las proteínas implicadas en las *tight junctions*, sino que induce una redistribución de la proteína ZO-2 que conduce a una desestabilización parcial de la barrera (Guignot et al., 2007).

En este trabajo hemos demostrado que Sat no produce ningún efecto significativo sobre la permeabilidad paracelular cuando se expresa en la cepa EcN. Otros factores secretados por la cepa probiótica impiden la posible desestructuración de la barrera. Estos resultados, junto con la ausencia de citotoxicidad observada sobre células Caco-2 polarizadas nos llevan a proponer que Sat no actúa como un factor de virulencia en la cepa probiótica.

Otras proteínas consideradas factores de virulencia en patógenos o con efectos tóxicos sobre células epiteliales son expresadas por la cepa EcN y contribuyen a su carácter probiótico. Una de estas proteínas es TcpC. Esta proteína, de elevada prevalencia en varios patógenos, presenta un dominio del tipo Toll/IL-1. A través de este dominio, TcpC interacciona con MyD88 y TLR4 impidiendo la señalización a través de este receptor y bloqueando la inducción de citoquinas. En base a este mecanismo de subversión de la inmunidad del huésped, basado en mimetizar las superficies moleculares de interacción, las proteínas con dominios TIR (entre ellas TcpC) han sido propuestas como una nueva clase de factores de virulencia (Snyder et al., 2013; Cirl and Miethke, 2010; Xiao, 2010). Sin embargo, en la cepa probiótica EcN, la proteína TcpC contribuye a la estabilización de la barrera epitelial a través de la inducción de la expresión de la proteína Claudina-14 via PKC $\zeta$  y ERK1/2 (Hering et al., 2013).

Dentro del grupo de proteínas tóxicas expresada por la cepa EcN se encuentra la Colibactina. Se trata de un péptido híbrido poliquétido (*hybrid peptide polyketide*) con propiedades genotóxicas. Este péptido induce roturas en el DNA de doble cadena en las células eucariotas. Estudios llevados a cabo con la cepa EcN demuestran la actividad de este péptido sobre el DNA produciendo roturas de cadena y aberraciones cromosómicas en células de epitelio intestinal IEC-6. Sin embargo, esta actividad genotóxica es esencial para el carácter probiótico de EcN puesto que en un modelo de colitis en ratones, el mutante deficiente en la síntesis de colibactina no es capaz de impedir ni prevenir la colitis inducida por DSS. El mutante no es capaz de modular la expresión de citoquinas del mismo modo que la cepa EcN *wild type* (Olier et al., 2012). La eliminación de los genes que llevan a la síntesis del péptido genotóxico no convierte a la cepa EcN en un mejor probiótico, lo que llevó a estos autores a proponer que un probiótico eficiente podría tener efectos secundarios igual que cualquier otro fármaco.

Nuestros resultados indican que Sat tampoco contribuye a la formación de *biofilms* o a la colonización del tracto intestinal. La deficiencia en Sat no altera la capacidad de colonizar el tracto intestinal en un modelo *in vivo* de ratones tratados con

estreptomycin. Sin embargo, en estudios de colonización *in vivo* en competición con la cepa parental EcN, el mutante deficiente en Sat es capaz de desplazar y superar en número a la cepa *wild type*. Esta capacidad se manifiesta también en crecimiento planctónico en medio LB, no sólo frente a la cepa EcN *wild type* sino también frente a cepas de *E. coli* enteropatógenas, incluso con mayor eficacia. No sabemos cuál es la base molecular de esta mayor competencia observada en ausencia de Sat. Más estudios han de ser realizados en este sentido, así como evaluar si el mutante deficiente en Sat evita la colonización por parte de EPEC mejor que la cepa EcN *wild type*.

Queda por definir cuál es la función de Sat en el contexto de la cepa probiótica EcN y su interacción con el huésped en el tracto intestinal. Aunque la presencia del gen *sat* se ha vinculado mayoritariamente con cepas patógenas, resultados obtenidos en nuestro grupo evidencian una alta prevalencia del gen *sat* en cepas comensales. Existe una gran diversidad en el genotipo de cepas comensales. La colección EcoR, con 72 cepas de *E. coli* de referencia (Ochman and Selander, 1984), se considera representativa del grado de variación genotípica de aislados naturales de esta especie. Estas cepas se clasifican en tres grupos, siendo el tercero el que contiene mayor número de cepas que presentan genes de virulencia. De las 72 cepas de la colección, 62 han sido aisladas de heces de mamíferos sanos, 27 de ellas son de origen intestinal humano. El *screening* de estas 27 cepas mediante PCR ha permitido identificar 14 cepas que contienen el gen *sat* en su genoma. El análisis por *Western blot* del sobrenadante de cultivos en LB de estas cepas ha permitido confirmar la expresión y secreción de la proteína Sat en todas ellas, indicando que el gen es funcional (Resultados obtenidos por Carina Alvarez). Destacar que las 14 cepas positivas para Sat están distribuidas entre los 3 grupos de la colección EcoR, con mayor prevalencia en el grupo II, y por tanto no limitadas al grupo que acumula más genes considerados de virulencia. La elevada prevalencia del gen *sat* en cepas de la microbiota comensal sugiere que la expresión de Sat puede representar una ventaja para la adaptación y supervivencia de estas bacterias en el nicho intestinal.

