



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Comunicación microbiota-huésped: Internalización y señalización intracelular de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales de *E. coli* en células de epitelio intestinal

María Alexandra Cañas Pacheco

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGÍA

SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Comunicación microbiota- huésped: Internalización y señalización intracelular de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales de *E. coli* en células de epitelio intestinal

María Alexandra Cañas Pacheco

2017



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y FISIOLOGÍA

SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Memoria presentada por MARÍA ALEXANDRA CAÑAS PACHECO 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 la sección de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, julio 2017

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Dra. Josefa Badía Palacín

María Alexandra Cañas Pacheco

A mi madre y mi hermana.

“Haz lo que puedas, con lo que tengas, estés donde estés”

“Mantén tus ojos en las estrellas y tus pies en el suelo”

Theodore Roosevelt.

AGRADECIMIENTOS

Después de algunos años de esfuerzo llega el final de esta tesis, es imposible no estar agradecida con quienes hicieron posible lograr culminar esta etapa, que me han acompañado y apoyado durante todo este tiempo compartiendo los buenos y no tan buenos momentos, los logros y fracasos, las alegrías y tristezas y han llenado mi vida no solo de conocimientos sino de experiencias enriquecedoras que me ayudaron a crecer personal como profesionalmente.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directoras de tesis Laura Baldomà y Josefa Badía. Laura, gracias por tu paciencia, tus conocimientos, tu experiencia investigadora, eres una gran persona, tu manera de ver la ciencia, la pasión y constancia que colocas en todo lo que haces es admirable y poder ver esto hizo encender mi curiosidad y mis ganas de aprender cada día más. A Josefa "Pepita", gracias por tus ánimos, tu preocupación, tu optimismo, tu incansable capacidad de trabajar, y sobre todo gracias por los consejos y tu manera de hacerme ver que todo es siempre posible, tu accesibilidad y la energía y alegría que impartes es indescriptible. A Rosa, gracias por la buena disposición que has tenido siempre para ayudarme, por la cercanía y el cariño que demuestras y esa gran calidad humana que te hace única. Mil gracias a todas por hacer esto posible, por la comprensión y la confianza depositada en mí.

A mis Colis, las palabras son cortas para expresar lo mucho que las quiero, y lo agradecida que estoy de haber coincidido todo este tiempo con ustedes. Laura "La Pequeña", los recuerdos que me llevo son inmensos, gracias por tu paciencia y sobre todo por la inmensa voluntad que has tenido siempre conmigo para enseñarme y ayudarme, por responder siempre todas mis preguntas, dudas y ocurrencias, por tu compañía durante todo este último año que sin ti habría sido solo monotonía, no tengo la más mínima duda que quien trabaje contigo se lleva una profesional y una persona admirable. A Lore, a miles de kilómetros el cariño es muy grande, llenaste siempre de alegría el laboratorio con tus ocurrencias, tus bailes y con esa alegría única que le colocas a vida, me ha hecho ver que siempre se puede volver a ser feliz y que los límites no existen. A Carina gracias por los ánimos y las buenas palabras en esos momentos que me viste más agobiada. Por último, a esta pequeña pero gran persona a ti Mari, que difícil que resulta escribirte algo sin que se me arrugue el corazón y sin que los recuerdos cobren vida, mil gracias por hacer esta tesis lo más llevadera posible porque trabajar contigo ha sido una de las mejores experiencias que he tenido, tu ayuda incondicional, tu buena voluntad, tu solidaridad, tu positivismo (aunque a momentos lo dudo), tu incansable energía (y no solo de bailar), tus consejos y tu compañía en todos los momentos marcaron mi vida, que más decirte que tu no sepas, mil gracias por ser mi amiga, por brindarme ese cariño y cuidar de mí, de todo corazón hay muy pocas personas como tú, sabes que tienes todo mi cariño y ocupas una parte de mi corazón.

A los amigos, que me hicieron sentir con su presencia estar en casa, Xana gracias por escucharme siempre y estar dispuesta ayudarme, por cada café y cada palabra de ánimo, por las celebraciones, las tradiciones y las fiestas. Carlos, que se me puede ocurrir que no sepas, tu personalidad te hace único, gracias por cada día y tolerar cada ocurrencia, eres un compañero, un amigo y mi mejor "Room Mate" contigo las risas han dejado sordos mis oídos y las preocupaciones han sido más llevaderas, por ti sé que la vida es corta y hay que vivirla. Gracias a ambos los quiero y los llevo en mi corazón.

A todos mis compañeros del departamento a muchos de los que ya no están y a las nuevas adquisiciones, chicos día tras día han aportado un ambiente agradable lleno de conversaciones, risas y ánimos en los días de largos experimentos, gracias por los picnics, los amigos inviables y las situaciones

más allá de las cotidianas que han hecho de esta tesis una experiencia única. No podría olvidar a los técnicos, Andrés gracias por tener siempre la disposición para solucionar cualquier problema que se presente, por tus bromas y tu buen sentido del humor. Kim, gracias por tu capacidad para solucionar problemas y tener siempre la mejor voluntad.

A mis amigas Patty y Sylvia, que a pesar de la distancia han mantenido esta conexión única, gracias por el cariño, las conversaciones, las risas, y por reñirme cuando era necesario gracias a ustedes nunca me he sentido lejos de casa. A ti Marcel, después de tantos años ya no hay cosas que tú y yo no sepamos, gracias por tu apoyo incondicional, por creer en mí y creer que esto era posible.

A mi familia, mi abuela, a mi tía Yolanda y mis primos (Mari y Rafa), saben lo valiosos que son para mí y lo afortunada que soy de tener esta familia, gracias por estar siempre pendientes y darme la tranquilidad de que, a pesar de estar lejos, en los momentos difíciles siempre estarán para mí y para los nuestros.

A mi padre, solo tú sabes lo importante que has sido en mi vida gracias por quererme y darme siempre lo mejor.

Por último, quiero dar especialmente las gracias a mi Madre, sin ti no sería lo que soy, todo lo que hago es por y para ti, gracias por enseñarme a soñar y ver que todo es posible, gracias por tu apoyo y confianza incondicional eres el pilar de mi vida, de mis principios y mis valores, gracias por ser siempre una mujer luchadora, generosa e incondicional por nosotras y a ti mi pequeña hermana Vane, eres la luz y alegría de mi vida la distancia siempre ha estado en nuestra contra, pero gracias por mantener este amor y complicidad que solo tú y yo sabemos que existe. Mi amor infinito es para ustedes.

PRESENTACIÓN

El epitelio intestinal es la primera línea de defensa contra patógenos y es también la superficie donde el huésped interactúa con la microbiota intestinal. Esta superficie está protegida por una capa de mucina que impide que las bacterias del lumen accedan a las células del epitelio intestinal. Las interacciones entre la microbiota y el huésped son complejas y dependen principalmente de factores secretados que pueden atravesar la capa de mucus y alcanzar el epitelio. Dentro de los factores secretados, las bacterias liberan vesículas extracelulares como mecanismo de comunicación con el entorno. Estas vesículas representan un mecanismo de secreción de proteínas y otros compuestos activos en un ambiente protegido que permiten la interacción a distancia con otras células. Por ello, las vesículas de la microbiota se vislumbran como agentes importantes en los procesos de señalización a nivel intestinal. Cabe resaltar que al inicio de este trabajo las aportaciones en esta área eran aún muy escasas, por ello como objetivo de este proyecto nos propusimos demostrar la función de las vesículas de la microbiota como efectores relevantes en la señalización a nivel de epitelio intestinal.

Puesto que *Escherichia coli* se encuentra formando parte de la microbiota normal del intestino humano, en este trabajo, se han utilizado como modelo de estudio las vesículas de membrana externa (OMVs) secretadas por la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (EcN) y la cepa comensal ECOR12. Numerosos estudios realizados en la última década demuestran que las OMVs de patógenos Gram-negativos son internalizadas en la célula huésped a través de procesos de endocitosis. Sin embargo, el mecanismo de entrada para las vesículas derivadas de la microbiota era desconocido. Por ello, como primer objetivo nos planteamos establecer la vía de internalización de las OMVs de EcN y ECOR12 en varias líneas celulares de epitelio intestinal. El análisis mediante espectrofluorimetría y microscopía confocal de fluorescencia de células incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 en presencia de inhibidores específicos de las vías de endocitosis ha permitido establecer que las OMVs de estas cepas son internalizadas en las células epiteliales mediante endocitosis mediada por clatrina. La colocalización de las OMVs con clatrina y marcadores específicos de endosomas (proteína EEA-1) y lisosomas (Lysotracker) demuestra el tráfico intracelular típico de esta vía, siendo por tanto dirigidas hacia compartimentos lisosómicos.

Hemos demostrado que las OMVs de estas cepas no son citotóxicas puesto que no alteran la viabilidad celular si bien reducen la proliferación de células HT-29. El marcaje específico de aductos de 8-oxo-dG, una de las lesiones mayoritarias inducidas por estrés oxidativo en el DNA, reveló que, a diferencia de otras cepas de *E. coli*, las OMVs de EcN y ECOR12 no promueven este tipo de daño oxidativo. Sin embargo, el análisis por citometría de flujo y microscopía confocal de fluorescencia de la histona H2AX

fosforilada (γ H2AX) evidenció que OMVs de la cepa probiótica EcN producen una mayor cantidad de roturas de doble cadena en el DNA que las vesículas de la cepa comensal ECOR12. Cabe destacar que en el probiótico EcN estos efectos genotóxicos han sido atribuidos a la síntesis de colibactina, un péptido inmunomodulador cuya síntesis depende de actividades enzimáticas no ribosomales codificadas en la isla génica *pks*. Se desconoce cómo la colibactina se exporta y entrega a la célula huésped.

Las OMVs contienen múltiples componentes que actúan como ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones microbianos presentes en la célula huésped. Uno de estos componentes es el peptidoglicano (PGN) reconocido específicamente por los receptores citoplasmáticos tipo NOD. Puesto que la entrada de las OMVs por endocitosis y su acceso a endosomas constituyen una de las vías de entrada del PGN al interior celular, nos planteamos analizar la implicación de los receptores NOD-1/NOD-2 en la señalización mediada por las OMVs de EcN y ECOR12. Para ello seguimos dos aproximaciones. Por una parte se analizó la respuesta inflamatoria inducida por las OMVs en células Caco-2 silenciadas con siRNA específicos para estos receptores. El análisis por RT-qPCR y ELISA de las citoquinas IL-6 e IL-8 confirmó la implicación de NOD-1, pero no de NOD-2 en la señalización mediada por OMVs. Por otra parte, demostramos mediante microscopía de fluorescencia la interacción de NOD-1 con las OMVs, así como el reclutamiento de NOD-1 hacia los compartimentos endosomales en células epiteliales incubadas con OMVs. Se ha descrito que este paso es esencial para la activación de NOD-1 por su ligando específico.

Uno de los mayores inconvenientes para los estudios con OMVs, es el bajo rendimiento el cual requiere una gran cantidad de cultivo inicial que dificulta el proceso. Para aumentar el rendimiento se ha descrito el uso de mutantes en proteínas de la envoltura celular que presentan un fenotipo de hipervesiculación. En este trabajo hemos obtenido OMVs a partir del mutante *tolR* derivado de la cepa EcN. Su posterior análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) no reveló diferencias significativas en la morfología y tamaño de las vesículas generadas por este mutante en comparación con las de la cepa parental EcN, sin embargo, la aplicación de técnicas de TEM de alta resolución mostró una considerable heterogeneidad estructural en las muestras del mutante EcN *tolR*, que, además de las vesículas comunes, incluían otras estructuras atípicas. Los ensayos de internalización en células Caco-2 utilizando vesículas marcadas con rodamina B-R18 o DIO evidenciaron una menor tasa de internalización para las vesículas derivadas de EcN *tolR*, la cual correlacionaba con una menor capacidad de unión de las OMVs a la célula epitelial. Estos hallazgos que indican la heterogeneidad de OMVs del mutante *tolR* puede tener un impacto importante sobre la funcionalidad de las vesículas, lo que nos llevó a descartar su posterior utilización en estudios funcionales de las mismas.

ABREVIATURAS

8-oxo-dG	8-oxo-2'-deoxiguanosina
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AP-1	proteína activadora 1
B-R18	Rodamina isotiocianato B-R18
BSA	Albúmina de suero bovino
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas
CLR	Receptores tipo C-lectina
CME	Endocitosis mediada por clatrina
CPA	Células presentadores de antígenos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño tisular
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DIO	3,3-perclorato-octadecilo carbocianina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DSBs	Rotura de doble cadena del DNA
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
EEA-1	Antígeno endosomal específico 1
EHEC	<i>Escherchia coli enterohemorrágica</i>
EPEC	<i>Escherchia coli enteropatógena</i>
GALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa del tracto gastrointestinal
HPF-FS	Criofijación a alta presión y criosustitución
IKK	Complejo IκB quinasa
IL	Interleuquina
I-OMV	Vesículas de membrana interna y externa
IRAK	Quinasa-4 asociada al receptor de la interleuquina 1
IRF	Factor regulador del interferón
JAMs	Moléculas de adhesión de la unión
KD	KnockDown
LB	Medio de cultivo <i>Luria-Bertani</i>
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MS	Espectrometría de masas
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88
NACHT	Dominio de unión a nucleótidos

NEMO	Modulador esencial de NF- κ B
NF κ B	Factor de transcripción nuclear kappa B
NLR	Receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos
NOD-1	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 1
NOD-2	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2
O/N	<i>Over night</i>
OMVs	Vesículas de membrana externa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PGN	Peptidoglicano
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RIP2	Proteína serina-treonina quinasa de Interacción con receptores
RLR	Receptores tipo Gen-I inducible por ácido retinoico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida
TAK-1	Quinasa activada por factor de crecimiento transformante β
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TIR	Dominio del receptor <i>Toll</i> para la interleuquina
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR
TJs	Uniones estrechas
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i>
TNF α	Factores de necrosis tumoral alfa
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor del TNF α
TRAM	Molécula adaptadora de TIRF
TRIF	Inductor de INF β con un dominio TIR
UPEC	<i>Escherchia coli uropatógena</i>
WGA	Aglutinina de germen trigo
ZO	Zónula occludens

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. LA MICROBIOTA Y EL TRACTO GASTROINTESTINAL	3
1.1.1. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL	5
1.1.1.1. FUNCIÓN METABÓLICA.....	5
1.1.1.2. FUNCIÓN TRÓFICA.....	6
1.1.1.3. FUNCIÓN PROTECTORA	7
1.2. SISTEMAS DE PROTECCIÓN Y BARRERA DEL TRACTO INTESTINAL	7
1.2.1. LA CAPA DE MUCINA.....	8
1.2.2. LAS CÉLULAS EPITELIALES	10
1.2.3. EL SISTEMA INMUNE INTESTINAL	13
1.2.3.1. RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (PRRS) EN LA INMUNIDAD INNATA.....	15
1.3. PROBIÓTICOS.....	25
1.3.1. ESCHERICHIA COLI NISSLE 1917 (ECN)	27
1.3.1.1. MECANISMOS RESPONSABLES DE LOS EFECTOS PROBIÓTICOS DE LA CEPA ECN	28
1.4. COMUNICACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y EL EPITELIO INTESTINAL: VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS	30
1.4.1. BIOGÉNESIS DE LAS OMVS	31
1.4.2. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OMVS.....	33
1.4.3. FUNCIONES DE LAS OMVS.....	34

1.4.4. OMVS: RECONOCIMIENTO Y ENTRADA EN LA CELULA HUÉSPED	36
1.4.5. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR OMVs.....	39
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES.....	47
3.1. CEPAS BACTERIANAS.....	47
3.2. LÍNEAS CELULARES	47
3.3. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES.....	48
3.4. SOPORTE INFORMÁTICO	48
3.4.1. BASES DE DATOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS	48
4. MÉTODOS	53
4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	53
4.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	53
4.1.1.1 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	53
4.2. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....	54
4.2.1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	54
4.2.2. EXPANSIÓN DE CULTIVOS	55
4.2.3. RECUENTO DE CÉLULAS	55
4.2.4. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.....	56
4.3. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.....	56
4.3.1. OBSERVACIÓN DE VESÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	57
4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A OMVS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	58

4.4. MARCAJE DE OMVs	59
4.4.1. MARCAJE DE OMVs CON RODAMINA B-R18	59
4.4.2. MARCAJE DE OMVs CON BODIPY-FL	60
4.4.3. MARCAJE DE OMVs CON VYBRAN®DIO.....	60
4.5. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL.....	61
4.5.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA.....	61
4.5.2. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.....	61
4.6. ENSAYOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR	63
4.6.1. ENSAYO DE EXCLUSIÓN POR AZUL DE TRIPANO.....	63
4.6.2. ENSAYO DEL MTT	64
4.7. TECNICAS DE MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	64
4.7.1. LOCALIZACIÓN DE OMVs EN COMPARTIMENTOS CELULARES	65
4.7.2. DETECCIÓN DE 8-OXO-2'-DEOXIGUANOSINA (8-OXO-DG) EN EL DNA	67
4.7.3. DETERMINACIÓN DE LA HISTONA YH2AX	68
4.8. CITOMETRÍA DE FLUJO	68
4.8.1. EN ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs.....	68
4.8.2. EN LA INMUNODETECCIÓN DE LA HISTONA YH2AX.....	69
4.8.3. EN EL ANÁLISIS DE CICLO CELULAR.....	70
4.9. ENSAYO DEL COMETA	70
4.9.1. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES.....	71
4.9.2. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS.....	71
4.9.3. TEST DEL COMETA	71

4.9.4. ELECTROFORESIS	72
4.10. KNOCKDOWN DE NOD-1 Y NOD-2 EN CÉLULAS EUCARIOTAS MEDIANTE siRNA	72
4.11. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA	73
4.11.1. OBTENCIÓN DE RNA DE CÉLULAS EUCARIOTAS	73
4.11.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL RNA	74
4.11.3. PCR CUANTITATIVA.....	74
4.12. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	76
5. <u>RESULTADOS</u>	81
5.1. INTERNALIZACIÓN DE OMVS EN LÍNEAS CELULARES DE EPITELIO INTESTINAL... 81	81
5.1.1. LAS OMVs DE CEPAS PROBIÓTICAS Y COMENSALES DE <i>E. COLI</i> SON INTERNALIZADAS EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL HT-29	81
5.1.2. LAS OMVS DE EcN Y ECOR12 SON INTERNALIZADAS MEDIANTE ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA	84
5.1.3. INTERNALIZACION DE OMVs DE EcN Y ECOR12 EN LINEAS CELULARES DIFERENCIADAS.....	88
5.1.4. INTERNALIZACION DE OMVS DE OTRAS CEPAS DE E. COLI DE ORIGEN INTESTINAL....	90
5.1.5. LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 SON DIRIGIDAS A COMPARTIMIENTOS ENDO-LISOSOMALES.....	92
5.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y DE INTERNALIZACIÓN DE VESÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE MUTANTES <i>TOLR</i>	95
5.2.1. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS OMVs AISLADAS DE EcN <i>TOLR</i> EN CÉLULAS CACO-2	96
5.2.2. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LAS OMVS AISLADAS DE LA CEPA EcN Y DEL MUTANTE EcN <i>TOLR</i>	99

5.2.3. ANÁLISIS MEDIANTE CRYO-TEM DE LAS OMVs DERIVADAS DE EcN Y DE EcN TOLR.....	100
5.3. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL	102
5.3.1. ANÁLISIS SOBRE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACION CELULAR.....	102
5.4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL	106
5.4.1. LAS OMVs DE <i>E. COLI</i> NO GENERAN ESTRÉS OXIDATIVO	106
5.4.2. LAS OMVs DE ECN INDUCEN ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL DNA.....	107
5.5. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR POR OMVs DE EcN Y ECOR12: ACTIVACIÓN DE RECEPTORES INTRACELULARES NOD-1 Y NOD-2	110
5.5.1. COLOCALIZACIÓN DE LAS OMVs CON NOD-1	111
5.5.2. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTOR NOD-1 Y NOD-2 EN LA RESPUESTA INDUCIDA POR OMVs EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL	114
5.5.2.1. EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE NOD-1 Y NOD-2 EN LÍNEAS DE EPITELIO INTESTINAL.....	114
5.5.2.2. SILENCIAMIENTO DE NOD-1 O NOD-2 EN CÉLULAS EPITELIALES CACO-2.....	115
5.5.2.3. LAS OMVs DE ECN Y ECOR12 INDUCEN LA RESPUESTA DEPENDIENTE DE NOD-1.....	116
5.5.2.4. LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 NO SE VE AFECTADA EN CÉLULAS SILENCIADAS EN LA EXPRESIÓN DE NOD-2	118
6. <u>DISCUSIÓN</u>	123
6.1 ENDOCITOSIS MEDIADA POR CLATRINA: UN MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs DE E. COLI COMENSALES EN CÉLULAS EPITELIALES	123
6.2 LAS VESICULAS GENERADAS POR EL MUTANTE HIPERVESICULANTE ECN TOLR SON HETEROGENEAS Y MUESTRAN UNA REDUCIDA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN CON LAS CELULAS EPITELIALES.....	126

6.3 LAS OMVs DE LAS CEPAS EcN Y ECOR12 NO SON CITOTÓXICAS, PERO EJERCEN DIFERENTES EFECTOS GENOTOXICOS SOBRE LA CÉLULA HUÉSPED.....	129
6.4 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR VÍA NOD.....	131
6.5. APORTACIONES RELEVANTES DEL ESTUDIO	134
7. <u>CONCLUSIONES</u>	139
8. <u>REFERENCIAS.....</u>	143
9. <u>ANEXOS.....</u>	159
10. <u>PUBLICACIONES.....</u>	179

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TIPOS DE PRRS: CLASIFICACIÓN SEGÚN SU LOCALIZACIÓN Y LIGANDO ASOCIADO.....	18
TABLA 2. EFECTOS BENEFICIOSOS PARA LA SALUD DE ALGUNOS PROBIÓTICOS.....	27
TABLA 3. CEPAS DE <i>E. coli</i> UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	47
TABLA 4. COEFICIENTES DE COLOCALIZACIÓN DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 CON LA PROTEÍNA EEA-1 DE ENDOSOMAS Y CON EL MARCADOR DE LISOSOMAS (LYSOTRACKER).	94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 . DISTRIBUCIÓN DE LA MICROBIOTA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.....	4
FIGURA 2. ESPESOR Y COMPOSICIÓN DE LA CAPA DE MUCUS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATÓN	9
FIGURA 3. ORGANIZACIÓN DE LA CAPA DE MUCUS: INMUNOTINCIÓN DE COLON DE RATÓN.....	9
FIGURA 4. ESQUEMA DEL COMPLEJO DE UNIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES Y ENDOTELIALES.....	12
FIGURA 5. COMPOSICIÓN CELULAR DEL SISTEMA INMUNE Y EPITELIO INTESTINAL	14
FIGURA 6. DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LINFOCITOS T.	14
FIGURA 7. SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE PRRS.....	16
FIGURA 8. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS TLRs	21
FIGURA 9. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOD-1 Y NOD-2.....	24
FIGURA 10. EFECTOS PROBIÓTICOS DE <i>E. COLI</i> NISSLE 1917	30
FIGURA 11. MODELOS DE FORMACIÓN DE OMVs	32
FIGURA 12. FUNCIONES FISIOPATOLÓGICAS DE OMVs DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS).....	35
FIGURA 13. VÍAS DE ENTRADA DE OMVs DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS EN LA CÉLULA HUÉSPED.	36
FIGURA 14. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR OMVs	40
FIGURA 15. CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS HT-29.....	82
FIGURA 16. VISUALIZACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA	83
FIGURA 17. ANÁLISIS DE LA VÍA DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS HT-29.	85

FIGURA 18. ANÁLISIS DE LA VÍA DE INTERNALIZACIÓN DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA	86
FIGURA 19. COLOCALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 CON CLATRINA EN CÉLULAS HT-29.	87
FIGURA 20. MECANISMOS DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS DIFERENCIADAS.....	89
FIGURA 21. ANÁLISIS DE LA VÍA DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs DEL GRUPO B2 DE CEPAS COMENSALES DE <i>E. COLI</i> EN CÉLULAS HT-29.	91
FIGURA 22. COLOCALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 CON ENDOSOMAS.....	93
FIGURA 23. COLOCALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 CON LISOSOMAS	94
FIGURA 24. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.	96
FIGURA 25. INTERNALIZACIÓN Y MECANISMO DE ENTRADA DE LAS OMVs DE EcN Y DE EcN TOLR EN CÉLULAS EPITELIALES CACO-2	97
FIGURA 26. INTERNALIZACIÓN Y ASOCIACIÓN DE LAS OMVs DE ECN Y DE ECN TOLR EN CÉLULAS CACO-2	99
FIGURA 27. PERFIL PROTEICO DE LAS OMVs AISLADAS DE LAS CEPAS DE EcN Y EcN TOLR.	100
FIGURA 28. ANÁLISIS POR CRYO-TEM DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA AISLADAS DE LAS CEPAS DE EcN Y EcN TOLR.....	101
FIGURA 29. EFECTOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 SOBRE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HT-29	104
FIGURA 30. LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 INDUCEN UNA PARADA DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS HT-29	105
FIGURA 31. EFECTOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN LA FORMACIÓN DE ADUCTOS 8-OXO-DG EN CÉLULAS HT-29.....	107
FIGURA 32. EFECTOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN LA FORMACIÓN DE ROTURAS EN LA DOBLE CADENA DEL DNA (DSBs).	109

FIGURA 33. ANÁLISIS MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA DE LA FORMACIÓN DE LESIONES DSBs INDUCIDAS POR LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN EL DNA DE CÉLULAS HT-29.	110
FIGURA 34. COLOCALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y ECOR12 CON NOD-1 EN CÉLULAS HT-29	112
FIGURA 35. INTERACCIÓN DE EEA-1 Y NOD-1 EN CÉLULAS HT-29.	113
FIGURA 36. COLOCALIZACIÓN DE OMVs DE EcN Y NOD-1 EN CÉLULAS HT-29.....	114
FIGURA 37. EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE NOD-1 Y NOD-2 EN CÉLULAS EPITELIALES DE COLON HUMANO	115
FIGURA 38. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NOD-1 Y NOD-2 EN CÉLULAS EPITELIALES CACO-2 SILENCIADAS CON siRNAs.....	116
FIGURA 39. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE IL-6 E IL-8 EN RESPUESTA A LAS OMVs DE ECN Y ECOR-12 EN CÉLULAS CACO-2 SILENCIADAS EN LA EXPRESIÓN DE NOD-1	117
FIGURA 40. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE IL-6 E IL-8 EN RESPUESTA A LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS CACO-2 SILENCIADAS PARA NOD-1	118
FIGURA 41. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE IL-6 E IL-8 EN RESPUESTA A LAS OMVs DE ECN Y ECOR12 EN CÉLULAS CACO-2 SILENCIADAS PARA NOD-2	119
FIGURA 42. APORTACIONES RELEVANTES DEL ESTUDIO	135

1 INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA MICROBIOTA Y EL TRACTO GASTROINTESTINAL

El tracto gastrointestinal está formado por un conjunto de órganos, cuyas funciones principales son la ingesta y digestión de alimentos, la absorción de nutrientes, la retención de agua y electrolitos, y la secreción de sustancias que ejercen una acción protectora frente a microorganismos y a las agresiones del medio externo.

Si tuviéramos que resumir las dos principales funciones del tracto gastrointestinal serían nutrición y defensa. Dentro del mismo, el intestino delgado es el principal responsable de las funciones digestivas relacionadas con la absorción de nutrientes, donde la pared luminal está formada por pliegues y vellosidades que proporcionan aproximadamente una superficie total de absorción entre 200 y 300 m² (Helander and Fandriks, 2014). La superficie luminal de las vellosidades está recubierta por una capa de células epiteliales especializadas y enterocitos, que esta a su vez recubierta por una capa protectora de mucus formado por glicoproteínas, siendo esta la principal zona de interacción con antígenos, microorganismos y medio externo (Hammer *et al.*, 2015). Asimismo, el tracto gastrointestinal es un órgano endocrino que forma parte del sistema inmunológico, expuesto a elementos exógenos derivados de la alimentación y de microorganismos ingeridos por vía oral (Cheng *et al.*, 2010; von Rosenvinge *et al.*, 2013).

La microbiota se refiere a toda la población de microorganismos que colonizan un entorno en particular. El tracto gastrointestinal es el órgano más densamente colonizado, con una comunidad compleja y diversa de microorganismos que residen o pasan a través de él y que constituyen la microbiota intestinal. La colonización microbiana del tracto gastrointestinal se desarrolla en paralelo con la maduración del sistema inmune y juega un papel en la fisiología y la homeostasis intestinal. Por lo tanto, la microbiota materna forma el primer inóculo microbiano desde el nacimiento, y la diversidad microbiana aumenta y converge hacia una microbiota adulta al final de los primeros 3 a 5 años de vida, la cual una vez establecida es relativamente estable durante toda la vida (Rodríguez *et al.*, 2015). En el ser humano se ha estimado que la cantidad de células microbianas es aproximadamente 10 veces superior al número de células humanas y se sugiere que el genoma microbiano tiene entre 100-150 veces más genes de copia única que el genoma humano. La mayoría de estos microorganismos se localizan a lo largo del tracto digestivo (Hao and Lee, 2004; Guarner, 2011). La microbiota intestinal está compuesta por alrededor de 1000 especies microbianas diferentes, si bien un estudio reciente a gran escala estima que la microbiota del

4 INTRODUCCIÓN

intestino humano esta compuesta por más de 35000 especies bacterianas (Jandhyala *et al.*, 2015). Además, desde una perspectiva de genes bacterianos totales, el Proyecto Microbioma Humano y los estudios sobre el Metagenoma del Intestino Humano (MetaHIT) sugieren que podría haber más de 10 millones de genes no redundantes en el microbioma humano.

La microbiota intestinal no es homogénea, el número de células bacterianas aumenta en cantidad y complejidad a medida que se avanza en el tracto gastrointestinal. Así, el contenido en el estómago y el duodeno es de aproximadamente 10^1 a 10^3 bacterias por gramo, debido a la secreción de ácido gástrico que únicamente permite que se desarrollen especies resistentes a pH ácido, como *Streptococos*, *Lactobacilos* o *Helicobacter pilori*. En el yeyuno e íleon el contenido es de 10^4 a 10^7 bacterias por gramo, donde las especies más numerosas identificadas son de los grupos *Bifidobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* y *Fusubacteria*. En el colon el contenido es de 10^{11} a 10^{12} células por gramo (Figura 1A), ya que el transito es más lento, y esto facilita que los microorganismos proliferen fácilmente fermentando los sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas (Sekirov, Russell and Antunes, 2010; Guarner, 2011)

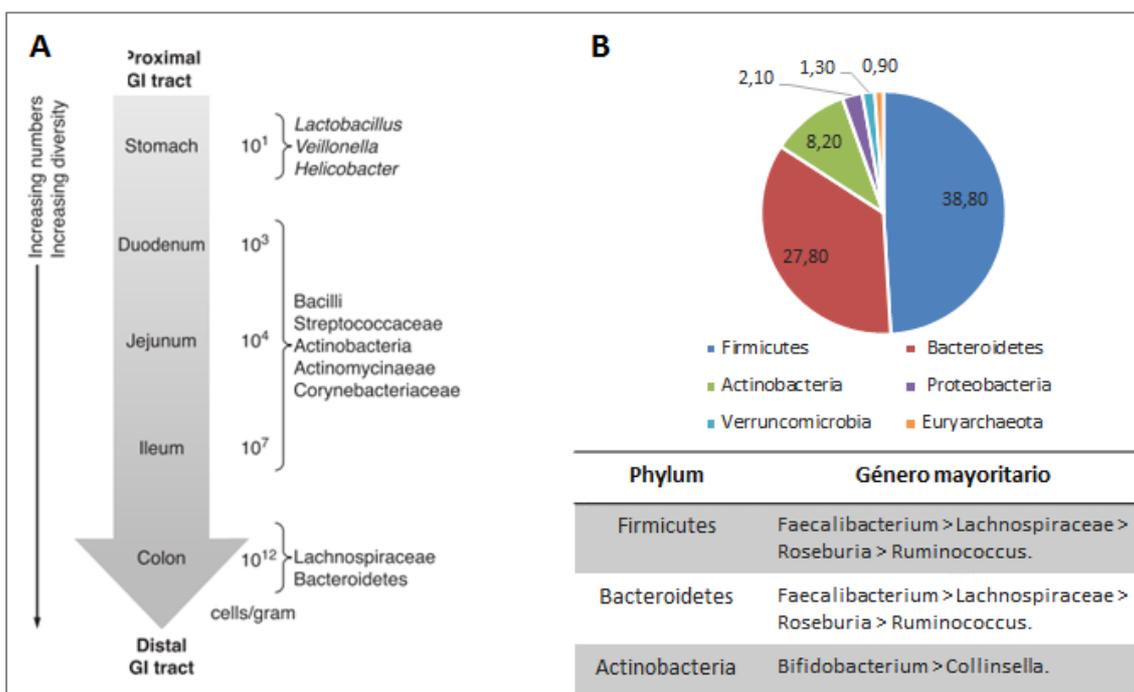


Figura 1 . Distribución de la microbiota en el tracto gastrointestinal. (A) Variaciones en el número de bacterias microbianas y composición del tracto gastrointestinal, expresado en unidades formadoras de colonia UCF/gr (Sekirov, Russell and Antunes, 2010). **(B)** Abundancia a nivel de *phylum* y género de la microbiota intestinal. (Arumugam *et al.*, 2011).

Los análisis metagenómicos que estudian la ecología microbiana y las complejas comunidades bacterianas en muestras fecales humanas, revela que a pesar de la diversidad en la población microbiana intestinal, la microbiota está representada casi en su totalidad por dos phyla: *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y en menor proporción por *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Euryarchaeota* (Arumugam *et al.*, 2011). Cada uno de estos phyla está representado en la microbiota intestinal por una serie de géneros bacterianos concretos (Figura 1B). Aunque la composición de la microbiota varía entre individuos, persisten estables un cierto número de géneros y especies bacterianas.

1.1.1. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL

Es importante destacar, que la microbiota intestinal se considera un órgano adicional del ser humano, perfectamente integrado en la fisiología del individuo, ya que el tracto gastrointestinal y la microbiota son interdependientes, y ambos son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, el rendimiento nutricional y el desarrollo corporal. La microbiota ejerce funciones nutricionales, metabólicas, tróficas y protectoras indispensables para el huésped, mientras que éste le aporta nutrientes y condiciones adecuadas para su crecimiento. De hecho, la presencia de la microbiota intestinal impacta fuertemente en la expresión de genes en la mucosa intestinal del huésped. Por ejemplo, la colonización de ratones axénicos (sin gérmenes) por *Bacteroides thetaiotaomicron* (un microorganismo común en la microbiota intestinal) induce la expresión de genes implicados en la defensa del organismo, la regulación de la función intestinal de barrera, la vascularización del epitelio y la digestión/absorción de nutrientes (Hooper, 2001).

1.1.1.1. Función Metabólica

El metabolismo de la microbiota intestinal constituye un enorme potencial enzimático y representa una parte importante de toda la actividad bioquímica del huésped, ayudando en los procesos de fermentación y degradación de residuos no digeribles provenientes de la dieta. Esta actividad, proporciona energía metabólica, así como nutrientes, utilizados tanto por los propios microorganismos como por el huésped. Durante la fermentación de carbohidratos se produce una disminución de pH y se generan metabolitos como ácidos grasos de cadenas corta (AGCC). La mayor parte de los AGCC producidos en el colon se absorben en la mucosa, constituyendo la principal fuente energética de las células del epitelio intestinal. La capacidad metabólica de estos

microorganismos también incluye la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea, favoreciendo de esta manera la eliminación de estas sustancias.

Otra función metabólica importante de los microorganismos es sintetizar vitaminas (vitamina K, biotina, ácido fólico y pantoténico) y facilitar la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro, que son imprescindibles para las funciones fisiológicas del huésped. (O'Hara and Shanahan, 2006; Guarner and Malagelada, 2003).

La actividad metabólica de la microbiota intestinal genera también algunas sustancias potencialmente dañinas para el organismo. Así, el metabolismo intestinal anaeróbico de péptidos y proteínas genera una serie de sustancias tóxicas como amoníaco, aminas, fenoles, tioles e indoles (Morales, Brignardello and Gotteland, 2010).

1.1.1.2. Función Trófica

La principal función de los AGCC generados durante el metabolismo de carbohidratos es la regulación de procesos mecánicos y de la proliferación y diferenciación epitelial. En el epitelio intestinal estos AGCC están implicados en la producción de nuevas células a partir de células de la cripta. Esta función se ha observado en estudios realizados en ratas libres de gérmenes las cuales producen un bajo número de células epiteliales, sugiriendo que la síntesis bacteriana de ácidos grasos ayuda a la proliferación del tejido. Además, productos del metabolismo bacteriano, como el butirato, promueven la reversión de células neoplásicas a fenotipos no neoplásicos ya que inhiben la proliferación celular y no estimulan la diferenciación de células neoplásicas *in vitro*. El rol de los AGCC es proteger a los tejidos en estados patológicos como la colitis ulcerosa crónica, o la carcinogénesis entre otros (Guarner and Malagelada, 2003).

Por otra parte, la microbiota es esencial para el desarrollo del sistema inmune, la correcta discriminación por parte del huésped entre microorganismos comensales y patógenos, y la activación de una respuesta inmune controlada para mantener un estado de inmunotolerancia frente a bacterias comensales. El epitelio posee una primera línea celular de acción mediada por los enterocitos a través de receptores del tipo "*Toll-like receptors*" (TLR) a nivel extracelular y de "*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Receptor*" (NLR) a nivel intracelular, los cuales conducen a la activación de factores de transcripción (NF- κ B, JNK y MAPKs). Estos factores estimulan la secreción de citoquinas y quimioquinas que actuarán como sensores generando la respuesta innata y adaptativa (O'Hara and Shanahan, 2006; Guarner, 2011).

1.1.1.3. Función Protectora

Una de las funciones más relevantes de las bacterias comensales es la regulación y estabilización del ecosistema, tanto a nivel intestinal como en el resto de las mucosas, evitando la colonización por parte de otros microorganismos patógenos. Existe un fenómeno de competición entre los microorganismos ya instaurados y los microorganismos patógenos, no sólo por el espacio que ocupan sino también por los nutrientes disponibles. Además, la microbiota da lugar a condiciones de pH y estimulación del epitelio intestinal que conducen a la síntesis y liberación de proteínas antibacterianas que dificultan la colonización por otros microorganismos patógenos. Estas proteínas pertenecen a diversas familias, entre las que se incluyen defensinas, catelicidinas y lectinas tipo C. Muchas de ellas 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.

La influencia de la microbiota en el desarrollo del sistema inmunitario es objeto de un gran número de estudios. 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 las enfermedades inflamatorias intestinales (colitis y enfermedad de Crohn), así como en enfermedades extra-intestinales como son la obesidad, las alergias o las enfermedades autoinmunes (Scaldaferri *et al.*, 2013).

1.2. SISTEMAS DE PROTECCIÓN Y BARRERA DEL TRACTO INTESTINAL

El tracto gastrointestinal, que es la mayor superficie en contacto continuo con el medio externo, cuenta con distintos mecanismos que previenen la entrada de compuestos o agentes potencialmente lesivos para el organismo. Para este cometido, la primera línea de defensa se encuentra en el propio lumen, donde microorganismos y antígenos son degradados por acción de las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares. A su vez, la microbiota comensal del lumen, por competición u otros mecanismos, contribuye a reducir la colonización por parte de agentes patógenos. Además, para evitar el contacto

directo de la microbiota y el epitelio intestinal, entre el lumen y el epitelio se encuentra una capa de mucus que contiene moléculas con capacidad defensiva. Esta capa de mucus y las uniones estrechas que mantienen unidos a los enterocitos forman una barrera física y modulan el paso bidireccional, selectivo y constante entre ambos compartimentos (Keita and Söderholm, 2010; Camillieri *et al.*, 2012).

1.2.1. LA CAPA DE MUCINA

Como se ha comentado, el lumen y el epitelio del tracto gastrointestinal son dos compartimentos que están separados por una capa de mucus. El mucus intestinal es un agregado altamente hidratado, que sirve como primera línea de la defensa innata del huésped contra agentes irritantes endógenos y exógenos, así como frente a la invasión bacteriana, sin interferir en las interacciones específicas necesarias que se dan normalmente entre los microorganismos comensales, o entre éstos y el propio huésped. De hecho se ha comprobado que si la superficie de la mucosa está dañada, las bacterias comensales pueden actuar como patógenos oportunistas (Kim and Khan 2013)

Las mucinas actúan como el principal componente estructural de la capa de mucus intestinal y son secretadas principalmente por células caliciformes que se dispersan a lo largo de la capa epitelial (*goblet cells*). Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que consisten en cadenas de oligosacáridos lineales o ramificados enlazados por O-glicanos que se unen al agua y dan propiedades similares a un gel de mucus. Estos dominios de mucina son ricos en prolina, treonina y serina (llamados dominios PTS) y forman una varilla extendida, rígida y voluminosa con un núcleo de proteína central. Los O-glicanos terminales, constituyen una superficie tridimensional que puede interactuar con células o microorganismos (Johansson and Hansson, 2016).

El proceso de ensamblaje de la capa de mucus comienza una vez que la mucina es secretada por las células caliciformes, al ser hidratada y expandida formando una estructura organizada visco-elástica. Dicha estructura presenta un gradiente de espesor que va desde 700 μm en el estómago hasta 150-300 μm en el intestino. En el intestino delgado forma una capa de mucus simple, fácilmente desprendible y en el colon forma una doble capa, con la capa interna firmemente unida al epitelio (Figura 2). En el intestino delgado la capa de mucus es penetrable, pero las bacterias se mantienen alejadas del epitelio por mediadores antibacterianos. En el intestino grueso, la capa de mucus interior es impenetrable, mientras que la capa externa de mucus se expande y sirve como hábitat para las bacterias (Figura 2) (Johansson and Hansson, 2016). Se ha descrito que la capa interna tiene un espesor de 50 μm en ratones y de 100 μm en ratas, y que está altamente condensada. En humanos se cree que el espesor de esta capa

interna es mayor pero aún no se ha determinado con exactitud (Johansson, Larsson and Hansson, 2011).

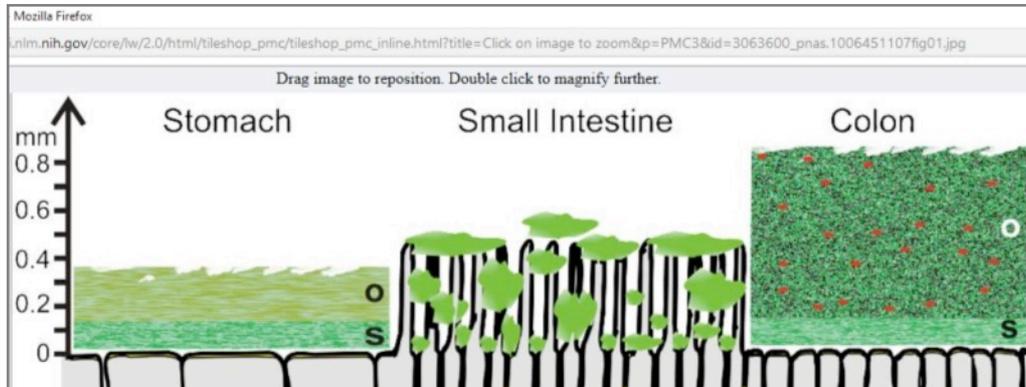


Figura 2. Espesor y composición de la capa de mucus del tracto gastrointestinal de ratón (Johansson, Larsson and Hansson, 2011).

Mediante la utilización de anticuerpos anti-mucina y técnicas de tinción del RNA ribosomal bacteriano 16S con rRNA FISH se ha podido visualizar claramente las diferencias en la composición de la capa de mucus, tal como se observa, a modo ilustrativo, en la figura 3 (Johansson *et al.*, 2008)

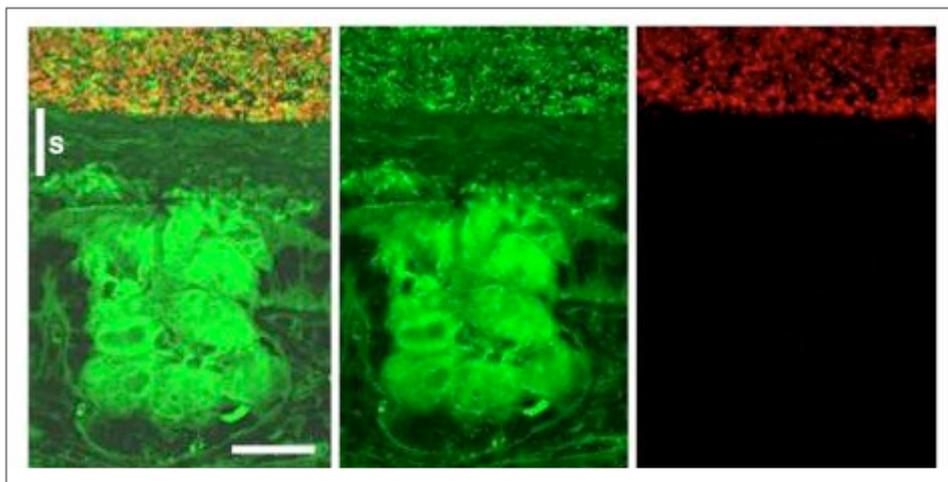


Figura 3. Organización de la capa de mucus: Inmunotinción de colon de ratón. El anticuerpo anti-MUC2 marca en verde la presencia de mucina en las células caliciformes y sobre ellas la estructuración de mucina en capa interna y capa externa. La presencia de bacterias esta marcada con FISH utilizando la sonda bacteriana general EUB338-Alexa Fluor 555 en color rojo. Las bacterias se pueden observar sobre la capa externa de mucina (Johansson *et al.*, 2008).

Los nombres de las mucinas específicas son confusos y no están relacionados con su estructura y función. Sin embargo, dos tipos principales de mucinas pueden distinguirse

funcionalmente: mucinas transmembrana y mucinas formadoras de gel. Las *mucinas transmembrana* son de clase 1 y tienen un solo dominio de unión a membrana, que puede estar implicado en la señalización intracelular. En el tracto intestinal, las mucinas transmembrana MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 y MUC17 se expresan constitutivamente, mientras que MUC1 y MUC16 son inhibidas en respuesta a la infección y al cáncer. Las *mucinas formadoras de gel* se secretan a partir de células caliciformes y conforman el esqueleto de la capa de mucus. Estas mucinas tienen regiones N- y C-terminales ricas en cisteína que median la oligomerización. En el intestino, la principal mucina de formación de gel es MUC2. Sin embargo, MUC6 se expresa en el estómago y en el duodeno; y se pueden encontrar bajos niveles de MUC5B en el colon humano. MUC5AC sólo se encuentra normalmente en la superficie del estómago, pero se puede inducir su expresión en el intestino en procesos infecciosos (Chul Kim, 2012; McDermott and Huffnagle, 2014; Johansson and Hansson, 2016)

1.2.2. LAS CÉLULAS EPITELIALES

La organización del epitelio está adaptada para satisfacer las necesidades funcionales específicas de las diferentes regiones del tracto intestinal. Bajo la capa de mucus se localiza el epitelio intestinal, donde la mucosa presenta un conjunto de evaginaciones e invaginaciones denominadas respectivamente vellosidades y criptas. El epitelio intestinal es una sola capa de células epiteliales columnares que separa el lumen intestinal de la lámina propia subyacente y está formado por diferentes tipos celulares que derivan de células madre intestinales localizadas a nivel de las criptas y permiten la renovación constante cada 4-7 días durante toda la vida (Figura 4). Estas células madre se especializan en la renovación celular y secreciones endo-, para- y exocrinas.

Las células más abundantes son los enterocitos, cuyas funciones principales son la absorción de nutrientes y agua, la secreción hidroelectrolítica y la función de barrera. Situadas entre los enterocitos se encuentran las células caliciformes (*goblet cells*), responsables de la producción y secreción de mucus que contribuyen a la lubricación y protección de la mucosa intestinal. Localizadas a nivel de las criptas, las células de *Paneth* llevan a cabo funciones de defensa, mediante la secreción de péptidos y enzimas antimicrobianas y participan en la inflamación intestinal. Otras células epiteliales son las células M que participan en la presentación de antígenos y están asociadas a las placas de Peyer (Kim and Khan 2013). Por último, dispersas entre todas estas células, se pueden encontrar células enteroendocrinas, que producen y secretan diferentes hormonas y neuropéptidos.

Una característica de las células epiteliales es que en su superficie se localizan numerosos receptores de membrana denominados TLR y receptores intracelulares como NOD-1 y NOD-2 (McDermott and Huffnagle, 2014). Todos estos receptores activan vías específicas de señalización que inducen la expresión de genes inflamatorios, citoquinas, proteínas inmuno-reguladoras, moléculas de adhesión, proteínas asociadas a estrés, así como también otros mediadores celulares como células T, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK), que en conjunto facilitan la eliminación de patógenos (Sanz and De Palma, 2009).

Por otra parte, estas células epiteliales están estrechamente unidas entre sí por complejos intercelulares de unión que regulan la permeabilidad paracelular y son cruciales para la integridad de la barrera epitelial. Los complejos de unión se componen de uniones estrechas (*tight junctions*, *TJs*), uniones adherentes y los desmosomas. Las uniones adherentes están situadas por debajo de la TJs y están involucradas en la adhesión celular y la señalización intercelular. Tanto las TJs como las uniones adherentes están asociadas al citoesqueleto de actina (Figura 4). Los desmosomas están implicados en la adhesión célula-célula y en la comunicación intracelular.

En particular, el estudio de la estructura y regulación de las *TJs* ha suscitado un gran interés. Estructuralmente se han identificado más de 50 proteínas, donde se incluyen una serie de proteínas transmembrana. Estas proteínas forman fibrillas que atraviesan la membrana plasmática e interactúan con proteínas en las células adyacentes mediando la adhesión célula-célula y sellando el espacio paracelular entre las células epiteliales. Las proteínas transmembrana se dividen en dos grupos: proteínas con cuatro dominios transmembrana o con un dominio transmembrana. Las proteínas con cuatro dominios transmembrana son la ocludina, la familia de las claudinas y la tricelulina. Las proteínas con un dominio transmembrana son en su mayoría moléculas de adhesión de la unión (*junctional adhesion molecules*, *JAMs*) (Figura 4). También se ha observado que estas proteínas se encuentran asociadas o interaccionan mediante su extremo carboxi-terminal con macromoléculas del complejo de oclusión (*zonula occludens*) tales como ZO-1, ZO-2, ZO-3, AF-6/afadina, cingulina, antígeno 7H6 y actúan como acopladores a proteínas del citoesqueleto de los enterocitos, concretamente a los microtubulos, filamentos intermedios y microfilamentos (Assimakopoulos, Papageorgiou and Charonis, 2011; Shen *et al.*, 2011; Zihni *et al.*, 2016). Diversos estudios han permitido discernir que las uniones intercelulares no son estáticas, sino que están sujetas a una regulación constante tanto a estímulos intracelulares como extracelulares. Dichos estímulos son capaces de regular la permeabilidad paracelular modificando la expresión de los componentes de las TJs o su interacción con el citoesqueleto (Shen *et al.* 2011; F. Wang *et al.* 2006; Zihni *et al.* 2016).

En las células endoteliales, las TJs y los complejos de uniones adherentes están compuestos por proteínas transmembrana del tipo caderinas endoteliales vasculares (VE-caderinas) y nectinas. Las proteínas α - y β -catenina constituyen la E-caderina mientras que la proteína AF6 forma parte de las nectinas (Figura 4). La E-caderina juega un papel fundamental en la integridad del endotelio y en el control de la permeabilidad vascular. En conjunto, estas uniones dan lugar a una fuerte interacción célula-célula implicadas en permeabilidad endotelial, la modulación del transporte hidroelectrolítico intestinal y en la polarización de las células (Huang *et al.*, 2014; Zihni *et al.*, 2016).

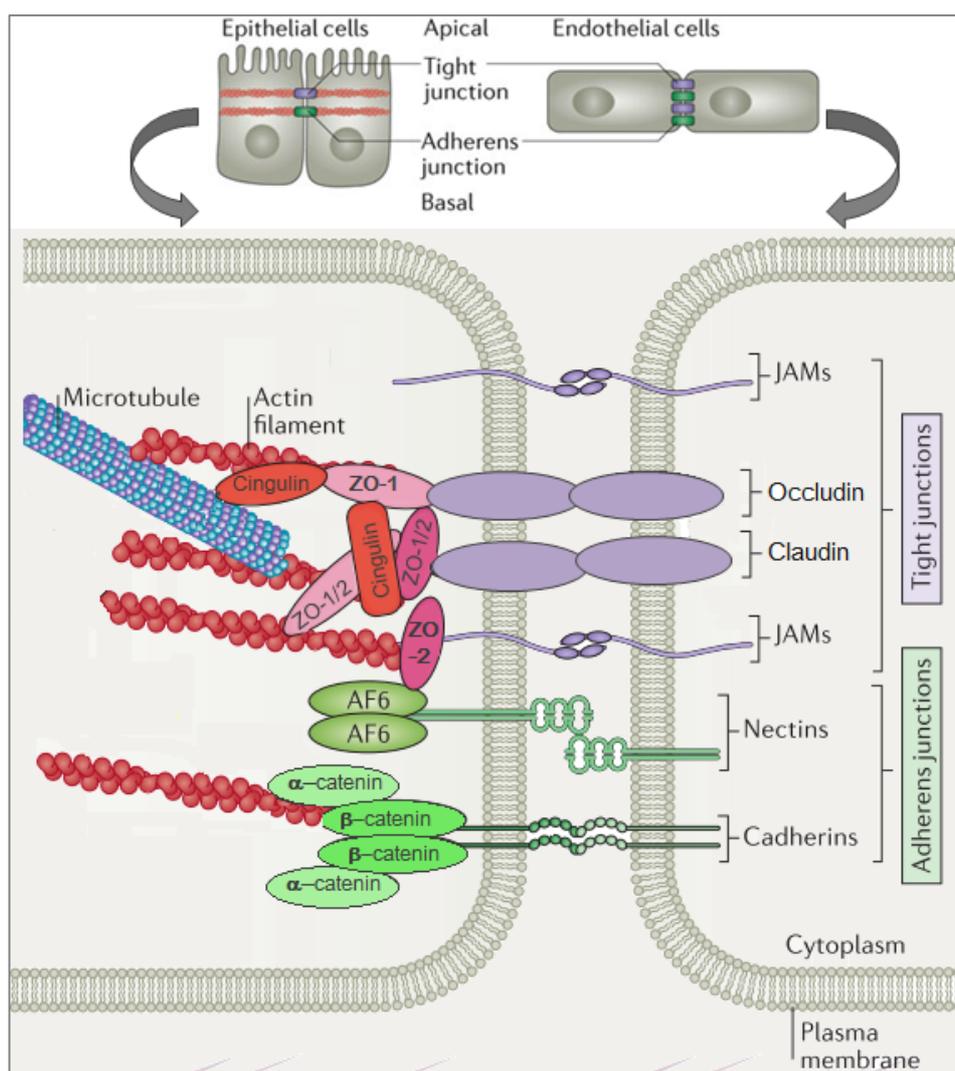


Figura 4. Esquema del complejo de unión en células epiteliales y endoteliales. Las uniones estrechas (*Tight junctions*, TJs) se localizan apicalmente en células epiteliales polarizadas y, a menudo, se entremezclan con las uniones adherentes (*Adherens junctions*) en células endoteliales. Las proteínas transmembrana como ocludina, claudinas, JAM, caderinas y nectinas sellan el espacio paracelular entre las células adyacentes mediante la interacción con proteínas adaptadores (familia ZO, AF6, α - y β -

catenina) que conectan las proteínas transmembrana con los filamentos de actina. Imagen adaptada (Zihni *et al.*, 2016).

1.2.3. EL SISTEMA INMUNE INTESTINAL

El tejido linfoide asociado a la mucosa del tracto gastrointestinal (*Gut Associated Lymphoid Tissue*, GALT) convierte a éste en el mayor sistema inmune del organismo, al contener la mayor fuente de células inmunocompetentes (Ramiro-Puig *et al.*, 2008). Las células epiteliales son las encargadas de iniciar la estimulación de células especializadas del sistema inmune presentes en la lámina propia (GALT) (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- α , IL-8, MCP-1, etc).

Anatómicamente el GALT se divide en dos compartimientos: A) *GALT organizado*, 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*, efector de la respuesta inmunitaria, 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 formadas por agregados linfoides y están separadas del lumen por una monocapa formada por los diferentes tipos de células epiteliales. Bajo esta capa epitelial se encuentran también células dendríticas y macrófagos. En las zonas interfoliculares se localizan linfocitos T, principalmente del tipo colaboradores o *helper* (Th). Inmersos en las placas de Peyer se hallan 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 predominan en el intestino grueso (Figura 5); (Laparra and Sanz, 2010; McDermott and Huffnagle, 2014).

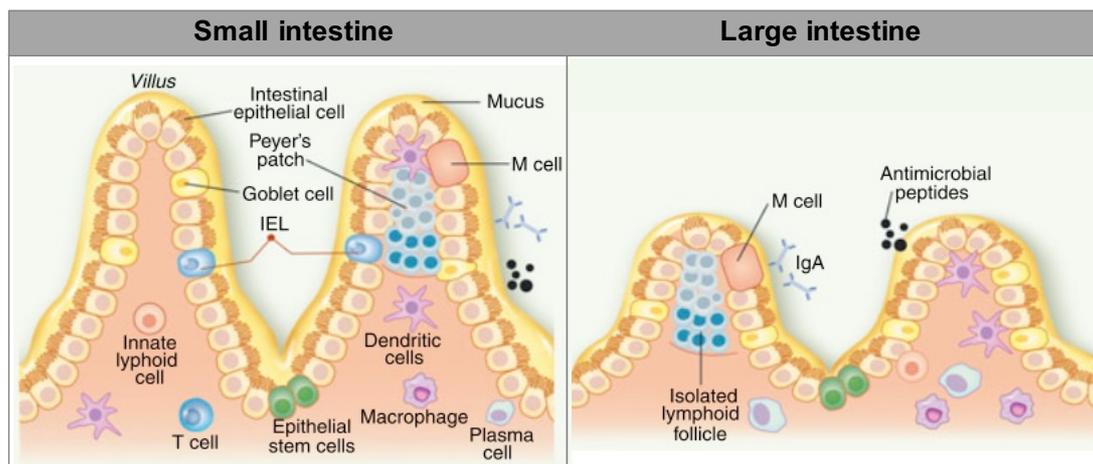


Figura 5. Composición celular del sistema inmune y epitelio Intestinal. (A) Estructura del intestino delgado con predominio de células T y placas de Peyer. (B) Estructura del intestino grueso con predominio de células B, productoras de Ig (McDermott and Huffnagle, 2014).

Los antígenos luminales pueden ser captados por las células M, las cuales 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. Una vez activados los linfocitos Th vírgenes, se diferenciarán en dos subpoblaciones según el estímulo recibido: linfocitos T efectores, en concreto linfocitos T *helper* 1, 2 y 17 y linfocitos T reguladores (TR1 y Th3) (Figura 6).

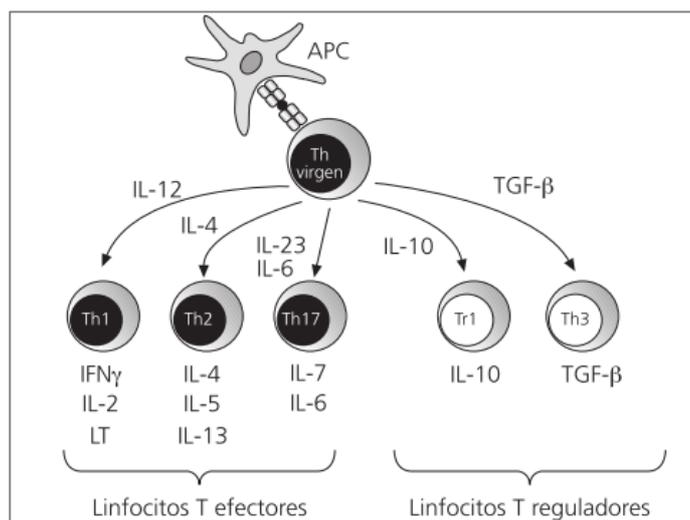


Figura 6. Diferenciación celular de linfocitos T. Diferenciación según el estímulo antigénico expuesto por las células presentadoras de antígeno y citoquinas expresadas por cada línea celular. Ramiro-Puig et al. (2008).

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 las otras. La función de Th17 parece estar implicada en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas que no están totalmente protegidas por la respuesta Th1 y Th2. En cuanto a los linfocitos T reguladores, TR1 y Th3, éstos son importantes para regular la respuesta inmunitaria durante procesos inflamatorios e infecciosos. Además, contribuyen al desarrollo de tolerancia oral frente a antígenos inoocuos procedentes de la dieta y de la microbiota. Citoquinas como IL-4, IL-5 y TGF- β inducen también la síntesis de IgA en linfocitos B presentes en los folículos de las placas de Peyer (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

1.2.3.1. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en la inmunidad innata

La función esencial del sistema inmune es proteger al huésped contra agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. En este contexto, es esencial la capacidad de las células de la mucosa intestinal de discriminar entre bacterias patógenas y comensales. De hecho, la respuesta a la microbiota simbiótica se ha descrito como un proceso de tolerancia que abarca una compleja integración de reconocimiento microbiano y una muy buena regulación de la respuesta inmunitaria. Para ello, las células inmunes y epiteliales presentes en la mucosa intestinal cuentan con dos tipos de defensa: la innata y la adaptativa. El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección en el momento más temprano después de la exposición a diferentes patógenos o daños celulares. Este sistema de defensa incluye los componentes celulares entre los que se encuentran las células epiteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK, además de componentes del sistema del complemento, y de una gran variedad de citoquinas y moléculas solubles. Estas células reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), que incluyen componentes de la pared celular bacteriana como el lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano (PGN), ácidos teicoicos y otros componentes de hongos, levaduras y protozoos. También reconocen señales endógenas asociadas al daño tisular (*Damage associated molecular patterns*, DAMPs) producidos por las células en respuesta a traumatismos, isquemia y daño tisular, ya sea en ausencia o presencia de infección por patógenos (Liu *et al.*, 2001; Núñez, 2011; Tang *et al.*, 2012). El sistema inmune innato es capaz de responder frente a este tipo de señales de peligro y daño tras ser detectadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Figura 7).

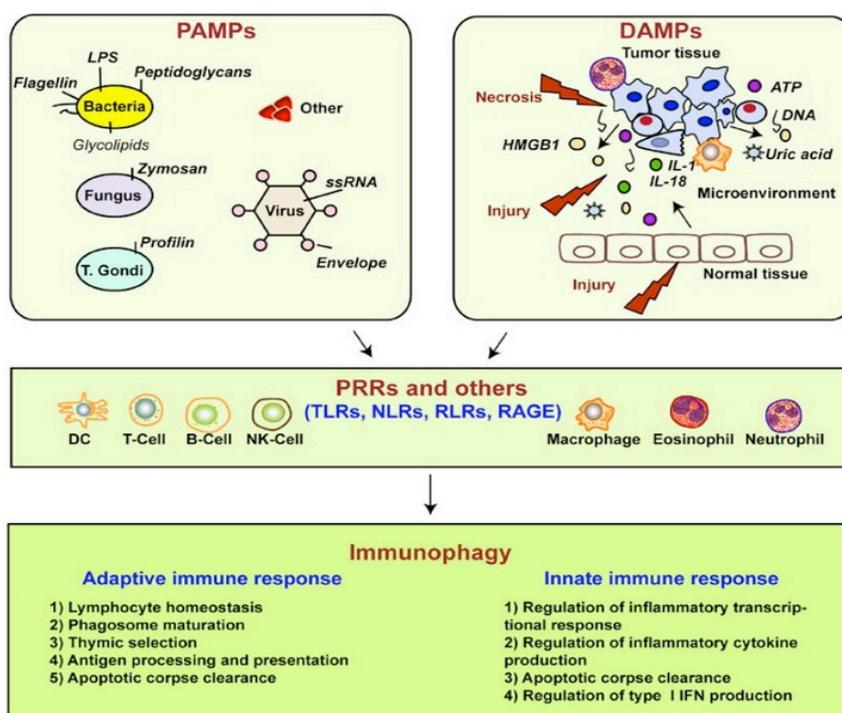


Figura 7. Señalización a través de PRRs. Las células del huésped reconocen las llamadas señales de peligro con inducción inmediata de una respuesta inmune innata y seguidamente, de una respuesta adaptativa. Los patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPs*) o los patrones moleculares asociados al daño (*DAMPs*) sirven como primera señal induciendo la respuesta inmune emergente mediante la liberación de péptidos, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, moléculas coestimuladoras y señales endógenas que se unen a receptores específicos y generan la expresión de citoquinas y la regulación de procesos inflamatorios, conduciendo a moléculas especializadas que promueven la inmunidad adaptativa (Tang *et al.*, 2012).

El sistema innato se completa con la respuesta a través del sistema inmune adaptativo que genera una respuesta antígeno-específica y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno. La respuesta adaptativa es mediada por componentes celulares de los linfocitos T y B y por componentes de tipo humoral como los anticuerpos. Las células presentadoras de antígenos (CPA), y en especial las células dendríticas y macrófagos, juegan un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, en el contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie. En consecuencia, el sistema inmune innato además de tener como función el reconocimiento de patógenos, estimula y polariza la respuesta adaptativa con objeto de optimizar la eliminación del patógeno y minimizar los daños tisulares colaterales (Akira, Uematsu and Takeuchi, 2006; Salzman, 2011; Perez-Lopez *et al.*, 2016).

Los PRRs incluyen 4 familias de proteínas que se clasifican de acuerdo con su función, localización y especificidad de ligando (ver Tabla 1):

- Receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*, TLR): receptores transmembrana presentes tanto en la membrana celular externa como en la membrana de vesículas citoplasmáticas.
- Receptores tipo Dominio de Oligomerización de Nucleótidos (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Receptor*, NLR): receptores citoplasmáticos que pueden desencadenar la producción de citoquinas proinflamatorias.
- Receptores tipo C-lectina (*C-type Lectin Receptor*, CLR): receptores de membrana que se pueden agrupar como una familia de receptores que reconocen carbohidratos. Entre ellos se encuentra la manosa, presente normalmente en los virus, micobacterias y hongos, mientras que la fucosa es común en bacterias y parásitos (helmintos), y los glucanos están presentes en micobacterias y hongos.
- Receptores tipo Gen-I Inducible por Ácido Retinoico (*Retinoic Acid-Inducible Gene I-like Receptor*, RLR): Son helicasas de RNA que reconocen el RNA de virus que se ha liberado al citoplasma y activan programas de genes de señalización antiviral.

A continuación, se explicará más en detalle los receptores TLR y los NLR.

- **Receptores de tipo Toll: características y funciones**

La familia TLRs es una de las familias de los PRRs mejor caracterizadas. Hasta el momento, se han identificado 10 TLRs en humanos y 12 en ratones. Son glicoproteínas localizadas tanto a nivel extracelular (membrana plasmática) como intracelular (membranas del retículo endoplasmático y compartimentos endosomales-lisosomales) siendo responsables de detectar patógenos invasores. La localización subcelular de los TLRs depende del tipo de PAMP que reconocen. Así pues, los *receptores presentes en la membrana celular* (TLR1, 2, 4, 5 y 6), son los encargados de responder a todos aquellos PAMP asociados a la superficie bacteriana, que desencadenan la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. En cambio, los *receptores presentes en las membranas intracelulares* (TLR3, 7, 8, 9 y 10) son los encargados de detectar ácidos nucleicos de virus y bacterias que inducirán la activación del factor de transcripción IRF (*Interferón Regulatory Factor*) y la consecuente activación de genes relacionados con el interferón (IFN) de tipo I (Akira, Uematsu and Takeuchi, 2006; Rompikuntal *et al.*, 2012).

18 INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Tipos de PRRs. Clasificación según su localización y ligando asociado. (Juárez Carvajal *et al.*, 2009; Takeuchi and Akira, 2010)

PRRs y sus ligandos			
PRRs	Localización	Ligando	Origen del Ligando
TLR			
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteína triacil	Bacterias
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacterias, virus, parásitos, humano
TLR3	Endolisosoma	dsRNA	Virus
TLR4	Membrana plasmática	LPS	Bacterias virus, humano
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteína diacil	Bacterias, virus
TLR7 (Humano TLR8)	Endolisosoma	ssRNA	Bacterias, virus, humano
TLR9	Endolisosoma	CpG-DNA	Bacterias, virus, protozoos, humano
TLR10	Endolisosoma	Desconocido	Desconocido
TLR11	Membrana plasmática	Molécula parecida a Profilina	Protozoos
NLR			
NOD1	Citoplasma	m-DAP *	Bacterias
NOD2	Citoplasma	MDP *	Bacterias
CLR			
Dectina-1 y 2	Membrana plasmática	B-glucano, zimozan	Hongos, bacterias
MR	Membrana plasmática	Manosa, fucosa, N-acetil-glucosamina	Bacterias
NINCLE	Membrana plasmática	SAP130	Hongos, humano
RLR			
RIG-1	Citoplasma	dsRNA (corto)	RNA virus, DNA virus
MDA5	Citoplasma	dsRNA (largo)	RNA virus (picornaviridae)
LGP2	Citoplasma	Desconocido	RNA virus

* m-DAP: ácido meso-diaminopimélico; MDP: ácido muramil dipéptido

En conjunto, los diferentes miembros de receptores son capaces de reconocer múltiples antígenos (LPS, PGN, lípidos) presentes en una gran variedad de microorganismos (bacterias, virus, hongos), así como moléculas propias del organismo (fibronectina) o compuestos sintéticos (taxol). Además, pueden incrementar la especificidad de reconocimiento formando heterodímeros mediante la interacción de TLR2 con TLR1, TLR6 y TLR10 (Takeuchi and Akira, 2010; Manavalan, Basith and Choi, 2011).

Estructuralmente, los TLRs se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular seguido por una hélice transmembrana simple y un dominio intracelular denominado TIR. El dominio extracelular, es esencial para el reconocimiento de patrones moleculares, contiene múltiples bloques de repeticiones ricas en leucina (LRR) plegados

en forma de herradura y protegidos por regiones ricas en cisteínas que forman una caperuza en los extremos N y C-terminales.

El receptor TLR4 expresado en la superficie celular de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, endoteliales y epiteliales, fue el primer miembro de la familia de los TLRs identificado y el mejor caracterizado hasta la fecha. El TLR4 participa en el reconocimiento y respuesta frente a bacterias Gram negativas y promueve la colonización del colon. Su principal función es el reconocimiento del LPS, un factor de virulencia e inmunopotenciador que está presente en la pared celular de bacterias Gram negativas. También se ha descrito que TLR4 es capaz de reconocer otros componentes microbianos como proteínas de fusión y de la cápsula en algunos tipos de virus. A diferencia de otros TLRs, el TLR4 es incapaz de reconocer por sí solo su ligando, requiriendo la formación de un complejo de reconocimiento para poder llevar a cabo esta función. Este complejo incluye dos proteínas accesorias: CD14 (cluster de diferenciación 14) y LBP (proteína de unión al lipopolisacárido), además de la proteína de señalización MD-2 (proteína de diferenciación mieloide 2). La función de estas moléculas consiste en presentar el LPS bacteriano a MD-2, que a su vez se une al TLR4. Los mecanismos moleculares bajo los cuales el LPS es transferido desde CD14 a MD-2 no han sido completamente caracterizados. En cambio, se conoce bien que MD-2 es una molécula imprescindible en la respuesta frente al LPS bacteriano, ya que su ausencia dentro del complejo implica la falta de reconocimiento de este ligando por parte del TLR4 (Takeuchi and Akira, 2010; Perez-Lopez *et al.*, 2016).

Entre los TLRs extracelulares está TLR5. Este es el receptor para la flagelina bacteriana y tiene un papel importante en la respuesta del huésped a patógenos invasivos. En el intestino, TLR5 se expresa en la lámina propia y en la región basolateral del epitelio, lo que hace que su función dependa de la vía de infección. La flagelina es reconocida por el huésped sólo cuando las bacterias han invadido la célula a través del epitelio (Trejo-de la O, Hernández-Sancén and Maldonado-Bernal, 2014).

En cuanto a los receptores TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se sabe que están estrechamente relacionados debido a su ubicación intracelular y a su capacidad para reconocer ácidos nucleicos de origen microbiano. TLR7 (de ratón) y TLR8 (en humanos) reconocen los mismos ligandos y requieren de la maduración endosomal/lisosomal para su activación (Trejo-de la O, Hernández-Sancén and Maldonado-Bernal, 2014).

Vías de señalización de los TLRs

Gracias a la caracterización genética y bioquímica de las vías de señalización mediadas a través de los TLRs, se han logrado identificar la mayoría de sus componentes y describir como se coordina el inicio de las señales intracelulares entre los distintos receptores. Fundamentalmente los mecanismos de señalización se basan en fosforilaciones y reclutamientos de moléculas que culminan con la síntesis de proteínas de carácter proinflamatorio que puedan combatir y erradicar la infección.

La unión de los TLR con sus correspondientes ligandos desencadena en el citoplasma la unión del dominio TIR con diferentes adaptadores. Estos adaptadores son: la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88); la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP) que une MYD88 con TLR2 y con TLR4; el adaptador inductor de IFN β que contiene el dominio TIR (TRIF) para TLR3 y TLR4; y la molécula adaptadora de TRIF (TRAM) para TLR4. De todos los componentes identificados, MYD88 representa un factor proximal esencial en la activación de la respuesta inflamatoria mediada por TLR, la cual actúa como punto de inicio de una ruta de señalización común para todos estos receptores, excepto para el TLR3.

El adaptador MYD88, recluta proteínas de la familia de las quinasas asociadas a IL-1R (IRAK), que una vez fosforiladas se separan de MYD88 y se unen al factor 6 asociado al receptor del TNF α (TRAF6) (Figura 8). Este factor TRAF se une a la E3 ligasa que a su vez se une a un complejo enzimático de ubiquitinas (Ubc13-Uev1A) capaz de promover la señal de poliubiquitinación y activar la quinasa activada por TGF β (TAK-1). TAK-1, a su vez, activa dos rutas: fosforila la proteína activadora de mitógeno (MAP quinasa) y el complejo IKK. Este complejo formado por IKK- α , IKK- β y IKK γ fosforila a I κ B, lo que conduce a su degradación. Esto permite que NF- κ B se transloque al núcleo e induzca la expresión de genes (Figura 8) (Takeuchi and Akira, 2010; Mills, 2011; McClure and Massari, 2014; Perez-Lopez *et al.*, 2016).

También se ha demostrado que es posible desencadenar una vía de señalización alternativa e independiente de MYD88 mediada por la molécula TRIF (Figura 8) (Carvajal *et al.* 2009). El adaptador TRIF, que se une al TLR3 y al TLR4, al unirse a TRAF6 o bien a la proteína RIP-1 (proteína-1 que interacciona con el receptor), activa a TAK-1 y desencadena la subsiguiente activación del NF- κ B (Takeuchi and Akira, 2010; McClure and Massari, 2014; Perez-Lopez *et al.*, 2016).

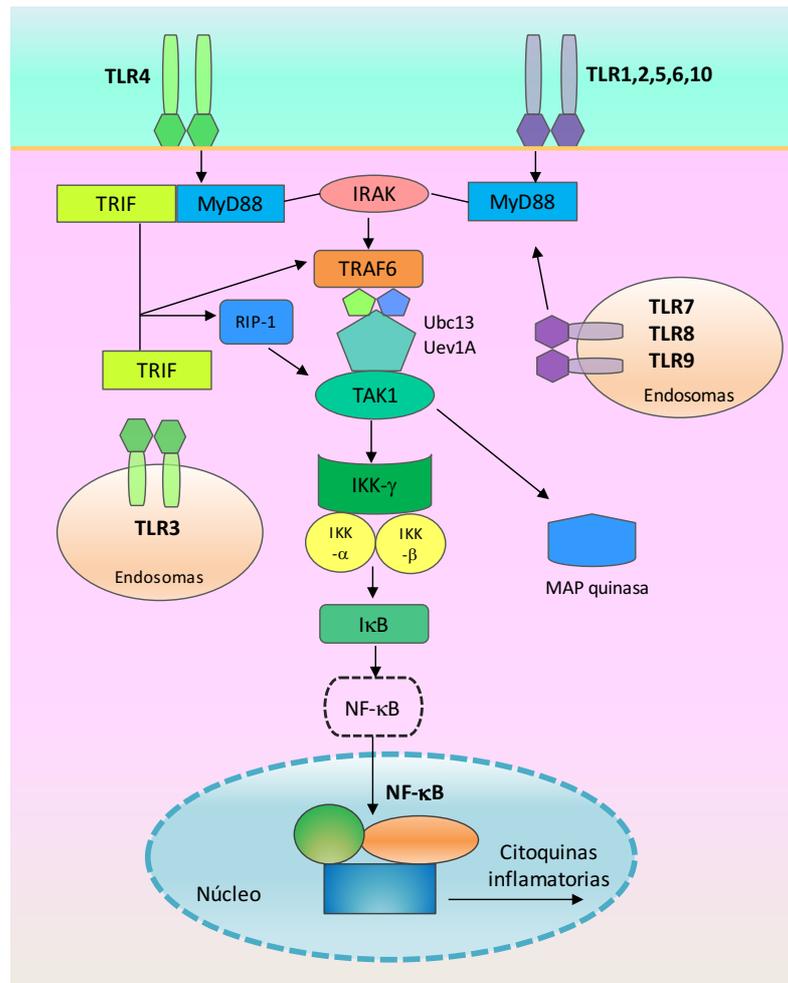


Figura 8. Vías de señalización de los TLRs. Todos los TLRs señalan a través de MyD88 a excepción de TLR3. TLR4 puede utilizar como moléculas adaptadoras tanto MyD88 como TRIF.

Como se ha mencionado, NF-κB es un factor de transcripción que se activa mediante la unión de los TLRs a sus ligandos correspondientes. NF-κB está formado por homodímeros o heterodímeros de proteínas pertenecientes a la familia REL, la cual está formada por 5 miembros (RELA, RELB, E-REL, p50 y p52). En condiciones basales, el dímero NF-κB se mantiene de manera inactiva en el citoplasma celular gracias a su unión con proteínas inhibitoras IκBs que están formadas por una familia de 7 miembros. Diversos estímulos patógenos, citoquinas (TNFα, IL-1β) o moléculas de estrés son capaces de desencadenar la activación del complejo IKK encargado de fosforilar a las proteínas inhibitoras IκBs, marcándolas para su posterior ubiquitinación. De este modo, el dímero NF-κB es capaz de translocarse al núcleo y unirse a determinados promotores en función de las proteínas que formen el dímero. NF-κB activa la transcripción de numerosos genes involucrados en la inmunidad innata y también de aquellos relacionados con factores de crecimiento y supervivencia (McClure and Massari, 2014).

- **Receptores de tipo NLR: características y funciones**

La familia de los NLR ha sido descrita recientemente como un grupo de proteínas citoplasmáticas solubles pertenecientes al sistema inmune innato, capaces de detectar y responder a patógenos exógenos y señales endógenas de peligro. Al igual que los TLRs, estos receptores están altamente conservados filogenéticamente durante la evolución y en humanos se han descrito 23 miembros. Los NLRs están estructuralmente formados por tres dominios: (i) *un dominio central de oligomerización (NACHT)*, el cual presenta actividad ATPasa esencial para la oligomerización de proteínas y consecuente formación de los complejos activos denominados inflamasomas y signalosomas NOD, (ii) *un dominio C-terminal* constituido por secuencias ricas en leucinas que reconoce los PAMPs y (iii) *un dominio efector N-terminal* de señalización altamente variable entre los distintos miembros de la familia NLRs, que puede contener, entre otros, dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD), dominios de repetición inhibitoria de baculovirus (BIR) denominada NAIP, dominio de activación ácida y dominios de pirinas (PYD) denominados NALP, PYPAF y PAN. Este dominio efector N-terminal permite la interacción con una amplia variedad de moléculas o antígenos como flagelina, componentes del PGN, toxinas, RNA bacteriano y viral, LPS, entre otros, implicadas en la transducción de señales (Shaw, Lamkanfi and Kanneganti, 2010).

La presencia de un dominio u otro en posición N-terminal permite la clasificación de los NLR en cuatro grandes categorías: **NLRA**, donde A indica la presencia de un dominio de activación ácida y cuyo único miembro es CIITA (*class II, major histocompatibility complex, transactivator*); **NLRB**, caracterizada por incluir al miembro NAIP con la presencia de un dominio BIR N-terminal, lo que le confiere capacidad para inhibir los procesos apoptóticos; **NLRC**, categoría constituida por NOD-1, NOD-2, NLRC3, NLRC4 y NLRC5, todos ellos con un dominio tipo CARD en posición N-terminal; y **NLRP**, en la cual se van a incluir la mayoría de los NLR (NLRP1-14) y que comparten, como rasgo común, la presencia de un dominio N-terminal PYD (Ting *et al.*, 2008).

En base a sus relaciones filogenéticas, los receptores NLRs se clasifican en tres grandes subfamilias. La primera de éstas, la denominada subfamilia NALPs o NLRPs, incluye hasta 14 proteínas identificadas en humanos (NLRP1-NLRP14), algunas de las cuales, como es el caso de NLRP1, NLRP2 y NLRP3, actúan como elementos centrales en la formación de los inflamasomas que, tras la asociación de proteínas adaptadoras, inducen la activación de la caspasa-1. A nivel estructural, esta subfamilia se caracteriza por presentar un dominio tipo PYD en posición N-terminal, manteniendo los dominios clásicos NACHT y LRR (Martinon and Tschopp 2007). La segunda subfamilia, denominada IPAF, incluye sólo a dos miembros: IPAF o NLRC4, con un dominio CARD N-terminal, y NAIP, en el cual el dominio N-terminal se constituye en base a tres dominios BIR, donde ambos

miembros comparten con la subfamilia NLRP la habilidad para formar complejos multiproteicos o inflamasomas (Martinon and Tschopp, 2007). Finalmente, la subfamilia NOD engloba tanto a receptores NLR con un dominio CARD en posición N-terminal (NOD-1-4), receptores con un dominio de transactivación ácido (CIITA) o receptores cuyo dominio N-terminal no ha sido aún definido (NOD5/NLRX1) (Martinon and Tschopp, 2005; Proell *et al.*, 2008). Esta variabilidad estructural implica que cada miembro muestra distintas funciones; así, NOD-1 y NOD-2 inducen la activación de NF- κ B, mientras que CIITA regula la expresión a nivel transcripcional del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 2. De forma similar a lo que ocurre con su estructura, la función de NOD5/NLRX1 es controvertida, si bien su reclutamiento a la membrana mitocondrial externa implica acciones sobre este orgánulo, como la regulación negativa de la vía antiviral mitocondrial o la producción de ROS (Moore *et al.*, 2008; Tattoli *et al.*, 2008). Cabe destacar que el uso poco consistente de estos nombres ha dado lugar a una confusión y mayor complejidad.

Dentro de los NLR, nos centraremos en NOD-1 y NOD-2, receptores citosólicos especializados, implicados en el reconocimiento de estructuras bacterianas liberadas como PGN y LPS. Se ha descrito que NOD-1 se expresa en muchos tipos celulares y órganos, mientras que NOD-2 tiene una localización más restringida. En concreto, NOD-1 y NOD-2 reconocen distintos fragmentos de PGN. El PGN es un polímero formado por dos disacáridos distintos que se alternan y están unidos entre sí por pequeños péptidos. Según las especies bacterianas estos disacáridos son de N-acetilglucosamina o de N-acetilmurámico. El ligando de NOD-1 es el ácido meso-diaminopimélico (m-DAP), que forma parte de los péptidos que unen las cadenas de disacáridos del PGN en las bacterias Gram-negativas. En cambio, NOD-2 reconoce el péptido de unión muramil dipéptido (MDP), presente en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

Así pues, los receptores NOD-1 y NOD-2 reconocen los péptidos de unión que se liberan durante la degradación del PGN. Estos fragmentos de PGN pueden liberarse durante la división celular bacteriana en el interior de las células inmunes infectadas, o bien, pueden escaparse de los lisosomas, donde el PGN de las bacterias fagocitadas es degradado por la lisozima (Viala *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito que las vesículas de membrana liberadas por patógenos son una vía de entrada del PGN a los compartimentos endolisosomales, donde es reconocido específicamente por el sensor intracelular NOD-1, dando como resultado la generación de respuestas inmunitarias innatas (Kaparakis *et al.*, 2010; Bielig *et al.*, 2014).

Vía de señalización de NOD-1 y NOD-2

NOD-1 y NOD-2 reconocen al PGN bacteriano, los fragmentos m-DAP y MDP respectivamente. Tras la unión a sus ligandos los receptores NOD reclutan e inducen la fosforilación del adaptador común RIP2 (proteína-2 que interacciona con el receptor). Este proceso está mediado por interacciones a través de dominios CARD-CARD. Seguidamente RIP2 activa a la proteína NEMO lo que conduce a la activación del complejo IKK y posterior translocación de NF- κ B al núcleo. Además, RIP2 tiene otro mecanismo de activación del NF- κ B a través de TAK1 (Figuras 8 y 9). TAK-1 promueve además la fosforilación de la proteína activadora de mitógeno (MAP quinasa) (Franchi *et al.*, 2010; Irving *et al.*, 2014).

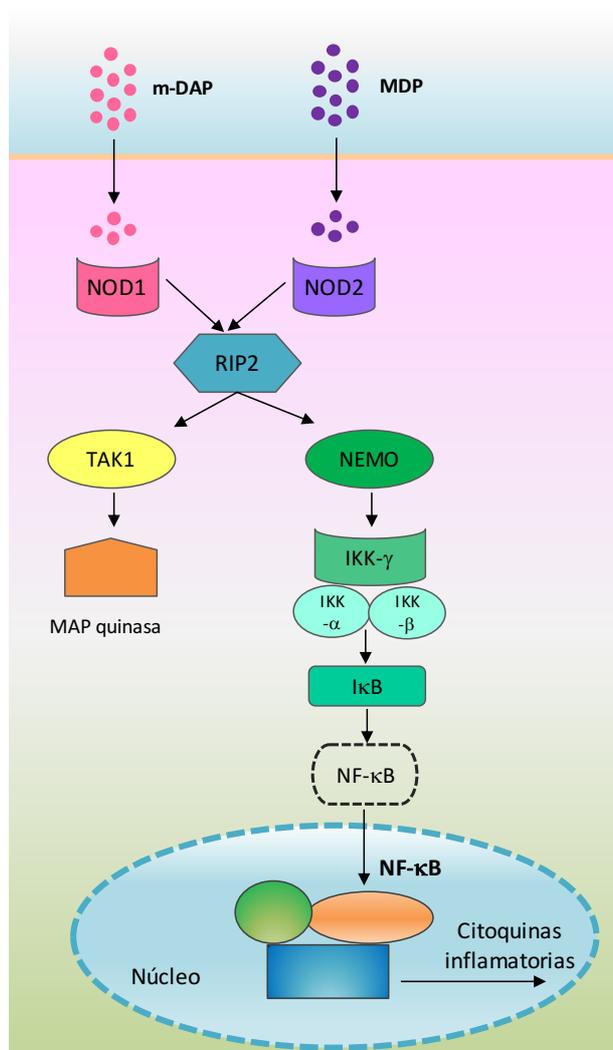


Figura 9. Vía de señalización de NOD-1 y NOD-2. * Inducción del NF κ B por TAK1 (ver señalización mediada por TLRs)

Cabe destacar que los receptores NOD-1/NOD-2 y TLRs comparten varios ligandos y su activación desencadena las mismas rutas de acción (NF- κ B y MAPK) (Tabla 1). Esto implica un incremento en la sensibilidad ante los antígenos y una colaboración sinérgica en la inducción de la respuesta. Para evitar la activación continua por PRRs y desencadenar un exceso de proteínas proinflamatorias que generen daños, las células presentan procesos de tolerancia hacia sus ligandos.