Nuestros resultados y otros datos disponibles en la literatura indican que la expresión de proteínas consideradas factores de virulencia en patógenos por cepas de la microbiota comensal no debe ser considerada un factor negativo. En algún caso cierto grado de toxicidad es necesario para obtener el efecto probiótico (como ejemplo la colibactina), en otros, la toxicidad o efecto nocivo depende de otros factores (como ejemplo Sat). Tal como hemos comentado a lo largo de la memoria los efectos tóxicos de Sat dependen de una combinación de factores. Por un lado influye el tipo celular sobre el que la proteasa actúa así como su estado de diferenciación. La mayor parte de efectos citotóxicos, vacuolizantes y de desestructuración del citoesqueleto han sido reportados en células en cultivo a una confluencia del 80-90% (células no diferenciadas). Por otra parte la acción de la proteína depende de la expresión de otros

factores y proteínas por parte de la bacteria productora. Así, en patógenos la expresión de Sat tiene lugar conjuntamente con otros factores de virulencia, cuya combinación puede determinar la acción tóxica de Sat (por ejemplo facilitar su entrada al interior de la célula infectada para que la proteína Sat pueda interactuar con algún factor o diana). Sin embargo, la cepa EcN expresa y secreta otras proteínas que contrarrestan o impiden la posible acción citotóxica de Sat.

## 6. CONCLUSIONES



---

## 6. CONCLUSIONES

1. El análisis *in silico* de las 22 proteínas identificadas en el secretoma de la cepa EcN en medio LB sugiere su implicación en procesos de colonización, interacción con el huésped o inducción de la respuesta inmune.
2. El análisis proteómico de OMVs aisladas de cultivos de la cepa EcN en medio DMEM comparados con los realizados en medio LB evidenciaron que los componentes presentes en el medio de crecimiento determinan la composición de las vesículas generadas, observándose en el proteoma obtenido en DMEM 34 proteínas que no están presentes en el proteoma vesicular de cultivos en LB.
3. Entre las proteínas secretadas por la cepa EcN se identificó la proteína Sat, un miembro de la familia de serin proteasas autotransportadoras de enterobacterias, considerada factor de virulencia en patógenos. La proteína Sat de la cepa EcN es secretada de forma soluble no ligada a vesículas. El dominio secretado presenta actividad serin proteasa y dicha actividad depende de la Ser256 del sitio catalítico.
4. El gen *sat* presenta una expresión basal en medio mínimo. La expresión es inducida por crecimiento en medio LB o en presencia de Mucina Tipo II. Estudios *in vivo* demuestran la expresión de Sat en el tracto intestinal de ratones.
5. La proteasa Sat de la cepa EcN produce una ligera desestructuración de las uniones entre enterocitos cuando es expresada en cepas de laboratorio, sin embargo este efecto no se observa en el contexto de la cepa probiótica EcN.
6. Sat no presenta citotoxicidad en cultivos de células Caco-2 polarizadas. Los efectos de Sat dependen del tipo celular sobre el que actúa, su estadio de diferenciación, así como de otras proteínas y mecanismos expresados por la propia bacteria capaces de contrarrestar el efecto de esta proteasa.
7. La proteína Sat no está implicada en la formación de *biofilms* ni en la colonización del tracto intestinal. Sin embargo, en estudios de competición *in vivo*, el mutante de EcN deficiente en Sat es capaz de desplazar a la cepa tipo salvaje y alcanzar una mayor proporción tanto en heces como en mucus aislado de íleon y colon.

8. Sat no es un factor de virulencia en la cepa probiótica EcN, tampoco un factor *fitness* implicado en colonización, si bien la deficiencia en Sat confiere a la cepa EcN la capacidad de competir en crecimiento planctónico y desplazar cepas de *E. coli* enteropatógenas, por lo que la mutación del gen *sat* podría resultar en la generación de un mejor probiótico.

## 7. REFERENCIAS



---

## REFERENCIAS

### A

---

- Abe, H., Tatsuno, I., Tobe, T., Okutani, A., and Sasakawa, C. (2002)** Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **70**: 3500–3509.
- Aguilera, L., Giménez, R., Badia, J., Aguilar, J., and Baldoma, L. (2009)** NAD<sup>+</sup>-dependent post-translational modification of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Int. Microbiol.* **12**: 187–92.
- Aguilera, L., Toloza, L., Giménez, R., Odena, A., Oliveira, E., Aguilar, J., et al. (2014)** Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics* **14**: 222–229.
- Alaniz, R.C., Deatherage, B.L., Lara, J.C., and Cookson, B.T. (2007)** Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* **179**: 7692–7701.
- Alteri, C.J. and Mobley, H.L.T. (2007)** Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect. Immun.* **75**: 2679–88.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D., et al. (2011)** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **273**: 174–180.
- Assimakopoulos, S.F., Papageorgiou, I., and Charonis, A. (2011)** Enterocytes ' tight junctions : From molecules to diseases. *World J gastrointest Pathophysiol.* **2**: 123–137.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994)** Current Protocols in Molecular Biology.

### B

---

- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., and Raffatellu, M. (2013)** Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**: a010074.
- Benjelloun-Touimi, Z., Si Tahar, M., Montecucco, C., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1998)** SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. *Microbiology* **144**: 1815–1822.

- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., and Ouellette, B.F. (1998)** GenBank. *Nucleic Acids Res* **26**: 1–7.
- Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M.J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A.R., et al. (2008)** Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 mutant. *Mol. Cell. Proteomics* **7**: 473–485.
- Bertani, G. (2004)** GUEST COMMENTARY Lysogeny at Mid-Twentieth Century : P1 , P2 , and Other Experimental Systems. *J. Bacteriol.* **186**: 595–600.
- Boncompain, G., Schneider, B., Delevoye, C., Kellermann, O., Dautry-Varsat, A., and Subtil, A. (2010)** Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* **78**: 80–7.
- Bonnington, K.E. and Kuehn, M.J. (2013)** Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Boronat, A. and Aguilar, J. (1979)** Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J. Bacteriol.* **140**: 320–326.
- Botteaux, A., Hoste, C., Dumont, J.E., Van Sande, J., and Allaoui, A. (2009)** Potential role of Noxes in the protection of mucosae: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a bacterial repellent. *Microbes Infect.* **11**: 537–44.
- Butel, M.-J. (2014)** Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine Mal. Infect.* **44**: 1–8.