1.3. PROBIÓTICOS

Como ya se ha comentado la microbiota intestinal es de gran importancia para la correcta función de diversos procesos del huésped, como son el desarrollo del sistema inmune, la respuesta inmunológica local y sistémica, las actividades antagonistas contra patógenos gastrointestinales y sus propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas. Todos estos estudios han fomentado que en la actualidad se considere la reposición de la microbiota intestinal como terapia útil a nivel inmunológico para mejorar la salud humana. En este sentido, el concepto de probiótico fue definido por FAO/OMS como 'microorganismos vivos que cuando se administran en concentraciones adecuadas confieren un beneficio a la salud del consumidor' (FAO and WHO, 2001). Según esta definición, los probióticos para ser efectivos, no necesitan colonizar, sino que el consumo de una cepa específica debe mostrar que ejerce un beneficio concreto en la salud.

Para ser considerados bacterias probióticas, los microorganismos deben reunir ciertas características como estar correctamente identificados, carecer de factores de virulencia y de la capacidad de producir metabolitos indeseables, mostrar tolerancia a las condiciones del entorno donde ejercen el beneficio, verificar su funcionalidad probiótica y haber sido reconocidos como bacterias seguras. Todo esto es imprescindible debido a que los efectos saludables demostrados por una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie (Ohashi and Ushida, 2009).

Clásicamente se ha atribuido el efecto de los probióticos a su capacidad de modificar la composición de la microbiota intestinal al convertirla de potencialmente dañina a beneficiosa. Sin embargo, un mayor conocimiento de estos microorganismos ha permitido profundizar en los mecanismos a través de los cuales ejercen sus efectos beneficiosos. El primer mecanismo de acción es la competición bacteriana, que previene la adherencia, establecimiento y/o acción de las bacterias patógenas al modificar el pH del lumen intestinal y producir compuestos antibacterianos. Estas actividades bacteriostáticas pueden no ser las únicas responsables del desplazamiento de las

bacterias nocivas ya que también se puede dar una competición física para la interacción y colonización de la capa de mucus. El segundo modo de acción de los probióticos es a través del efecto “barrera”, ya que algunos han demostrado ser capaces de contribuir al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, así como prevenir y reparar daños en la mucosa causados por microorganismos patógenos. Los mecanismos de acción implicados en este beneficio incluyen la estimulación de la secreción de mucina, modulación de la fosforilación de proteínas, el aumento de la resistencia transepitelial y la disminución de la permeabilidad. Un tercer modo de acción está relacionado con el sistema inmune mediado por receptores celulares capaces de discriminar entre microbiota comensal y patógena. Éste último se basa en la capacidad de inducir la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión) y de provocar respuestas adaptativas específicas destinadas a combatir a los agentes patógenos (Butel, 2014).

Además de estas funciones, la administración de probióticos puede ser también útil para el tratamiento y prevención de distintos procesos patológicos: 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, Garg and Aggarwal, 2013).

Entre los microorganismos utilizados como probióticos, las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado, pero también se utilizan con este fin otras cepas bacterianas como *Escherichia coli* no patogénica y otros microorganismos no bacterianos como *Saccharomyces boulardii*. En diferentes estudios, tanto en animales como en humanos, se ha demostrado que distintas cepas de microorganismos probióticos son capaces de ejercer una gran diversidad de beneficios (Tabla 2). Entre estos beneficios están, incrementar el valor nutricional de los alimentos al favorecer la absorción de minerales y vitaminas, promover la digestión de la lactosa, y modular la respuesta inmunológica.

Tabla 2. Efectos beneficiosos para la salud de algunos probióticos. (FAO and OMS, 2006; Martínez-Cuesta. M. C., Peláez. C, 2012)

Cepa probiótica	Beneficio para la salud
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	<ul style="list-style-type: none"> • Alivio del síndrome del intestino irritable (SII). • Reducción del LDL-colesterol. • Reducción de la recurrencia de diarrea por <i>Clostridium difficile</i>.
<i>L. casei</i> DN114001	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación inmune.
<i>L. rhamnosus</i> GG	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de rotavirus agudo y diarrea asociada a antibióticos. • Modulación inmune. • Tratamiento y prevención de alergias.
<i>L. acidophilus</i> M92	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de rotavirus y diarrea asociada a antibióticos.
<i>L. salivarius</i> UCC118	<ul style="list-style-type: none"> • Alivio del sistema inmune en pacientes con SII. • Reducción del colesterol en suero.
<i>L. reuteri</i> DSM 12246	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de rotavirus y diarrea asociada.
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA6475	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación inmune.
<i>Bifidobacterium breve</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación inmune y estimulación. • Reducción de síntomas del SII.
<i>B. animalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento de secreción de IgA.
<i>B. longun</i> BB536	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de alergias.
<i>B. lactis</i> Bb12	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención de la diarrea recurrente por rotavirus (diarrea del viajero). • Efectos inhibitorios contra <i>Helicobacter pylori</i>.
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	<ul style="list-style-type: none"> • Menos recaídas en la enfermedad del SII. • Modulación inmune. • Recuperación de la colitis ulcerosa. • Exclusión de patógenos de <i>E. coli</i>.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Menos recaídas en la enfermedad del SII. • Reducción de la diarrea asociada a antibióticos. • Prevención de la diarrea recurrente por <i>Clostridium difficile</i>.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la intolerancia a la lactosa. • Prevención de la diarrea por rotavirus.

1.3.1. *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) es una bacteria Gram-negativa no patógena perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta cepa fue descrita por el doctor Alfred Nissle en 1917, quien por primera vez aisló esta cepa de *E. coli* a partir de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial, que fue el único de su unidad en no ser afectado de disentería (Wassenaar, 2016).

Se sabe actualmente que esta cepa probiótica presenta múltiples efectos beneficiosos sobre la homeostasis intestinal. Entre ellos cabe destacar en primer lugar que, a

diferencia de otras cepas de *E. coli*, no produce factores de virulencia por lo que es incapaz de inducir daño en el epitelio intestinal (Schultz, 2008; Vejborg *et al.*, 2010)

El probiótico EcN estimula la producción de β -defensina 2, una molécula que ha demostrado ser crucial en la protección de la mucosa frente a la adhesión e invasión de especies bacterianas patógenas. Además, EcN puede restaurar el epitelio intestinal dañado a través de la modulación de proteínas TJs y de la *zonula occludens* (Schlee *et al.*, 2007). Asimismo, esta cepa bacteriana puede secretar algunos factores que favorecen su capacidad de colonización (factores *fitness*) como microcinas, adhesinas, sistemas de captación de hierro o proteasas. Por último, EcN puede modular la respuesta inflamatoria de la mucosa mediante una acción directa sobre los linfocitos T activados (Hancock, Dahl and Klemm, 2010; Rund *et al.*, 2013).

EcN ha sido utilizada en varios ensayos clínicos para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales, incluyendo las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), un grupo heterogéneo de desórdenes inflamatorios crónicos recurrentes del tracto gastrointestinal como la colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD) (Schultz, 2008; Spiller, 2008; Faghihi *et al.*, 2015).

1.3.1.1. Mecanismos responsables de los efectos probióticos de la cepa EcN

EcN tiene propiedades únicas que ejercen su efecto beneficioso en el huésped mediante la utilización de factores *fitness*, factores de interferencia y factores moduladores.

Dentro de los factores *fitness*, se encuentran 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 y F1C). 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. Además de estos factores, EcN posee seis sistemas de captación de hierro diferentes que 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. Otro factor *fitness* de EcN es el tipo de LPS. Éste tiene una mutación en el gen del antígeno O6 que se traduce en un codón de parada, dando lugar a cadenas más cortas, lo que le confiere sensibilidad al suero y contribuye a sensibilizar proteínas del sistema del complemento que lo inactivan, provocando una respuesta inmune en el huésped (Figura 10). Tal inactivación del LPS es una de las propiedades de EcN que la convierten en una bacteria segura para ser administrada a humanos (Guttsches *et al.*, 2012). Por último, también posee una flagelina H1 y un polisacárido capsular extracelular (cápsula

K5) que induce respuestas antimicrobianas y está implicado en la inducción de la expresión de receptores TLR5 y de ciertas citoquinas en células del epitelio intestinal (Behnsen *et al.*, 2013). Por otra parte, EcN carece de factores específicos de virulencia como las adhesinas alfa-hemolisina, CNF1 o P-fimbria, que se encuentran en cepas uropatógenas (Jacobi and Malfertheiner, 2011).

En cuanto a los factores de interferencia de EcN, se ha descrito que dificultan la invasión de células epiteliales intestinales humanas por patógenos bacterianos enteroinvasivos. Esta interferencia se produce por mecanismos de producción de bacteriocinas, agotamiento del ATP intracelular, aumento de la permeabilidad de la membrana y su sensibilización a la acción lítica, deterioro de la motilidad del flagelo y la prevención de la internalización bacteriana (Trebichavsky *et al.*, 2010).

Las cepas intestinales de *E. coli* producen colicinas y microcinas que proporcionan un efecto de barrera contra otras cepas de *E. coli* patógenas (Figura 10). EcN sintetiza y secreta las microcinas denominadas MccH47 y MccM que actúan contra bacterias genéticamente relacionadas con la cepa productora (Jacobi and Malfertheiner, 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 del péptido antibacteriano β -defensina-2. Esta activación se produce a través de vías de señalización que implican los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. La β -defensina-2 posee un gran espectro de acción actuando sobre microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos, levaduras y virus (Behnsen *et al.*, 2013; Jacobi and Malfertheiner, 2011).

Finalmente, EcN es capaz de actuar sobre diferentes parámetros de la homeostasis intestinal, mediante la inducción de diversos factores moduladores. Entre ellos, citoquinas proinflamatorias (IL-8), receptores de reconocimiento de patrones microbianos (TLR5), factores de mantenimiento de la barrera intestinal (*tight junctions*) y factores antiinflamatorios e inmunoestimuladores. El mecanismo de acción principal de este probiótico es la modulación del balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias a favor de las anti-inflamatorias. La flagelina es reconocida por receptores TLR5 de los enterocitos e induce la secreción de IL-8, una de las citoquinas antibacterianas más relevantes, ya que actúa como quimio-atrayente de neutrófilos, facilitando la fagocitosis bacteriana *in situ* (Figura 10).

EcN restaura la *tight junctions* a nivel de células epiteliales mediante la reorganización de proteínas de la *zonula occludens* (Figura 10). Se ha descrito, que la incubación de células epiteliales con EcN incrementa la resistencia eléctrica transepitelial (TER) como consecuencia de un aumento y expresión de la proteína ZO-2 en la membrana plasmática lo que ayuda a reforzar las *tight junctions*. Por el contrario, la incubación de una monocapa de células epiteliales con la cepa de *E. coli* enteropatógena (EPEC)

produce una disminución en los niveles de TER. La infección con EPEC produce un aumento de la proteína quinasa PKC ξ , 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 ξ (Zyrek *et al.*, 2007). Recientemente, se ha descrito que EcN secreta la proteína TpcC, responsable de la inducción de la proteína claudina-14 a través de la vía de señalización de PKC ξ y ERK1/2, lo que lleva a un aumento de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) en cultivos celulares (Hering *et al.*, 2013).

Es importante señalar que, a pesar de las diversas propiedades probióticas, EcN es capaz de sintetizar péptidos que pueden inducir daño celular, como es el caso del polipeptido colibactina, un agente genotóxico capaz de inducir roturas en el DNA. Sin embargo, estudios *in vivo* realizados con un mutante de EcN deficiente en colibactina, han mostrado que esta proteína es necesaria para los efectos anti-inflamatorios de EcN como probiótico (Olier *et al.*, 2012).

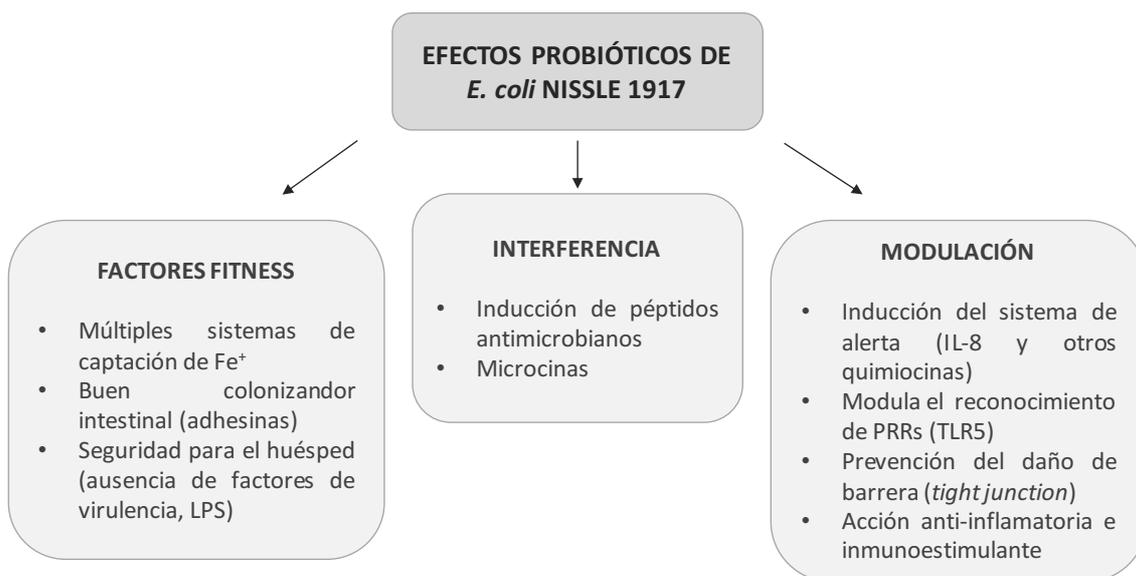


Figura 10. Efectos probióticos de *E. coli* Nissle 1917. Imagen adaptada (Trebichavsky *et al.*, 2010)

1.4. COMUNICACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y EL EPITELIO INTESTINAL: VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Las complejas interacciones entre el huésped y la microbiota intestinal requieren de elaborados mecanismos reguladores que aseguren la simbiosis y eviten respuestas aberrantes que provoquen patologías en el huésped. La microbiota induce respuestas a

nivel intestinal a través de factores microbianos secretados que son actores importantes en la comunicación con el hospedador, entre estos factores están las vesículas de membrana.

Las bacterias Gram-negativas, patógenas y no patógenas, secretan de forma espontánea vesículas de la membrana externa (OMVs, *outer membrane vesicles*) durante su crecimiento. Diferentes estudios sobre el papel de las vesículas secretadas por diversas cepas bacterianas han permitido establecer una función común. Las OMVs son un mecanismo de comunicación de las bacterias con el entorno, que facilita la interacción a distancia con otras células y evita el contacto intercelular directo. Las vesículas son, por lo tanto, un mecanismo de secreción de proteínas y otros compuestos activos en un ambiente protegido. (Kulp and Kuehn 2010). Adicionalmente, se les atribuye numerosas funciones biológicas como la liberación de toxinas bacterianas, la modulación del sistema inmune innato y adaptativo, el transporte de moléculas de señalización entre células bacterianas y la formación de biofilms.

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, Vesik and Work, 1966). Actualmente se sabe que las OMVs derivadas de bacterias Gram-negativas, objetivo de este estudio, son producto de un proceso evolutivo que también han desarrollado las bacterias Gram-positivas y diferentes especies de arqueobacterias, aunque en este caso no reciban el mismo nombre al poseer una envoltura celular diferente (Reister *et al.*, 2014).

1.4.1. BIOGÉNESIS DE LAS OMVs

Las OMVs derivadas de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas, son porciones esféricas derivadas de la membrana externa cuyo tamaño oscila entre 20 y 500 nm. Es importante considerar la arquitectura única de este componente bacteriano para comprender los mecanismos que intervienen en su formación. La envoltura celular consta de dos membranas que difieren en la composición de lípidos y de proteínas, la membrana interna y la membrana externa. Estas están separadas por el periplasma donde se localiza una fina capa de peptidoglicano (PGN). En la mayoría de bacterias Gram-negativas, la superficie de la membrana externa (OM) se compone principalmente de lipopolisacárido (LPS), mientras que la parte interior y 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 y genera un entorno oxidante desprovisto de cualquier fuente de energía conocida, como el ATP. Dentro del periplasma hay una capa delgada y rígida de PGN, unida a ambas membranas, la interna

y externa, a través de proteínas ancladas a la membrana como son la lipoproteína de Braun (LPP) y OmpA. La envoltura celular contiene gran número de proteínas que desempeñan funciones importantes para la célula y permiten la adquisición de nutrientes, adhesión, secreción, señalización, y protección frente al medio externo (Kulp and Kuehn 2010; Schwechheimer and Kuehn 2015).

Por lo tanto, las OMVs contienen componentes como fosfolípidos, LPS, así como determinadas proteínas de membrana y del espacio periplasmático. Además, contienen proteínas de origen citosólico, RNA y DNA. Las OMVs producidas por cepas patógenas transportan toxinas, enzimas digestivas y otros factores de virulencia como adhesinas, proteínas integrales de membrana asociadas a la virulencia del patógeno. Estos factores median la coagregación de células bacterianas y la unión a las superficies del huésped permitiendo dirigir las OMVs a células blanco específicas (MacDonald and Kuehn, 2012; Kulkarni and Jagannadham, 2014a).

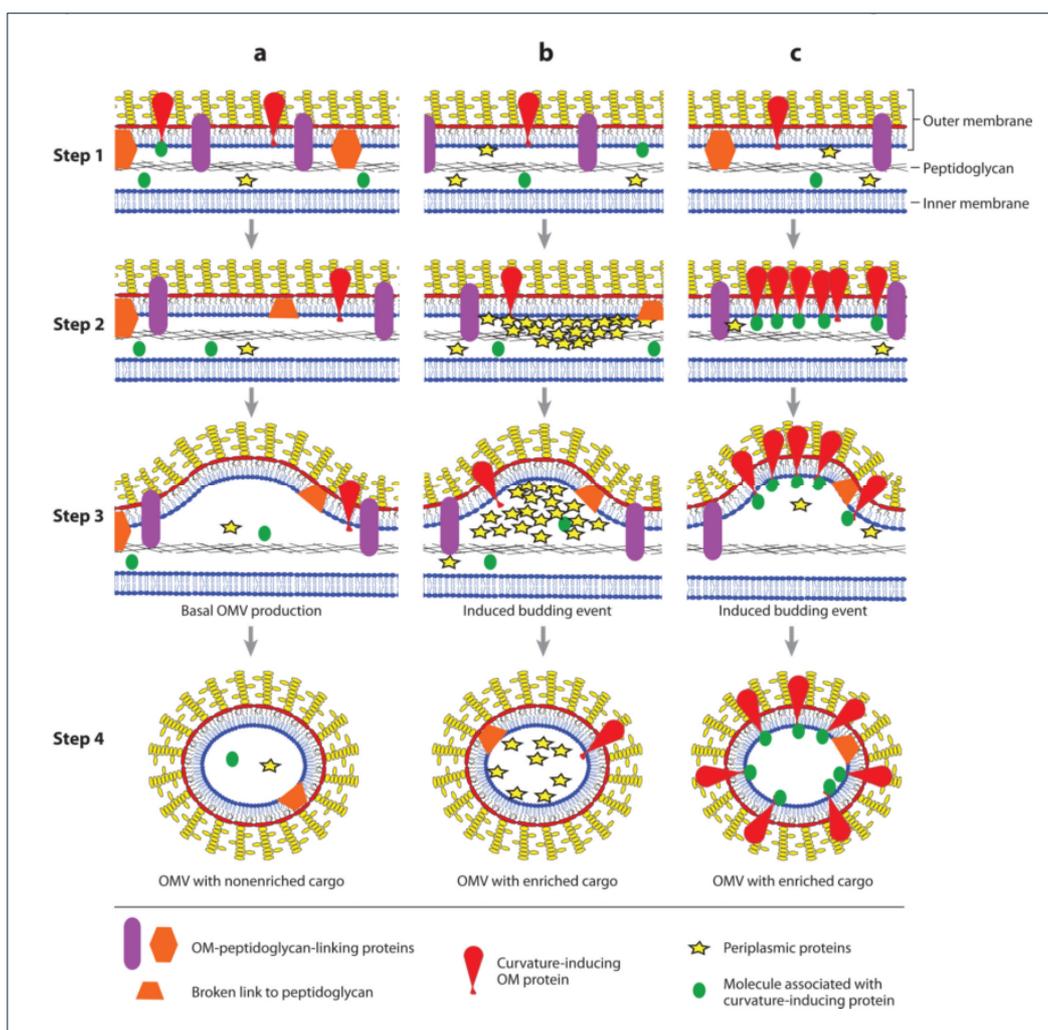


Figura 11. Modelos de formación de OMVs. (A) Por ruptura de las uniones entre la membrana externa y el péptidoglicano, bien por movimiento de las proteínas de unión (rojo) o por ruptura de las conexiones

(naranja). **(B)** Por acúmulo de proteínas periplasmáticas. **(C)** Por acúmulo de proteínas de la membrana externa que inducen la curvatura de la misma. (Kulp and Kuehn 2010)

Se han sugerido tres mecanismos diferentes que podrían favorecer la formación de vesículas. El primer mecanismo sería la pérdida del contacto entre la membrana externa y el PGN subyacente. El segundo mecanismo, un aumento local de proteínas periplasmáticas que hace que el PGN ejerza presión y empuje la membrana externa hacia el exterior provocando consecuentemente la secreción de OMVs que arrastran consigo grandes cantidades de proteínas. Finalmente, el tercer mecanismo, proteínas integrales de membrana o posiblemente pequeñas moléculas dentro de la membrana externa que inducen la curvatura de la misma y por tanto la vesiculación (Figura 11). Cabe destacar que la biogénesis de las OMVs debe basarse en la disociación de la membrana externa desde el PGN subyacente, seguida por una ruptura que no compromete la integridad de la envoltura.

1.4.2. 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 bacteriófagos, entre otras, pueden provocar una sobreproducción de OMVs (Unal, Schaar and Riesbeck, 2011).

La producción de OMVs depende del anclaje del PGN a la membrana externa a través de la unión covalente con las proteínas Lpp, OmpA y proteínas del complejo *tol-pal* implicado en la división celular. Por lo tanto, las bacterias de tipo salvaje pueden modular la producción de OMVs controlando el número de enlaces cruzados Lpp-PGN a través de la regulación de la remodelación PGN. Se ha demostrado que la producción de OMVs puede estar también 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*. Los mutantes que carecen de OmpA muestran una mayor producción de OMVs, muy probablemente por disminución en la reticulación entre PGN y la membrana exterior. Por el contrario, mutaciones en los genes *ypjA* y *nlpA* disminuyen drásticamente la producción de las mismas (Schwechheimer and Kuehn, 2015).

1.4.3. FUNCIONES DE LAS OMVs

Las OMVs son capaces de desempeñar diversas funciones biológicas, debido a las actividades inherentes de las propias proteínas y componentes que llevan asociados. Además, actúan como vehículos de entrega, como ejes centrales en la formación de comunidades bacterianas y como contribuyentes a la supervivencia y virulencia bacteriana.

Las diferentes funciones de las OMVs en las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-huésped juegan un importante papel en la fisiología de las bacterias Gram-negativas, ya sea estimulando directamente las células diana o suministrando los componentes que transportan (Figura 12). Así pues, en las interacciones bacteria-bacteria, las OMVs pueden mediar la resistencia a los antibióticos, la adquisición de nutrientes y la muerte de bacterias competidoras. Se ha demostrado que vesículas derivadas de *Pseudomona aeruginosa* y *Moraxella catarrhalis* llevan y transfieren beta-lactamasas a bacterias susceptibles a este tipo de antibiótico, lo que conlleva la supervivencia transitoria de la bacteria. Además, las OMVs albergan varios sistemas de eflujo de múltiples fármacos que pueden contribuir también a la resistencia a antibióticos. Las proteínas que intervienen en el transporte de sideróforos, aminoácidos y ácidos grasos también se asocian con OMVs de bacterias Gram-negativas, y estas proteínas ayudan a la adquisición de nutrientes. La muerte de bacterias competidoras a través de vesículas está asociada a enzimas de tipo murein hidrolasas o endopeptidasas L5.

En cuanto al papel de las OMVs en las interacciones bacteria-huésped (figura 12), estas vesículas contribuyen a promover respuestas inflamatorias a través de su adhesión, así como al transporte y liberación de factores de virulencia y de otros componentes bacterianos del tipo patrones moleculares asociados a patógenos, incluyendo lipoproteínas y LPS. Así, por ejemplo, la administración intraperitoneal a ratones de vesículas de *Escherichia coli* induce la respuesta inflamatoria sistémica, mientras que la administración intranasal de vesículas de *P. aeruginosa* estimula la inflamación pulmonar a través de TLR2 y TLR4. Las OMVs derivadas de *Helicobacter pylori* y *Acinetobacter baumannii* median la adhesión bacteriana a las células huésped mediante adhesinas (Ata, BabA, SabA) y porinas (OmpA). Además, las vesículas de ciertos patógenos tienen varios factores de virulencia, tales como toxinas (Cif, citolisina A, enterotoxina termoablabable, leucotoxina y toxina Shiga) y enzimas digestivas (fosfatasa alcalina, elastasa y fosfolipasa hemolítica C), que pueden desempeñar funciones en la modulación de la respuesta inmune del huésped (Berleman and Auer, 2013; Schwechheimer and Kuehn, 2015; Lee, Kim and Gho, 2016).

Evidentemente, la contribución de las OMVs a la patogénesis bacteriana sigue siendo un tema de gran interés. Sin embargo, también se ha empezado a valorar el beneficio de la producción de vesículas por bacterias no patógenas a través de estudios funcionales relacionados con OMVs presentes en la microbiota intestinal y sus efectos sobre la salud y la homeostasis intestinal. En este contexto, estudios sobre la cepa comensal *Bacteroides fragilis*, mostraron que el polisacárido capsular presente en las vesículas induce efectos inmunomoduladores siendo capaz de prevenir la colitis en un modelo experimental. En dicho modelo las células dendríticas detectan la asociación OMVs-polisacárido a través de TLR2, resultando en la regulación de células T y la producción de citoquinas antiinflamatorias (Shen *et al.*, 2012).

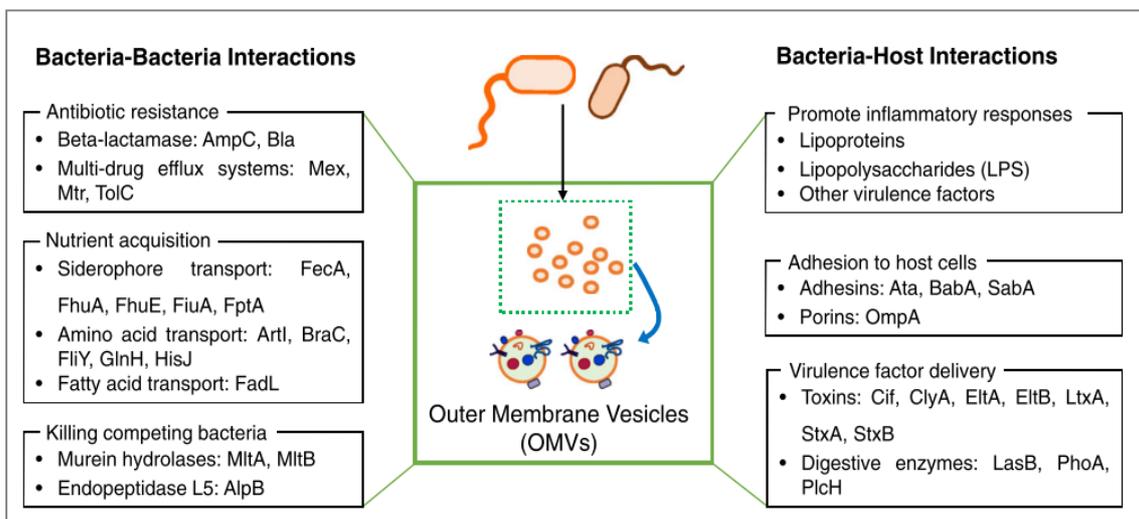


Figura 12. Funciones fisiopatológicas de OMVs de bacterias Gram-negativas (Lee, Kim and Gho, 2016).

La investigación desarrollada por nuestro grupo de investigación en diversos modelos celulares *in vitro* que simulan condiciones de barrera epitelial intacta o dañada han demostrado la capacidad de las OMVs secretadas por cepas de *E. coli* comensales y probióticas de modular la respuesta inmunitaria y la permeabilidad paracelular (Alvarez *et al.*, 2016; Fábrega *et al.*, 2016). Por lo tanto, las OMVs son una estrategia eficaz utilizada por las bacterias de la microbiota intestinal para comunicarse con las células de la mucosa intestinal, promoviendo la entrega de mediadores que desencadenan la respuesta inmune y la defensa del huésped. Actualmente, las OMVs liberadas por componentes de la microbiota intestinal se vislumbran como actores importantes en los procesos de señalización en la mucosa intestinal.

1.4.4. OMVs: RECONOCIMIENTO Y ENTRADA EN LA CELULA HUÉSPED

Debido a su versatilidad como vehículo de entrega, las OMVs han de ser efectivas en la transferencia de materiales o señales; deben interactuar específicamente y finalmente fundirse o acceder a sus respectivas células diana.

La membrana plasmática es la frontera entre la célula y su entorno y desempeña un papel clave en la comunicación de las células regulando el tránsito de moléculas. Las OMVs requieren de procesos de endocitosis para la entrada celular, con el fin de alcanzar su objetivo y ejercer su efecto en el huésped. Se han descrito diversas vías o rutas para la internalización de las OMVs de especies Gram negativas. Estas rutas pueden requerir regiones de la membrana recubiertas de clatrina, formación de caveolas, uso de balsas lipídicas o fusión directa de membrana (Figura 13).

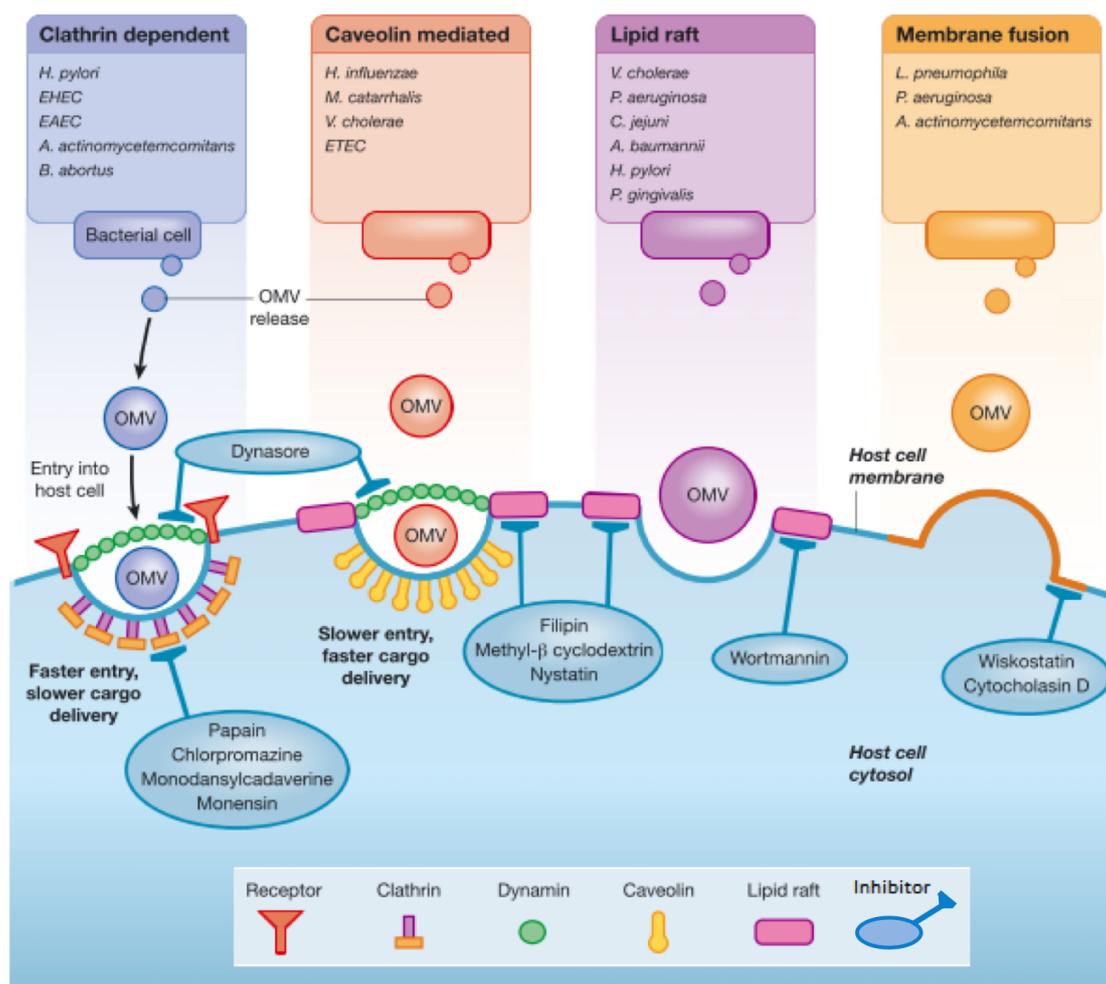


Figura 13. Vías de entrada de OMVs de bacterias Gram-negativas en la célula huésped. Se han descrito varias vías que permiten la entrada de las OMVs en las células huésped. Estas rutas pueden requerir fosas

recubiertas de clatrina, formación de caveolas y uso de balsas lipídicas o fusión directa de membrana. La entrada de OMVs se ve afectada por el uso de inhibidores de componentes de estas vías (O'donoghue *et al.*, 2016).

La endocitosis mediada por clatrina (CME, *Clathrin-mediated endocytosis*) es un proceso complejo, bien descrito, definido como la captación celular del material a través de la formación de vesículas de la membrana plasmática recubiertas de clatrina. En resumen, el proceso comprende la formación de fosas revestidas con clatrina, la selección de carga mediante el reclutamiento de proteínas específicas a receptores presentes en las fosas, el ensamblaje de la capa de clatrina, y la escisión mediada por dinamina, cuya función es imprescindible para este tipo de endocitosis. Después de la escisión de la membrana celular, las vesículas internalizadas entran en las rutas de tráfico endosómico, donde su carga puede ser devuelta a la superficie celular o dirigida a los lisosomas (Rewatkar *et al.*, 2015). La vía de endocitosis mediada por clatrina se inhibe típicamente usando fármacos tales como la clorpromazina que evita la formación de fosas revestidas con clatrina, o por inhibidores de la dinamina que impiden la escisión del endosoma a partir de la membrana. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía sobre la entrada de OMVs a través de CME. Se ha demostrado que determinados factores de virulencia bacteriana, como la toxina *shiga*, la toxina del cólera y la adhesina arg-gingipain de *Porphyromonas gingivalis*, utilizan endocitosis mediada por clatrina para entrar en la célula huésped. Existen evidencias sobre la entrada de las OMVs producidas por *H. pylori* a través de endocitosis mediada por el receptor AP2, complejo adaptador indispensable para la internalización a través de fosas revestidas con clatrina. Se ha visto una reducción en la capacidad de las OMVs para entrar en células silenciadas para AP2 mediante siRNA (Vanaja *et al.*, 2016). Varios estudios han identificado la toxina vacuolizante A (VacA) en OMVs de *H. pylori*. El mecanismo de entrada de este importante factor de virulencia citotóxico es a través de OMVs vía endocitosis mediada por clatrina (O'donoghue *et al.*, 2016; Vanaja *et al.*, 2016).

En otros casos, la internalización de OMVs depende de balsas lipídicas (*Lipid raft*). Las balsas lipídicas son dominios de la membrana plasmática ricos en esfingolípidos y colesterol. Las regiones ricas en colesterol son abundantes en la bicapa y se plantea la hipótesis de que el agrupamiento de estas regiones permite la curvatura de la membrana, impulsando la formación de invaginaciones en la célula huésped y la entrada de partículas dentro de la célula. Los dominios de balsas lipídicas también pueden estar enriquecidos en caveolina. Se ha demostrado la dependencia del colesterol en la entrada de las OMVs de una gran variedad de especies bacterianas. Los microdominios ricos en colesterol son comúnmente interrumpidos por el uso de sustancias químicas tales como metil- β -ciclodextrina (m β cd) que secuestra y agota el colesterol de la membrana celular, o filipina que se une al colesterol en la membrana y altera el empaquetamiento de los lípidos. Muchos estudios han utilizado estos inhibidores para

demostrar la importancia del colesterol de la membrana en la internalización de OMVs. Las OMVs de *Vibrio vulnificus* liberan citolisinas en las células epiteliales para inducir la muerte celular, pero este efecto se ve reducido en presencia de filipina. Los componentes de las OMVs también pueden ayudar en los procesos de entrada mediada por balsas lipídicas. Las OMVs de *P. aeruginosa* que contienen aminopeptidasa (PaAP) presentan una mayor asociación a células pulmonares que las OMVs de una cepa con una delección de PaAP, y esta asociación es dependiente del colesterol de la membrana (Bomberger *et al.*, 2009).

La endocitosis mediada por caveolas es otra vía endocítica que se encarga de internalizar ligandos extracelulares. El componente principal son las caveolinas, proteínas de la membrana plasmática asociadas a dominios enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, y caracterizados por su morfología distintiva (invaginaciones en copa). Tras la estimulación con el ligando, estas regiones de la membrana denominadas caveosomas, recubiertas de caveolina, forman pequeñas vesículas endocíticas que internalizan los componentes vesiculares, (Rewatkar *et al.*, 2015). Las interacciones entre patógenos y caveolas han sido sugeridas como mecanismo de invasión preferencial para muchos patógenos, incluyendo bacterias, virus y hongos, ya que se postula que las caveolas internalizadas evitan la fusión con los compartimentos lisosómicos y la posterior degradación. Actualmente existen numerosos ejemplos de OMVs que utilizan procesos endocíticos mediados por caveolina para entrar en las células huésped. Sin embargo, muchos estudios a menudo no distinguen entre la dependencia de la balsa lipídica, que es inhibida por el agotamiento del colesterol, y la dependencia de la balsa lipídica específica de la caveolina, que es sensible tanto al colesterol como al agotamiento de la dinamina (Bonnington and Kuehn, 2014; Lee, Kim and Gho, 2016).

A pesar de la diferente arquitectura de la bicapa de la membrana presente en OMVs y la de las células eucariotas del huésped, la fusión de membrana se ha descrito como un mecanismo para la entrada de OMVs en las células huésped. Para confirmar la fusión entre las membranas, se han utilizado liposomas de fosfolípidos que imitan las membranas de las células huésped. Los liposomas se marcaron con un par de colorantes FRET para demostrar que el material de la membrana de las OMVs de *L. monocytogenes* se puede incluir en la bicapa del huésped modelo, monitorizando el cambio en la señal FRET, que aumenta tras la incorporación de OMVs (Lee, Kim and Gho, 2016).

Así pues, tal como se ha demostrado, las OMVs pueden utilizar múltiples rutas para entrar a las células huésped, porque están bien adaptadas para dirigir y entregar factores activos de virulencia y moléculas inmunomoduladoras, así como para mejorar sus funciones defensivas y su patogénesis.

1.4.5. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR OMVS

La detección temprana de OMVs por el sistema inmune del huésped es importante para desarrollar la síntesis de proteínas proinflamatorias y de péptidos antimicrobianos. El reconocimiento de componentes microbianos, la activación de las vías de señalización y los mecanismos efectores, son eventos secuenciales que deben ser altamente controlados. El huésped reconoce componentes vesiculares a través de PRRs dentro de los que se incluyen receptores de tipo Toll (TLR) y receptores de tipo oligomerización de unión a nucleótidos (NLRs). TLRs y NLRs juegan un papel clave en el reconocimiento de componentes extracelulares e intracelulares y control de la respuesta inflamatoria. La activación de TLRs y NLRs por sus respectivos ligandos activa vías de señalización que convergen en la activación de factores de transcripción, tal como el factor nuclear-kappaB (NF-κB), dando lugar a la expresión de citocinas inflamatorias y moléculas antimicrobianas.

En concreto, las OMVs contienen múltiples compuestos reconocidos por los PRRs, tales como; flagelina (TLR5), porinas (TLR2), LPS (TLR 4), ácido lipoteicoico (TLR2), DNA (TLR3-TLR7), RNA (TLR9) y PGN (NOD-1 y NOD-2). Los receptores citosólicos NOD-1 y NOD-2 reconocen fragmentos del PGN de bacterias Gram negativas y Gram positivas que han accedido al interior de la célula huésped por invasión de la bacteria (en caso de patógenos invasivos) o a través de las OMVs internalizadas por endocitosis. En el caso de la internalización de las OMVs via CME, la interacción de NOD-1 y NOD-2 con PGN tiene lugar en la membrana de los endosomas donde los receptores son reclutados para su activación (Figura 14).

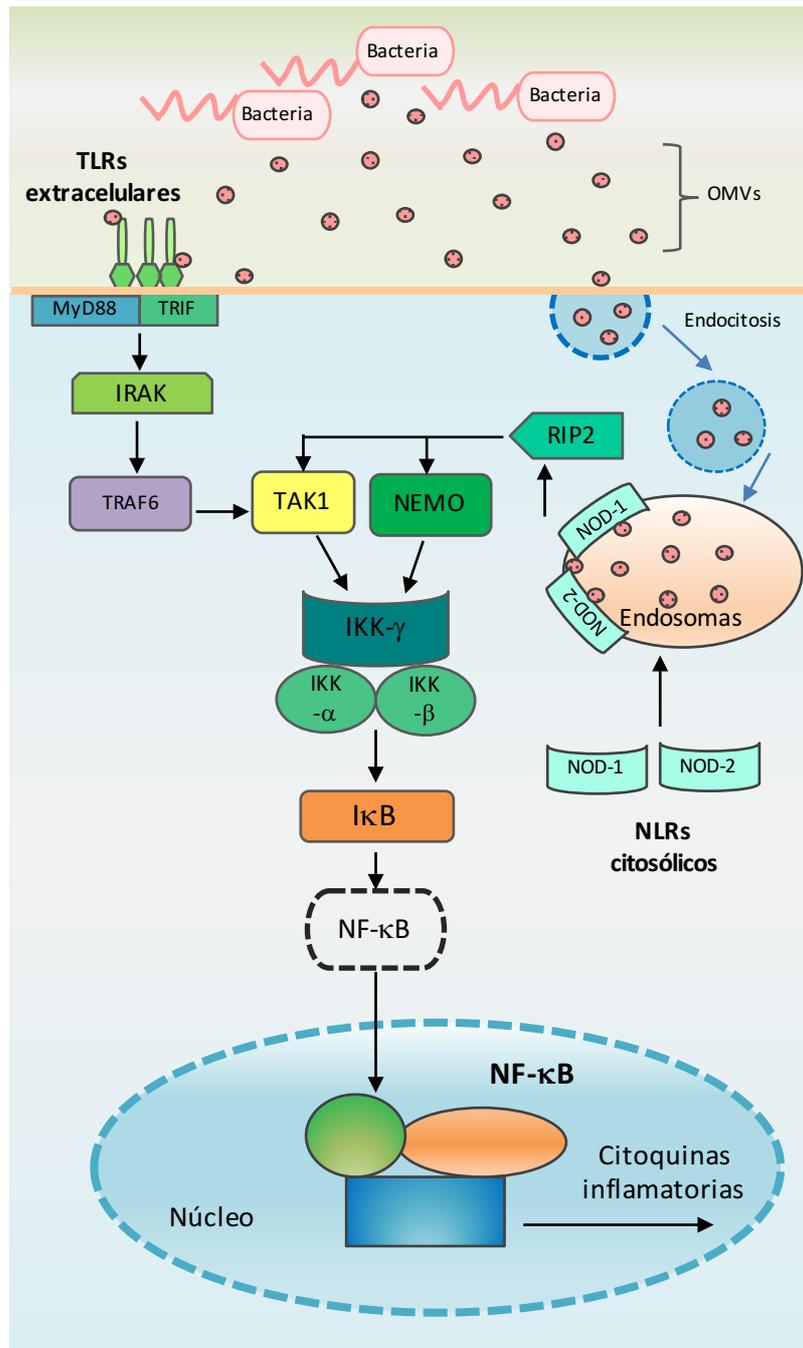


Figura 14. Señalización mediada por OMVs

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los factores secretados por la microbiota tienen un importante papel como señalizadores y moduladores de las funciones de la mucosa intestinal. Entre los factores secretados por las bacterias Gram-negativas están las vesículas de membrana externa (OMVs), cuyo estudio en patógenos ha sido un área muy activa en la última década. Sin embargo, los estudios sobre OMVs de microbiota eran muy escasos al inicio de este proyecto de tesis.

Este trabajo tiene como objetivo general contribuir a establecer la función de las vesículas de microbiota como efectores en la regulación de la homeostasis intestinal, usando como modelo las OMVs secretadas por cepas de *E. coli* probióticas (cepa EcN) y comensales (cepa ECOR12).

Dentro de los objetivos específicos se encuentran:

1. Establecer el mecanismo de internalización y tráfico intracelular de las OMVs secretadas por EcN y ECOR12 en líneas de epitelio intestinal.
2. Analizar los efectos citotóxicos y genotóxicos de las OMVs sobre la célula huésped:
 - Efectos sobre la viabilidad y proliferación celular
 - Efectos sobre el DNA: estrés oxidativo y roturas de doble cadena.
3. Determinar la implicación de los receptores citosólicos tipo NOD en la señalización intracelular mediada por las OMVs de estas cepas.

3 MATERIALES

3. MATERIALES

3.1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se han utilizado cepas no patógenas de *Escherichia coli* de origen intestinal. En la Tabla 3 se detallan las características más importantes de las cepas y su referencia.

Tabla 3. 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	<i>E. coli</i> Nissle 1917 serotipo (O6:K5:H1A1) Grupo B2, Probiótico	Ardeypharm, Alemania
ECOR12	Aislada natural de heces humanas serotipo (O7:H32), Grupo A	Ochman (1984)
ECOR51	Aislada natural de heces humanas serotipo (O25:HN), Grupo B2	Ochman (1984)
ECOR53	Aislada natural de heces humanas serotipo (O4:HN), Grupo B2	Ochman (1984)
ECOR56	Aislada natural de heces humanas serotipo (O6:H1), Grupo B2	Ochman (1984)
ECOR63	Aislada natural de heces humanas serotipo (ON:MN), Grupo B2	Ochman (1984)
EcN <i>tolR::cm</i>	Mutante <i>tolR</i> derivada de EcN	(Pérez-Cruz <i>et al.</i> , 2016)

3.2. LÍNEAS CELULARES

- **Caco-2:** Células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colón humano. American Type Culture Collection; ATCC HTB-37.
- **HT-29:** Células epiteliales derivadas de adenocarcinoma colorectal humano. American Type Culture Collection; ATCC HTB-38.
- **HT29-MTX:** Línea celular productora de mucina, derivada de la línea celular HT-29 por inducción de resistencia a metrotexato. Esta línea celular ha sido cedida por la Dra. Theclá Lesuffleur, Hospital Robertt Debré, Paris.

3.3. 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 en cada caso y salvo que se indique lo contrario, se siguieron los protocolos incluidos en ellos.

3.4. SOPORTE INFORMÁTICO

3.4.1. BASES DE DATOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- **SPSS (versión 22.0):** Es un programa estadístico informático que permite realizar análisis multivariados de datos recogidos para pruebas específicas de estadística dependiendo del sistema de módulos del SPSS.
- **Imagen J:** Es un programa de procesamiento de imagen digital, que permite analizar imágenes en multiprocesos. Adicionalmente mide el área y las estadísticas de valor de pixel y la intensidad de objetos umbral permitiendo crear histogramas de densidad y perfiles de línea.

En este contexto, para establecer la colocalización y los índices de solapamiento fueron empleados los siguientes plugins dentro del programa ImagenJ:

- *JACoP (Just Another Colocalization Plugin)*
- *Oval Profile Plot*
- *Colocalization*
- *RGB_Profiler*
- *Colocalization_Finder*
- *RG2B Colocalization*
- *Color Profiler*
- **SWISS-PROT:** Base de datos de proteínas que incluye información de su estructura tridimensional, función y modificaciones post-traduccionales, etc.

- **Proteome Discoverer™**: El software permite la identificación y cuantificación de proteínas y péptidos en muestras biológicas complejas. Es compatible con varios algoritmos de búsqueda en bases de datos (SEQUEST, Z-Core, Mascot, etc.).

4 MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

4.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Para el crecimiento de las cepas bacterianas, se han utilizado diferentes medios de cultivo, en función del tipo de experimento a realizar. En concreto se han utilizado medios clásicos para cultivos bacterianos, y medios para el crecimiento de células eucariotas.

Se utilizaron medios de cultivo líquidos y sólidos. Para los cultivos líquidos se usaron tubos de ensayo o matraces *Erlenmeyer*, en los que el volumen del cultivo ocupaba normalmente un 10% del volumen total del recipiente utilizado. En este caso, las cepas bacterianas se cultivaron siempre a una temperatura óptima según el experimento a realizar y en agitación constante a 250 rpm, en un agitador orbital. En los cultivos, el crecimiento bacteriano se siguió por medida de la absorbancia a 600 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV240. Para la preparación de los cultivos sólidos se adicionó al medio líquido 1,5% (p/v) de agar bacteriológico. Posteriormente, el medio se depositó en placas de Petri y el crecimiento se llevó a cabo en un incubador termostatzado a 37°C. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 30 minutos antes de su utilización.

Para el mantenimiento a largo plazo de las cepas bacterianas, éstas se cultivaron hasta fase exponencial en medio LB y se guardaron a -80°C en presencia de una concentración final de glicerol del 20%.

4.1.1.1 Composición de los medios de cultivo

De manera rutinaria, las cepas bacterianas se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) (Bertani, 2004). Se trata de un medio completo que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de cepas de *E.coli*, como son todas las utilizadas en este trabajo, por lo que no requiere la adición de fuentes de carbono o nitrógeno exógenas.

Medio LB (% p/v)	
Triptona	1,0
Extracto de levadura	0,5
NaCl	0,5

Según el experimento, las cepas bacterianas se crecieron en medios habituales para cultivo de células eucariotas como *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), en ausencia de suero y antibióticos. Ver la composición en el apartado MÉTODOS 4.2.1.

Para el crecimiento de la cepa EcN *tolR* al medio de cultivo se adicionó cloranfenicol a una concentración de 20 µg/ml.

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 CO₂.

Para el mantenimiento rutinario de las líneas celulares, estas se hicieron crecer en placas de 100 mm de diámetro. Cuando los cultivos alcanzaban un 80-90% de confluencia se procedía a su expansión. Para algunos ensayos en los que se requería la diferenciación celular, se utilizaron placas de diferente diámetro, según el ensayo a realizar. En este caso, cuando las células adherentes llegaban a confluencia, se procedía a renovar el medio de cultivo cada dos días durante 21 días.

Para ensayos de microscopía confocal de fluorescencia, las células se cultivaron en cámaras de 8 pocillos con fondo óptico y un diámetro de 9,4 mm (IBIDI).

Para el mantenimiento a largo plazo de las líneas celulares, estas se guardaron a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo y 10 % DMSO, congeladas mediante gradiente frío y posteriormente guardadas en nitrógeno líquido.

4.2.1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para el mantenimiento y diferenciación de las líneas celulares fueron los medios DMEM y DMEM GlutaMAX (GIBCO), suplementados tal como se describe en la tabla que se presenta a continuación.

MEDIO DMEM / DMEM GLUTAMAX	
Reactivo	ml
DMEM / DMEM GlutaMAX (Gibco)	500
Suero Fetal Bovino FBS (Gibco)	50
Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco)	5
Penicilina (100U/ml)-Estreptomicina (100µg/ml) (Gibco)	5
Hepes 1M (Gibco)	12,5

4.2.2. EXPANSIÓN DE CULTIVOS

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

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 las células con tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS).
3. Agregar 2 ml de la solución de tripsina e incubar a 37°C durante 5-10 minutos hasta que las células se despeguen 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 2×10^5 células y adicionar el volumen necesario de medio hasta obtener un volumen final de 10 ml totales.
6. Agitar la placa cuidadosamente para distribuir homogéneamente las células en la superficie.
7. Incubar las placas a 37°C, en atmosfera humidificada y con un 5% de CO₂, hasta que se alcance nuevamente la confluencia de 80-90%.

4.2.3. RECUENTO DE CÉLULAS

Para el recuento celular se utilizó un contador automático *Countes® Automated cell counter*. Este permite realizar recuentos de células viables después de mezclarlas con una solución de azul de tripano (*Trypan blue*).

Procedimiento:

1. Mezclar en un tubo tipo eppendorf, 10 µl de la suspensión celular con 10 µl del reactivo azul de tripano (0,4%).
2. Depositar 10 µl de la mezcla en el soporte de recuento.
3. Determinar la concentración de la población celular (células totales, células vivas y células muertas), siguiendo las instrucciones del fabricante.
4. Comprobar que la viabilidad celular sea superior al 90%.

4.2.4. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

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

Procedimiento:

1. Descongelar las células a 37°C y diluir el contenido del criotubo en medio de cultivo hasta un volumen de 10 ml.
2. Centrifugar inmediatamente a 1.200xg durante 3 minutos a 4°C, y eliminar el sobrenadante, que contiene DMSO.
3. Resuspender el sedimento celular en medio de cultivo.
4. Depositar en una placa o frasco medio completo y adicionar la suspensión celular.
5. Agitar cuidadosamente para distribuir homogéneamente las células en la superficie.
6. Incubar la placa a 37°C, durante 24 horas.
7. Cambiar el medio para retirar las células no viables y adicionar de nuevo medio de cultivo.
8. Incubar a 37°C hasta que se alcance una confluencia del 80-90%.

4.3. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA

Las vesículas de membrana externa (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 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. Centrifugar el cultivo a 10.000xg, 20 minutos a 4°C y reservar el sobrenadante, descartando las bacterias.
3. Filtrar el sobrenadante a través de filtros de 0,22 µm de poro para eliminar las bacterias residuales.
4. Concentrar los sobrenadantes hasta un volumen de 8 ml, mediante filtros concentradores (Centricon-plus70) con un límite de exclusión de 10.000 Daltons.

5. Ultracentrifugar los sobrenadantes concentrados a 100.000xg, durante 1 hora a 4°C.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento, que corresponde a la fracción de vesículas, en tampón PBS para volver a centrifugar.
7. Resuspender en PBS pH 7,2 la fracción de vesículas obtenidas y guardar a -20°C hasta su utilización.

La cuantificación de las vesículas obtenidas se realizó en base a la concentración de proteína, que fue determinada por el método de Lowry et al. (1951). Este método presenta un rango de linealidad de 20-200 µg/ml. Las determinaciones se hicieron por duplicado 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 diferenciaban de la media en más de un 10%.

4.3.1. OBSERVACIÓN DE VESÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para la visualización de las OMVs mediante esta técnica de microscopía es necesario realizar previamente una tinción negativa de las muestras. 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 unen a estructuras moleculares.

Procedimiento:

1. Preparar una rejilla con 15 µl de la muestra a observar y dejar secar.
2. Depositar 50 µl de H₂O, 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 electrónico de transmisión (TEM).

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Tecnai Spirit electron 160 (FEI Company, Netherlands) a un voltaje de aceleración de 120 kV del centro científico tecnológico de la UB.

Adicionalmente, la caracterización en detalle de las estructuras vesiculares fue llevado a cabo por el grupo de la Dra. Mercadé de la unidad de Microbiología de la Facultad de Farmacia aplicando técnicas de: (i) cryo-microscopía electrónica de transmisión (cryo-TEM) y (ii) TEM de muestras congeladas y fijadas a alta presión seguidas de criosustitución (HPF-FS) (Pérez-Cruz *et al.*, 2013; Pérez-Cruz *et al.*, 2015).

4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A OMVs POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las OMVs aisladas fueron analizadas por electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). 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 en un campo eléctrico hacia su ánodo.

En este trabajo se utilizó geles con un porcentaje de acrilamida del 10%. Para la preparación de los geles se empleó el *kit Mini PROTEAN® 3 Electrophoresis cell* (Bio-Rad). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente a un voltaje de 20 mA por cada gel de 0.75mm. Las bandas fueron visualizadas mediante tinción con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes) siguiendo el protocolo del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó *BENCHMARK™ Prestein Ladder* (Invitrogen) que abarca un intervalo de proteínas de masa molecular comprendida entre 10 y 220 kDa.

La composición de las soluciones utilizadas se muestra a continuación:

Gel apilador		Gel separador	
Tris-HCl pH 6.8	0,13M	Tris-HCl pH 8.9	0,375M
SDS	0,1%	SDS	0,1%
Acrilamida:Bisacrilamida (37.5:1)	4%	Acrilamida:Bisacrilamida (37.5:1)	10%
Persulfato amónico	0,16%	Persulfato amónico	0,08%
TEMED	0,075%(v/v)	TEMED	0,075%(v/v)

Tampón de carga para proteínas (4x)		Tampón de electroforesis	
Tris-HCl pH 6.8	0,25M	Tris-HCl pH 8.3	25mM
SDS	8%	Glicina	192mM
Glicerol	40%	SDS	0,1%
β- mercaptoetanol	20%		
Azul de Bromofenol	0,08%(v/v)		

Después de la electroforesis y la visualización de proteínas por tinción de Sypro®Ruby, las bandas diferenciales de proteínas entre las muestras fueron escindidas y analizadas en la plataforma de Proteómica en el *Parc Científic* de Barcelona para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas.

Digestión del gel:

Las bandas de interés fueron tratadas con un tampón de bicarbonato de amonio (25mM NH_4HCO_3) y acetonitrilo. A continuación, las muestras fueron sometidas a reducción (DTT 10mM; 30 minutos, 56°C) y alquilación (iodoacetamida 55mM; 15 minutos, 21°C, en oscuridad). Finalmente, las muestras se digirieron con tripsina porcina (Tripsina Gold, Promega; 80ng/muestra; O/N). Los péptidos fueron extraídos de la matriz del gel mediante ácido fórmico al 10% y acetonitrilo.

Análisis por LC-MS/MS

Los péptidos resultantes fueron analizados en un *NanoAcquity* (Waters) acoplado al espectrómetro de masas *LTQ-Orbitrap Velos* (Thermo Scientific). Los datos se adquirieron en formato de datos sin procesar utilizando el software Thermo Xcalibur (v.2.2). Se creó una base de datos fusionando las entradas de proteínas presentes en la base de datos pública *Swiss-Prot E. coli* (v. 10/10/2016) con una base de datos que contenía todas las entradas para *E. coli* Nissle 1917 de NCBI (v. 2016). Los archivos obtenidos en el análisis de espectrometría de masas se utilizaron para buscar en la base de datos descrita anteriormente. El software utilizado fue *Proteome Discoverer* (v.1.4.1.14) con *Sequest HT* como motor de búsqueda.

4.4. MARCAJE DE OMVs

Para monitorizar la fusión e internalización de las OMVs con las células epiteliales, su localización en compartimientos subcelulares o su interacción con receptores intracelulares, las OMVs se marcaron fluorescentemente siguiendo los protocolos que se detallan a continuación.

4.4.1. MARCAJE DE OMVs CON RODAMINA B-R18

Las vesículas se marcaron con Isotiocianato de Rodamina B-R18 (Molecular Probes), un fluoróforo que se apantalla cuando se intercala a alta concentración entre la bicapa lipídica de las OMVs y únicamente emite fluorescencia después de la fusión con la membrana celular.

Procedimiento:

1. Lavar las OMVs (200-300 μg) con PBS.
2. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.

3. Resuspender el sedimento en tampón de marcado (50 mM Na₂CO₃, 100mM NaCl, pH 9,2).
4. Incubar 1 hora a 25°C con rodamina B-R18 (1 mg/ml).
5. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.
6. Lavar con PBS (0,2 M NaCl).
7. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.
8. Resuspender las OMVs marcadas en PBS (0,2 M NaCl).
9. Guardar a 4°C hasta un máximo de 6 semanas.

4.4.2. MARCAJE DE OMVs CON BODIPY-FL

Las OMVs se marcaron con BODIPY-FL (Life Technologies), un fluoróforo que reconoce las estructuras tetrapeptidas del peptidoglicano.

Procedimiento:

1. Lavar las OMVs (200-300 µg) con PBS.
2. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.
3. Resuspender el sedimento en tampón PBS.
4. Incubar 30 minutos a 25°C con BODIPY-FL (4 ng/ml).
5. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.
6. Resuspender las OMVs marcadas en PBS (0,2 M NaCl).
7. Guardar a 4°C hasta un máximo de 6 semanas.

4.4.3. MARCAJE DE OMVs CON VYBRAN®DIO

Las OMVs se marcaron con Vybran®DIO 3,3-perclorato-octadecilo carbocyanine (Life Technologies), un fluoróforo altamente lipófilo que se intercala entre la membrana de las OMVs.

Procedimiento:

1. Lavar las OMVs (1mg/ml) con PBS.
2. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.
3. Resuspender el sedimento en 1 ml de tampón PBS que contiene Vybran®DIO (1%v/v).
4. Incubar 1 hora a 37°C.
5. Ultracentrifugar a 100.000xg durante 1 hora a 4°C.
6. Resuspender las OMVs marcadas en PBS (0,2 M NaCl).
7. Guardar a 4°C hasta un máximo de 4 semanas.

4.5. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL

Para determinar la entrada de vesículas a células epiteliales se utilizaron dos métodos: uno indirecto (espectrofluorimetría) que permitió cuantificar la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo de internalización de las OMVs y un método directo que permitió visualizar mediante técnicas de microscopía confocal de fluorescencia la localización intracelular de OMVs en la célula epitelial.

4.5.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA

La internalización de vesículas en líneas de epitelio intestinal fue cuantificada por medida de la fluorescencia emitida tras la incubación de estas células con vesículas marcadas con rodamina B-R18 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

Este método espectrofluorimétrico se utilizó fundamentalmente en el estudio de la internalización de OMVs y de su mecanismo de entrada, en el que se utilizaron inhibidores de diferentes vías endocíticas.

Procedimiento:

1. Cultivar las células hasta una confluencia de 80-90% o diferenciadas a 17 días según el experimento a realizar en placas de 96 pocillos con fondo óptico.
2. Lavar las células con PBS previamente a la realización del experimento.
3. Resuspender las OMVs marcadas con rodamina B-R18 en DMEM, sin suero fetal bovino (FBS) ni rojo fenol.
4. Incubar las células con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2µg/pocillo) a 37°C, en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
5. Medir cada 30 minutos la fluorescencia emitida a 575 nm en un equipo Modulus™ Microplate Fluorescence Reader (Turner BioSystems).

4.5.2. MICROSCOPÍA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Es una técnica directa de observación microscópica de procesos tisulares, celulares, subcelulares, estudios de localización de marcadores y monitorización de moléculas. Un sistema informático de digitalización de imágenes permite visualizar marcajes simultáneos para observar la distribución y relación entre las estructuras marcadas, mediante el uso de filtros de emisión y excitación.

Procedimiento:

1. Cultivar las células hasta una confluencia de 80-90% o diferenciadas a 17 días según el experimento a realizar en cámaras de 8 pocillos con fondo óptico.
2. Lavar las células con PBS previamente a la realización del experimento.
3. Resuspender las OMVs marcadas con rodamina B-R18, en DMEM sin FSB ni rojo fenol.
4. Incubar las células de 1 hasta 3 horas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2µg/pocillo) a 37°C, en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
5. Lavar con PBS.
6. Marcar la membrana plasmática de la célula con *wheat germ agglutinin* (WGA) Alexa-488 (Molecular Probes) a 1 µg/ml durante 25 minutos a 4°C.
7. Lavar con PBS.
8. Fijar las células con paraformaldehído al 3% durante 30 minutos a 25°C.
9. Lavar con PBS.
10. Marcar los núcleos con diclorato de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI – Sigma Aldrich) a 0,5 µg/ml durante 15 minutos a 25°C.
11. Lavar con PBS.
12. Agregar solución de montaje (PBS).
13. Visualizar las imágenes en un microscopio confocal con detección espectral Leica SPII usando un objetivo en aceite de inmersión de 63x.

Para determinar la vía de entrada de las OMVs a la célula epitelial, se emplearon diferentes inhibidores de las vías de endocitosis, que se detallan en la siguiente tabla.

	Inhibidor	Concentración
Vía balsas lipídicas	Filipina III	10 µg/ml
	Nistatina	10 µg/ml
Vía endocitosis mediada por clatrina	Clorpromazina	15 µg/ml
	Dynasore	80 mM

En los estudios con inhibidores se siguieron los protocolos anteriores, tanto para espectrofluorimetría como para microscopía confocal de fluorescencia, si bien en el punto 4 las células fueron incubadas durante 1 hora con los diferentes inhibidores previamente a la adición de las vesículas marcadas con rodamina B-R18.

4.6. ENSAYOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

4.6.1. ENSAYO DE EXCLUSIÓN POR AZUL DE TRIPANO

La prueba de exclusión por *Azul de tripano* se utilizó para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen colorantes tales como el *trypan blue*, mientras que las células muertas no lo hacen.

Procedimiento:

1. Sembrar en placas de 12 pocillos una suspensión celular de 1×10^4 células/ml.
2. Incubar 24 horas a 37°C en atmosfera humidificada y con un 5% de CO_2 .
3. Agregar vesículas (a una concentración final de $5 \mu\text{g/ml}$) e incubar durante 168 horas en las mismas condiciones. En intervalos de 2 días determinar la integridad de la membrana mediante el ensayo de exclusión por *trypan blue*.
4. Descartar el medio.
5. Lavar con PBS.
6. Despegar las células adheridas con tripsina/EDTA 0,05%.
7. Adicionar medio de cultivo.
8. Anadir 0,25 % p/v de la solución de *Azul de tripano* a las células.
9. Determinar la densidad celular de la suspensión usando un contador automático *Countes® Automated cell counter*.
10. Estimar el número de células totales, el número de células con y sin tinción azul, y la viabilidad celular.

Con los datos obtenidos se puede determinar: el porcentaje de viabilidad celular, el MPI (media del porcentaje del índice proliferativo), el PDL (nivel de duplicación poblacional) y el PDT (tiempo de duplicación poblacional).

$$\text{MPI} = \frac{\text{Número de células vivas tratadas con OMVs en cada pozo}}{\text{Número de células vivas del control en cada pozo}} \times 100$$

$$\text{PDL} = \log \frac{N1}{N0} \times 3.31$$

$$\text{PDT} = \frac{\text{CT}}{\log \left(\frac{N0}{N1} \right)} \times 3.31$$

Donde N_1 es el número de células al final del experimento, N_0 es el número de células al comienzo del experimento y CT es el tiempo de crecimiento celular.

4.6.2. ENSAYO DEL MTT

Este ensayo se basa en la reducción enzimática del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado de color azul (formazan). Este método, permite por tanto determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido utilizado para medir la supervivencia y la proliferación celular.

Procedimiento:

1. Sembrar placas de 96 pocillos con 100 μ l de una suspensión de 1×10^4 células/ml en cada pocillo.
2. Incubar 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada y 5% de CO₂.
3. Agregar vesículas (concentración final de 5 μ g/ml) e incubar durante 168 horas. A intervalos de 2 días determinar la funcionalidad mitocondrial mediante la reducción del MTT.
4. Descartar el medio.
5. Agregar MTT 0,25% (Sigma Aldrich).
6. Incubar 2 horas a 37°C.
7. Aspirar el MTT.
8. Añadir 100 μ l DMSO al 99%. Dejar el cultivo a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazan estén disueltos.
9. Leer la absorbancia a 570 nm en Modulus™ Microplate Fluorescence Reader (Turner BioSystems).
10. Determinar el porcentaje de viabilidad celular con las lecturas obtenidas utilizando la fórmula que se detalla a continuación.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia de las células tratadas con OMVs}}{\text{Absorbancia de las células control sin OMVs}} \times 100$$

4.7. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Es una técnica de inmunodetección que se basa en el uso de anticuerpos específicos conjugados a un fluoróforo. En nuestro caso esta técnica se utilizó en estudios de colocalización de vesículas con componentes celulares, con receptores intracelulares, y también en el análisis de los efectos *in vivo* de las OMVs sobre el DNA. Para la

determinación del daño en el DNA esta técnica se aplicó específicamente para la detección del 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-OXO-DG) y en la de la histona fosforilada H2AX.

A continuación, se detalla la información de los anticuerpos utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

Anticuerpos primarios	Concentración	Antígeno reconocido
Anti-E. coli LPS (<i>mouse monoclonal</i>)	5 µg/ml	Lipopolisacárido de OMVs
Anti-Clathrin (<i>mouse monoclonal</i>)	2,5 µg/ml	Clatrina
Anti-EEA-1 (<i>rabbit polyclonal</i>)	1 µg/ml	Endosomas
Anti-EEA-1 FITC (<i>mouse monoclonal</i>)	4 µg/ml	Endosomas
Anti-8-oxo-dG	1/200	Roturas de tipo 8-oxo-dG
Anti γH2AX	1/1000	Histona H2AX
Anti-NOD-1 (<i>rabbit monoclonal</i>)	1/200	Receptor intracelular NOD-1
Anticuerpos secundarios		
Goat anti-Mouse IgG Alexa-Fluor® 488 conjugate	1/400	
Goat anti-Mouse IgG Alexa-Fluor® 546 conjugate	1/400	
Goat anti-Rabbit IgG Alexa-Fluor® 488 conjugate	1/400	
Goat anti-Rabbit IgG Alexa-Fluor® 546 conjugate	1/400	
Goat anti-Rabbit IgG Alexa-Fluor® 647 conjugate	1/400	
Marcador de orgánulos		Orgánulo
LysoTracker® Green DND-26	300 nM	Lisosomas

En los ensayos microscopía confocal de fluorescencia para evidenciar la relación de la clatrina con el proceso de endocitosis dependiente de esta proteína, se utilizó Transferrina Alexa Fluor® 647, a una concentración final de 25 µg/ml, como control positivo de la implicación de este receptor en la CME.

4.7.1. LOCALIZACIÓN DE OMVS EN COMPARTIMENTOS CELULARES

En estos estudios se utilizaron anticuerpos primarios dirigidos contra proteínas específicas de los componentes intracelulares de interés y marcadores específicos de orgánulos celulares.

Procedimiento: Aplicado en el uso de OMVs marcadas con rodamina B-R18

1. Cultivar las células hasta una confluencia de 80-90% en cámaras de 8 pocillos con fondo óptico.
2. Lavar las células con PBS previamente a la realización del experimento.
3. Resuspender las OMVs marcadas con rodamina B-R18, en DMEM sin FSB ni rojo fenol.
4. Incubar las células de 1 a 3 horas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2µg/pocillo) a 37°C, en atmosfera humidificada y con un 5% de CO₂.
5. Lavar con PBS.
6. Fijar las células con paraformaldehído al 3% durante 30 minutos a 25°C.
7. Lavar con PBS.
8. Agregar solución de permeabilización (saponina 0,05% en PBS con glicina 20mM), 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar con PBS.
10. Adicionar solución de bloqueo (BSA 1% en PBS con glicina 20mM), 1 hora a temperatura ambiente.
11. Incubar el anticuerpo primario en solución de incubación (BSA 1%, saponina 0,025% en PBS con glicina 20mM), 1 hora a 37°C.
12. Lavar 3 veces con PBS.
13. Incubar el anticuerpo secundario en solución de incubación (BSA 1%, saponina 0,025% en PBS con glicina 20mM), 1 hora a 37°C.
14. Lavar 3 veces con PBS.
15. Marcar los núcleos con diclorato de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI – Sigma Aldrich) a 0,5 µg/ml durante 15 minutos a 25°C.
16. Lavar con PBS.
17. Agregar solución de montaje.
18. Visualizar las imágenes en un microscopio confocal con detección espectral Leica SPII usando objetivo de inmersión en aceite 63x.

Procedimiento: Aplicado en la inmunodetección de OMVs nativas con el anticuerpo anti-LPS de *E.coli*.

En los estudios empleando OMVs sin marcar, se siguió el protocolo anterior, con la excepción de los puntos que se indican a continuación:

4. Incubar las células de 1 a 3 horas con OMVs aisladas de medio de cultivo (5µg/pocillo) a 37°C, en atmosfera humidificada y con un 5% de CO₂.

11. En el paso correspondiente a la incubación con anticuerpos primarios, este se lleva a cabo de manera simultánea (todos los anticuerpos primarios) en solución de incubación (BSA 1%, saponina 0,025% en PBS con glicina 20mM), 1 hora a 37°C.
13. Posteriormente la incubación de los anticuerpos secundarios también es realizada de manera simultánea en solución de incubación (BSA 1%, saponina 0,025% en PBS con glicina 20mM), 1 hora a 37°C.

4.7.2. DETECCIÓN DE 8-OXO-2'-DEOXIGUANOSINA (8-OXO-DG) EN EL DNA

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente las especies reactivas generadas o reparar el daño resultante. Para determinar si las OMVs ejercen estrés oxidativo en células epiteliales se procedió a la inmunodetección del 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG). Estos aductos son generados generalmente por ataque de radicales hidroxilo sobre el DNA.

Procedimiento:

1. Sembrar en cámaras de 8 pocillos con fondo óptico una suspensión celular de 1×10^4 células/ml.
2. Incubar 24 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
3. Agregar vesículas a una concentración final de 5µg/ml, en presencia de gentamicina (200 µg/ml).
4. Incubar un máximo de 72 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂. Determinar la presencia del 8-oxo-dG a las 24, 48 y 72 horas.
5. Lavar las células con PBS previamente a la realización del experimento.
6. Fijar las células con paraformaldehído al 3% durante 30 minutos a 25°C.
7. Lavar con PBS.
8. Agregar solución de permeabilización (Triton®X-100 al 0,1% en PBS), 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar con PBS.
10. Adicionar solución de bloqueo (BSA de 5% en PBS), e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
11. Incubar el anticuerpo primario *anti-8-oxo-desoxiguanosina mouse monoclonal* (1/200) en solución de bloqueo durante 24 horas a 4°C.
12. Lavar 3 veces con PBS.
13. Incubar el anticuerpo secundario *Goat anti-Mouse IgG Alexa-Fluor® 488 conjugate* (1/400) en solución de bloqueo, 1 hora a 37°C.
14. Continuar según procedimiento detallado para el uso de OMVs marcadas con rodamina B-R18, pasos 14-18.

4.7.3. DETERMINACIÓN DE LA HISTONA γ H2AX

Las histonas son requeridas para la detención del control de la progresión del ciclo celular en respuesta a la reparación eficiente del DNA con roturas de dobles de cadenas “*double strand breaks*” (DSBs). Cuando se producen estas lesiones la histona H2AX es fosforilada (γ H2AX) y reclutada sobre los puntos de rotura. El efecto de las OMVs sobre la fosforilación de la H2AX se ha analizado mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo (MÉTODOS 4.8.1). Respecto a la determinación por inmunofluorescencia, se siguió el mismo procedimiento seguido para la determinación de los aductos de 8-oxo-dG. En este caso, el anticuerpo primario utilizado en el punto 11 fue el *Anti-gamma H2A.X rabbit polyclonal* a una dilución 1/1.000 (Abcam®) durante 16 horas a 4°C y el secundario (punto 13) el *Goat anti-Rabbit IgG Alexa-Fluor® 546 conjugate* (1/400) en solución de bloqueo.

4.8. CITOMETRÍA DE FLUJO

Es una técnica analítica que permite la clasificación de células según sus características morfológicas y la medida simultánea de varios parámetros de una misma partícula en presencia de biomarcadores, ya sea porque las partículas analizadas sean autofluorescentes o por que llevan incorporados determinados fluorocromos. Esta técnica se utilizó para cuantificar la internalización de OMVs en la célula huésped, para la inmunodetección de la histona fosforilada H2AX (γ H2AX) y en el análisis del ciclo celular de células incubadas con OMVs.

4.8.1. EN ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs

Procedimiento

1. Sembrar en placas de 6 pocillos una suspensión celular de 2×10^5 células/ml.
2. Incubar 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada y 5% de CO₂.
3. Agregar vesículas marcadas con DIO a una concentración final de 100µg/pocillo en presencia de gentamicina (200 µg/ml).
4. Incubar durante 2 y 4 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
5. Lavar las células tres veces con PBS frio.
6. Despegar las células adheridas con tripsina/EDTA 0,05%
7. Adicionar medio de cultivo.
8. Analizar mediante Citometro analizador CyAn (Beckman Coulter) la intensidad de fluorescencia.

9. Adicionar a la misma muestra 0,25% de *Azul de tripano* para apantallar la fluorescencia extracelular que corresponde a las OMVs asociadas a las células, pero no a las internalizadas.
10. Analizar nuevamente la intensidad de fluorescencia mediante citometría para diferenciar la fluorescencia asociada a la membrana celular de la fluorescencia internalizada.

4.8.2. EN LA INMUNODETECCIÓN DE LA HISTONA γ H2AX

Procedimiento

11. Sembrar en placas de 6 pocillos una suspensión celular de 1×10^4 células/ml.
12. Incubar 24 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
13. Agregar vesículas a una concentración final de 5µg/ml en presencia de gentamicina (200 µg/ml).
14. Incubar durante 48 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
Cuantificar la formación de γ H2AX a las 24 y 48 horas.
15. Lavar las células una vez con PBS frio.
16. Despegar las células adheridas con tripsina/EDTA 0,05%
17. Adicionar medio de cultivo.
18. Recoger las células por centrifugación a 1.500xg durante 5 minutos.
19. Resuspender el sedimento celular en 5 mililitros de PBS y etanol al 70% (1:9).
20. Centrifugar a 1.500xg durante 5 minutos.
21. Resuspender el sedimento celular en solución de permeabilización (Triton®X-100 al 0,1 %; Tween®20 al 0,05% en PBS) y RNAsa A (2 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.
22. Centrifugar a 600xg durante 3 minutos.
23. Descartar el sobrenadante.
24. Resuspender el sedimento celular en solución de bloqueo (BSA al 5% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
25. Centrifugar a 600xg durante 3 minutos.
26. Descartar el sobrenadante.
27. Incubar el sedimento celular con el anticuerpo primario *Anti-gamma H2A.X rabbit polyclonal* (1/1.000) en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C en agitación.
28. Centrifugar a 600xg durante 3 minutos.
29. Lavar 3 veces con PBS-Tween®20 al 0,05%.
30. Incubar el sedimento celular con el anticuerpo secundario *Goat anti-Rabbit IgG Alexa-Fluor® 546 conjugate* (1/1.200) en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C en agitación.
31. Centrifugar a 600xg durante 3 minutos.

32. Lavar 3 veces con PBS-Tween®20 al 0,05%
33. Adicionar PBS con yoduro de propidio (concentración final 5mg/ml).
34. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
35. Analizar mediante Citometro analizador Gallios (Beckman Coulter) la presencia de γ H2AX.

4.8.3. EN EL ANÁLISIS DE CICLO CELULAR

El ciclo celular es un conjunto ordenado de fases que conducen a la replicación del DNA y la división celular, evitando la creación de células con múltiples errores. En este estudio, el ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo. El procedimiento se describe a continuación.

Procedimiento:

1. Sembrar en placas de 6 pocillos una suspensión celular de 1×10^4 células/ml.
2. Incubar 24 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂.
3. Agregar vesículas a una concentración final de 5µg/ml e incubar un máximo de 72 horas. Determinar las fases del ciclo celular según el contenido cromosómico celular a diferentes intervalos de tiempo.
4. Lavar con PBS frio.
5. Despegar las células adheridas con tripsina al 0,05%.
6. Adicionar medio de cultivo.
7. Recoger las células por centrifugación a 1.000xg durante 3 minutos.
8. Resuspender el sedimento celular en 5 mililitros de PBS y etanol al 70% (1:9).
9. Centrifugar 1.500xg durante 3 minutos.
10. Resuspender el sedimento celular en PBS con RNAsa A (2 mg/ml) y 0,1% de Triton®X-100.
11. Adicionar PBS con yoduro de propidio (concentración final 5mg/ml).
12. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
13. Analizar mediante citometro analizador Coulter Epics XL.

4.9. ENSAYO DEL COMETA

El ensayo del cometa, conocido también como electroforesis Alcalina de Células Individuales, es una técnica que se utiliza para la detección de daño en el DNA causado por diferentes agentes químicos y físicos. El daño produce un aumento de fragmentos del DNA que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma similar a la cola de un cometa; estos fragmentos son generados por rupturas en el DNA. En nuestro caso se procedió a cultivar células que han sido tratadas *in vitro* con OMVs, durante

diferentes intervalos de tiempo, y posteriormente se evaluó el daño remanente a lo largo del tiempo mediante el ensayo del cometa, donde las células con DNA dañado presentan una mayor migración del DNA hacia el polo positivo, con respecto a las células normales.

4.9.1. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

SOLUCIONES	COMPOSICIÓN
Solución de electroforesis	Mezclar 5 ml de EDTA 0,2 M con 30 ml de NaOH 10 M. Completar hasta 1 l con agua destilada y ajustar a pH 13
Solución de lisis (Stock)	NaCl 2,5 M: 146,1 g EDTA 100 mM: 37,2 g Tris 10 mM: 1,2 g N-lauroyl-sarcosine: 10 g Completar hasta 1 l con agua destilada y ajustar a pH 10
Solución de lisis (trabajo)	Triton® X-100: 1 ml DMSO: 10 ml Completar hasta 100 ml con solución de lisis STOCK
Solución de neutralización	Tris 0,4 M: 48,5 g Completar hasta 1 l con agua destilada y ajustar a pH 7,5
Solución de tinción (20µg/ml)	Bromuro de etidío: 10 mg Agua destilada: 50 ml

4.9.2. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS

1. Limpiar los portaobjetos con etanol y marcarlos en uno de los extremos.
2. Sumergir los portaobjetos $\frac{3}{4}$ partes en agarosa de bajo punto de fusión (EEO) al 1,5% previamente fundida.
3. Mantener el portaobjetos en posición horizontal sin dejar gotear la agarosa.
4. Secar a temperatura ambiente durante algunas horas en posición horizontal.

4.9.3. TEST DEL COMETA

1. Preparar la solución de lisis (trabajo) 2 horas antes y mantenerla en la nevera a 4°C.
2. Fundir la agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% sin dejar hervir y mantener a 37°C.

3. Agregar 240 μ l de agarosa de bajo punto de fusión en un eppendorf.
4. Adicionar 40 μ l de la muestra (células) dentro del eppendorf que contiene la agarosa de bajo punto de fusión y homogenizar.
5. Agregar 25 μ l de la muestra (células + agarosa LMP) sobre el portaobjetos, previamente preparado con la agarosa EEO al 1,5%.
6. Solidificar 5 minutos a 4°C.
7. Sumergir el portaobjetos en solución de lisis (trabajo) durante 1 hora a 4°C.

4.9.4. ELECTROFORESIS

1. Preparar la solución de electroforesis y dejar 24 horas a 4°C.
2. Retirar el portaobjetos de la solución de lisis y colocarla en la cubeta de electroforesis, normalizando la posición.
3. Rellenar la cubeta con la solución de electroforesis hasta cubrir el portaobjetos.
4. Dejar el portaobjetos dentro de la cubeta con la solución de electroforesis durante 30 minutos.
5. Desarrollar la electroforesis durante 40 minutos a 4°C, regulando la fuente a 25 Volts – 300 mA.
6. Retirar el portaobjetos cuidadosamente y sumergirlo en solución de tampón neutralizante 5 minutos y luego 5 minutos fuera de la solución neutralizante (repetir dos veces este paso).
7. Secar a temperatura ambiente durante 1 hora.
8. Sumergir el portaobjetos en etanol 100% (fijación) durante 5 minutos.
9. Secar el portaobjetos a temperatura ambiente.
10. Añadir a la muestra 30 μ l de la solución de bromuro de etídio.
11. Cubrir cuidadosamente el portaobjetos con un cubreobjetos
12. Visualizar el DNA inmediatamente con un microscopio de fluorescencia Leica D1000 usando un objetivo de inmersión en aceite 63x.

4.10. *KNOCKDOWN* DE NOD-1 y NOD-2 EN CÉLULAS EUCARIOTAS MEDIANTE siRNA

La transfección es el proceso de inserción de pequeños fragmentos u oligonucleótidos cortos de DNA o RNA dentro de células eucariotas, utilizando métodos no virales. Generalmente, se lleva a cabo abriendo poros en la membrana plasmática de las células para permitir el paso del material genético.

Para el silenciamiento de la expresión de genes diana se utilizaron los siguientes siRNA frente a genes humanos (*small interfering RNA*): NOD-1 siRNA (sc-37279), NOD-2 siRNA (sc-43973) y Control siRNA-A (sc-37007), así como el reactivo de transfección (sc-29528)

y medio de transfección (sc-36868). Todos estos materiales fueron adquiridos de *Santa Cruz Biotechnologies*.

La línea celular Caco-2 fue transfectada siguiendo las instrucciones del fabricante que se describen a continuación.

Procedimiento:

1. Sembrar en placas de 12 pocillos una suspensión celular de 2×10^5 células/ml en medio normal de crecimiento, libre de antibiótico y suplementado con FBS.
2. Incubar 48 horas a 37°C , en atmosfera humidificada y 5% de CO_2 .
3. Preparar las siguientes soluciones para cada transfección:
 - Solución A: diluir 180 nM de siRNA en 50 μl de medio de transfección.
 - Solución B: diluir 6 μl de reactivo de transfección en 50 μl de medio de transfección.
4. Adicionar la dilución del siRNA (Solución A) directamente sobre la dilución del reactivo de transfección (Solución B), mezclar e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar las células con PBS.
6. Para cada transfección, adicionar 400 μl de medio de transfección que contiene la mezcla del siRNA y el reactivo de transfección (Solución A + Solución B).
7. Incubar durante 6 horas a 37°C , en atmosfera humidificada y 5% de CO_2 .
8. Agregar 1 ml de medio normal de crecimiento que contiene doble de concentración de FBS y antibióticos.
9. Incubar las células adicionalmente 24 horas a 37°C en las mismas condiciones.
10. Aspirar el medio y remplazarlo con medio de cultivo normal de crecimiento.
11. Incubar las células 24 horas a 37°C .
12. Aspirar el medio.
13. Agregar OMVs (concentración final 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia de gentamicina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubar durante 8 horas a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO_2 .
14. Guardar el sobrenadante y el sedimento celular a -80°C .