## C

- Caron, J. and Scott, J.R. (1990)** A rns-like regulatory gene for colonization factor antigen I (CFA/I) that controls expression of CFA/I pilin. *Infect. Immun.* **58**: 874–8.
- Casadaban, M.J. (1976)** Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**: 541–555.
- Choi, D.-S., Kim, D.-K., Choi, S.J., Lee, J., Choi, J.-P., Rho, S., et al. (2011)** Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **11**: 3424–3429.
- Cirl, C. and Miethke, T. (2010)** Microbial Toll/interleukin 1 receptor proteins: a new class of virulence factors. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 396–401.

---

**Conter, A., Menchon, C., and Gutierrez, C. (1997)** Role of DNA supercoiling and rpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **273**: 75–83.

## D

---

**Dautin, N. (2010)** Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins (Basel)*. **2**: 1179–206.

**Didari, T., Solki, S., Mozaffari, S., Nikfar, S., and Abdollahi, M. (2014)** A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin. Drug Saf.* **13**: 227–39.

**Donnenberg, M.S., Calderwood, S.B., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G.T., and Kaper, J.B. (1990)** Construction and analysis of *TnphoA* mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **58**: 1565–1571.

**Dutta, P.R., Cappello, R., Navarro-garci, F., Nataro, J.P., and Phylogenetic, S. (2002)** Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* **70**: 7105–7113.

## E

---

**Egea, L., Aguilera, L., Giménez, R., Sorolla, M.A., Aguilar, J., Badía, J., and Baldoma, L. (2007)** Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 1190–203.

**Elliott, T. (1992)** A method for constructing single-copy lac fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J. Bacteriol.* **174**: 245–253.

## F

---

**FAO WHO (2001)** WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Córdoba, Argentina. Oct.* 1–34.

**Fuqua, W. (1992)** An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques* **12**: 223–5.

**Furuta, N., Tsuda, K., Omori, H., Yoshimori, T., Yoshimura, F., and Amano, A. (2009)** *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect. Immun.* **77**: 4187–96.

## G

- Galka, F., Wai, S.N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., et al. (2008)** Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* **76**: 1825–1836.
- Glenister, D.A., Salamon, K.E., Smiths, K., Beightons, D., and Keevil, C.W. (1988)** Enhanced Growth of Complex Communities of Dental Plaque Bacteria in Mucin-Limited Continuous Culture. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **1**: 31–38.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A., and Streicher, S.L. (1974)** Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **118**: 810–814.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., and Dobrindt, U. (2004)** Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**: 5432–5441.
- Guarner, F. (2011)** [The intestinal microbiota and inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol. Hepatol.* **34**: 147–54.
- Guarner, F. and Malagelada, J.-R. (2003)** Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**: 512–9.
- Guignot, J., Breard, J., Bernet-Camard, M.F., Peiffer, I., Nowicki, B.J., Servin, a L., and Blanc-Potard, a B. (2000)** Pyelonephritogenic diffusely adhering *Escherichia coli* EC7372 harboring Dr-II adhesin carries classical uropathogenic virulence genes and promotes cell lysis and apoptosis in polarized epithelial caco-2/TC7 cells. *Infect. Immun.* **68**: 7018–27.
- Guignot, J., Chaplais, C., Coconnier-Polter, M.-H., and Servin, A.L. (2007)** The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **9**: 204–21.
- Gujrati, V., Kim, S., Kim, S.-H., Min, J.J., Choy, H.E., Kim, S.C., and Jon, S. (2014)** Bioengineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as Cell-Specific Drug-Delivery Vehicles for Cancer Therapy. *ACS Nano*.
- Gutierrez, C., Barondess, J., Manoil, C., and Beckwith, J. (1987)** The use of transposon TnpHoA to detect genes for cell envelope proteins subject to a common regulatory stimulus. Analysis of osmotically regulated genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **195**: 289–297.

- 
- Guttsches**, A.-K., Loseke, S., Zahringer, U., Sonnenborn, U., Enders, C., Gatermann, S., and Bufe, A. (2012) Anti-inflammatory modulation of immune response by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in human blood mononuclear cells. *Innate Immun.* **18**: 204–216.
- Guyer**, D.M., Henderson, I.R., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2000) Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **38**: 53–66.
- Guyer**, D.M., Radulovic, S., Jones, F., and Mobley, H.L.T. (2002) Sat , the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli* , Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells Sat , the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli* , Is a Vacuolating Cytotoxin for Bla. *Infect. immunity.* **70**: 4539–4546.

---

## H

---

- Hananahan** D, editado por G., and B, H. (1995) Techniques for transformation of *Escherichia coli*.
- Hancock**, V., Dahl, M., and Klemm, P. (2010a) Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation. *J. Med. Microbiol.* **59**: 392–9.
- Hancock**, V., Vejborg, R.M., and Klemm, P. (2010b) Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Mol. Genet. Genomics* **284**: 437–454.
- Harrington**, S.M., Sheikh, J., Henderson, I.R., Ruiz-Perez, F., Cohen, P.S., and Nataro, J.P. (2009) The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect. Immun.* **77**: 2465–73.
- Henderson**, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 692–744.
- Hering**, N. a, Richter, J.F., Fromm, a, Wieser, a, Hartmann, S., Günzel, D., et al. (2013) TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC $\zeta$  and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunol.*
- Hooper**, L. V and Macpherson, A.J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 159–69.
- Houdt**, R. and Michiels, C.W. (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* **156**: 626–633.