4.11. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA

4.11.1. OBTENCIÓN DE RNA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Para la obtención de RNA de células eucariotas se utilizó el kit *illustra™RNAspin Mini RNAIsolation Kit* (GE healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los materiales empleados en la obtención y manipulación del RNA eran libres de RNAsas.

La cuantificación del RNA obtenido se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop®), y su calidad se determinó mediante la relación A_{260}/A_{280} la cual permite detectar la existencia de posibles contaminaciones (DNA, proteínas).

Los tubos con RNA se conservaron a -80° para evitar su degradación. Antes de su utilización fueron descongelados lentamente en hielo.

4.11.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL RNA

La síntesis de la cadena de cDNA a partir de un molde de RNA se da por acción de la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Para la obtención de cDNA se utilizó *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (ThermoFisher Scientific). Todos los materiales empleados en la manipulación del RNA eran libres de RNAsas. La composición de la mezcla de reacción y el programa de retrotranscripción se detallan a continuación.

Reactivo	Volumen/reacción
<i>Buffer</i> 10X RT	2 μ l
dNTPs 100mM	0,8 μ l
<i>Random Primers</i> 10X	2 μ l
Transcriptasa 50U/ μ l	1 μ l
Inhibidor de RNAsa 200U/ μ l	1 μ l
H ₂ O	3,2 μ l
RNA	1 μ g

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4
Tiempo (minutos)	10	120	5	>10

4.11.3. PCR CUANTITATIVA

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es una técnica que tiene como finalidad monitorizar en tiempo real el progreso de una PCR convencional. El proceso se basa en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente. En este trabajo se utilizó SYBR Green (Applied Biosystems), un fluoróforo que se une al DNA de

doble cadena. La señal incrementa de manera proporcional a la cantidad de producto de PCR presente en la reacción en el momento que la molécula se intercala en la doble cadena de DNA.

La reacción de qPCR se llevó a cabo en un termociclador con capacidad de detección de fluorescencia *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life technologies), donde los volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados fueron los siguientes.

Reactivo/Reacción	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
2X SYBR Green PCR Master Mix	2X	10 µl	1X
Mezcla de cebadores (Oligonucleotido sentido y Oligonucleotido antisentido)	100 µM	1 µl	3 µM
cDNA	40 ng/µl	9 µl	18 ng/µl
Volume final		20 µl	
* El cDNA obtenido (1µg/µl) se diluye 25 veces en agua libre de DNasa.			

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1. 50 °C durante 2 minutos.
2. 95 °C durante 10 segundos.
3. 95 °C durante 15 segundos.
4. 62 °C durante 1 minuto
5. 40 ciclos (Paso 3 y 4).

Las secuencias de los oligonucleótidos sentido y anti-sentido utilizadas se muestran en la siguiente tabla.

Gen	Sentido (5`-3`)	Anti sentido (5`-3`)
NOD-1	TCCAAAGCCAAACAGAACTC	CAGCATCCAGATGAACGTG
NOD-2	GAAGTACATCCGCACCGAG	GACACCATCCATGAGAAGACAG
IL-8	CTGATTTCTGCAGCTTCGTG	GGGTGAAAGGTTTGGAGTATG
IL-6	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC	GCCTCTTGCTGCTTTCACAC
β-actina	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT	GCCACCGATCCACACGAGT

El método utilizado para determinar la expresión del gen de interés es el método comparativo de umbral o *cycle threshold* [*Comparative threshold (C_T) method (ΔΔC_T)*]. Al

finalizar la PCR cuantitativa se observa una curva de la fluorescencia obtenida respecto al ciclo de PCR. De esta curva se obtuvo el valor C_T (*cycle threshold*), que representa el ciclo en el cual la fluorescencia pasa el nivel umbral de detección. De esta manera, cuanto mayor sea la cantidad de cDNA de partida, más rápidamente se acumula el producto de PCR, obteniendo un valor C_T más bajo. La fluorescencia obtenida es normalizada automáticamente respecto a la fluorescencia de una referencia pasiva (6-carboxi-X-rodamina) presente en la mezcla de SYBR Green.

Para calcular el ΔC_T de cada muestra, el valor de C_T obtenido para el gen diana se normaliza con el valor de C_T de un gen normalizador. Como gen normalizador se utilizó el de β -actina. El valor de ΔC_T para cada muestra fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\Delta C_T = C_T(\text{gen diana}) - C_T(\text{gen normalizador})$$

Una de las muestras de la serie analizada es escogida como muestra de referencia (normalmente células control sin tratar) para efectuar la comparación con las demás muestras, obteniendo así el valor $\Delta\Delta C_T$.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{muestra X}) - \Delta C_T(\text{muestra de referencia})$$

Por último, los datos fueron transformados a valores absolutos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de expresión} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

La eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos fue testada mediante la generación de curvas estándar con los valores de expresión correspondientes a diluciones consecutivas de una muestra de cDNA de referencia.

4.12. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

El ensayo de ELISA se llevó a cabo en placas de alta capacidad de unión (Maxisorp, NUNC). Esta técnica se utilizó para determinar la interleuquina humana IL-6 (OptEIA human IL-6, no. 555220; Becton Dickinson) y la interleuquina humana IL-8 (OptEIA human IL-8, no. 555244; Becton Dickinson) a partir de sobrenadantes de células Caco-2 tratadas con OMVs. Las concentraciones fueron calculadas con el estándar humano recombinante para IL-6 e IL-8 y siguiendo las instrucciones del fabricante que se describen a continuación.

Procedimiento:

1. Agregar a cada pocillo 100 μ l de anticuerpo de captura diluido en *Coating Buffer* (0.1 M de Na_2CO_3 pH 9,5) e incubar durante 18 horas a 4°C.
2. Aspirar y lavar 3 veces con PBS- Tween® 20 al 0.05%.
3. Bloquear con 200 μ l de *Assay Diluent* (Cat. No.555213) por pocillo e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Aspirar y lavar 3 veces con PBS- Tween® 20 al 0.05%.
5. Agregar 100 μ l del estándar o de las muestras en cada pocillo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Aspirar y lavar 5 veces con PBS- Tween® 20 al 0.05%.
7. Agregar 100 μ l de *Working Detector* (anticuerpo de detección + Sav-HRP) en cada pocillo e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Aspirar y lavar 7 veces con PBS- Tween® 20 al 0.05%.
9. Agregar 100 μ l de *Substrate Solution* (Cat. No.555214) en cada pocillo e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
10. Agregar 50 μ l de *Stop Solution* (H_2SO_4 al 2N) en cada pocillo.
11. Leer la absorbancia 450 nm con Modulus™ Microplate Absorbance Reader (Turner BioSystems).

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. INTERNALIZACIÓN DE OMVs EN LÍNEAS CELULARES DE EPITELIO INTESTINAL

La captación de OMVs de bacterias Gram-negativas por células del epitelio intestinal está mediada principalmente por endocitosis. Este proceso implica la invaginación de la membrana celular, y se lleva a cabo a través de diferentes vías dependiendo de la composición y la carga de las vesículas. Numerosos estudios realizados con vesículas de microorganismos patógenos han demostrado que las OMVs son internalizadas por la célula huésped y contribuyen a la virulencia mediante la liberación de factores citotóxicos y mediadores diversos que interfieren con el sistema inmune (Kulkarni and Jagannadham, 2014b; Schwechheimer, Kulp and Kuehn, 2014). Si bien las vesículas liberadas por componentes de la microbiota se perciben como actores clave en la maduración del sistema inmune y en los procesos de señalización en la mucosa intestinal, las aportaciones en este campo son todavía escasas.

5.1.1. LAS OMVs DE CEPAS PROBIÓTICAS Y COMENSALES DE *E. coli* SON INTERNALIZADAS EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL HT-29

En primer lugar, y como punto de partida de este estudio, nos propusimos llevar a cabo estudios de internalización de OMVs aisladas de cultivos en LB de las cepas EcN y ECOR12. Como modelo de células de epitelio se utilizó la línea celular HT-29. La internalización de OMVs fue analizada mediante ensayos de espectrofluorimetría y microscopía confocal de fluorescencia. Para ello, células HT-29 crecidas a confluencia en placas de 96 pocillos fueron incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2 µg/pocillo). La internalización de las OMVs fue monitorizada a lo largo del tiempo mediante la medida de la fluorescencia emitida por las OMVs marcadas durante su entrada al interior de la célula epitelial. En paralelo, se analizó como control la fluorescencia emitida por células HT-29 no tratadas y la fluorescencia basal de las OMVs marcadas en ausencia de células epiteliales. Para cada lectura, la intensidad de fluorescencia de las muestras fue normalizada en base a la fluorescencia basal de las OMVs marcadas. Las incubaciones con OMVs, tanto aisladas del probiótico EcN como de la cepa comensal ECOR12, mostraron un incremento en la intensidad de la fluorescencia emitida, proporcional al tiempo de incubación, mientras que no se observaron cambios significativos en la fluorescencia basal emitida por las OMVs marcadas con rodamina B-

R18 ni en la de las células epiteliales control (Figura 15). Estos resultados indican que las OMVs de EcN y ECOR12 son internalizadas en células HT-29.

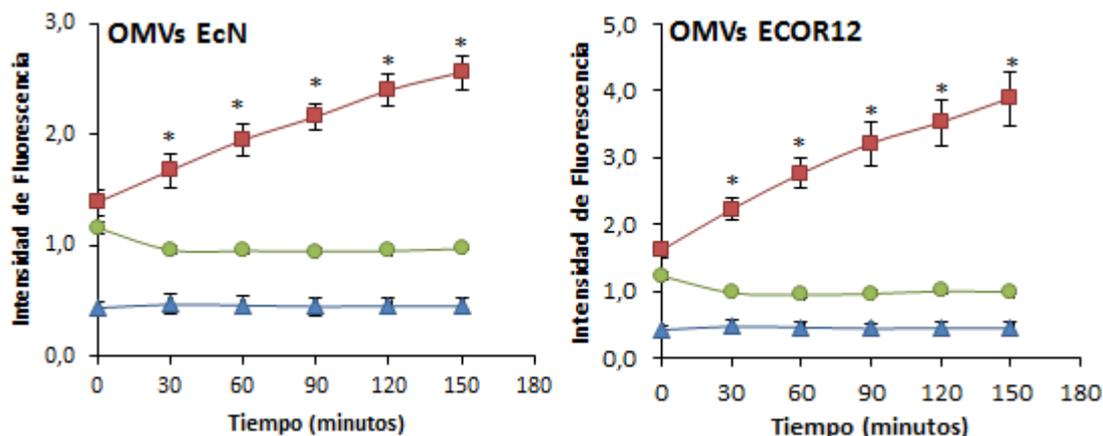


Figura 15. Cinética de incorporación de las OMVs de EcN y ECOR12 en células HT-29. Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs (2 μ g/pocillo) de EcN y ECOR12 marcadas con rodamin B-R18 (en rojo), y la fluorescencia emitida fue medida a lo largo del tiempo de incubación a diferentes intervalos. Las OMVs (en verde) y las células epiteliales (en azul) fueron analizadas en paralelo como control. Para cada medida, la intensidad de fluorescencia fue normalizada respecto a la fluorescencia basal de las OMVs marcadas en ausencia de células. Los valores se presentan como la media \pm error estándar de 5 ensayos independientes. *, $P < 0,006$, células incubadas con OMVs versus la fluorescencia basal emitida por las OMVs marcadas.

La internalización de OMVs en células HT-29 fue confirmada mediante microscopía confocal de fluorescencia. En este caso, las células HT-29 fueron incubadas con OMVs marcadas con rodamin B-R18 (2 μ g/pocillo) durante 1 y 3 horas a 37°C y a 4°C. Para poder determinar la localización citoplasmática de las OMVs internalizadas, las células epiteliales se fijaron y la membrana celular y el núcleo se marcaron con WGA y DAPI respectivamente. Los resultados muestran la presencia de fluorescencia roja en el citoplasma celular, indicativa de la fusión e internalización de las OMVs marcadas con rodamin B-R18 al cabo de 1 y 3 horas de incubación a 37°C con ambos tipos de vesículas (Figura 16, A). La ausencia de fluorescencia roja a nivel citoplasmático en células HT-29 incubadas con ambas vesículas bacterianas a 4°C indica que el proceso de internalización es dependiente de temperatura.

Por último, la localización intracelular de las OMVs en células HT-29 fue validada mediante un marcaje alternativo. En este caso, las células HT-29 fueron incubadas con preparaciones de OMVs sin marcar (2 μ g/pocillo). Al cabo de 1 y 3 horas, las vesículas internalizadas fueron inmunodetectadas con anticuerpos anti-LPS de *E. coli* seguido de un anticuerpo secundario Alexa-Fluor® 546. Adicionalmente se marcó la membrana plasmática y el núcleo celular. Las imágenes de inmunofluorescencia adquiridas

mediante microscopía confocal de fluorescencia, mostraron la presencia de OMVs de EcN y ECOR12 en el citoplasma celular (Figura 16, B).

Estos resultados son coincidentes con los datos obtenidos de la cinética de internalización y del análisis mediante microscopía de fluorescencia realizados con vesículas marcadas con rodamina B-R18.

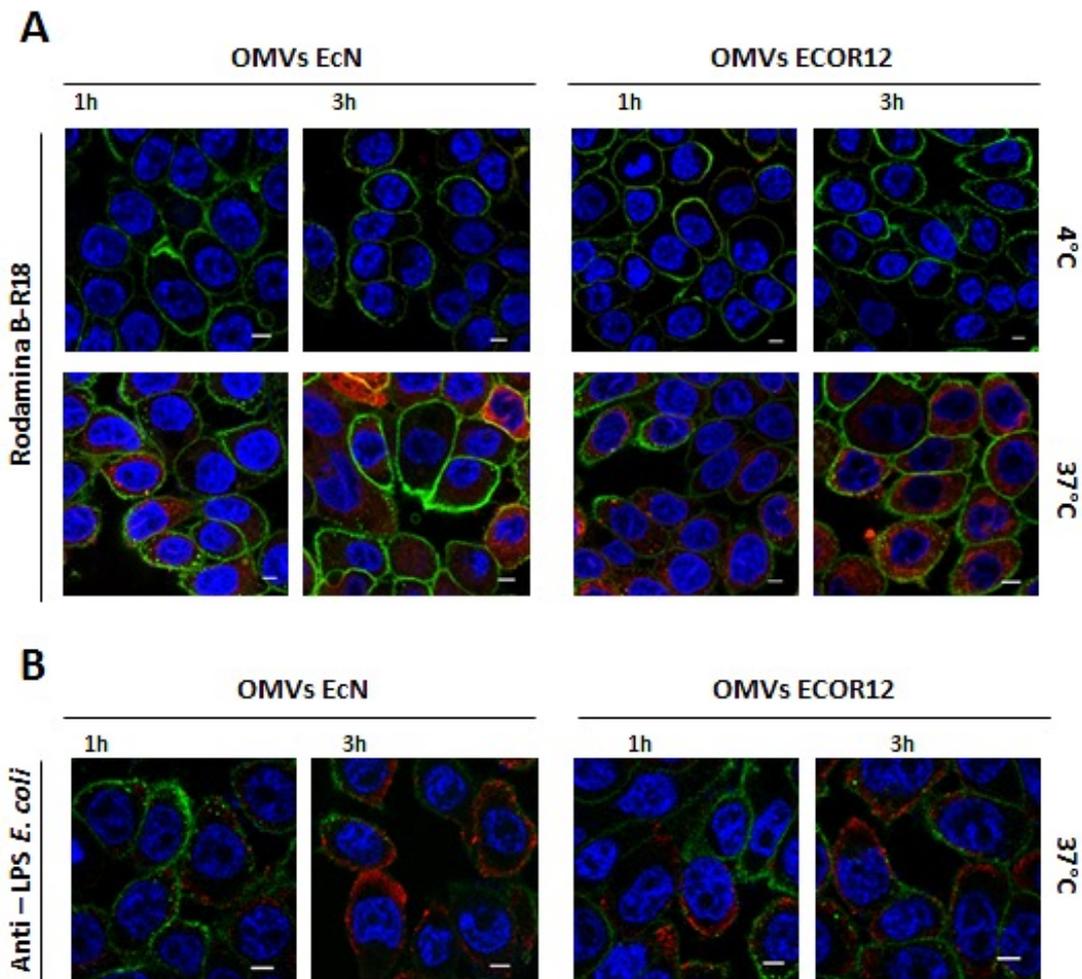


Figura 16. Visualización de la internalización de OMVs de EcN y ECOR12 mediante microscopía confocal de fluorescencia. (A) Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs de EcN y ECOR12 marcadas con rodamina B-R18 (2 μg /pocillo) durante 1 y 3 h a 4°C y 37°C respectivamente. Las OMVs se visualizan en rojo. **(B)** las vesículas (2 μg /pocillo) se adicionaron sin marcar y se procedió a su inmunodetección con anticuerpos anti-LPS de *E. coli* y un anticuerpo secundario Alexa Fluor-546. Se presentan las imágenes de uno de los planos x-y adquiridas mediante microscopía confocal de fluorescencia. En ambos casos la membrana celular fue marcada con WGA (verde) y el núcleo con DAPI (azul). La línea blanca indica la escala de 20 μm .

5.1.2. LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 SON INTERNALIZADAS MEDIANTE ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA

El mecanismo de internalización de las OMVs para acceder a la célula huésped depende de la cepa que las produce y de las proteínas asociadas a ellas. Se ha descrito que las vesículas liberadas por determinadas cepas de *E. coli* patógenas son internalizadas en la célula huésped mediante procesos de endocitosis, entre los que se consideran principalmente, la endocitosis dependiente de clatrina (CME), o procesos de endocitosis asociados a balsas lipídicas (*lipid rafts*) que pueden depender o no de caveolina.

Para analizar la vía de endocitosis implicada en la entrada de las OMVs de EcN o ECOR12, realizamos ensayos en presencia de inhibidores farmacológicos específicos de las vías de endocitosis. Se utilizaron filipina III (10 µg/ml) y nistatina (10 µg/ml) como inhibidores de la endocitosis a través de *lipid raft*, y dynasore (80 nM) y clorpromazina (15 µg/ml) como inhibidores de la CME. Aunque el mecanismo de acción concreto no es del todo conocido, los compuestos filipina y nistatina alteran la composición lipídica de la membrana interfiriendo con algunos esteroides de la misma, mientras clorpromazina y dynasore inhiben el ensamblaje del trisquelión de clatrina y la función de la dinamina, respectivamente (Macia et al. 2006; Wang, Rothberg, and Anderson 1993). Para analizar la vía de internalización, las células HT-29 se trataron con cada uno de los inhibidores anteriormente mencionados durante 60 minutos previamente a la adición de las OMVs marcadas con rodamina B-R18. La internalización de las vesículas se analizó mediante espectrofluorimetría, midiendo la fluorescencia emitida a diferentes intervalos hasta un máximo de 150 minutos desde el momento de la incorporación de las OMVs a las células. Como se observa en la Figura 17, los tratamientos con clorpromazina y dynasore provocaron una disminución significativa en la entrada de OMVs en la célula huésped en comparación con los tratamientos con filipina III y nistatina, los cuales no mostraron cambios significativos en la fluorescencia emitida respecto a células no pre-tratadas con los inhibidores. Como era de esperar no se observó incremento de fluorescencia con el tiempo en los controles correspondientes a las OMVs marcadas y a las células HT-29 en ausencia de OMVs. En general estos resultados indican que las OMVs de la cepa probiótica EcN y de la cepa comensal ECOR12 son internalizadas en células HT-29 vía endocitosis mediada por clatrina.

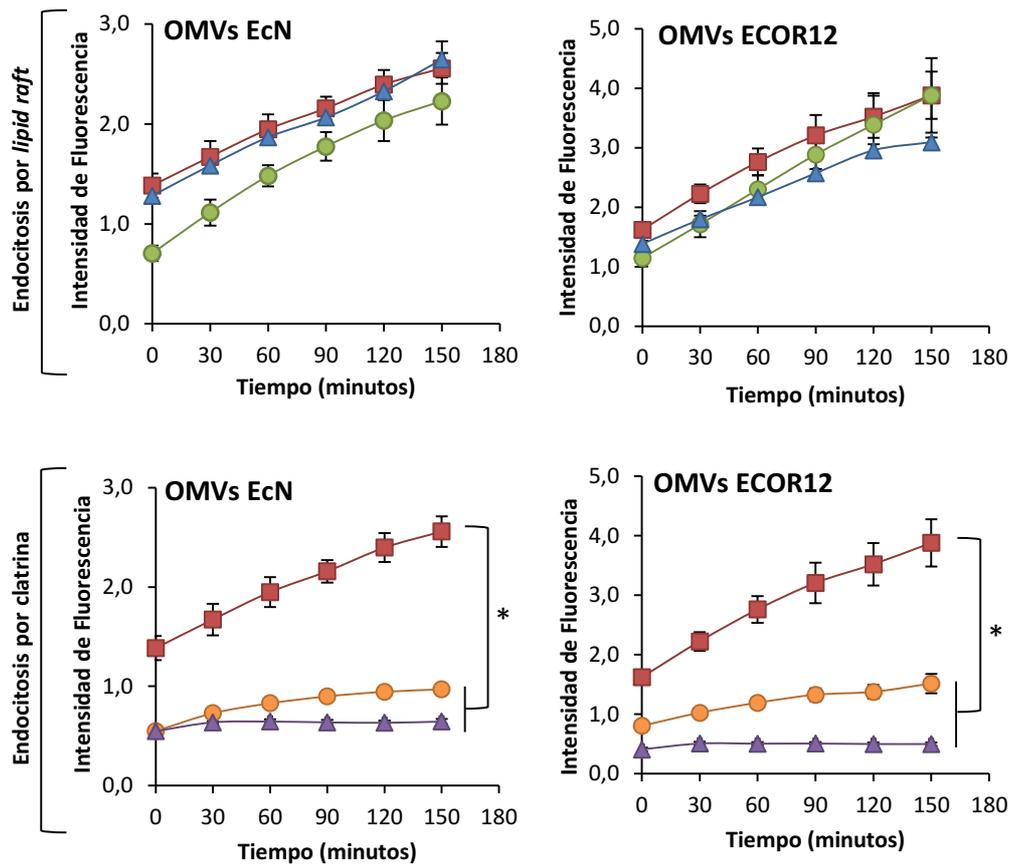


Figura 17. Análisis de la vía de internalización de OMVs de EcN y ECOR12 en células HT-29. Las células HT-29 fueron pre-incubadas durante 1 h a 37°C con los inhibidores de la vía de la clatrina, clorpromazina a una concentración final de 15 $\mu\text{g/ml}$ (en naranja) o dynasore a 80 μM (en lila), y con los inhibidores de *lipid raft*, filipina III a 10 $\mu\text{g/ml}$ (en verde) o nistatina a 10 $\mu\text{g/ml}$ (en azul) antes de la adición de OMVs de EcN y ECOR12 marcadas con rodamina B-R18. La fluorescencia emitida fue medida a lo largo del tiempo. Las células incubadas con OMVs en ausencia de inhibidores fueron analizadas en paralelo y la intensidad de fluorescencia fue normalizada en los diferentes puntos con la fluorescencia basal de las OMVs en ausencia de células. Los valores se presentan como la media \pm error estándar de 5 ensayos independientes. *, $P < 0,012$, células incubadas con OMVs en presencia de inhibidores (clorpromazina) *versus* células incubadas con OMVs en ausencia de inhibidores.

Para corroborar estos resultados, analizamos en paralelo mediante microscopía confocal de fluorescencia la internalización de OMVs en presencia de un inhibidor de cada vía de endocitosis, en concreto filipina III y clorpromazina. El tratamiento y las incubaciones se realizaron en las condiciones anteriormente descritas. Después de 1 h de incubación con OMVs, las células se fijaron y la membrana celular y el núcleo se marcaron con WGA y DAPI respectivamente. El análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia mostró internalización de las OMVs de EcN y ECOR12 en células HT-29 previamente tratadas con filipina III, pero no en células pre-tratadas con clorpromazina (Figura 18). Estos resultados confirman que la vía implicada en la entrada de las OMVs de ambas cepas a las células epiteliales HT-29 es la vía de endocitosis dependiente de clatrina.

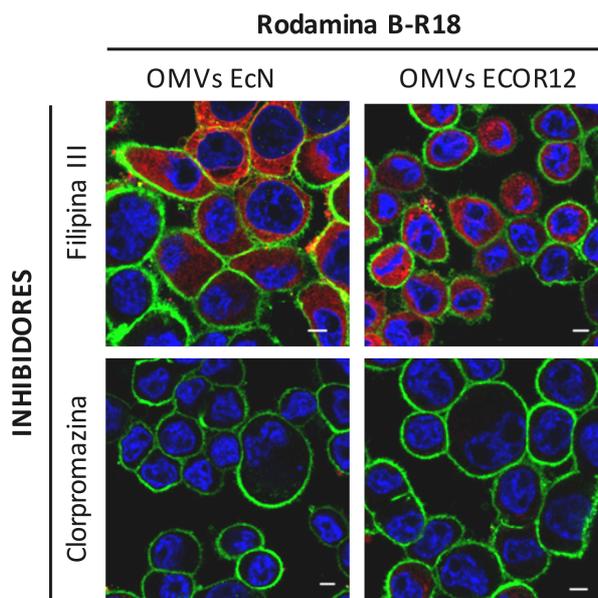


Figura 18. Análisis de la vía de internalización de las OMVs de EcN y ECOR12 mediante microscopía confocal de fluorescencia. Las células HT-29 fueron pre-incubadas con clorpromazina o filipina III durante 1 hora a 37°C antes de la adición de OMVs de EcN y ECOR12 marcadas con rodamina B-R18 (2 µg/pocillo). Después de 1 h de incubación, la membrana celular fue marcada con WGA (verde) y el núcleo con DAPI (azul). La internalización de OMVs se visualiza en rojo. Se presentan las imágenes de uno de los planos x-y, adquirida mediante microscopía confocal de fluorescencia.

Para un análisis más detallado de esta vía de internalización, analizamos la colocalización de las OMVs de EcN y ECOR12 con la clatrina, proteína esencial en el proceso de internalización vía CME. Las células HT-29 crecidas a confluencia fueron incubadas durante 15 minutos con las OMVs marcadas con rodamina B-R18, o con transferrina conjugada Alexa-fluor 647 como control positivo de esta vía endocítica. Las células se fijaron e incubaron con el anticuerpo anti-clatrina y la visualización de la colocalización de las OMVs (rojo) o de la transferrina (rojo) con clatrina (verde) se observó mediante microscopía confocal de fluorescencia (Figura 19). Las imágenes de colocalización mostraron diversos puntos de solapamiento entre ambos marcajes (OMVs y clatrina, o transferrina y clatrina) visualizándose puntos amarillos. El perfil de colocalización y la convergencia de los fluoróforos en una región seleccionada se analizaron mediante un histograma de frecuencias. Los valores para el coeficiente de solapamiento (R) de las OMVs marcadas con rodamina B-R18 o de la transferrina-Alexa fluor-649 con la clatrina fue calculado a partir de los datos obtenidos de 4 ensayos independientes. En todos los casos el número de células analizadas fue entre 100-120. Los valores obtenidos fueron de $0,71 \pm 0,07$ para las OMVs de EcN y de $0,603 \pm 0,025$ para las OMVs de ECOR12. Estos coeficientes son similares al del control positivo de transferrina ($r = 0,556 \pm 0,028$). Estos resultados demuestran un alto grado de colocalización de las OMVs con la clatrina, proteína que permite el transporte transcelular de manera específica.

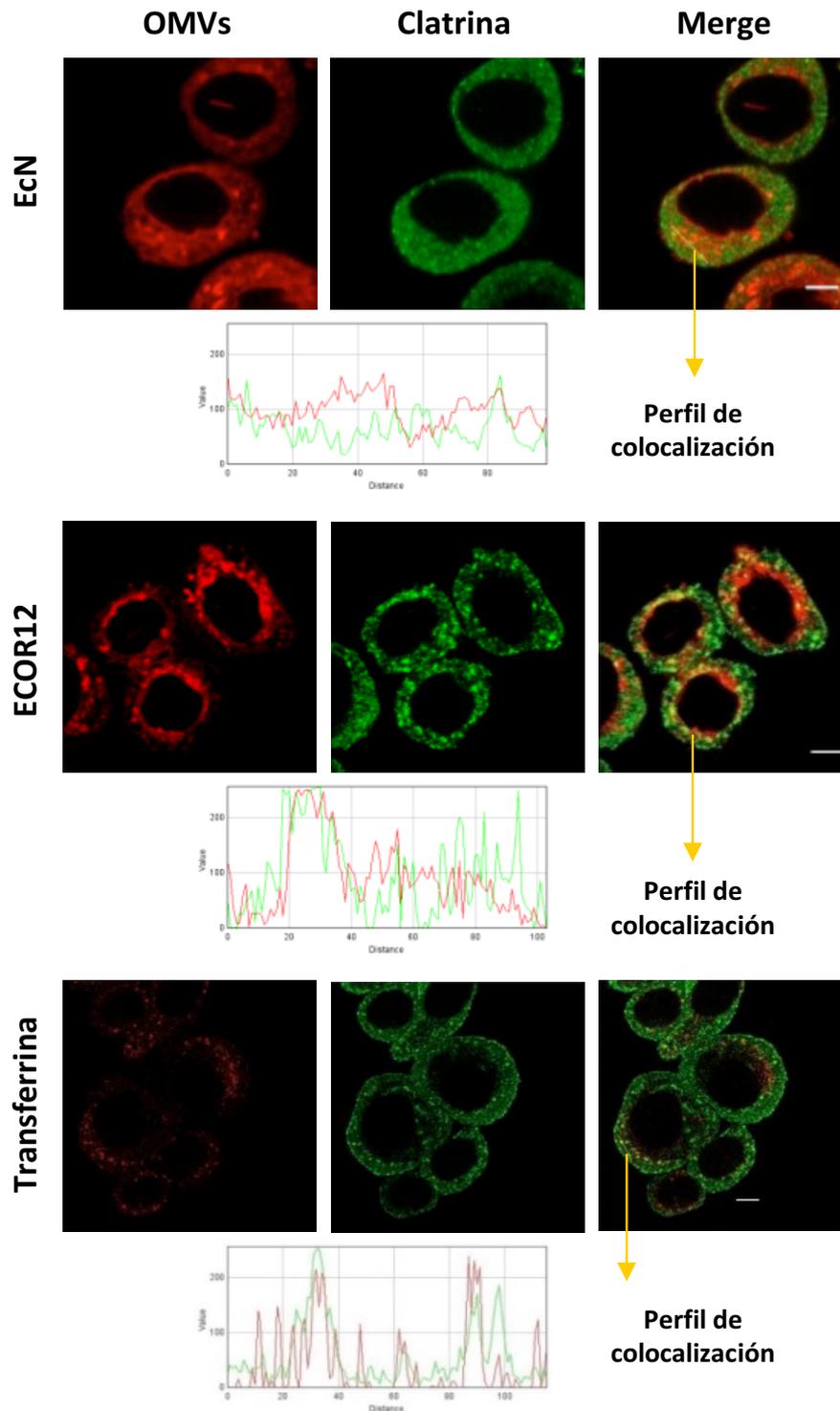


Figura 19. Colocalización de OMVs de EcN y ECOR12 con clatrina en células HT-29. Las células HT-29 (70-80% de confluencia) fueron incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2 μ g) o transferrina Alexa fluor-649 (5 μ g/ml) durante 15 minutos a 37°C. La clatrina fue inmunodetectada con un anticuerpo monoclonal anti-clatrina seguido de un anticuerpo secundario Alexa fluor 488. Las imágenes muestran la representación de los planos z tomados en el eje x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=4). Los puntos amarillos representan el solapamiento de ambos marcajes y el histograma de intensidades representa la dispersión en un plano de los marcajes (línea amarilla).

5.1.3. INTERNALIZACION DE OMVs DE EcN Y ECOR12 EN LINEAS CELULARES DIFERENCIADAS.

A continuación, nos propusimos estudiar si la vía internalización de OMVs puede depender del grado de diferenciación celular. Para ello, se cultivaron células HT29-MTX y Caco-2 diferenciadas (17 días post-confluencia) en placas de 96 pocillos. Para realizar los ensayos de cinética de captación de vesículas, las células Caco-2 o HT29-MTX fueron incubadas con OMVs de EcN o ECOR12 marcadas con rodamina B-R18 a una concentración final de 2 µg/pocillo. La adición de las vesículas se realizó en la parte apical de la monocapa celular. En paralelo, se llevaron a cabo ensayos en presencia de inhibidores farmacológicos de las vías endocíticas (filipina III y clorpromazina) para la evaluación del mecanismo de entrada de OMVs en las células diferenciadas. Desde la adición de las OMVs, la emisión de la fluorescencia fue medida durante 150 minutos en un lector de placas, manteniendo las condiciones de temperatura necesarias para los procesos de endocitosis. El conjunto de resultados obtenidos muestra un incremento significativo de la emisión de fluorescencia por parte de las células incubadas con las OMVs marcadas, lo que confirma la internalización de las vesículas de ambas cepas en células epiteliales diferenciadas a lo largo del tiempo. No se observó cambios en la emisión de fluorescencia en las muestras control que contenían solamente OMVs marcadas o células epiteliales (Figura 20). En línea con estos resultados, en la misma figura se muestra la internalización de OMVs de EcN y ECOR12 en presencia de los inhibidores filipina III o clorpromazina. Los resultados muestran como la entrada de OMVs a células diferenciadas no se ve afectada por filipina III, pero si por clorpromazina, observando en este último caso una reducción significativa de la internalización de OMVs en ambas líneas celulares, Caco-2 (Figura 20, A), y HT-29-MTX (Figura 20, B).

En base a todos estos datos, podemos concluir que la vía de internalización de las OMVs de EcN y ECOR12 en células epiteliales intestinales no depende de manera específica del grado de diferenciación celular. Además, puesto que las células HT29-MTX diferenciadas son productoras de mucina, estos resultados demuestran la capacidad de las OMVs de difundir a través de la capa de mucina que recubre la superficie de la monocapa epitelial.

Esto sugiere que *in vivo*, las OMVs liberadas por la microbiota intestinal pueden atravesar la capa de mucus del tracto gastrointestinal y acceder a las células epiteliales, en las que pueden activar diferentes vías de señalización a través de su interacción con receptores celulares diversos.

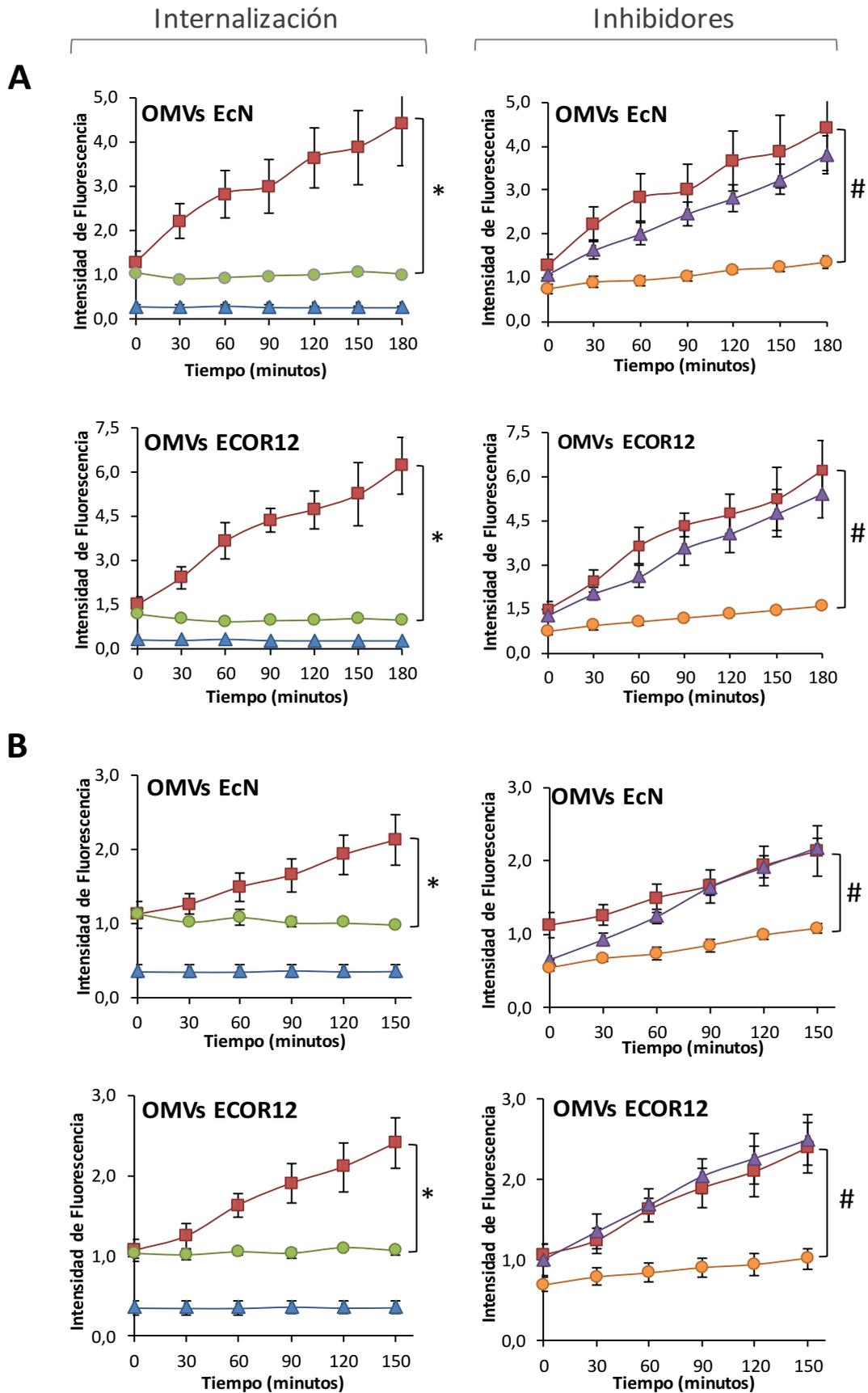


Figura 20. Mecanismos de internalización de OMVs de EcN y ECOR12 en células diferenciadas. (A) En células Caco-2 (B) En células HT29-MTX. Las células diferenciadas (17 días post confluencia) fueron pre-

incubadas con clorpromazina (inhibidor de la vía CME) a una concentración final de 15 µg/ml (círculos naranjas) o con filipina III (inhibidor de la vía dependiente de caveolas) a 10 µg/ml (triángulos lila) durante 1 h a 37° antes de la adicción de las OMVs (2 µg) marcadas con rodamina B-R18 (cuadros rojos). La fluorescencia fue medida a lo largo del tiempo. Las OMVs solas (círculos verdes) y las células en ausencia de OMVs (triángulos azules) fueron analizadas en paralelo y la intensidad de fluorescencia fue normalizada con la fluorescencia basal emitida por OMVs marcadas en ausencia de células en los diferentes intervalos de tiempos de tiempo. Los datos se presentan como la media ± error estándar de 3 ensayos independientes. *, $P < 0,003$, células incubadas con OMVs *versus* la fluorescencia basal emitida por las OMVs marcadas. #, $P < 0,003$, células incubadas con OMVs en presencia de inhibidores (clorpromazina) *versus* células incubadas con OMVs en ausencia de inhibidores.

5.1.4. INTERNALIZACION DE OMVs DE OTRAS CEPAS DE *E. COLI* DE ORIGEN INTESTINAL

Las cepas de *E. coli* pueden ser asignadas a uno de los cuatro principales grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Estos cuatro grupos codifican enzimas para la expresión de factores de virulencia en la bacteria (Duriez *et al.*, 2001; Soto, 2006). Las cepas de los grupos B2 y D presentan más genes de virulencia que las cepas de los grupos A y B1. Por ello, nos planteamos analizar si la relación filogenética dentro de algunas de las especies comensales de *E. coli* y la expresión de factores de virulencia establece una relación o diferencia en el mecanismo de internalización de las vesículas en la célula de epitelio intestinal. Con este fin, se llevaron a cabo estudios de internalización de vesículas de las cepas comensales de la colección ECOR (Ochman and Selander, 1984), tales como ECOR51, ECOR53, ECOR56 y ECOR63, todas ellas pertenecientes al grupo B2, al igual que la cepa probiótica EcN. Las OMVs de estas cepas fueron aisladas y marcadas con rodamina B-R18. Tras la adición de las OMVs marcadas (2 µg/pocillo) a células HT-29 crecidas al 80% de confluencia, la intensidad de la fluorescencia emitida fue medida en un espectrofluorímetro en función del tiempo. En todos los casos se observó un incremento de fluorescencia indicativo de la internalización de las OMVs, mientras que los controles (OMVs solas o células HT-29 sin tratar) no mostraron cambios en la emisión de fluorescencia (Figura 21, A). Una vez demostrado que las OMVs de estas cepas son internalizadas, analizamos la internalización en presencia de inhibidores específicos de las vías de endocitosis anteriormente descritas (clorpromazina y filipina III). Los resultados presentados en la Figura 21, B mostraron que las OMVs de ECOR63 tienen un proceso de internalización similar a la cepa probiótica EcN y a la comensal ECOR12, siendo la CME la principal vía de entrada al interior celular, ya que la emisión de fluorescencia acoplada a la internalización sólo fue significativamente inhibida por clorpromazina. Los datos obtenidos en los ensayos llevados a cabo con las OMVs de las cepas ECOR51, ECOR53 y ECOR56 no mostraron un patrón claro y concreto respecto a la vía de internalización. En estos casos se observó una reducción significativa de la fluorescencia emitida con ambos tipos de inhibidores, lo que indicaría que posiblemente estén implicadas diversas vías endocíticas (Figura 21, B).