---

**J**

---

- Jacobi, C. a and Malfertheiner, P.** (2011) *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig. Dis.* **29**: 600–7.
- Jefferson, K.** (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 163–173.
- Jeon, M.K., Klaus, C., Kaemmerer, E., and Gassler, N.** (2013) Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **4**: 94–99.
- Jin, H., Song, Y.P., Boel, G., Kochar, J., and Pancholi, V.** (2005) Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J. Mol. Biol.* **350**: 27–41.
- Johansson, M.E. V, Larsson, J.M.H., and Hansson, G.C.** (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl** : 4659–65.
- Johansson, M.E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C.** (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15064–9.
- Juge, N.** (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* **20**: 30–9.

---

**K**

---

- Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J.** (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**: 3998–4008.
- Kesty, N.C., Mason, K.M., Reedy, M., Miller, S.E., and Kuehn, M.J.** (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* **23**: 4538–4549.
- Kim, K.C.** (2012) Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **25**: 415–9.
- Kleta, S., Nordhoff, M., Tedin, K., Wieler, L.H., Kolenda, R., Oswald, S., et al.** (2014) Role of F1C fimbriae, flagellae and secreted bacterial components. *Infect. Immun.* **82**: 1801–1812.

---

**Knox**, K.W., Vesk, M., and Work, E. (1966) Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **92**: 1206–1217.

**Kulp**, A. and Kuehn, M.J. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 163–84.

**Laemmli**, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

---

## L

**Laparra**, J.M. and Sanz, Y. (2009) Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**: 695–701.

**Leatham**, M.P., Banerjee, S., Autieri, S.M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., and Cohen, P.S. (2009) Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect. Immun.* **77**: 2876–2886.

**Lee**, E., Choi, D., Kim, K., Gho, Y.S., and Introduction, I. (2008) PROTEOMICS IN GRAM-NEGATIVE BACTERIAL OUTER MEMBRANE VESICLES. *Mass Spectrom.* **27**: 535–555.

**Lee**, E.-Y., Bang, J.Y., Park, G.W., Choi, D.-S., Kang, J.S., Kim, H.-J., et al. (2007) Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* **7**: 3143–3153.

**Lesuffleur**, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., et al. (1993) Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell Sci.* **106**. Pt 3: 771–83.

**Leteurtre**, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D., et al. (2004) Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol. Cell* **96**: 145–151.

**Liévin-Le Moal**, V., Comenge, Y., Ruby, V., Amsellem, R., Nicolas, V., and Servin, A.L. (2011) Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. *Cell. Microbiol.* **13**: 992–1013.

**Linden**, S.K., Sutton, P., Karlsson, N.G., Korolik, V., and McGuckin, M. a (2008) Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* **1**: 183–97.

**Lindsay**, D. and von Holy, A. (2006) Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J. Hosp. Infect.* **64**: 313–25.

**Lowry, O.,** Rosebrough, N., Randall, R.J., and Lewis, A. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biological Chem.* **193**: 265–275.

**Lüdi, S.,** Frey, J., Favre, D., and Stoffel, M.H. (2006) Assessing the expression of enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific surface antigens in recombinant strains by transmission electron microscopy and immunolabeling. *J. Histochem. Cytochem.* **54**: 473–7.

---

## M

---

**MacDonald, I.** and Kuehn, M.J. (2012) Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Res. Microbiol.* **163**: 607–18.

**Manning, A.J.** and Kuehn, M.J. (2013) Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J Mol Microbiol Biotechnol* **23**: 131–141.

**Maroncle, N.M.,** Sivick, K.E., Brady, R., Stokes, F.-E., and Mobley, H.L.T. (2006) Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **74**: 6124–34.

**Martín-Venegas, R.,** Brufau, M.T., Mercier, Y., Geraert, P.-A., and Ferrer, R. (2011) Intestinal cell conversion of DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid in vitro: dietary up-regulation by this methionine precursor. *Br. J. Nutr.* **106**: 350–6.

**McConnell, R.E.,** Higginbotham, J.N., Shifrin, D.A., Tabb, D.L., Coffey, R.J., and Tyska, M.J. (2009) The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J. Cell Biol.* **185**: 1285–1298.

**McDermott, A.J.** and Huffnagle, G.B. (2014) The Microbiome and Regulation of Mucosal Immunity. *Immunology* **142**: 24–31.

**McDole, J.R.,** Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., et al. (2012) Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**: 345–349.

**McGuckin, M. a,** Lindén, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 265–78.

**Miller, J.H.** (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Volumen 1.

**Mukherjee, P.,** Tinder, T.L., Basu, G.D., and Gendler, S.J. (2005) MUC1 (CD227) interacts with Ick tyrosine kinase in Jurkat lymphoma cells and normal T cells. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 90–9.

---

**Mullaney, E., Brown, P.A., Smith, S.M., Botting, C.H., Yamaoka, Y.Y., Terres, A.M., et al.** (2009) Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics. Clin. Appl.* **3**: 785–796.

## N

---

**Niu, C. and Gilbert, E.S.** (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6951–6.

**Nyström, T. and Neidhardt, F.C.** (1992) Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3187–98.

## O

---

**O'Hara, A.M. and Shanahan, F.** (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**: 688–93.

**O'Toole, R. and Williams, H.D.** (2003) Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* **154**: 387–92.

**Ochman, H. and Selander, R.K.** (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* **157**: 690–3.

**Ohland, C.L. and Macnaughton, W.K.** (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **1**:

**Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., et al.** (2012) Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* **3**: 501–9.

## P

---

**Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, M.B., and Keenan, J.I.** (2010) Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**: 5054–5061.

**Pérez-Cruz, C., Carrión, O., Delgado, L., Martínez, G., López-Iglesias, C., and Mercade, E.** (2013) New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 1874–81.

**Pierson, T., Matrakas, D., Taylor, Y.U., Manyam, G., Morozov, V.N., Zhou, W., and van Hoek, M.L.** (2011) Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* **10**: 954–967.

**Pumbwe**, L., Skilbeck, C. a, Nakano, V., Avila-Campos, M.J., Piazza, R.M.F., and Wexler, H.M. (2007) Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb. Pathog.* **43**: 78–87.

---

## R

**Ramiro-Puig**, E., Pérez-Cano, F.J., Castellote, C., Franch, A., and Castell, M. (2008) El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev. Española Enfermedades Dig.* **100**: 29–34.

**Rao**, R.K. and Samak, G. (2013) Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr Nutr Food Sci* **9**: 99–107.

**Robles Alonso**, V. and Guarner, F. (2013a) Linking the gut microbiota to human health. *Br. J. Nutr.* **109 Suppl**: S21–6.

**Robles-Alonso**, V. and Guarner, F. (2013b) [Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota]. *Nutr. Hosp.* **28**: 553–7.

**Rodríguez-Piñeiro**, A.M., Bergström, J.H., Ermund, A., Gustafsson, J.K., Schütte, A., Johansson, M.E. V, and Hansson, G.C. (2013) Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**: G348–56.

**Ruiz-Perez**, F. and Nataro, J.P. (2013) Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life Sci.*

**Ruiz-Perez**, F., Wahid, R., Faherty, C.S., Kolappaswamy, K., Rodriguez, L., Santiago, A., et al. (2011) Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 12881–6.

**Rund**, S. a, Rohde, H., Sonnenborn, U., and Oelschlaeger, T. a (2013) Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**: 1–8.

---

## S

**Saiki**, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (80- )*. **230**: 1350–1354.

**Sambrook**, J. and W Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY* 999.

- 
- Sanz, Y.** and De Palma, G. (2009) Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *Int. Rev. Immunol.* **28**: 397–413.
- Scaldaferri, F.,** Gerardi, V., Lopetuso, L.R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., et al. (2013) Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res. Int.* **2013**: 435268.
- Schaar, V.,** de Vries, S.P.W., Perez Vidakovics, M.L.A., Bootsma, H.J., Larsson, L., Hermans, P.W.M., et al. (2011) Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **13**: 432–449.
- Schaumburg, J.,** Diekmann, O., Hagendorff, P., Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., et al. (2004) The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* **4**: 2991–3006.
- Schlee, M.,** Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. a, Stange, E.F., and Fellermann, K. (2007) Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* **75**: 2399–407.
- Schwechheimer, C.,** Sullivan, C.J., and Kuehn, M.J. (2013) Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry* **52**: 3031–40.
- Sekirov, I.,** Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **90**: 859–904.
- Sharma, V.,** Garg, S., and Aggarwal, S. (2013) Probiotics and liver disease. *Perm. J.* **17**: 62–7.
- Sharpe, S.W.,** Kuehn, M.J., and Mason, K.M. (2011) Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **79**: 4361–9.
- Shen, Y.,** Giardino Torchia, M.L., Lawson, G.W., Karp, C.L., Ashwell, J.D., and Mazmanian, S.K. (2012) Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* **12**: 509–20.
- Shen, Y.,** Torchia, M.L.G., Lawson, G.W., Karp, C. I., Ashwell, J.D., and Mazmanian, S.K. (2012) Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal. *Cell Host Microbe* **12**: 509–520.

- Sherman**, P.M., Cabana, M., Gibson, G.R., Koletzko, B. V, Neu, J., Veereman-Wauters, G., et al. (2009) Potential roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants, and children: proceedings from a global prebiotic summit meeting, New York City, June 27-28, 2008. *J. Pediatr.* **155**: S61–70.
- Simons**, R.W., Houtman, F., and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85–96.
- Singer**, M., Baker, T.A., Schnitzler, G., Deischel, S.M., Goel, M., Dove, W., et al. (1989) A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **53**: 1–24.
- Snyder**, G. a, Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., et al. (2013) Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 6985–90.
- Suzuki**, T. (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**: 631–59.

---

## T

---

- Taddei**, C.R., Fasano, A., Ferreira, A.J.P., Trabulsi, L.R., and Martinez, M.B. (2005) Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**: 263–269.
- Tiihonen**, K., Ouwehand, A.C., and Rautonen, N. (2010) Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res. Rev.* **9**: 107–16.
- Trebichavsky**, I., Splichal, I., Rada, V., and Splichalova, A. (2010) Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nutr. Rev.* **68**: 459–64.
- Troge**, A., Scheppach, W., Schroeder, B.O., Rund, S. a, Heuner, K., Wehkamp, J., et al. (2012) More than a marine propeller--the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int. J. Med. Microbiol.* **302**: 304–14.
- Tyrer**, P.C., Frizelle, F. a, and Keenan, J.I. (2014) *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells. *Infect. Agent. Cancer* **9**: 2.

---

**U**

---

**Uliczka**, F., Pisano, F., Kochut, A., Opitz, W., Herbst, K., Stolz, T., and Dersch, P. (2011) Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. *PLoS One* **6**: e20425.

**Unal**, C.M., Schaar, V., and Riesbeck, K. (2011) Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin. Immunopathol.* **33**: 395–408.

---

**V**

---

**Vejborg**, R.M., Friis, C., Hancock, V., Schembri, M. a, and Klemm, P. (2010) A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972. *Mol. Genet. Genomics* **283**: 469–84.

**Vidakovics**, M.L.A.P., Jendholm, J., Mörgelin, M., Månsson, A., Larsson, C., Cardell, L.-O., and Riesbeck, K. (2010) B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog.* **6**: e1000724.