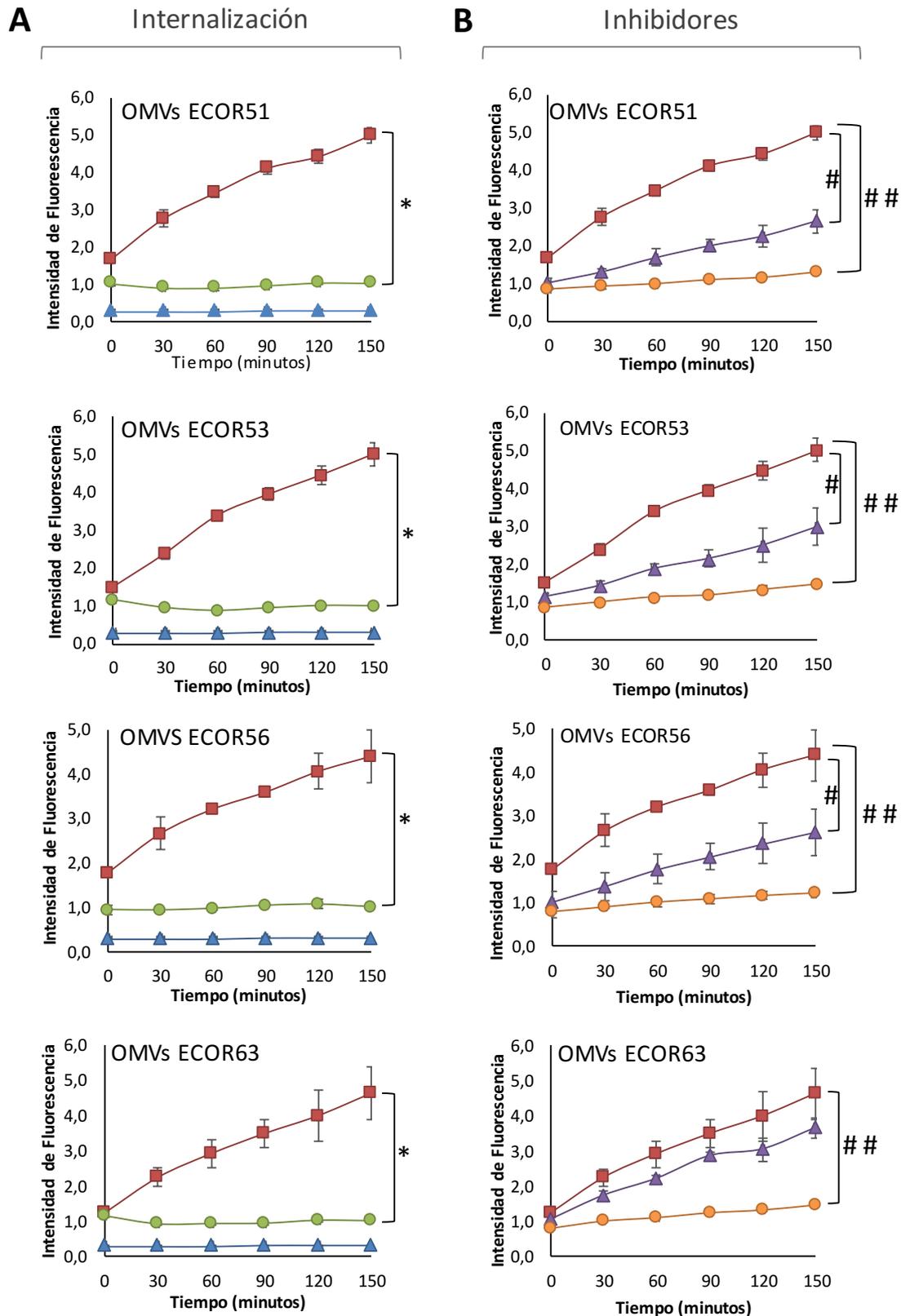


Figura 21. Análisis de la vía de internalización de OMVs del grupo B2 de cepas comensales de *E. coli* en células HT-29. (A) Las Células HT-29 fueron crecidas a confluencia e incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (cuadrados rojos) de las cepas indicadas, y la fluorescencia emitida fue medida a lo largo del tiempo. Las OMVs solas (círculos verdes) y las células HT-29 en ausencia de OMVs (triángulos azules) fueron analizadas en paralelo como control. **(B)** Las células fueron pre-incubadas con clorpromazina

(inhibidor de la vía CME) a una concentración final de 15 µg/ml (círculos naranjas) o con filipina III (inhibidor de la vía dependiente *delipid raft*) a 10 µg/ml (triángulos lila) durante 1 h a 37° antes de la adición de las OMVs (2 µg) marcadas con rodamina B-R18 (cuadrados rojos). La fluorescencia fue medida a lo largo del tiempo. La intensidad de fluorescencia fue normalizada respecto la fluorescencia basal detectada en los diferentes intervalos de tiempo con las OMVs marcadas en ausencia de células epiteliales. Los datos se presentan como la media ± error estándar de 3 ensayos independientes. *, $P < 0,003$, células incubadas con OMVs *versus* la fluorescencia basal emitida por las OMVs marcadas. #, $P < 0,040$ # #, $P < 0,005$, células incubadas con OMVs en presencia de inhibidores *versus* células incubadas con OMVs en ausencia de inhibidores.

5.1.5. LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 SON DIRIGIDAS A COMPARTIMIENTOS ENDOLISOSOMALES

Una vez demostrado que la vía de entrada de OMVs de EcN y ECOR12 en la célula huésped tiene lugar a través de endocitosis mediada por clatrina, analizamos la progresión o tráfico intracelular de las vesículas en diferentes compartimentos subcelulares relacionados con esta vía de endocitosis en células HT-29 crecidas a confluencia. Para ello utilizamos marcadores específicos de endosomas tempranos (proteína EEA-1) y de lisosomas (LysoTracker) y valoramos la colocalización de las OMVs con estos marcadores durante la primera hora de incubación mediante microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados muestran que a los 30 minutos de incubación las OMVs de EcN y ECOR12 marcadas con rodamina B-R18 colocalizan con la proteína EEA-1 asociada a endosomas tempranos (Figura 22, A). El grado de colocalización fue valorado mediante los coeficientes de solapamiento (R) y el coeficiente de Manders, los cuales estiman el nivel donde dos puntos en un mismo plano se encuentran. El valor de los coeficientes calculados para la colocalización de las OMVs con EEA-1 es compatible con la localización de las vesículas internalizadas en endosomas tardíos (Tabla 4). Adicionalmente, la colocalización de las OMVs con la proteína EEA-1 presente en este compartimento endocítico fue confirmada en ensayos paralelos llevados a cabo con OMVs nativas (sin marcar) e inmunodetectadas específicamente con anticuerpos anti-LPS de *E. coli* (Figura 22, B). Los dos coeficientes de colocalización estimados para este ensayo validan el grado de solapamiento entre las OMVs y el EEA-1 (Tabla 4).

Así pues, la colocalización de OMVs en endosomas tardíos queda validada indistintamente del marcaje de vesículas. Siguiendo con el tráfico vesicular, la colocalización de las OMVs de EcN y ECOR12 marcadas con rodamina B-R18 con los lisosomas (*LysoTracker Green DND-26*) fue analizada a los 60 minutos de incubación. Las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia (Figura 23) así como los coeficientes de solapamiento calculados (Tabla 4) demuestran el acceso de las vesículas al compartimento lisosomal. En ningún caso se observó señal de fluorescencia asociada a

las vesículas internalizadas marcadas con rodamina B-R18 en el núcleo de células HT-29 incubadas entre 15 min a 5 h con las OMVs de EcN y ECOR12.

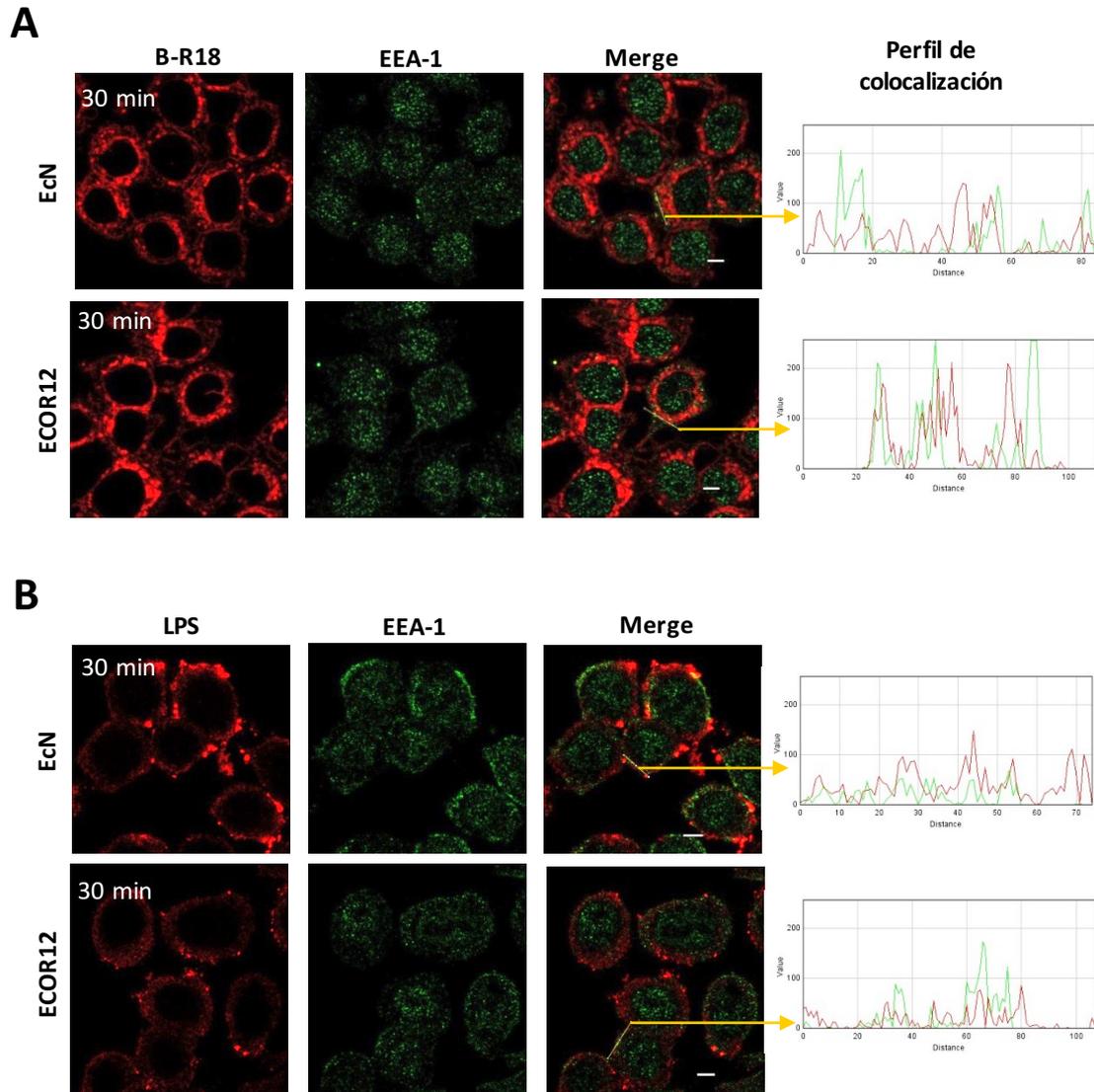


Figura 22. Colocalización de OMVs de EcN y ECOR12 con endosomas. Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2 μ g) durante los tiempos indicados y analizadas por microscopía confocal de fluorescencia. Los endosomas se marcaron con un anticuerpo policlonal obtenido contra la proteína específica EEA-1 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). Las imágenes muestran la representación de los planos z tomados en el eje x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=4). La interacción de las OMVs (en rojo) con los compartimentos endosomales (en verde) se muestra como puntos amarillos en las imágenes superpuestas. En cada panel, el perfil de colocalización en una región seleccionada (línea amarilla) fue analizado mediante el histograma de intensidades. La línea blanca indica la escala de 20 μ m.

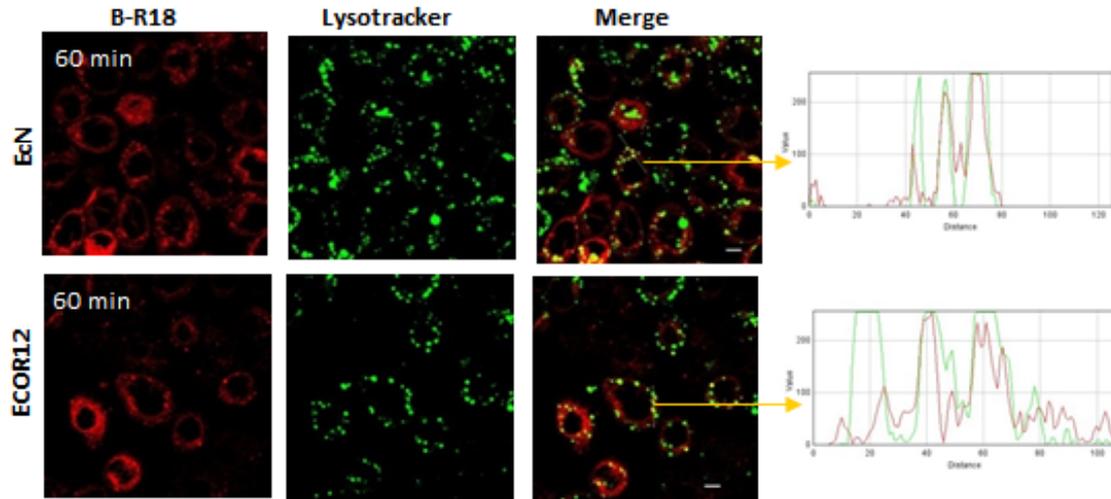


Figura 23. Colocalización de OMVs de EcN y ECOR12 con lisosomas. Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 (2 μg) durante 60 minutos y analizadas por microscopía confocal de fluorescencia. Los lisosomas se detectaron utilizando el marcador LysoTracker DND-26 (verde). Las imágenes muestran la representación de los planos z tomados en el eje x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=4). La interacción de las OMVs (en rojo) con los compartimentos lisosomales (en verde) se muestra como puntos amarillos en las imágenes superpuestas. En cada panel, el perfil de colocalización en una región seleccionada (línea amarilla) fue analizado mediante el histograma de intensidades. La línea blanca indica la escala de 20 μm .

Tabla 4. Coeficientes de colocalización de las OMVs de EcN y ECOR12 con la proteína EEA-1 de endosomas y con el marcador de lisosomas LysoTracker.

	Coeficiente de solapamiento		Coeficiente de Manders	
	EEA-1 (30 min)	Lysotracker (60 min)	EEA-1 (30 min)	Lysotracker (60 min)
OMVs EcN (Rodamina B-R18)	0,422 \pm 0,071	0,546 \pm 0,031	M1=0,620 \pm 0,012 M2= 0,404 \pm 0,098	M1=0,630 \pm 0,018 M2=0,325 \pm 0,0620
OMVs ECOR12 (Rodamina B-R18)	0,366 \pm 0,017	0,481 \pm 0,005	M1=0,549 \pm 0,093 M2=0,322 \pm 0,051	M1=0,608 \pm 0,027 M2=0,440 \pm 0,093
OMVs EcN (anti-LPS <i>E. coli</i>)	0,440 \pm 0,08	ND	M1=0,547 \pm 0,055 M2=0,276 \pm 0,0415	ND
OMVs ECOR12 (anti-LPS <i>E. coli</i>)	0,39 \pm 0,045	ND	M1=0,554 \pm 0,003 M2=0,331 \pm 0,006	ND

Nota: los valores en M1 corresponden a la colocalización de los orgánulos con las OMVs y el M2 corresponde a la colocalización de las OMVs con los orgánulos.

5.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y DE INTERNALIZACIÓN DE VESÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE MUTANTES *tolR*

Las OMVs son producidas durante el crecimiento normal de las bacterias Gram-negativas, sin embargo, la cantidad de OMVs producidas depende de las condiciones del cultivo, y en general el rendimiento es muy bajo. Se ha descrito que mutaciones en determinados genes de proteínas de la envoltura celular (membrana externa, periplasma y membrana interna) que alteran la integridad de la misma, conducen a un fenotipo de hipervesiculación, y por tanto resultan atractivas de cara a obtener preparaciones de OMVs con un elevado rendimiento (Moon *et al.*, 2012; Kulp *et al.*, 2015). Entre estas mutaciones están las que afectan al sistema *tol-pal*. Se ha descrito que mutaciones en cualquiera de los genes *tol-pal*, entre ellos *tolR*, confieren un defecto en la membrana externa que conduce a un aumento en la producción de OMVs (Bernadac *et al.*, 1998)

Con la finalidad de mejorar el rendimiento en la obtención de OMVs con vistas a futuros estudios funcionales, nos planteamos aislar y caracterizar las vesículas producidas por un mutante *tolR* derivado de la cepa EcN (*EcN tolR::cm*), construido anteriormente en nuestro grupo de investigación. Para ello, se aislaron las OMVs a partir del sobrenadante de un cultivo en LB (1 litro) tras 15 horas de crecimiento tanto del mutante EcN *tolR* como de la cepa EcN tipo salvaje como control. La cuantificación de las OMVs aisladas se efectuó en base a la concentración de proteína de cada preparación. La concentración estimada para las OMVs aisladas del mutante *tolR* fue significativamente mayor que para las de la cepa tipo salvaje. Los valores obtenidos estaban alrededor de 10 mg de proteína/litro de cultivo para EcN *tolR* frente a 0,3 mg de proteína/litro de cultivo para EcN. Puesto que los cultivos presentaban la misma densidad celular ($1,3 \times 10^9$ UFC/ml) en el momento de la recogida de las vesículas, estos valores indican que EcN *tolR* producen mayor cantidad de vesículas que la cepa EcN tipo salvaje (alrededor de 33 veces superior).

En primer lugar, se procedió a evaluar la morfología de las OMVs aisladas a partir ambas cepas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de preparaciones sometidas a tinción negativa. Las imágenes mostraron para ambas cepas la formación de vesículas esféricas. El tamaño de las OMVs de la cepa tipo salvaje oscilaba entre aproximadamente entre 20 - 60 nanómetros de diámetro, mientras que las OMVs del mutante *tolR* mostraron una mayor dispersión de tamaño, entre 20 - 150 nm, con una menor proporción de vesículas de pequeño tamaño (Figura 24).

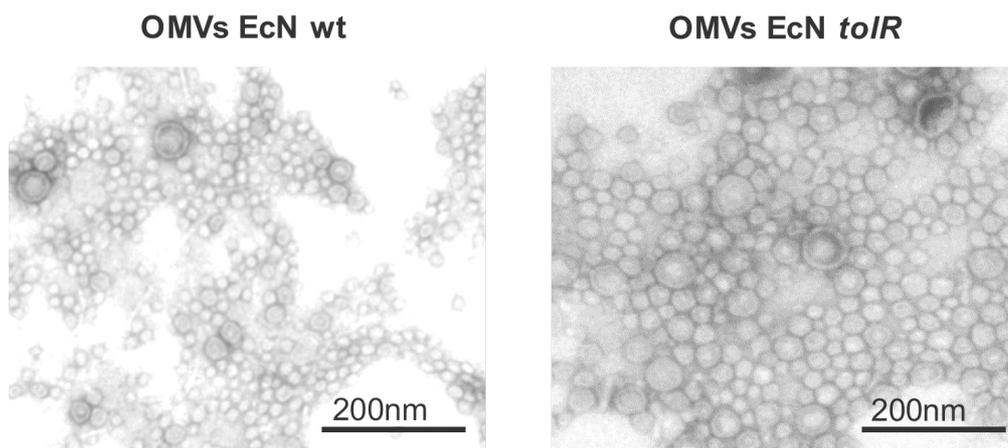


Figura 24. Microscopía electrónica de transmisión. Tinción negativa de OMVs liberadas por EcN y EcN *tolR* después de 15 h de crecimiento en LB. Para ambas cepas, las OMVs se recogieron de un cultivo de 1 litro y se resuspendieron en un volumen final de 0,2 ml. Se muestran imágenes representativas de muestras de las OMVs aisladas de la cepa EcN tipo salvaje (inspección directa) y del mutante EcN *tolR* (dilución 1:20).

5.2.1. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS OMVs AISLADAS DE EcN *tolR* EN CÉLULAS Caco-2

Habiendo demostrado anteriormente que las OMVs de EcN se internalizan en células HT-29 y Caco-2 (RESULTADOS 5.1.1 y 5.1.3), nos planteamos llevar a cabo estudios de internalización comparativos entre vesículas derivadas de la cepa probiótica EcN y el mutante EcN *tolR* para valorar si el proceso de internalización de OMVs se ve afectado por la disrupción del gen *tolR*. Con este fin, se marcaron OMVs de EcN y de EcN *tolR* con rodamina B-R18, y estas fueron adicionadas en la parte apical de células Caco-2 diferenciadas (1 µg/pocillo). La fluorescencia emitida por las OMVs internalizadas fue monitorizada durante 180 minutos. Como controles se analizó la fluorescencia basal emitida por las OMVs o la de células Caco-2 no tratadas. Los resultados muestran que el nivel de fluorescencia observado en las células incubadas con una cantidad igual de OMVs de EcN *tolR* fue significativamente inferior al nivel de fluorescencia observado en células incubadas con OMVs de la cepa EcN tipo salvaje (Figura 25, A). El análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia confirmó la captación reducida de OMVs derivadas del mutante *tolR* por parte de las células Caco-2. Las imágenes capturadas bajo los mismos parámetros de intensidad de láser para las vesículas de EcN o de EcN *tolR* internalizadas después de 1 h de incubación a igual concentración de OMVs marcadas con rodamina B-R18 confirman la menor internalización de las OMVs aisladas del mutante *tolR* (Figura 25, B).

Los estudios anteriores llevados a cabo en varias líneas de células epiteliales mostraron que las OMVs de EcN entran en las células epiteliales intestinales a través de endocitosis mediada por clatrina (RESULTADOS 5.1.2). Para comprobar si esta vía endocítica es también la responsable de la captación de las OMVs derivadas del mutante EcN *tolR* se llevaron a cabo experimentos de internalización utilizando OMVs marcadas con rodamina B-R18 en células Caco-2 en presencia de inhibidores de las vías de endocitosis. La internalización de las OMVs del mutante EcN *tolR* se vió sólo inhibida por clorpromazina, pero no por filipin III (Figura 25, C). Estos resultados indican que, al igual que las OMVs de la cepa salvaje, las OMVs generadas por el mutante EcN *tolR* son internalizadas en células de epitelio intestinal mediante endocitosis mediada por clatrina.

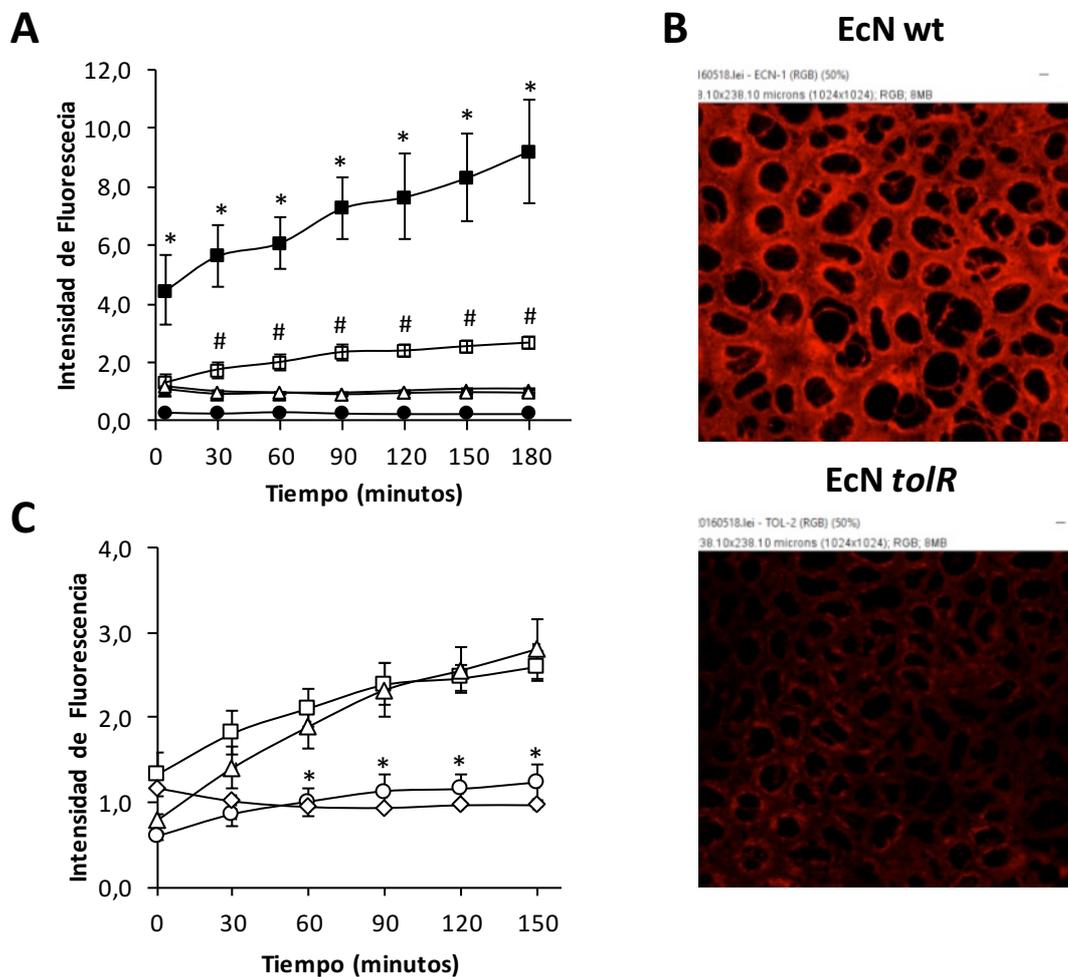


Figura 25. Internalización y mecanismo de entrada de las OMVs de EcN y de EcN *tolR* en células epiteliales Caco-2. Las Células Caco-2 fueron incubadas con OMVs de EcN o de EcN *tolR* marcadas con rodamina B-R18 (1 µg/pocillo). **(A)** La fluorescencia emitida fue determinada a lo largo del tiempo en las células incubadas con OMVs de EcN (cuadrados negros) o con OMVs de EcN *tolR* (cuadrados blancos), las OMVs marcadas en ausencia de células epiteliales (triángulos negros para EcN y blancos para el mutante *tolR*) y las células Caco-2 solas (círculos). Los valores son la media ± error estándar de 3 experimentos

independientes. * $P < 0,02$, células incubadas con OMVs *versus* la fluorescencia basal emitida por OMVs marcadas; # $P < 0,02$, células incubadas con OMVs derivadas de EcN *tolR* *versus* células incubadas con OMVs de la cepa salvaje EcN. **(B)** Visualización de las OMVs internalizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Las Células Caco-2 fueron incubadas con OMVs marcadas con rodamina B-R18 durante 3 h a 37°C. Las OMVs internalizadas se visualizan en rojo. El análisis se realizó mediante microscopía confocal de fluorescencia con un objetivo de inmersión en aceite 63x, y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon de color (16 bits). **(C)** Las células fueron pre-incubadas durante 1 h a 37°C con un inhibidor de la vía CME, la clorpromazina (círculos) o con un inhibidor de la vía mediada por *lipid raft*, la filipina III (triángulos) antes de la adicción de las OMVs de EcN *tolR* marcadas con rodamina B-R18. La fluorescencia fue medida a lo largo del tiempo. Las OMVs y las células solas fueron analizadas en paralelo y la intensidad de fluorescencia fue normalizada con la fluorescencia basal detectada en los diferentes intervalos de tiempo en OMVs marcadas en ausencia de células. Los valores son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $P < 0,02$, células incubadas con OMVs de EcN *tolR* en presencia de inhibidores (clorpromazina) *versus* células incubadas con OMVs en ausencia de inhibidores de las vías endocíticas.

Para confirmar la diferente capacidad de las OMVs del mutante *tolR* para ser internalizadas en células Caco-2, se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo usando OMVs marcadas con el colorante de membrana fluorescente DIO, cuyas propiedades de fluorescencia son diferentes a las de la rodamina B-R18. Para distinguir las OMVs internalizadas de las asociadas o unidas a la superficie de la célula, la fluorescencia emitida por las OMVs extracelulares se apantalló con azul de tripano. Los resultados presentados en la Figura 26 muestran que las OMVs de ambas cepas marcadas con DIO se internalizaron en células Caco-2 de forma dependiente del tiempo de incubación. Sin embargo, la capacidad de las OMVs para unirse y entrar en las células epiteliales es significativamente diferente entre las OMVs liberadas por la cepa tipo salvaje o por el mutante *tolR*. Las intensidades de fluorescencia después de 2 h y 4 h de incubación fueron significativamente menores en el caso de las vesículas del mutante EcN *tolR*, confirmando así su reducida capacidad de entrada en las células epiteliales (Figura 26). El porcentaje de OMVs asociadas a las células (fluorescencia en ausencia de azul de tripano) que se internalizan (fluorescencia en presencia de azul de tripano) no mostró diferencias significativas entre las OMVs de ambas cepas (Figura 26). Estos resultados indican que la disminución en la internalización de las OMVs de EcN *tolR* podría deberse a una reducida capacidad de unión a los receptores específicos en la membrana de la célula epitelial.

Obsérvese que incluso para el tipo salvaje EcN, no todas las OMVs asociadas a las células están siendo internalizadas. Se ha descrito que la capacidad de las OMVs para unirse y entrar en las células epiteliales depende de la línea celular utilizada (Kunsmann *et al.*, 2015). En este sentido, estudios realizados con OMVs de *E. coli* enterohemorrágica marcadas con DIO mostraron una menor proporción de vesículas internalizadas en células Caco-2 que en otras líneas celulares (Kunsmann *et al.*, 2015), con valores de

intensidad de fluorescencia comparables a los obtenidos en este trabajo en células Caco-2 incubadas con OMVs de EcN.

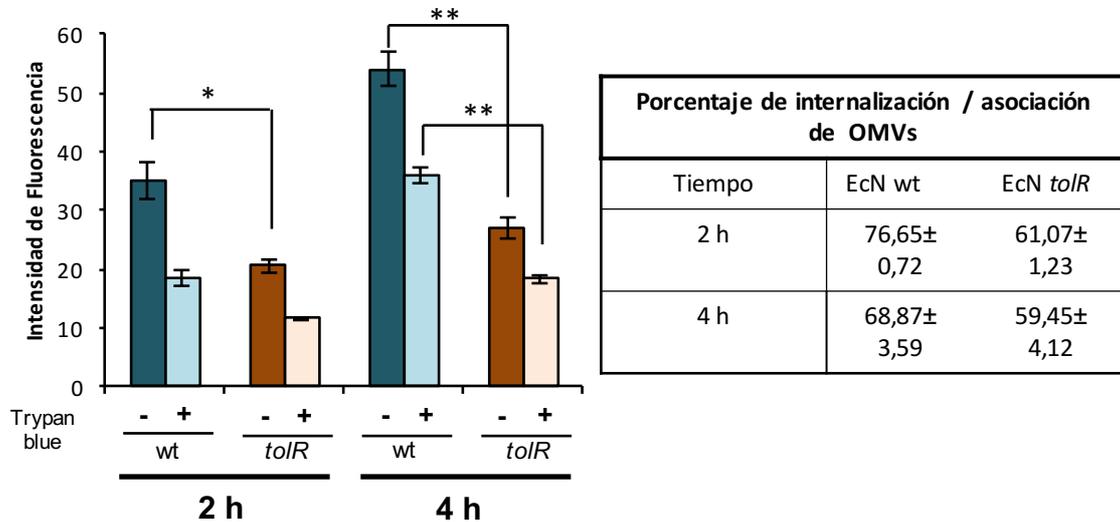


Figura 26. Internalización y asociación de las OMVs de EcN y de EcN *tolR* en células Caco-2. Las células Caco-2 fueron crecidas a confluencia e incubadas con OMVs de EcN o de EcN *tolR* marcadas con DIO (100 µg/pocillo) durante 2 y 4 horas a 37°C. La fluorescencia adherida a la superficie de las células fue apantallada con azul de tripano y las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. Los resultados fueron filtrados mediante FSC frente a SSC. Un total de 10.000 eventos fueron analizados para cada muestra. Los datos se presentan como media ± error estándar de tres experimentos independientes. *P<0.02, células incubadas con OMVs derivadas de EcN *tolR* frente a células incubadas con OMVs de la cepa salvaje de EcN.

5.2.2. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LAS OMVs AISLADAS DE LA CEPA EcN Y DEL MUTANTE EcN *tolR*

La reducida capacidad de interacción de las OMVs de EcN *tolR* con la membrana de la célula epitelial sugiere cambios, ya sea en la composición o en la estructura, de estas vesículas. Para identificar posibles proteínas diferenciales en las OMVs del mutante de EcN *tolR*, se comparó su perfil proteico con el de las vesículas aisladas de la cepa EcN tipo salvaje mediante SDS-PAGE (Figura 27). La mayoría de las bandas de proteínas estaban presentes en ambas muestras, aunque se observaron algunas diferencias. De las bandas diferencialmente expresadas se seleccionaron 7, las cuales fueron escindidas del gel y sometidas a digestión con tripsina para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. En la Figura 27 se indica, para cada banda, el nombre de la proteína identificada que mostró el índice *score* más elevado. Los resultados mostraron que las diferencias más relevantes se correlacionan con alteraciones en proteínas estructurales de la membrana externa. Las OMVs aisladas del mutante *tolR* están enriquecidas en la

lipoproteína asociada al peptidoglicano (Pal) y en TolB (bandas 4 y 7 respectivamente), pero son deficientes en flagelina y en la proteína MipA (proteína que interacciona con mureína) (bandas 1 y 3). Tanto en las OMVs derivadas de EcN como en las del mutante EcN *tolR*, las tres bandas principales, cercanas al marcador de 40 kDa, corresponden a las proteínas de membrana externa OmpC, OmpF, NmpC y OmpA. Sin embargo, la proteína que muestra la menor masa molecular (principalmente OmpA) se ve reducida en las OMVs de EcN (banda 6).

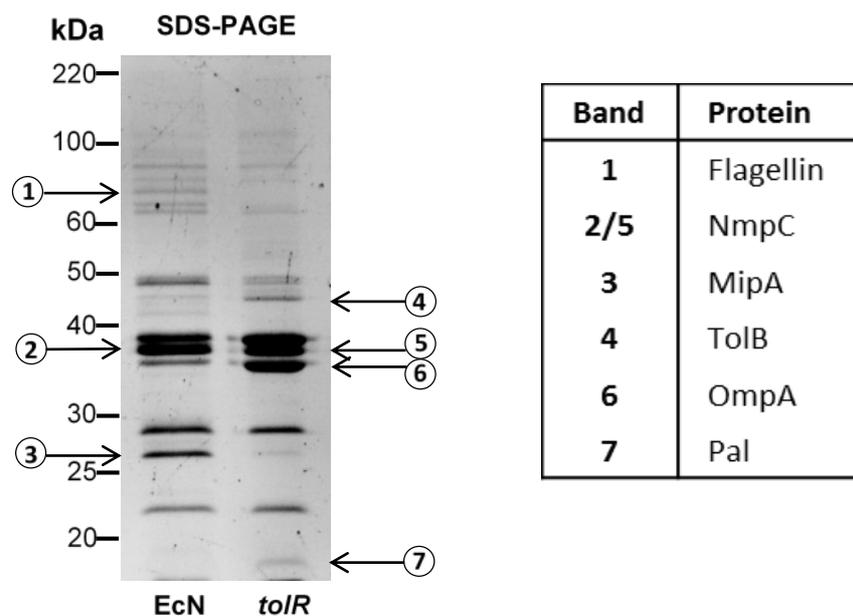


Figura 27. Perfil proteico de las OMVs aisladas de las cepas de EcN y EcN *tolR*. Las vesículas aisladas (10 µg de proteína) se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y el gel fue teñido con Sipro® Ruby Protein Gel Stain. En la izquierda de la imagen se indican los marcadores de tamaño molecular. Se seleccionaron 7 bandas (marcadas con números) para la identificación de las proteínas mediante LC-MS/MS. En la tabla adjunta se indica para cada banda el nombre de la proteína que mostró el índice score más alto.

5.2.3. ANÁLISIS MEDIANTE CRYO-TEM DE LAS OMVs DERIVADAS DE EcN Y DE EcN *tolR*

Para caracterizar con más detalle la estructura de las vesículas generadas por ambas cepas, se realizó un análisis por cryo-TEM. Para este propósito, se aislaron las OMVs a partir de cultivos líquidos, y analizaron en la unidad de Microbiología de la Facultad de Farmacia, concretamente las muestras fueron procesadas por Carla Pérez-Cruz, integrante del grupo de investigación de la Dra. Mercadé, experta en este tipo de análisis. Las imágenes obtenidas en el servicio de microscopía de la Universidad de Barcelona muestran una mayor diversidad en los tipos de vesículas producidas por el mutante EcN *tolR* (Figura 28).

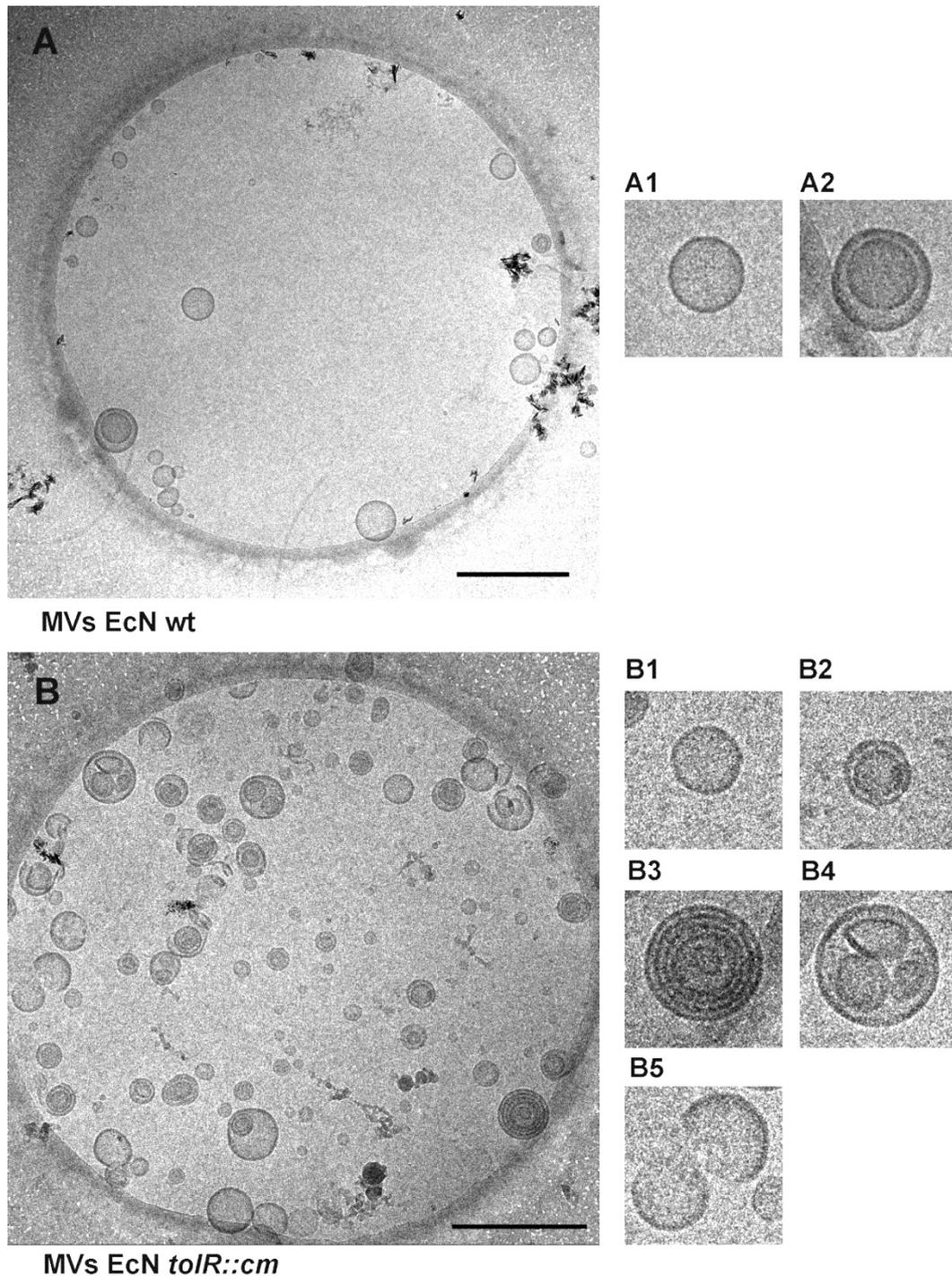


Figura 28. Análisis por cryo-TEM de las vesículas de membrana aisladas de las cepas de EcN y EcN *tolR*. (A) Se muestra una imagen representativa de las vesículas de EcN, en la que se pueden ver dos tipos de vesículas de membrana. Las más abundantes corresponden a OMVs comúnmente descritas (vista ampliada A1). También se observaron algunas vesículas de membrana del tipo O-IMV recientemente descritas (ampliadas en vista A2). (B) Se muestra una imagen representativa de las vesículas de EcN *tolR* donde se observan diferentes tipos de estructuras. En la derecha de la imagen se muestran vistas ampliadas: (B1) OMVs comunes; (B2) O-IMV; (B3) vesículas multicapa; (B4) vesículas agrupadas; (B5) membranas parcialmente circularizadas. Las imágenes son representativas de la observación de las vesículas de membrana congeladas en inmersión a partir de dos lotes diferentes para cada cepa. Barra: 500 nm. (Imágenes obtenidas y analizadas por el grupo de la Dra. Mercadé)

En las muestras de EcN (Figura 28, A), predominan las vesículas de una sola capa (típicas OMVs) en todos los campos observados (Figura 28, A1), y ocasionalmente se detectan también vesículas de doble capa conocidas como *outer-inner membrane vesicles* (O-IMV) (Figura 28, A2). Por el contrario, el análisis por cryo-TEM de las vesículas aisladas del mutante EcN *tolR* mostró diferentes estructuras, muchas de las cuales no corresponden a los modelos comunes, establecidos como OMVs o O-IMV (Figura 28, B). Además de OMVs (Figura 28, B1) y O-IMVs (Figura 28, B2), también se observaron vesículas de membrana de múltiples capas (Figura 28, B3), así como pequeños grupos de vesículas de membrana rodeadas por una bicapa (Figura 28, B4), y fragmentos de la bicapa membranosa parcialmente circularizados (Figura 28, B5).

La alta resolución de la criomicroscopía electrónica ha permitido identificar la existencia de una heterogeneidad en la estructura de vesículas producidas por el mutante EcN *tolR*. La presencia de estructuras vesiculares alteradas o atípicas en las preparaciones de OMVs aisladas de este mutante podría explicar las diferencias observadas en los ensayos de internalización. Los resultados parecen indicar que sólo ciertos tipos de vesículas, muy probablemente las OMVs y las O-IMVs, son capaces de interactuar eficientemente con los receptores específicos presentes en la membrana de la célula epitelial. Este es un paso esencial antes de ser internalizadas a través de la vía de endocitosis mediada por clatrina.

Por todo ello, se descartó la estrategia basada en el uso de mutantes *tolR* para incrementar el rendimiento en la obtención de OMVs para ser utilizadas en estudios funcionales. La heterogeneidad de las preparaciones de vesículas obtenidas a partir de este tipo de mutantes dificulta su estandarización. Además, la menor internalización de estas vesículas, así como su diferente composición y estructura, pueden afectar a la señalización inducida en la célula huésped. Por tanto, a lo largo de la presente Tesis Doctoral se han utilizado preparaciones de OMVs obtenidas a partir de las cepas tipo salvaje, tanto de la cepa probiótica EcN como de la cepa comensal ECOR12.

5.3. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL

5.3.1. ANÁLISIS SOBRE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACION CELULAR

La liberación de OMVs por parte de patógenos es uno de los mecanismos que ayudan a la interacción de la bacteria con la célula huésped, e incluso a la invasión (en caso de patógenos enteroinvasivos) (Glasser *et al.*, 2001). En este contexto, las OMVs pueden

actuar como efectores y alterar la proliferación celular o inducir estrés oxidativo en la célula huésped. Se ha descrito que las OMVs derivadas de determinadas cepas patógenas de *E.coli* del tipo EHEC inducen la proliferación celular de células Caco-2 en cultivo (Tyrrer et al, 2014).