---

**W**

---

**Weng**, M. and Walker, W.A. (2013) The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J. Dev Orig Heal.* **4**: 1–23.

**Wu**, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Sue, A., et al. (2012) linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science (80-. ).* **334**: 105–108.

**Wykes**, M., MacDonald, K.P.A., Tran, M., Quin, R.J., Xing, P.X., Gendler, S.J., et al. (2002) MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 692–701.

---

**X**

---

**Xiao**, T.S. (2010) Subversion of Innate Immune Signaling Through Molecular Mimicry. *J. Clin. Immunol.* **30**: 638–642.

---

**Z**

---

**Zabarovsky**, E.R. and Winberg, G. (1990) High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5912.

**Zhang**, X., Wojcikiewicz, E., and Moy, V.T. (2002) Force spectroscopy of the leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *Biophys. J.* **83**: 2270–9.

**Zyrek, A. a, Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2007)** Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell. Microbiol.* **9**: 804–16.

## 8. ANEXOS



## 8. ANEXOS

### ANEXO 1: OLIGONUCLEOTIDOS

#### OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS COMO CEBADORES

##### *Cebadores empleados en el estudio del promotor Sat*

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| <i>FW <math>\phi</math>(sat-lacZ)</i>      | TACGAATTCGGATGCTTTTGCAACAAGGGT |
| <i>RW <math>\phi</math>(sat-lacZ)</i>      | TACGGATCCTTCAGAAACAGCAATGAGTC  |
| <i>FW <math>\phi</math>(sat-gfpmut3.1)</i> | TACGAATTCGGATGCTTTTGCAACAAGGGT |
| <i>RW <math>\phi</math>(sat-gfpmut3.1)</i> | TACGGATCCTTCAGAAACAGCAATGAGTC  |
| <i>RW M13</i>                              | GTA AACGACGGCAGT               |
| <i>RW PFU34</i>                            | CGCATGCTTAATTTCTCCTCG          |

##### *Cebadores empleados para construcción del mutante de Serina<sup>256</sup> de Sat*

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| <i>FW Mut 256</i> | TCGGAGACATCGGCTCTGG |
| <i>RW Mut 256</i> | CCAGAGCCGATGTCTCCGA |

##### *Cebadores empleados para la construcción del knockout de Sat*

|                       |                                     |
|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>FW knockout</i>    | TAGAGTTGAGAGAATATATGAATAAAATATACTCC |
| <i>RW knockout</i>    | TCAGAAAGAGTAACGGAAGTTG              |
| <i>RW cassette CM</i> | CCCAAGCTTTTATTACGCCCCGCCCTGCCACTC   |

##### *Cebadores para la construcción de Sat*

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| <i>FW Clon</i>   | TACGGATCCGGATCAGGGTTGGCAATATCG      |
| <i>RW Clon</i>   | TAGAAGGATCCGCTAATAATGAGAGCAAGAGCGAT |
| <i>FW pBR322</i> | ATCGACTACGCGATCATGG                 |
| <i>RW pBR322</i> | CCAGCAACCGCACCTGTG                  |

##### *Cebadores para amplificación de Sat*

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <i>FW Sat1</i>                | CAGCATATAGCCATGATCTCTG                 |
| <i>FW Sat2</i>                | AGGCCCCGGTACTCTGAATGTTCA               |
| <i>FW Sat3</i>                | ATACATTACACCTGAACAATGC                 |
| <i>FW Sat4</i>                | GTATGGCTTTGATACCGCCTATCG               |
| <i>FW Fracción Catalítica</i> | TAGAAGGAGAAGGATGGCAAATATTGATATATCAAATG |
| <i>RW Fracción Catalítica</i> | GTTGACCTCAGCAAGGAAG                    |

##### *Otros Cebadores*

|                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| <i>FW gen rpsl</i> | ATGGCAACAGTTAACCAGCTG  |
| <i>RW gen rpsl</i> | TTAAGCCTTAGGACGCTTCACG |



## Anexo 2:

Proteínas asociadas a vesículas aisladas de cultivos de la cepa EcN, en medio DMEM, presentes también en el proteoma de las OMVs obtenidas de cultivos en LB (114 proteínas en total).

| Nº Acceso (EcN)  | Nombre de la proteína   | GENE en <i>E. coli</i> | BIOLOGICAL FUNCTION   |
|------------------|---|------------------------|---|
| <b>Cytoplasm</b> |   |                        |   |
| 442605370        | Polyribonucleotide nucleotidyltransferase   | <i>pnp</i>             | Cellular processes - Macromolecule degradation                                    |
| 442604555        | Prophage Clp protease-like protein  | <i>clpP</i>            | Cellular processes - Macromolecule degradation                                    |
| 442606143        | Heat shock protein 60 family chaperone GroEL  | <i>groL</i>            | Cellular processes - Posttranslational modification, protein turnover, chaperones |
| 442606364        | Non-specific DNA-binding protein Dps / Iron-binding ferritin-like antioxidant protein / Ferroxidase | <i>dps</i>             | Information transfer - Chromosome condensation                                    |
| 442604375        | Integration host factor alpha subunit   | <i>ihfA</i>            | Information transfer - DNA replication, repair and recombination                  |
| 442607415        | DNA-directed RNA polymerase beta' subunit   | <i>rpoC</i>            | Information transfer - Transcription  |
| 442607651        | DNA-binding protein H-NS  | <i>hns</i>             | Information transfer - Transcription  |
| 442607416        | DNA-directed RNA polymerase beta subunit  | <i>rpoB</i>            | Information transfer - Transcription  |
| 442604006        | Cyclic AMP receptor protein   | <i>crp</i>             | Information transfer - Transcription  |
| 442607718        | Phage shock protein A   | <i>pspA</i>            | Information transfer - Transcription  |
| 442606461        | SSU ribosomal protein S1p   | <i>rpsA</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442604758        | LSU ribosomal protein L19p  | <i>rplS</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442607470        | LSU ribosomal protein L17p  | <i>rplQ</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442607461        | SSU ribosomal protein S5p (S2e)   | <i>rpsE</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442606199        | LSU ribosomal protein L9p   | <i>rplI</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442607463        | LSU ribosomal protein L15p (L27Ae)  | <i>rplO</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442607459        | LSU ribosomal protein L6p (L9e)   | <i>rplF</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442604378        | LSU ribosomal protein L20p  | <i>rplT</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442607420        | LSU ribosomal protein L11p (L12e)   | <i>rplK</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442607460        | LSU ribosomal protein L18p (L5e)  | <i>rplR</i>            | Information transfer - Translation  |
| 442606197        | SSU ribosomal protein S6p   | <i>rpsF</i>            | Information transfer - Translation  |

|           |   |             |  |
|-----------|---|-------------|--|
| 442607449 | LSU ribosomal protein L22p (L17e)   | <i>rplV</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607466 | SSU ribosomal protein S13p (S18e)   | <i>rpsM</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607450 | SSU ribosomal protein S3p (S3e)   | <i>rpsC</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607447 | LSU ribosomal protein L2p (L8e)   | <i>rplB</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607032 | SSU ribosomal protein S20p  | <i>rpsT</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607418 | LSU ribosomal protein L10p (P0)   | <i>rplJ</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607456 | LSU ribosomal protein L5p (L11e)  | <i>rplE</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607467 | SSU ribosomal protein S11p (S14e)   | <i>rpsK</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607419 | LSU ribosomal protein L1p (L10Ae)   | <i>rplA</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607468 | SSU ribosomal protein S4p (S9e)   | <i>rpsD</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607451 | LSU ribosomal protein L16p (L10e)   | <i>rplP</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607445 | LSU ribosomal protein L4p (L1e)   | <i>rplD</i> | Information transfer - Translation               |
| 442603988 | Translation elongation factor G   | <i>fusA</i> | Information transfer - Translation               |
| 442605427 | LSU ribosomal protein L13p (L13Ae)  | <i>rplM</i> | Information transfer - Translation               |
| 442605426 | SSU ribosomal protein S9p (S16e)  | <i>rpsI</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607444 | LSU ribosomal protein L3p (L3e)   | <i>rplC</i> | Information transfer - Translation               |
| 442605371 | SSU ribosomal protein S15p (S13e)   | <i>rpsO</i> | Information transfer - Translation               |
| 442605276 | SSU ribosomal protein S21p  | <i>rpsU</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607457 | SSU ribosomal protein S14p (S29e) @ SSU ribosomal protein S14p (S29e), zinc-independent | <i>rpsN</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607446 | LSU ribosomal protein L23p (L23Ae)  | <i>rplW</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607443 | SSU ribosomal protein S10p (S20e)   | <i>rpsJ</i> | Information transfer - Translation               |
| 442604380 | Translation initiation factor 3   | <i>infC</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607453 | SSU ribosomal protein S17p (S11e)   | <i>rpsQ</i> | Information transfer - Translation               |
| 442607301 | SSU ribosomal protein S2p (SAe)   | <i>rpsB</i> | Information transfer - Translation               |
| 442603989 | SSU ribosomal protein S7p (S5e)   | <i>rpsG</i> | Information transfer - Translation               |
| 442606453 | Pyruvate formate-lyase  | <i>pflB</i> | Metabolism - Amino acid transport and metabolism |
| 442606139 | Aspartate ammonia-lyase   | <i>aspA</i> | Metabolism - Amino acid transport and metabolism |

|                             |  |              |  |
|-----------------------------|--|--------------|--|
| 442605034                   | Glycine dehydrogenase [decarboxylating] (glycine cleavage system P protein)    | <i>gcvP</i>  | Metabolism - Amino acid transport and metabolism     |
| 442607357                   | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | <i>aceF</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442607655                   | Alcohol dehydrogenase  | <i>adhE</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442606942                   | Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit                                   | <i>sdhA</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442608213                   | NADP-dependent malic enzyme  | <i>maeB</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442606156                   | Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit                                   | <i>frdA</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442607358                   | Pyruvate dehydrogenase E1 component  | <i>aceE</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442604842                   | Catalase   | <i>katG</i>  | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| 442607288                   | (3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase                       | <i>fabZ</i>  | Metabolism - Lipid transport and metabolism          |
| 442605451                   | Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase                                   | <i>accC</i>  | Metabolism - Lipid transport and metabolism          |
| 442603885                   | 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase                                     | <i>fabG</i>  | Metabolism - Lipid transport and metabolism          |
| 442605373                   | Ribosome-binding factor A  | <i>rbfA</i>  | Information transfer - RNA modification              |
| 442607177                   | Glutamine synthetase type I  | <i>glnA</i>  | Metabolism - Amino acid transport and metabolism     |
| 442604444                   | NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                         | <i>gapA</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442603407                   | Thioredoxin  | <i>trxA</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442604626                   | Ferritin-like protein 2  | <i>ftnA</i>  | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| <b>Inner membrane</b>       |  |              |  |
| 442607594                   | Membrane-bound lytic murein transglycosylase E                                 | <i>emtA</i>  | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442605782                   | ATP synthase beta chain  | <i>atpD</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| 442605784                   | ATP synthase alpha chain   | <i>atpA</i>  | Metabolism - Energy production and conversion        |
| <b>Poorly characterized</b> |  |              |  |
| 442607550                   | Phage tail fiber protein   | <i>c1591</i> | Cellular processes - Macromolecule degradation       |
| 442603719                   | FIG00921676: hypothetical protein  | <i>c1204</i> | Function unknown                                     |
| <b>Outer membrane</b>       |  |              |  |
| 47600589                    | FocA protein   | <i>focA</i>  | Cellular processes - Cell adhesion                   |