Dada la escasa información en este campo respecto a los efectos de las OMVs producidas por la microbiota intestinal, nos planteamos analizar el impacto de las OMVs del probiótico EcN y de la cepa comensal ECOR12 sobre el crecimiento de la línea celular HT-29. Con esta finalidad se procedió a incubar células HT-29 con las OMVs de estas cepas (5 µg/ml) durante un periodo de 168 h. A intervalos de 48 h se analizó la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión con azul de tripano. Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad de las células no se ve afectada por la presencia de las OMVs. El número de células muertas no incrementó de manera significativa a lo largo del periodo de incubación con respecto a células control no tratadas (Figura 29, A). Sin embargo, la tasa de proliferación de las células tratadas con OMVs fue menor que el de las células control, con valores estadísticamente significativos a partir de las 72 horas de incubación, siendo de alrededor del 50 % y 60% en células tratadas respetivamente con las OMVs de EcN y ECOR12, manteniéndose así hasta el final de experimento (Figura 29, B). De acuerdo con estos resultados, los valores de duplicación poblacional fueron significativamente más bajos en las células tratadas con OMVs que en las células control no estimuladas (Figura 29, C). En todos los casos se observó crecimiento exponencial de las células HT-29 durante las primeras 72 h. Posteriormente la velocidad de crecimiento empezó a disminuir a medida que las células alcanzaron el estado de confluencia. El cálculo del PDT (tiempo de duplicación de la población) en la fase exponencial de crecimiento mostró valores de $17,42 \pm 1,40$ h para las células no tratadas, de $30 \pm 1,40$ h para las células tratadas con las OMVs de EcN y de $25,76 \pm 1,15$ h para las tratadas con OMVs de ECOR12, indicando que las células tratadas con OMVs requieren un mayor periodo de tiempo para duplicar su población.

Paralelamente se llevaron a cabo ensayos de MTT (Figura 29, D). Los resultados mostraron una reducción cerca del 20% en los niveles de actividad en las células tratadas con OMVs en comparación a las células control. Estos datos fueron coherentes con la reducción en la tasa de crecimiento y con el número de células obtenidas en el ensayo de exclusión de azul de tripano. En conjunto estos resultados sugieren que las OMVs de EcN y ECOR12 inhiben la proliferación celular, pero no afectan la viabilidad de las mismas.

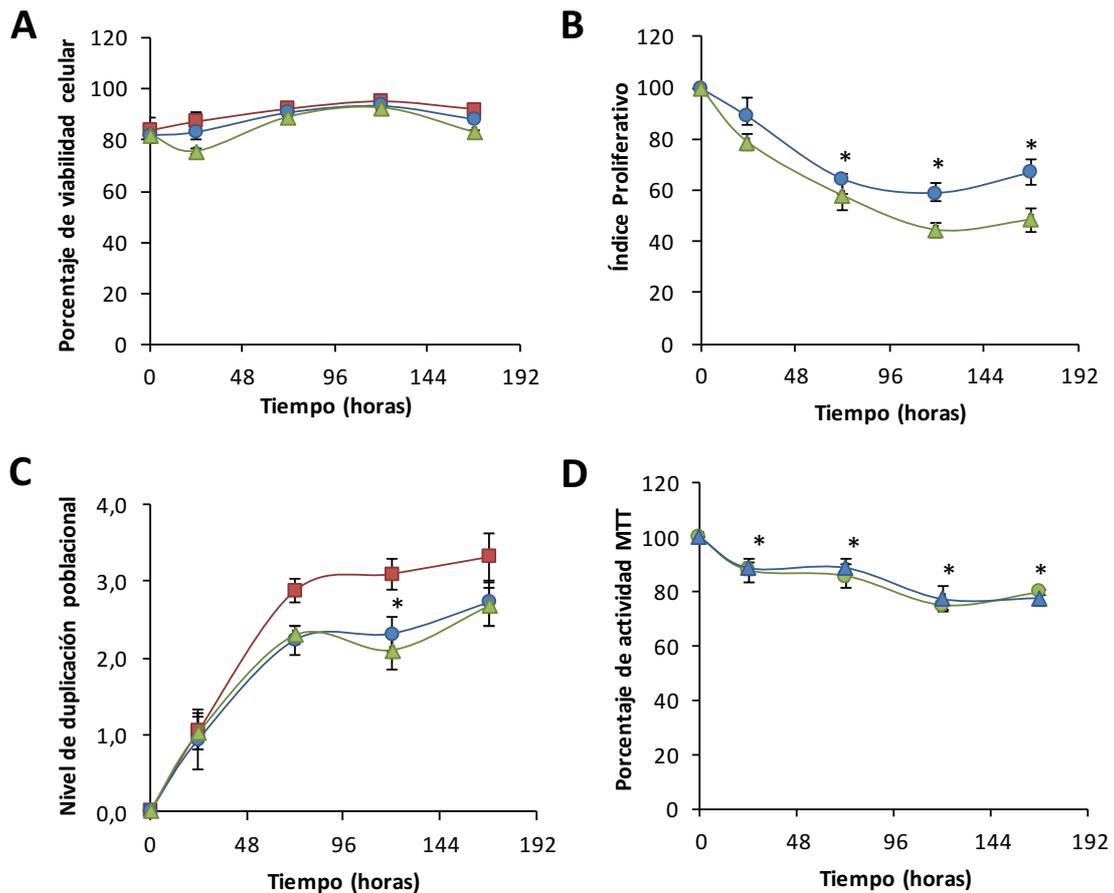


Figura 29. Efectos de las OMVs de *EcN* y *ECOR12* sobre la viabilidad y proliferación de células HT-29. (A) El porcentaje de viabilidad celular, (B) El índice proliferativo, (C) El nivel de duplicación poblacional de células HT-29 estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OMVs de *EcN* (en azul) o OMVs de *ECOR12* (en verde) durante 168 horas, fueron determinados mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano. En la figura (A) y (C) las células control no tratadas están indicadas en rojo. (D) Actividad de reducción del MTT a lo largo del experimento expresada como porcentaje respecto a la actividad de células no tratadas (100%). Los valores son la media \pm error estándar de cuatro ensayos independientes (*, $P < 0.01$, células incubadas con OMVs *versus* las células control no tratadas)

Basándonos en los resultados obtenidos sobre la reducción de la proliferación en células incubadas con OMVs, nos propusimos analizar el efecto de estas vesículas sobre la progresión del ciclo celular en células HT-29 incubadas con OMVs (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24, 48 y 72 horas (Figura 30).

El análisis mediante citometría de flujo de las células marcadas con yoduro de propidio mostró que no hay diferencias significativas en el porcentaje de células en fase G1 entre el control y las células tratadas con OMVs. Sin embargo, las vesículas de *EcN* y *ECOR12* incrementan el porcentaje de células en fase S, con valores que son significativamente estadísticos al cabo de 72 horas de incubación. De acuerdo con este resultado, el número de células que alcanzan la fase G2 es significativamente menor a las 48 h y 72 h

de incubación con OMVs respecto a las células control no tratadas. Por tanto, estos resultados indican que en esta línea celular las OMVs de EcN y ECOR12 promueven la parada del ciclo celular en fase S/G2. Este efecto explica la inhibición observada en el crecimiento de las células tratadas con estas vesículas.

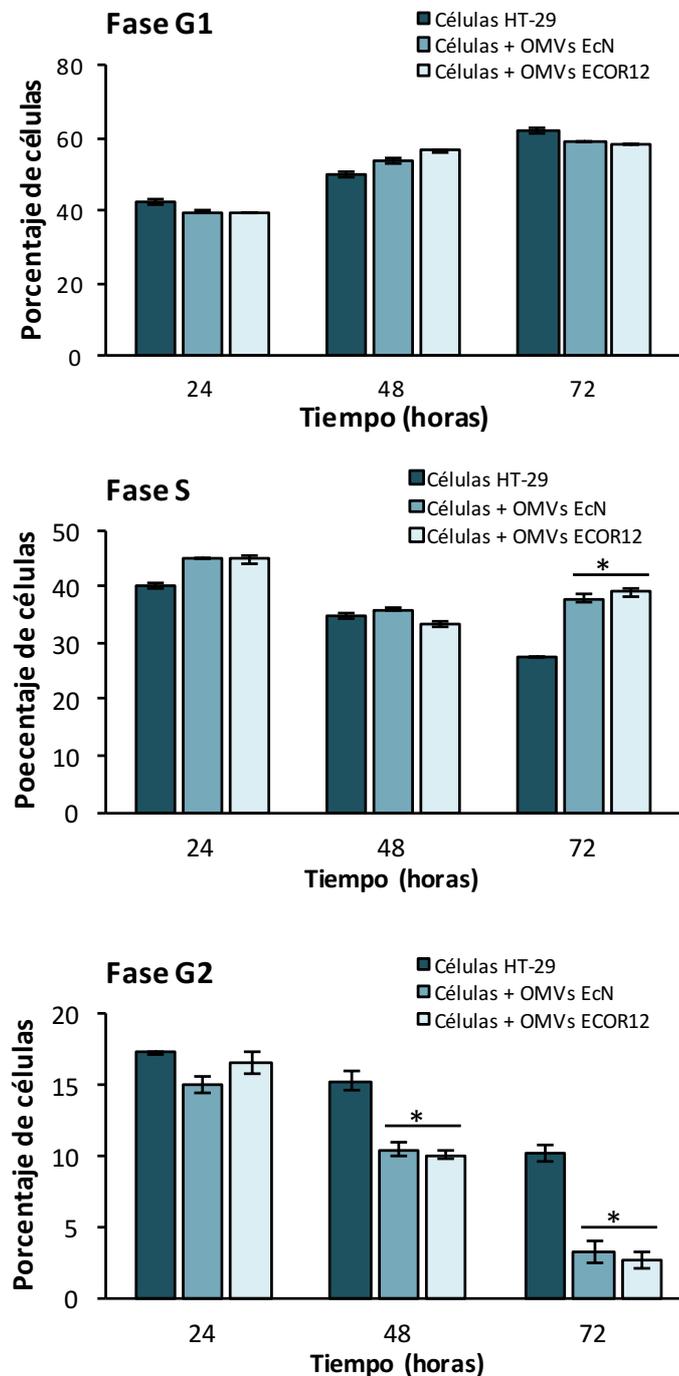


Figura 30. Las OMVs de EcN y ECOR12 inducen una parada del ciclo celular en células HT-29. Las células HT-29 fueron tratadas con OMVs (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de las cepas de EcN o ECOR12 durante 24, 48 y 72 h. En paralelo, células HT-29 no tratadas fueron analizadas como control. En los tiempos indicados las células fueron marcadas con yoduro de propidio y analizadas mediante citometría de flujo, aplicando los filtros

FSC y SSC. Un total de 10.000 eventos fueron analizados para cada muestra. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes. (*, $P < 0.02$, células incubadas con OMVs *versus* las células control no tratadas).

5.4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DE LAS OMVs DE EcN Y ECOR12 EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL

Las células están expuestas a numerosos factores que causan lesiones en el DNA. Los mecanismos de reparación pueden ser iniciados en respuesta a una variedad de señales de estrés generadas durante los procesos fisiológicos o en respuesta a señales exógenas. Las lesiones del DNA interfieren con la transcripción y la replicación del DNA. Ello se traduce en un retraso en la progresión de las células a través de la fase G1/S del ciclo celular, lo que permite la reparación del daño en el DNA antes de la replicación del mismo y la división celular. En este trabajo se ha valorado la formación de aductos 8-oxo-dG y de roturas de la doble cadena de DNA en células epiteliales expuestas a las OMVs de las cepas EcN y ECOR12.

5.4.1. LAS OMVs DE *E. coli* NO GENERAN ESTRÉS OXIDATIVO

Las OMVs de determinadas cepas de *E. coli* son capaces de inducir daño en el DNA y desencadenar mutaciones de genes e inestabilidad genómica en la célula (Tyrer, Frizelle and Keenan, 2014). Para analizar la capacidad de las OMVs de las cepas en estudio de inducir daño oxidativo en el núcleo de las células HT-29 se analizó la formación de aductos 8-oxo-desosiguanosina (8-oxo-dG) en el DNA. La presencia del 8-oxo-dG en el DNA de células HT-29 expuestas a OMVs de EcN y ECOR12 (5 $\mu\text{g/ml}$), se determinó mediante microscopía confocal de fluorescencia a diferentes tiempos (24h, 48h, 72h, 120h y 168h). Como control positivo las células fueron tratadas con 300 μM de H_2O_2 durante 24 horas (Figura 31). Los resultados muestran la formación de aductos 8-oxo-dG en el núcleo de las células tratadas con H_2O_2 , pero no en ninguna de las células tratadas con OMVs en los diferentes tiempos de tratamiento. Estos resultados sugieren que las OMVs de ambas cepas no inducen la formación de aductos de tipo 8-oxo-dG, lo que indica que las OMVs de EcN y ECOR12 no inducen estrés oxidativo en las células diana.

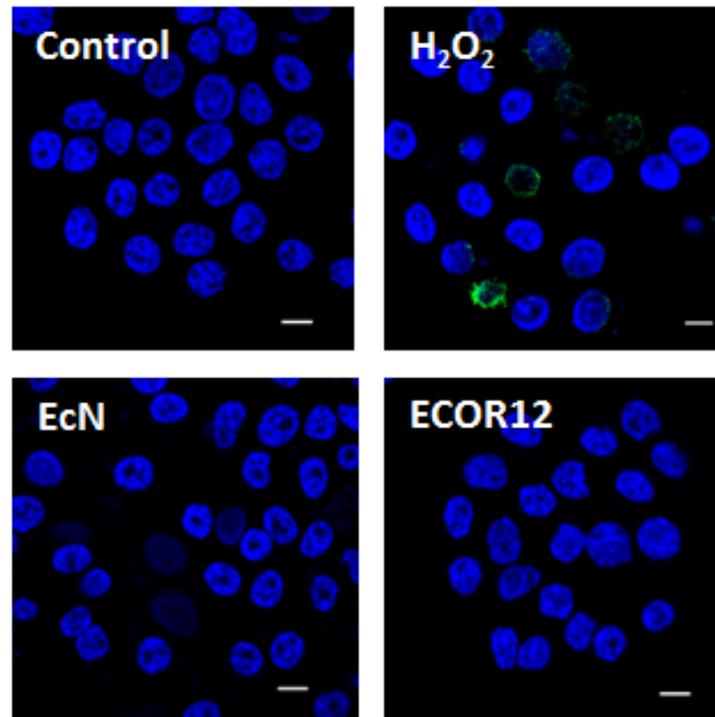


Figura 31. Efectos de las OMVs de EcN y ECOR12 en la formación de aductos 8-oxo-dG en células HT-29. Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs (5 $\mu\text{g/ml}$) de EcN o ECOR12 48 horas. Las células tratadas con 300 μM de H_2O_2 fueron analizadas en paralelo como control positivo de la formación de este daño. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo específico para aductos 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) (en verde), seguido de los núcleos marcados con DAPI (en azul). Las imágenes muestran la representación de los planos x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=3).

5.4.2. LAS OMVs DE EcN INDUCEN ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL DNA

La modificación de determinadas histonas representa uno de los primeros eventos de la respuesta celular frente a lesiones en el DNA, como son la formación de roturas de doble cadena (DSBs). Este tipo de daño induce rápidamente la fosforilación de la histona H2AX, una variante de la histona H2A, la cual es reclutada sobre los nuevos extremos generados por rotura de la doble cadena de DNA.

La forma fosforilada de esta histona se denomina H2AX γ . Esta histona puede utilizarse como marcador para examinar el daño producido en el DNA y la posterior reparación de la lesión. Algunas toxinas bacterianas presentes en las OMVs de *E. coli* O157:H7 pueden producir DSBs (Tyrer, Frizelle and Keenan, 2014). Además, se ha descrito que las cepas de *E. coli* que albergan la isla génica *pks* responsable de la síntesis del poliketido genotóxico colibactina generan esta clase de lesiones en el DNA. Se ha descrito además

que la cepa probiótica EcN es productora de colibactina, la cual induce altos niveles de DSBs en las células epiteliales intestinales (Olier *et al.*, 2012). Estos experimentos se realizaron con cultivos de células epiteliales aisladas de intestino de ratón, incubadas con suspensiones bacterianas del probiótico EcN.

Sobre la base de esta información, hemos tratado de analizar si las OMVs de esta cepa probiótica tienen el potencial de inducir este tipo de daño en el DNA. Las vesículas de la cepa comensal ECOR12 han sido incluidas para su comparación. Como la reparación de las lesiones DSBs en el DNA requiere el reclutamiento y la fosforilación de la histona H2AX en los sitios dañados, la inmunodetección de la histona γ H2AX (fosforilada) se llevó a cabo en las células HT-29 después de 24 y 48 horas de incubación con OMVs de EcN o ECOR12 (Figura 32, A). Las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostraron que las células no tratadas con OMVs presentan un bajo marcaje de γ H2AX en el núcleo (rojo), el cual es compatible con la generación de radicales libres que dañan el DNA durante el cultivo de las células en presencia de oxígeno y que es reparado durante el proceso de división celular normal. Sin embargo, tras la exposición a las OMVs de EcN se observa un mayor número de células con tinción nuclear de γ H2AX (22,5% de núcleos positivos frente a 13,6% en las células no tratadas a las 48h). En este caso, los núcleos mostraron modificaciones morfológicas. En las células estimuladas con OMVs de ECOR12, la inmunodetección de γ H2AX era sólo aparente en algunas células después del tratamiento durante 48 horas, pero con valores muy similares a los de las células control (14,5% de núcleos positivos frente a 13,6% en las células no tratadas).

La cuantificación de la γ H2AX mediante citometría de flujo confirmó los resultados de microscopía de inmunofluorescencia (Figura 32, B). Se observó un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia en las células individuales estimuladas con OMVs de EcN con respecto a las células HT-29 no tratadas al cabo de 24 horas y 48 horas, mientras que las vesículas de la cepa comensal ECOR12 solamente promovieron un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia a las 48 horas, el cual no fue estadísticamente significativo. En general, estos resultados sugieren que las OMVs de la cepa probiótica EcN inducen una mayor formación de DSB, que las OMVs de la cepa comensal ECOR12. Este efecto podría estar relacionado con al colibactina.

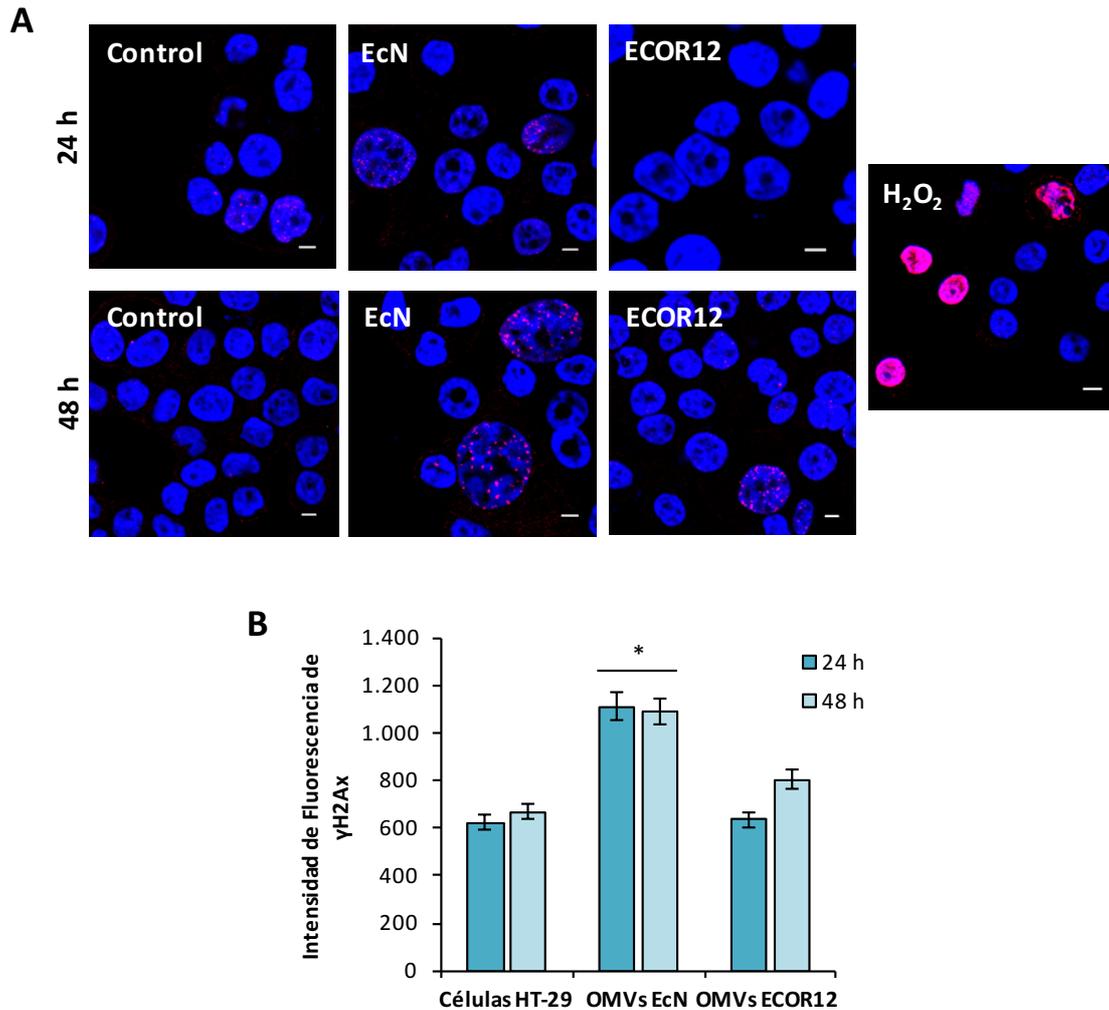


Figura 32. Efectos de las OMVs de EcN y ECOR12 en la formación de roturas en la doble cadena del DNA (DSBs). Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs (5 μ g/ml) de EcN o ECOR12 durante 24 y 48 horas. **(A)** Inmunodetección de la histona γ H2AX (en rojo), seguido de los núcleos marcados con DAPI (en azul). Las células tratadas con 300 μ M de H_2O_2 fueron analizadas en paralelo como control positivo de este tipo de daño. Las imágenes muestran la representación de los planos x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=3). **(B)** Cuantificación de los niveles de γ H2AX mediante citometría de flujo. Las células fueron filtradas teniendo en cuenta FSC frente a SSC. Un total de 10.000 eventos fueron analizados para cada muestra. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. (*, $P < 0,02$, células incubadas con OMVs versus las células control no tratadas).

De acuerdo con estos resultados, se creyó de interés realizar el ensayo del cometa o electroforesis alcalina de células individuales para confirmar la fragmentación del DNA en las células incubadas con las OMVs de EcN. Este método evalúa las lesiones DSBs y a través del aumento de fragmentos de DNA (de menor tamaño) que migran fuera del núcleo de la célula. Este análisis mostró como las células estimuladas con OMVs de ECOR12 presentan una muy leve fragmentación del DNA, no muy alejada de las células

control. Sin embargo, las células tratadas con OMVs de EcN presentan una mayor pérdida de la integridad del DNA en comparación con las células no tratadas (Figura 33). También se puede apreciar el daño causado por el peróxido de hidrógeno que fue utilizado como control positivo por ser un agente genotóxico, que es capaz de inducir un daño celular general en el genoma de la célula.

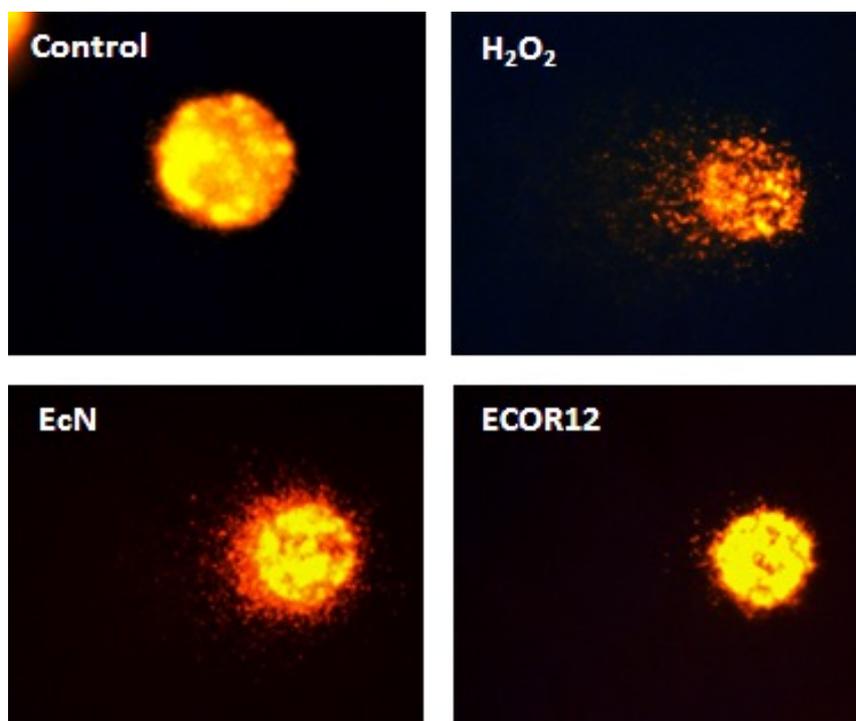


Figura 33. Análisis mediante el ensayo del cometa de la formación de lesiones DSBs inducidas por las OMVs de EcN y ECOR12 en el DNA de células HT-29. Células HT-29 fueron incubadas con OMVs de EcN o ECOR12 (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas o con H_2O_2 (300 μM) durante 24 horas como control. Después de su tratamiento con tripsina se procesaron para el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales. El DNA se tiñó con bromuro de etidio (20 mg/ml). Los portaobjetos se examinaron usando un microscopio Leica D1000 con un objetivo de inmersión en aceite 63X. Las imágenes mostradas corresponden a un experimento representativo (n = 3).

5.5. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR POR OMVs DE EcN Y ECOR12: ACTIVACIÓN DE RECEPTORES INTRACELULARES NOD-1 Y NOD-2

Como se ha descrito en la introducción las células huésped disponen de un conjunto de receptores del sistema inmune que permiten articular la respuesta inmunitaria basada en PRRs (Takeuchi and Akira, 2010). Entre estos receptores se encuentran NOD-1 y NOD-2, que permiten detectar componentes esenciales de bacterias comensales y

patógenas, como el peptidoglicano (PGN) una vez ha accedido al interior de la célula huésped.

Muchos estudios se han centrado en la señalización intracelular mediada por LPS presente en las OMVs (Ellis, Leiman and Kuehn, 2010). Sin embargo, el PGN asociado a las vesículas también representa un importante mediador de la respuesta inflamatoria. De hecho, se ha demostrado que las OMVs de *S. flexneri* se internalizan en células no fagocíticas y entregan el peptidoglicano al endosoma, interactuando directamente con NOD-1, y como consecuencia impulsan la regulación de la activación de NF-kappa B y expresión de IL-8 en la respuesta celular (Girardin *et al.*, 2003).

Por ello se planteó analizar si la ruta de señalización intracelular de estos receptores (NOD-1 y NOD-2) juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria inducida por las OMVs del probiótico EcN o de la cepa comensal ECOR12 en células epiteliales.

5.5.1. COLOCALIZACIÓN DE LAS OMVs CON NOD-1

Para dilucidar la implicación de esta ruta de señalización en la respuesta inducida por las OMVs de EcN y ECOR12 nos planteamos analizar la colocalización de las OMVs de EcN y ECOR12 con NOD-1, ya que este receptor reconoce específicamente el ácido meso-diaminopimélico presente en la peptidoglicano de bacterias Gram-negativas.

En primer lugar, las células HT-29 fueron incubadas durante 1 hora con OMVs de EcN o ECOR12 (10 µg/pocillo) y posteriormente lavadas para eliminar las OMVs no internalizadas. Para delimitar la localización de los componentes celulares y las vesículas, la membrana celular fue marcada con WGA. Posteriormente las células se fijaron y fueron procesadas de manera simultánea con anticuerpos específicos que reconocen el receptor NOD-1 y el LPS presente en las vesículas. El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia muestran la interacción de OMVs de ambas cepas con el receptor NOD-1 (Figura 34).

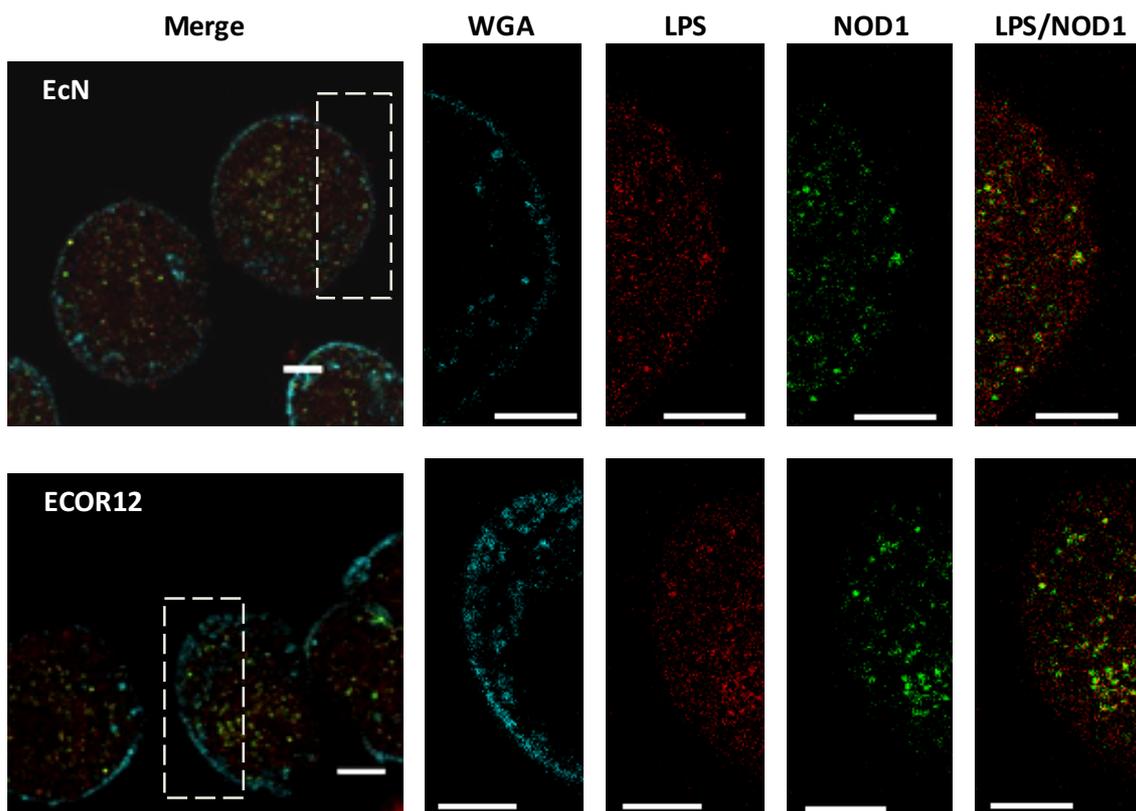


Figura 34. Colocalización de OMVs de EcN y ECOR12 con NOD-1 en células HT-29. Las células HT-29 fueron incubadas con 10µg/ml OMVs de EcN o ECOR12 durante 1 hora a 37°C. Las vesículas fueron inmunodetectadas con anti-LPS y el NOD-1 con un anticuerpo monoclonal anti-NOD-1 seguidos de anticuerpos secundarios específicos Alexa fluor 546 y 488 respectivamente. Las imágenes muestran la representación de los planos z tomados en el eje x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=3). Los puntos amarillos representan el solapamiento de ambos marcajes. Barra de escala = 20 µm.

Ensayos realizados en paralelo en células HT-29 en ausencia o presencia de vesículas, revelan que la presencia de OMVs a nivel de endosomas (RESULTADOS 5.1.5) es posiblemente la señal que inicia el reclutamiento de NOD-1 a las membranas del endosoma, esencial para el posterior reclutamiento de RIP2 y para la activación de la señal dependiente de este receptor citosólico, puesto que sólo se observa un patrón de interacción entre NOD-1 y la proteína de endosomas EEA-1 en presencia de OMVs, pero no en ausencia de estas (Figura 35). El análisis de la máxima proyección en z de los diferentes planos adquiridos de las células (eje x-y), mostró la intercepción de los marcajes de las OMVs con NOD-1 y de este receptor con EEA-1 únicamente en células incubadas con vesículas; lo que sugiere que NOD-1, EEA-1, y las OMVs de EcN y ECOR12 están estrechamente asociados mediante la interacción directa de sus componentes.

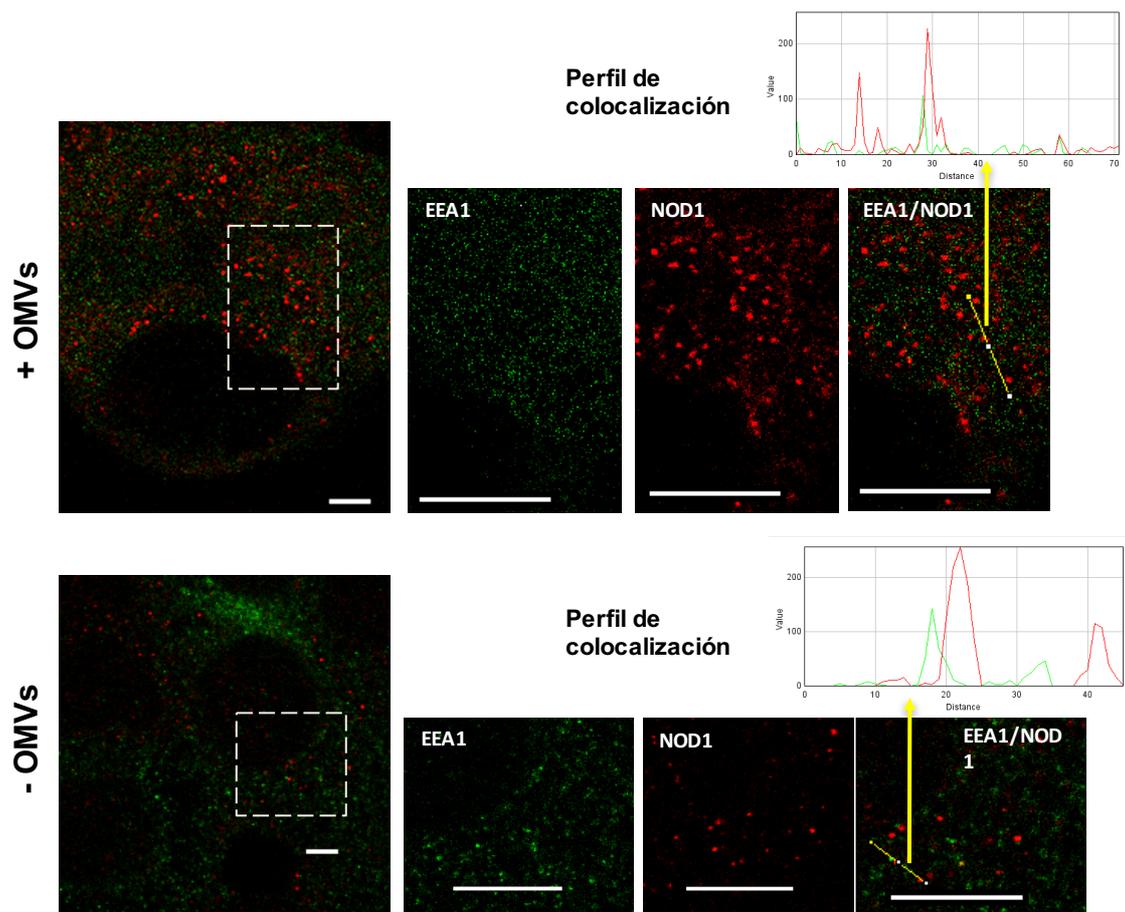


Figura 35. Interacción de EEA-1 y NOD-1 en células HT-29. Las células HT-29 fueron incubadas con OMVs de EcN (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora a 37°C o en ausencia de vesículas. Los endosomas fueron inmunodetectados con el anticuerpo anti-EEA-1, y el receptor NOD-1 con un anticuerpo monoclonal anti-NOD-1 seguido de anticuerpos secundarios específicos *Alexa fluor 488* y 546 respectivamente. Las imágenes muestran la representación de los planos z tomados en el eje x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=3). Los puntos amarillos representan el solapamiento de ambos marcajes y el histograma de intensidades representa la dispersión en un plano de los marcajes (línea amarilla). Barra de escala = 20 μm .

Para confirmar estos resultados, las células epiteliales HT-29 fueron incubadas durante 1 hora con las OMVs de EcN previamente marcadas con BODIPY-FL (reconoce estructuras del PGN presente en las vesículas) o rodamina B-R18 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, las células fijadas fueron procesadas para el marcaje del receptor NOD-1 con el anticuerpo específico anti-NOD-1. El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia, mostraron que las OMVs de EcN interaccionan con el receptor NOD-1, indistintamente del tipo de marcaje de OMVs (Figura 36). Cabe destacar, que el marcaje con BODIPY-FL específico del PGN, demuestra la presencia del ligando reconocido por NOD-1 (Ácido diaminopimélico) en las vesículas, lo que supone una potencial capacidad de activar la señalización a través de este receptor intracelular.

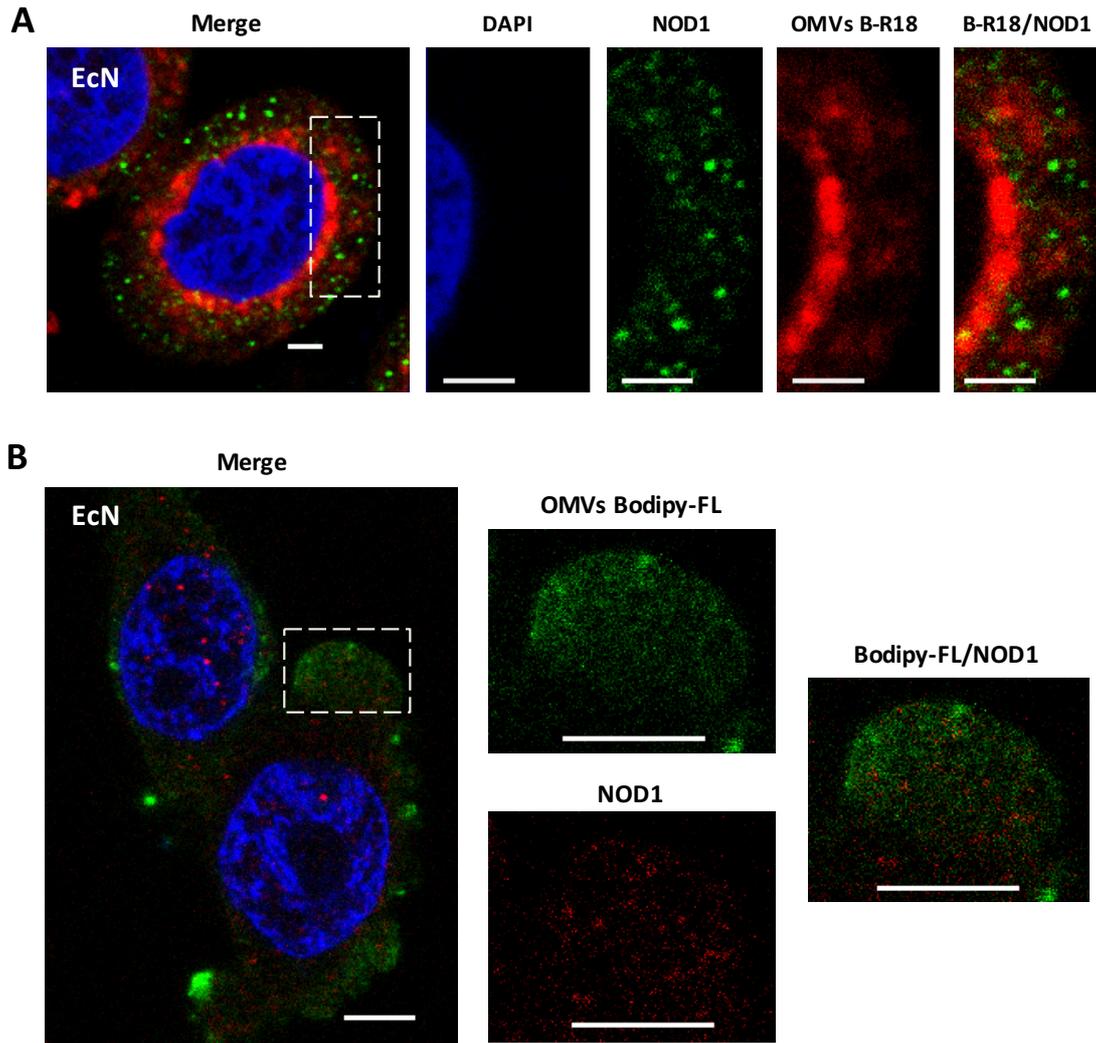


Figura 36. Colocalización de OMVs de EcN y NOD-1 en células HT-29. Las células HT-29 fueron incubadas con vesículas de EcN marcadas con (A) rodamina-BR18 (B) Bodipy-FL a una concentración de 10 μ g/ml durante 30 minutos a 37°C. El receptor intracelular NOD-1 fue inmunodetectado con el anticuerpo monoclonal anti-NOD-1 seguido del anticuerpo secundario Alexa fluor 546. Las imágenes muestran la representación de los planos z tomados en el eje x-y de un campo analizado mediante microscopía confocal de fluorescencia (n=3). Los puntos amarillos representan el solapamiento de ambos marcajes. Barra de escala 20 μ m.

5.5.2. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTOR NOD-1 Y NOD-2 EN LA RESPUESTA INDUCIDA POR OMVs EN CÉLULAS DE EPITELIO INTESTINAL

5.5.2.1. Expresión constitutiva de NOD-1 y NOD-2 en líneas de epitelio intestinal

La función de NOD-1 y NOD-2 en la activación de genes pro-inflamatorios en células de epitelio intestinal humano se da cuando estos receptores detectan componentes de peptidoglicano microbianos y señalan la activación de NF κ B. Para evaluar la expresión y

funcionalidad de NOD-1 y NOD-2, se usaron dos líneas diferentes de células epiteliales de colon humano que expresan de forma constitutiva NOD-1 y NOD-2. Los niveles de expresión de estos receptores fueron evaluados mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) en células Caco-2 y HT-29. Tanto NOD-1 como NOD-2 se expresan en ambas líneas celulares, sin embargo, el nivel de expresión relativo es mayor en células Caco-2 (Figura 37). En cada línea celular, el umbral mínimo de detección de mRNA para NOD-2 fue mayor que el detectado para NOD-1, siendo la diferencia entre ambos entre 8 a 10 ciclos de umbral, lo que indica un menor nivel de expresión de NOD-2 en ambas líneas celulares Caco-2 y HT-29.

Para estudios posteriores, nos centramos en el uso de células Caco-2. Esta elección se basó en dos hechos: (i) mayor expresión de NOD-1 y NOD-2 en comparación con células HT-29, y (ii) ausencia de respuesta por parte de células Caco-2 a la estimulación por LPS dada la baja expresión de TLR4 y de MD-2, un coreceptor clave para la señalización a través de TLR4 (Abreu et al. 2001; Kim, Lee, and Kagnoff 2004). Este perfil de expresión evita la interferencia de otras vías de señalización activadas por OMVs a través de su interacción con receptores de membrana, siendo la respuesta prácticamente dependiente de los receptores intracelulares.