|           |   |                    |  |
|-----------|---|--------------------|--|
| 442603770 | type 1 fimbriae adaptor subunit FimF  | <i>focF</i>        | Cellular processes - Cell adhesion                   |
| 442604205 | type 1 fimbriae major subunit FimA  | <i>c1936</i>       | Cellular processes - Cell adhesion                   |
| 442604339 | major outer membrane lipoprotein  | <i>lpp</i>         | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442607993 | Outer membrane protein C precursor  | <i>ompC</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442606499 | Outer membrane protein A precursor  | <i>ompA</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442608028 | Uncharacterized protein YfaZ precursor  | <i>yfaZ</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442604303 | Outer membrane lipoprotein pcp precursor [Escherichia coli Nissle 1917]   | <i>slyB</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442604447 | MltA-interacting protein MipA   | <i>mipA</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442606296 | 18K peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein; Peptidoglycan-associated lipoprotein precursor; Outer membrane protein P6; OmpA/MotB precursor | <i>pal</i>         | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442606479 | Outer membrane protein F precursor  | <i>ompF</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442606799 | Protease VII (OmpT) precursor   | <i>ompT</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |
| 442604815 | Outer membrane vitamin B12 receptor BtuB  | <i>btuB</i>        | Metabolism - Coenzyme transport and metabolism       |
| 442607384 | Aerobactin siderophore receptor IutA @ TonB-dependent siderophore receptor  | <i>iutA</i>        | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| 442603673 | Outer Membrane Siderophore Receptor IroN  | <i>iroN</i>        | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| 442607318 | Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA   | <i>fhuA</i>        | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| 442605916 | Ferrichrome-iron receptor   | <i>c2518/c0294</i> | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| 442607597 | Putative TonB dependent outer membrane receptor   | <i>prrA/c1646</i>  | Metabolism - Inorganic ion transport and metabolism  |
| 47600594  | FocG protein  | <i>focG</i>        | Cellular processes - Cell adhesion                   |
| 47600595  | FocH protein  | <i>focH</i>        | Cellular processes - Cell adhesion                   |
| 442605241 | Type I secretion outer membrane protein, TolC precursor   | <i>tolC</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis |

|                  |  |                    |   |
|------------------|--|--------------------|---|
| 442605577        | Outer membrane protein A precursor   | <i>yiaD</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442608230        | Outer membrane protein NlpB, lipoprotein component of the protein assembly complex (forms a complex with YaeT, YfiO, and YfgL); Lipoprotein-34 precursor | <i>nlpB (bamC)</i> | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442603872        | Lipoprotein YcfM, part of a salvage pathway of unknown substrate   | <i>lpoB</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442606866        | Rare lipoprotein A precursor   | <i>rlpA</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442607291        | Outer membrane protein assembly factor YaeT precursor  | <i>yaeT</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442606874        | LPS-assembly lipoprotein RlpB precursor (Rare lipoprotein B)   | <i>lptE</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442606723        | Glycoprotein-polysaccharide metabolism   | <i>ybaY</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442605809        | Protein RcsF   | <i>rscF</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442607386        | Per-activated serine protease autotransporter enterotoxin EspC   | <i>sat</i>         | Cellular processes - Macromolecule degradation                                    |
| 442604644        | Flagellar hook-associated protein FliD   | <i>fliD</i>        | Cellular processes - Motility   |
| 442606701        | Hypothetical lipoprotein YajG precursor  | <i>yajG</i>        | Function unknown  |
| 442607766        | Heat shock protein hslJ  | <i>hslJ</i>        | Function unknown  |
| 442607526        | Lipoprotein Bor  | <i>borD</i>        | Function unknown  |
| 442606321        | Pectinesterase   | <i>ybhC</i>        | Metabolism - Carbohydrate transport and metabolism                                |
| <b>Periplasm</b> |  |                    |   |
| 442607290        | Outer membrane protein H precursor   | <i>ompH</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442606371        | L,D-transpeptidase YbiS  | <i>ybiS</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442605136        | Capsular polysaccharide export system periplasmic protein KpsD   | <i>kpsD</i>        | Cellular processes - Cell wall / membrane biogenesis                              |
| 442605430        | Outer membrane stress sensor protease DegQ,serine protease   | <i>degQ</i>        | Cellular processes - Posttranslational modification, protein turnover, chaperones |
| 442606295        | tolB protein precursor, periplasmic protein involved in the tonb-independent uptake of group A colicins  | <i>tolB</i>        | Cellular processes - Protein transport  |
| 442604648        | FIG00640199: hypothetical protein  | <i>yedD</i>        | Function unknown  |

---

|           |  |             |  |
|-----------|--|-------------|--|
| 442604132 | DcrB protein precursor                               | <i>dcrB</i> | Function unknown                                 |
| 442604265 | Protein ydgH precursor                               | <i>ydgH</i> | Function unknown                                 |
| 442605808 | Methionine ABC transporter substrate-binding protein | <i>metQ</i> | Metabolism - Amino acid transport and metabolism |
| 442605356 | 21 kDa hemolysin precursor                           | <i>yraP</i> | Function unknown                                 |
| 442605808 | Methionine ABC transporter substrate-binding protein | <i>metQ</i> | Metabolism - Amino acid transport and metabolism |

## 9. PUBLICACIONES