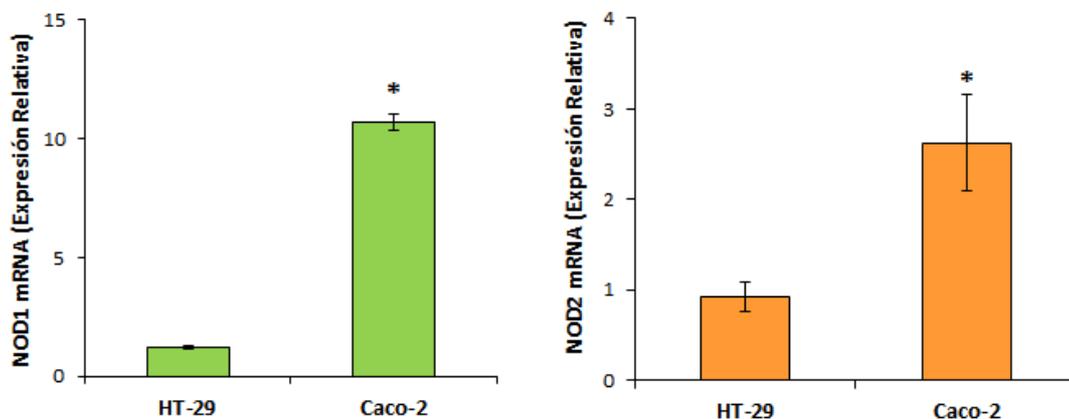


Figura 37. Expresión constitutiva de NOD-1 y NOD-2 en células epiteliales de colon humano. La cuantificación relativa de los niveles de mRNA de NOD-1 y NOD-2 se llevó a cabo mediante RT-qPCR en dos líneas celulares diferentes de epitelio intestinal HT-29 y Caco-2. * $P < 0.010$, los valores relativos de NOD-1 en células Caco-2 se expresan *versus* los valores relativos determinados en la línea celular HT-29 (valor 1)

5.5.2.2. Silenciamiento de NOD-1 o NOD-2 en células epiteliales Caco-2

Las células Caco-2 expresan de manera constitutiva NOD-1, y en forma menos estable NOD-2. Para evaluar la implicación de estos receptores en la secreción de citoquinas

pro-inflamatorias inducida por las OMVs de EcN y ECOR12 en estas células epiteliales, se realizó el silenciamiento de la expresión de NOD-1 y de NOD-2 mediante transfección transitoria con siRNA específicos para cada uno de ellos (METODOS 4.10). Como control se analizaron células Caco-2 transfectadas con siRNA *scramble*. El detalle de los reactivos y protocolos de transfección se describe en METODOS 4.10. La expresión de NOD-1 y NOD-2 se analizó por RT-qPCR después de 48 horas de la transfección. Los resultados muestran que la expresión de ambos receptores se ve disminuida en un 50%-60% frente a los controles ensayados, concretamente células Caco-2 sin transfectar y células transfectadas con siRNA *scramble* (Figura 38).

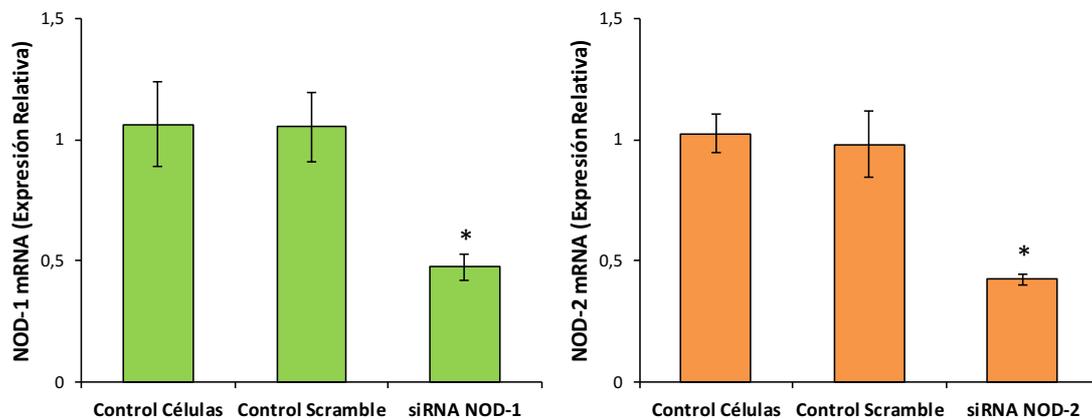


Figura 38. Evaluación de la expresión de NOD-1 y NOD-2 en células epiteliales Caco-2 silenciadas para estos receptores. Células Caco-2 crecidas al 90% de confluencia fueron transfectadas con siRNA para los genes NOD-1 o NOD-2 durante 24 horas. La expresión de los genes fue valorada por RT-qPCR después de 48 horas de tratamiento. Los datos representan los niveles de expresión relativa (media \pm error estándar) de cuatro ensayos independientes. * $P < 0.05$ expresión en células transfectadas con siRNA frente a las células Caco-2 control.

5.5.2.3. LAS OMVs de EcN y ECOR12 inducen la respuesta dependiente de NOD-1

Una vez confirmada la disminución de la expresión de NOD-1 en células transfectadas con el siRNA específico (50% de silenciamiento), nos propusimos analizar si el bajo nivel de expresión de este receptor se traduciría en una menor respuesta pro-inflamatoria frente al tratamiento con las OMVs de EcN y ECOR12. Para ello, las células Caco-2 silenciadas con el siRNA de NOD-1 fueron posteriormente estimuladas con las OMVs de EcN o de ECOR12 (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 8 horas. La respuesta celular fue evaluada mediante análisis de la expresión de IL-6 e IL-8 por RT-qPCR. Comentar que la transcripción de ambas citoquinas depende de NF- κ B. Los datos obtenidos muestran que la activación de ambas citoquinas en respuesta a las OMVs de ambas cepas se ve reducida en las células Caco-2 con expresión disminuida de NOD-1 (NOD-1 *knockdown*)

frente a las células control transfectadas con siRNA *scramble* (Figura 39). Este efecto es mucho más marcado en el caso de la expresión de IL-6. Los niveles relativos de mRNA para IL-6 en células Caco-2 incubadas con OMVs son 15 veces superiores a los que presentan las células control no estimuladas, mientras que el incremento en los niveles del mRNA de esta citoquina es sólo de 2 veces en las células Caco-2 NOD-1 *knockdown*.

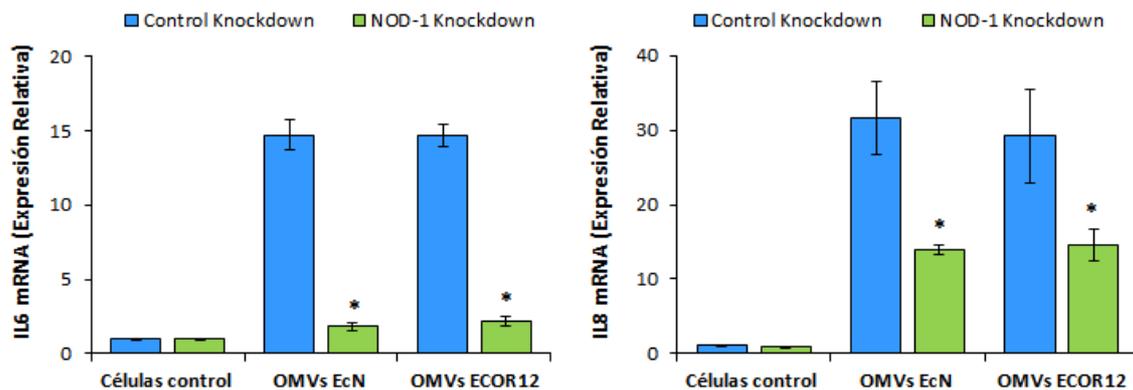


Figura 39. Análisis de la expresión de IL-6 e IL-8 en respuesta a las OMVs de EcN y ECOR12 en células Caco-2 silenciadas para NOD-1 (células NOD-1 knockdown). Células Caco-2 crecidas al 90% de confluencia fueron transfectadas con siRNA para el gen NOD-1, o con siRNA *scramble* como control. A continuación, fueron estimuladas con OMVs de EcN o ECOR12 durante 8 horas y la expresión de los genes IL-6 e IL-8 fue valorada por RT-qPCR. Los datos representan los niveles de expresión relativa (media \pm error estándar) de tres ensayos independientes. * $P < 0.05$ expresión en células NOD-1 *knockdown* frente a células Caco-2 control (transfectadas con siRNA *scramble*).

Para analizar si las diferencias observadas a nivel transcripcional de IL-6 e IL-8 en las células NOD-1 *knockdown* se veían reflejadas a nivel de proteína, se procedió a cuantificar mediante ELISA los niveles de ambas citoquinas secretadas al medio tras co-incubación con OMVs de EcN o ECOR12 durante 8 horas. Las células Caco-2 control mostraron secreción incrementada de IL-6 y IL-8 tras la estimulación con las OMVs de ambas cepas. De acuerdo con los resultados de RT-qPCR, los niveles de secreción de ambas citoquinas tras la estimulación con OMVs fueron considerablemente inferiores en las células NOD-1 *knockdown* (significación estadística para IL-6) (Figura 40). En conjunto estos resultados evidencian la implicación de la vía de señalización de NOD-1 en la respuesta inmunitaria mediada por las OMVs de cepas de *E. coli* comensales y probióticas.

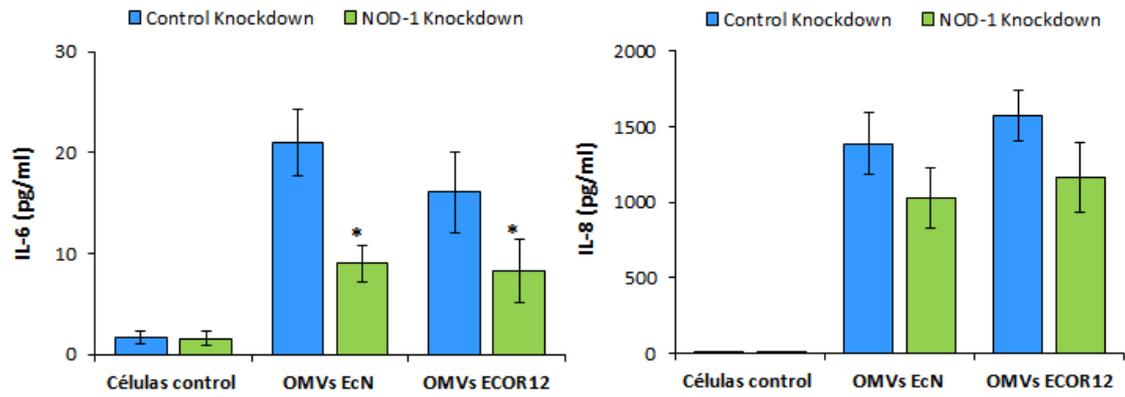


Figura 40. Análisis de la secreción de IL-6 e IL-8 en respuesta a las OMVs de EcN y ECOR12 en células Caco-2 silenciadas para NOD-1 (células NOD-1 knockdown). Células Caco-2 crecidas al 90% de confluencia fueron transfectadas con siRNA para el gen NOD-1, o con siRNA *scramble* como control. A continuación, fueron estimuladas con OMVs de EcN o ECOR12 durante 8 horas, y la concentración de las citoquinas IL-6 e IL-8 secretadas al medio fue determinada por ELISA. Los datos representan los niveles de secreción en pg/ml (media \pm error estándar) de tres ensayos independientes. * $P < 0.05$ expresión en células NOD-1 knockdown frente a células Caco-2 control (transfectadas con siRNA *scramble*).

5.5.2.4. La respuesta inmune mediada por las OMVs de EcN y ECOR12 no se ve afectada en células silenciadas en la expresión de NOD-2

Para evaluar la posible implicación de la vía de señalización del receptor de tipo NOD-2 en los efectos mediados por las OMVs de EcN y ECOR12, se llevaron a cabo ensayos en células Caco-2 silenciadas mediante transfección transitoria con siRNA frente NOD-2. Tras incubación de 8 horas con las OMVs de ambas cepas, se procedió a evaluar la expresión de IL-6 e IL-8 mediante RT-qPCR (Figura 41). Los resultados muestran que la activación de la transcripción de ambas citoquinas en respuesta a las OMVs no se ve alterada en las células Caco-2 con expresión disminuida de NOD-2 (*NOD-2 knockdown*), y en consecuencia descartan la implicación de NOD-2 en la señalización mediada por las OMVs de estas cepas de la microbiota intestinal.

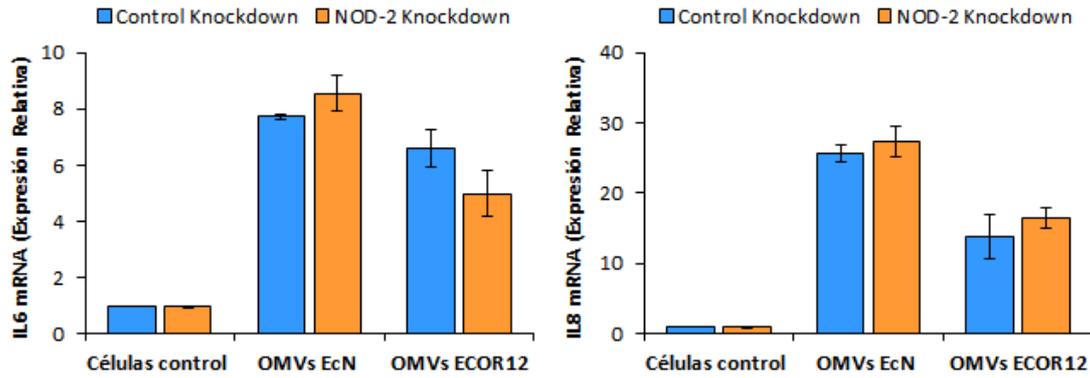


Figura 41. Análisis de la secreción de IL-6 e IL-8 en respuesta a las OMVs de EcN y ECOR12 en células Caco-2 silenciadas para NOD-2 (células NOD-2 knockdown). Células Caco-2 crecidas al 90% de confluencia fueron transfectadas con siRNA para el gen NOD-2, o con siRNA *scramble* como control. A continuación, fueron estimuladas con OMVs de EcN o ECOR12 durante 8 horas, y la expresión de los genes IL-6 e IL-8 fue valorada por RT-qPCR. Los datos representan los niveles de expresión relativa (media \pm error estándar) de tres ensayos independientes.

6 DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El estudio de vesículas de membrana es un área de investigación muy actual. Las OMVs actúan como una vía de secreción generalizada en bacterias Gram-negativas que les permite transferir su contenido a otras células bacterianas, así como a células eucariotas. De hecho, las OMVs están consideradas como “comunicadores” intercelulares, ya que actúan como un mecanismo de liberación a distancia de compuestos activos entre células (Kulp and Kuehn 2010). Así, está demostrado que las OMVs constituyen uno de los mecanismos utilizados por las bacterias patógenas para transferir a las células diana una diversa gama de productos. Las OMVs secretadas al medio permiten la interacción directa de componentes bacterianos con receptores celulares antes que la propia bacteria pueda interactuar directamente con receptores o ser internalizada en la célula huésped. Este sistema de liberación de componentes bacterianos facilita la infección, ya que normalmente las OMVs inducen daño en la célula huésped y a menudo promueven la supresión del sistema inmune cuando estas provienen de bacterias patógenas (Kim et al. 2015).

La gran mayoría de los estudios relacionados con OMVs se han centrado en bacterias patógenas. Actualmente, las OMVs producidas por la microbiota intestinal se vislumbran como agentes importantes en la modulación de la homeostasis intestinal, ya que pueden promover efectos inmunomoduladores en células epiteliales y células inmunes (Kaparakis-Liaskos and Ferrero, 2015). Sin embargo, al inicio de esta tesis doctoral eran muy escasos los estudios relacionados con vesículas secretadas por la microbiota intestinal. Los resultados de esta tesis, así como otros estudios recientes (Chu et al. 2016; Kang et al. 2013; Shen et al. 2012) han mostrado la capacidad de las OMVs de cepas comensales de actuar como vehículos clave en la interacción con el huésped. Además, su capacidad de entrar en la célula huésped y liberar moléculas en su interior ha llevado a estudiar su potencial utilización para aplicaciones biotecnológicas y clínicas (Kim et al. 2015; Kunsmann et al. 2015; Nieves et al. 2014).

6.1 ENDOCITOSIS MEDIADA POR CLATRINA: UN MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN DE OMVs DE *E. coli* COMENSALES EN CÉLULAS EPITELIALES

La superficie de las vesículas se asemeja a la membrana externa bacteriana, y es capaz de interactuar con la superficie de la célula huésped. Las OMVs de patógenos Gram-negativos son internalizadas principalmente por las células del huésped a través de endocitosis (Schaar *et al.*, 2011; Bielaszewska *et al.*, 2013). La endocitosis constituye un

mecanismo eficiente utilizado por muchas vesículas para atravesar la barrera física impuesta por la membrana plasmática y poder penetrar en la célula huésped. La vía endocítica utilizada para su internalización depende de las proteínas u otros componentes vesiculares que dirigen estas vesículas a receptores celulares específicos o a microdominios lipídicos de la membrana. Esto se ha demostrado para las OMVs producidas por *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), donde la enterotoxina termolábil (LT) interacciona con un receptor específico de la superficie celular denominado GM1, lo que conlleva que la entrada de las OMVs se produzca en este caso por endocitosis mediada por balsas lipídicas ricas en colesterol (Kesty *et al.*, 2004). Por el contrario, las OMVs de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) entran en células epiteliales a través de CME. En este caso, la bacteria transfiere la toxina hemolisina (Hly) al interior celular a través de OMVs. Esta toxina no determina la vía de entrada de las OMVs ya que no interacciona con ningún receptor de la membrana de la célula huésped. La internalización de las OMVs depende pues de la interacción de otros componentes con receptores ligados a clatrina que dirigen las vesículas a compartimentos endo-lisosómicos, donde la toxina HlyA es separada y posteriormente dirigida a las mitocondrias (Bielaszewska *et al.*, 2013).

Puesto que la vía de internalización de las vesículas de la microbiota intestinal no había sido descrita, nos propusimos como objetivo de esta tesis doctoral estudiar la internalización de OMVs liberadas por cepas comensales en líneas celulares de epitelio intestinal. Para estos estudios se seleccionaron dos cepas de *E. coli* que pueden colonizar el intestino humano, la cepa probiótica EcN (grupo filogenético B2) y la cepa comensal ECOR12 (grupo filogenético A). Estas cepas difieren en los componentes de la superficie bacteriana, ya que EcN expresa un polisacárido capsular K5 que está muy presente en algunos grupos bacterianos patógenos y que es importante para la interacción con células del epitelio intestinal (Hafez *et al.*, 2009). A través de diferentes aproximaciones experimentales hemos demostrado que las OMVs de ambas cepas, a pesar de su diferencia en los componentes de la superficie bacteriana, son internalizadas en células de epitelio intestinal a través de un mecanismo endocítico mediado por clatrina. Esto se evidenció por el hecho que la internalización de las vesículas fue claramente inhibida por clorpromazina y dynasore pero no por nistatina o filipina III. El dynasore es un compuesto farmacológico descrito por primera vez como un inhibidor de la dinamina, interfiriendo así con la remodelación y la fisión de vesículas revestidas con clatrina durante la endocitosis. Este inhibidor también presenta otros efectos que son independientes de la dinamina, como su capacidad para interrumpir la organización de las balsas lipídicas al reducir el contenido en colesterol de la membrana plasmática. Sin embargo, debido a que filipina III y nistatina, ambos agentes secuestrantes del colesterol, no alteran la internalización de las OMVs de EcN y de ECOR12, el efecto del dynasore sobre la captación de estas vesículas microbianas debe atribuirse a la inhibición de la CME a través de su efecto sobre la dinamina. Esta proteína actúa como un factor fundamental en los procesos post-internalización implicados en el control del

tráfico intracelular a través del sistema endosomal mediante la fusión de estructuras tubulares, esencial para la acidificación de los endosomas así como para el control de las rutas de reciclamiento y degradación de sus componentes (Mettlen *et al.*, 2009; Mesaki *et al.*, 2011). Mediante microscopía confocal y diferentes marcajes (B-R18 o anti-LPS) demostramos que las OMVs colocalizan específicamente con clatrina, siendo la medida del coeficiente de solapamiento superior a 0,6. En conjunto estos resultados confirman que CME es la principal vía para la captación de estas vesículas en células de epitelio intestinal.

En este trabajo se han llevado también a cabo estudios de internalización de OMVs de otras cepas de *E. coli* de origen intestinal, aisladas de individuos sanos, pertenecientes al grupo B2, al igual que el probiótico EcN. Este grupo filogenético expresa factores de virulencia y engloba una gran parte de cepas que causan infecciones extra-intestinales. En concreto se ensayaron las cepas ECOR51, ECOR53, ECOR56 y ECOR63. Los resultados obtenidos con las OMVs de la cepa ECOR63 demuestran su internalización por endocitosis a través de CME de manera similar a lo observado para EcN y ECOR12. Sin embargo, las OMVs de ECOR51, ECOR53 y ECOR56 no presentaron un patrón claro respecto a la vía de internalización, ya que todos los inhibidores de las vías de endocitosis ensayados producían una reducción parcial de la entrada de las OMVs al interior de las células epiteliales, y ninguno de ellos promovió una inhibición completa del proceso endocítico. Estos resultados sugieren que las OMVs son capaces de compensar la ausencia de una ruta de entrada, o bien utilizan más de una vía de internalización. Como ejemplo, podemos citar la internalización de las OMVs de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, la cual es reducida en un 25% en presencia de monensina, un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina, y también se observa una reducción del mismo orden por la presencia de filipina III que secuestra el colesterol. Este es un claro ejemplo de cómo las OMVs son capaces de utilizar diferentes vías de internalización (Rompikuntal *et al.*, 2012; Bielig *et al.*, 2014). En este sentido, las OMVs de las cepas ECOR51, ECOR53 y ECOR56 podrían contener componentes de superficie específicos de cepa, tales como proteínas de membrana externa, adhesinas o carbohidratos concretos, capaces de reconocer e interactuar con receptores de membrana de las células epiteliales, involucradas en vías de endocitosis a través de vías dependientes de balsas lipídicas o caveolina.

Es de destacar que la vía de internalización de las OMVs no depende del tipo ni grado de diferenciación de la célula epitelial, obteniéndose resultados comparables en diferentes líneas de epitelio intestinal tanto cultivadas al 80-90% de confluencia como en monocapas de epitelio polarizado. Además, nuestros resultados utilizando la línea celular HT29-MTX productora de mucina muestran que las OMVs pueden difundir a través de la capa de mucus antes de ser internalizadas en las células diana (Figura 20).

Siguiendo la vía de la CME, las OMVs bacterianas una vez internalizadas continúan su tráfico a través de compartimentos endo-lisosómicos (Parker *et al.*, 2010; Bielaszewska *et al.*, 2013; Olofsson *et al.*, 2014). Los estudios de colocalización realizados en este trabajo confirman la presencia de las OMVs de EcN y de ECOR12 en los endosomas tempranos y los lisosomas. El análisis de los coeficientes de solapamiento (superior o cercano a 0,5) corrobora la colocalización de las OMVs de ambas cepas con marcadores específicos de estos compartimentos subcelulares. Los coeficientes de solapamiento calculados para la colocalización con EEA-1 fueron ligeramente inferiores (menores a 0,5), lo que puede explicarse por la localización transitoria de vesículas en los endosomas tempranos durante su tráfico a lisosomas. Una vez que estas vesículas llegan al endosoma pueden activar la señalización a través de NLRs mediante reconocimiento de patrones moleculares específicos como por ejemplo el peptidoglicano (ligando de NOD-1 y NOD-2) o el lipopolisacárido. En los lisosomas, es posible separar o disociar determinados componentes de las vesículas desde el interior de este compartimento y luego dirigirlos a otros orgánulos o localizaciones subcelulares para inducir respuestas específicas. Este es, por ejemplo, el destino de la hemolisina HlyA de EHEC asociada a OMVs. Tras la acidificación de los endosomas y la consiguiente caída del pH, la toxina se separa de las OMVs y escapa de los lisosomas, probablemente a través de su actividad de formación de poros, y desencadena una serie de efectos biológicos asociados a la toxina en otros compartimentos celulares, especialmente mitocondrias donde desencadena la apoptosis (Bielaszewska *et al.*, 2013). Este proceso implica un nuevo mecanismo en la patogénesis de algunas enfermedades.

6.2 LAS VESICULAS GENERADAS POR EL MUTANTE HIPERVESICULANTE EcN *tolR* SON HETEROGENEAS Y MUESTRAN UNA REDUCIDA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN CON LAS CELULAS EPITELIALES

Tal como se ha comentado anteriormente, la utilización de las OMVs para aplicaciones biotecnológicas y clínicas es un campo en creciente estudio, sin embargo, el mayor inconveniente es el bajo rendimiento de su obtención. Este es también un factor limitante de cara a abordar determinados estudios funcionales con las OMVs aisladas a partir de cultivos bacterianos. Normalmente, las OMVs se aíslan a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos en diferentes medios pero tienen como principal inconveniente su baja tasa de vesiculación, lo que repercute en un bajo rendimiento de su obtención. Una estrategia para superar esta limitación es el uso de cepas mutantes en proteínas de la envoltura celular con un fenotipo hipervesiculante (Schwechheimer, Kulp and Kuehn, 2014). En este sentido, se han reportado mutantes del sistema *tol-pal* en varias especies bacterianas para incrementar la producción de OMVs (Henry *et al.*, 2004). Aunque el análisis por tinción negativa (TEM) de las vesículas producidas por estas bacterias no revela cambios fenotípicos significativos respecto a las OMVs de la

cepa original, se han reportado algunas diferencias en cuanto al perfil de proteínas y la capacidad de inducir respuestas inmunogénicas e inflamatorias en el caso de vesículas aisladas de mutantes de *H. Pylori* $\Delta tolB$ y Δpal (Turner *et al.*, 2015). Estos hallazgos señalan claramente diferencias en la composición molecular de las OMVs aisladas de mutantes *tol-pal* y requieren un conocimiento más profundo de la estructura antes de su aplicación en estudios funcionales.

En este trabajo, antes de mejorar el rendimiento en la obtención de OMVs a través del uso de mutantes hipervesiculizantes, nos planteamos obtener más información sobre la estructura molecular de las vesículas generadas por mutantes del sistema *tol-pal*, utilizando como modelo la cepa probiótica EcN. Para ello, las OMVs derivadas de EcN y del mutante EcN *tolR* se aislaron a partir del mismo volumen de cultivo en LB obtenidos tras 12-15 h de crecimiento. Se seleccionaron estas condiciones por ser las comúnmente utilizadas para la obtención de vesículas derivadas de bacterias Gram-negativas para estudios funcionales, así como para su aplicación como vehículo para la administración de sustancias activas (Klimentová and Stulík, 2015). La cuantificación en la producción de las OMVs mediante la determinación de la concentración de proteína mostró aumentos significativos en la producción de OMVs a partir de la cepa EcN *tolR* en comparación con la cepa de tipo salvaje EcN, aproximadamente de unas 33 veces, confirmando el fenotipo hipervesiculante. Aunque el tamaño medio de las vesículas generadas por el mutante EcN *tolR* es ligeramente superior al de las OMVs aisladas de la cepa salvaje, éste no es suficiente para justificar la mayor concentración de proteína en las vesículas del mutante *tolR*.

Si bien el perfil proteico de las OMVs de EcN *tolR* fue bastante similar al de las OMVs de la cepa de tipo salvaje, se identificaron algunas diferencias. Las diferencias más relevantes se correlacionan con alteraciones en la estructura de la membrana externa, probablemente resultantes de la deficiencia en la proteína TolR. Así, las OMVs liberadas por el mutante *tolR* mostraron mayor contenido en dos proteínas del complejo *tol-pal*, en concreto TolB (proteína periplásmica) y Pal (lipoproteína de la membrana externa asociada al peptidoglicano). En la cepa EcN *tolR*, la formación del complejo proteico TolQRA-B-Pal esta alterada como consecuencia de la deficiencia en TolR, por ello las proteínas TolB y Pal en forma libre (que no interactúan con el resto de componentes del complejo) pueden ser liberadas a través de las OMVs. Al igual como ocurre con el mutante *tolR* de *Gallibacterium anatis* (Bager *et al.*, 2013) las OMVs producidas por EcN *tolR* estaban enriquecidas en OmpA. Esta es una proteína muy abundante de la membrana externa que también contribuye (al igual que el sistema Tol-Pal) a enlazar el PGN a la membrana externa. Se ha sugerido que el aumento de los niveles de OmpA puede compensar la inestabilidad de la membrana en cepas deficientes en Tol-Pal (Bager *et al.*, 2013). Por el contrario, tanto la proteína MipA requerida para la biosíntesis de PGN como la flagelina estaban disminuidas en las OMVs de la cepa EcN *tolR*. En este

sentido, se ha descrito que mutantes *tolB* de *H. pylori* presentan una baja producción de flagelo. En este caso, también las OMVs del mutante *tolB* mostraron diferencias específicas en la composición de proteínas con respecto a las producidas por *H. pylori* tipo salvaje, con aproximadamente diez proteínas ausentes en el mutante (Turner *et al.*, 2015). Por tanto, las principales alteraciones en la composición molecular de las OMVs generadas por EcN *tolR* pueden atribuirse a la deficiencia en la proteína *TolR*.

La composición de las vesículas obtenidas a partir de mutantes *tolR* ha sido estudiada por varios grupos, pero la estructura no ha sido analizada en detalle. La observación por tinción negativa de OMVs mediante TEM es la técnica más comúnmente utilizada para evaluar la presencia y morfología de OMVs, pero no proporciona suficiente resolución para distinguir entre diferentes tipos de vesículas, los posibles artefactos, o las membranas recircularizadas procedentes de células lisadas (Bernadac *et al.*, 1998; McBroom *et al.*, 2006; Roier *et al.*, 2016). Algunos estudios han descrito la morfología de las vesículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) o a través de TEM en muestras químicamente fijadas y deshidratadas a temperatura ambiente (Deatherage *et al.*, 2009). Sin embargo, en ambos métodos el material extracelular, que incluye las OMVs, tiene una marcada preferencia a colapsar y ser eliminado durante la preparación de la muestra (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995; Nevot *et al.*, 2006). Sorprendentemente, pocos estudios han utilizado TEM de especímenes crio-inmovilizados por HPF-FS, o cryo-TEM para visualizar las muestras de vesículas de membrana, a pesar de que ambas técnicas se han mostrado muy útiles para observar en detalle la estructura de vesículas de membrana y de las cepas que las producen (Renelli *et al.*, 2004; Pérez-Cruz *et al.*, 2013; Perez-Cruz *et al.*, 2015).

En este estudio, se ha colaborado con el grupo de la Dra. Mercadé, experta en análisis microscopico de vesículas de membrana para caracterizar a nivel estructural las vesículas generadas por el mutante EcN *tolR* en comparación con las generadas por la cepa tipo salvaje. El análisis clásico por TEM sólo mostró un ligero aumento en el diámetro medio de vesículas de EcN *tolR* y una menor población de vesículas pequeñas. Ningún otro detalle que no fuera su forma esférica o tamaño se apreciaron con esta técnica. Por el contrario, la observación mediante TEM de secciones de preparaciones obtenidas por HPF-FS nos permitió observar en las muestras de EcN *tolR* no sólo una mayor producción de vesículas sino también la existencia de diferentes tipos de vesículas que se intercalaban entre las bacterias. En las preparaciones de EcN se observaron sólo dos tipos de vesículas, la mayoría correspondientes al tipo OMVs (vesículas de membrana externa) y una pequeña proporción de vesículas del tipo *outer-inner membrane vesicles* recientemente descritas (O-IMVs) (Perez-Cruz *et al.* 2015). Por otro lado, y consistente con esta observación, el análisis por cryo-TEM de las preparaciones de vesículas aisladas de EcN *tolR* reveló la existencia de al menos cinco tipos de vesículas, que incluían las típicas OMVs, O-IMVs, vesículas con varias capas o envueltas, fragmentos de membrana recircularizados y agrupaciones de vesículas.

Destacar que algunas estructuras vesiculares diferentes han sido también visualizadas mediante análisis ultraestructural de preparaciones obtenidas de *H. pylori* cepa 60190 (Fiocca *et al.*, 1999). Por tanto, el análisis de la estructura de las vesículas por TEM después de las técnicas de HPF-FS y cryo-TEM nos ha permitido obtener información complementaria y más exacta sobre su estructura y confirma tanto el fenotipo hipervesiculante de EcN *tolR* como la heterogeneidad de las vesículas generadas por este mutante.

Este estudio muestra que no sólo la composición y la estructura de OMVs pueden ser modificadas por mutaciones en las proteínas de la envuelta celular, sino que también su interacción con las células huésped puede verse afectada. El análisis de la captación de las vesículas generadas por EcN *tolR*, analizada tanto por el aumento de la fluorescencia emitida por vesículas marcadas con rodamina como por las imágenes obtenidas mediante microscopía de las mismas, mostró un nivel de internalización reducido, aproximadamente 3 veces inferior, con respecto a las OMVs de la cepa salvaje EcN. Cabe resaltar que las OMVs derivadas de EcN *tolR* son internalizadas por la misma vía endocítica que las OVMs de EcN, siendo su entrada inhibida específicamente por clorpromazina. El análisis por citometría de flujo realizado con OMVs marcadas con DIO confirmó un menor grado de internalización para las OMVs derivadas del mutante *tolR*. Los valores de intensidad de fluorescencia cuantificados antes y después de la adición de Azul de tripano permitieron establecer que el bajo número de vesículas internalizadas era debido a una menor capacidad de unión a la membrana de la célula huésped por parte de las vesículas del mutante *tolR*, y no a una vía o mecanismo de entrada diferente. Estos resultados sugieren que sólo ciertos tipos de vesículas, probablemente las OMVs convencionales y las O-IMVs, interactúan eficientemente con su(s) receptor(es) o dianas en la membrana celular, un paso clave antes de ser internalizadas por las células epiteliales. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran diferencias a nivel de estructura e internalización entre el fenotipo salvaje y el hipervesiculante. Por ello, de cara a abordar estudios funcionales se optó por obtener las OMVs a partir de cultivos de las cepas tipo salvaje, aun considerando el menor rendimiento en su producción.

6.3 LAS OMVs DE LAS CEPAS EcN Y ECOR12 NO SON CITOTÓXICAS, PERO EJERCEN DIFERENTES EFECTOS GENOTÓXICOS SOBRE LA CÉLULA HUÉSPED

Nuestros resultados descartan la presencia de OMVs, como tales estructuras vesiculares, en el núcleo de la célula huésped, sin embargo, las vesículas de EcN promueven la ruptura de la doble cadena de DNA en células epiteliales, como lo demuestra la inmunocuantificación de la histona γ H2AX fosforilada y la formación de

colas de DNA en el ensayo del cometa. En esta cepa probiótica, la genotoxicidad se ha atribuido a la colibactina (Olier *et al.*, 2012). Esta toxina es un péptido no ribosómico sintetizado por actividades enzimáticas codificadas en la isla *pks*, que pertenece a una familia de moléculas genotóxicas pequeñas que no están bien caracterizadas y que inducen roturas de doble cadena (DSB) en el DNA. Estudios realizados con un mutante EcN deficiente en la síntesis de colibactina mostraron que, además de su actividad genotóxica, la colibactina es esencial para los efectos antiinflamatorios de este probiótico *in vivo*. Es más, la deficiencia en la biosíntesis de colibactina conduce a la exacerbación de la severidad de la colitis inducida por DSS en ratones (Olier *et al.*, 2012). Estos hechos llevaron a los autores a considerar la colibactina como una inmunomodulina. Curiosamente, la actividad probiótica de EcN no puede disociarse de su genotoxicidad, y ambos efectos requieren una vía de biosíntesis funcional de colibactina. Actualmente se desconoce cómo se exporta y se entrega esta toxina a la célula diana. Puesto que las OMVs de EcN inducen lesiones en el DNA compatibles con los DSB generados por colibactina, podemos especular que este factor u otro metabolito intermediario de la biosíntesis de colibactina podrían ser liberados a través de las OMVs e internalizados en las células diana. Por el contrario, las OMVs de la cepa comensal ECOR12 (*pks* negativo) muestran una baja capacidad para inducir lesiones en el DNA, lo que apunta a la colibactina como el agente responsable de este tipo de lesiones inducidas por las OMVs de EcN. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de componentes vesiculares específicos de EcN distintos de la colibactina a los efectos genotóxicos de sus vesículas. Aunque el perfil proteico y el contenido de LPS de las vesículas producidas por EcN y ECOR12 son muy similares (Fábrega *et al.*, 2016), estas cepas pertenecen a un grupo filogenético diferente y por tanto, difieren en sus perfiles genómicos. Estas diferencias genómicas pueden afectar al contenido proteico de las vesículas liberadas. Cabe destacar que las OMVs de cepas de *E. coli* no patógenas pueden ser genotóxicas para las células epiteliales intestinales humanas. Incluso las vesículas liberadas por la cepa de laboratorio *E. coli* DH5a inducen la generación de especies reactivas de oxígeno que conducen al daño oxidativo del DNA provocando la formación de aductos 8-oxo-dG mutagénicos (Tyrer, Frizelle and Keenan, 2014). Nuestros resultados muestran que ni las OMVs del probiótico EcN ni de la cepa comensal ECOR12 inducen este tipo de lesiones oxidativas en el DNA de células epiteliales después de su internalización.

Se sabe que la acumulación de daño en el DNA da como resultado el paro del ciclo celular. El análisis de la progresión del ciclo celular indica que las OMVs de ambas cepas, EcN y ECOR12, promueven la detención del ciclo celular entre las fases S / G2 en células HT-29. Estos resultados son compatibles con la mutación p53 presente en esta línea celular. La deficiencia en p53 suprime el punto de control G1, que es esencial para controlar la entrada de células en la fase S.

Las OMVs de las cepas EcN y ECOR12 no afectan a la viabilidad celular por lo que no pueden considerarse citotóxicas. Sin embargo, estas reducen la tasa de proliferación de las células diana, lo que es consistente con la parada del ciclo celular observada y cuya finalidad es reparar el DNA dañado antes de la división celular. Estos efectos sobre la viabilidad y proliferación promovidos por las OMVs de las cepas de microbiota intestinal utilizadas en este trabajo son claramente diferentes a los reportados para algunas cepas patógenas de *E. coli*, como EHEC. Respecto a la viabilidad celular, las toxinas específicas presentes en las OMVs de EHEC inducen la apoptosis y la muerte de la célula (Bielaszewska *et al.*, 2013; Kunsmann *et al.*, 2015). Respecto al crecimiento celular, las OMVs de EHEC o de patógenos del tipo *E. coli* adherente invasivo aumentan significativamente la proliferación celular (Tyrer, Frizelle and Keenan, 2014). Este hecho, junto con la actividad genotóxica asociada a estas vesículas ha llevado a los autores del trabajo a hipotetizar que, al igual que las vesículas de *H. pylori* (Chitcholtan, Hampton and Keenan, 2008; Bielaszewska *et al.*, 2013), las OMVs de estas cepas patógenas de *E. coli* podrían influir en el desarrollo de cáncer colorectal. Contrariamente, las vesículas de la cepa no patógena *E. coli* DH5 α no alteran la viabilidad ni la tasa de crecimiento de las células huésped (Tyrer, Frizelle and Keenan, 2014).

En este contexto, las OMVs de la cepa comensal ECOR12 y del probiótico EcN, pueden considerarse mediadores seguros de los efectos de estas bacterias de la microbiota intestinal puesto que no afectan a la viabilidad ni incrementan la proliferación de las células epiteliales del intestino.

6.4 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR VÍA NOD

Estudios recientes han demostrado que las células huésped reconocen inicialmente gran variedad de productos bacterianos como el LPS, PGN y flagelina, comúnmente conocidos como PAMPs (Chatterjee and Chaudhuri, 2013; Irving *et al.*, 2014). El PGN asociado a la membrana de las bacterias puede ser internalizado a través de varios mecanismos. El primer mecanismo conocido fue su entrada a través de patógenos invasivos, accediendo así al lisosoma, donde se degrada (Feerick and McKernan, 2016). Recientemente se han descrito otros mecanismos adicionales que permiten su internalización, incluyendo las vesículas de membrana externa, la endocitosis y los sistemas de secreción bacteriana de tipo inyectisoma. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los péptidos muramyl tienen acceso al citosol del huésped permanecen poco claros. Este es un factor clave ya que la vía principal de entrada del PGN es a través de endocitosis mediada por clatrina y los receptores NLR activados por estos péptidos tienen una localización citosólica (Lee *et al.*, 2009). Desde el hallazgo del receptor NOD-1, numerosos estudios han examinado su papel en la respuesta inmune innata y han evaluado como el PGN de bacterias Gram negativas es reconocido por el receptor,

utilizando agonistas de PGN o NOD-1 purificados e introducidos en células epiteliales (Girardin *et al.*, 2003). El uso de OMVs de *H.pilori* como vehículo natural para la entrada del PGN de bacterias no invasivas al interior de células epiteliales ha permitido establecer que la activación de NOD-1 por el PGN presente en las OMVs tiene lugar en la membrana de los endosomas primarios, donde NOD-1 y RIP-2 son reclutados (Irving *et al.*, 2014). Este estudio no pudo demostrar la formación por degradación del péptido específico derivado del PGN dentro del endosoma, ni tampoco explica como desde esta localización puede interactuar directamente con NOD-1. En este sentido, se ha descrito que el pH de los endosomas (pH 5,5-6) es esencial para el procesamiento de los péptidos activadores de NOD-1. Este hecho junto con la presencia de un sistema de transporte en la membrana (SLC15A4) de los endosomas que actuaría como puerta de acceso de estos péptidos al citosol (Lee *et al.*, 2009) permitiría la interacción de los mismos con NOD-1 para iniciar la cascada de fosforilación que conducirá a la activación de NF- κ B. En ausencia de ligandos, los NLR mantienen un estado monomérico inactivo dispersos en el citosol donde se piensa que estos complejos contribuyen a la tolerancia bacteriana, evitando una respuesta inflamatoria excesiva en regiones como el intestino (Viala *et al.*, 2004).

En este trabajo hemos analizado la participación de NOD-1 y NOD-2 en la respuesta inmunitaria inducida por las OMVs de cepas comensales y probióticas en células epiteliales. Las células de epitelio intestinal Caco-2 y HT-29 expresan de manera constitutiva NOD-1, siendo el nivel de expresión mayor en la línea celular Caco-2. Para demostrar la implicación de la señalización a través de estos PRR intracelulares se utilizó la estrategia de silenciamiento génico de NOD-1 y NOD-2 por siRNA. Puesto que las OMVs contienen LPS pueden también activar vías de señalización a partir de receptores TLR de la membrana celular como TLR4. Por ello la estrategia del siRNA se aplicó a la línea celular Caco-2, que debido a la escasa expresión de un receptor TLR4 funcional no responde a LPS bacteriano. Se evita así la interferencia de otras vías de señalización activadas por OMVs que conducen también, al igual que los receptores NOD, a la activación de NF- κ B (Abreu *et al.* 2001; Kim, Lee, and Kagnoff 2004). En las células Caco-2 transfectadas con el siRNA específico de NOD-1, el grado de silenciamiento génico para este receptor fue de alrededor del 50%. La estimulación de células Caco-2 con las OMVs de las cepas EcN y ECOR12 induce una respuesta inflamatoria significativa como se evidencia por el incremento en la transcripción y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8. Sin embargo, la respuesta inflamatoria inducida por OMVs en las células silenciadas para NOD-1 (NOD-1 *knockdown*) fue claramente inferior, lo que sugiere que la activación de NF- κ B promovida por las OMVs es mediada, al menos en parte, por la señalización a través de NOD-1. Se ha reportado que las OMVs derivadas de *H. pylori*, *P. aeruginosa* y *N. gonorrhoea* también vehiculan e internalizan PGN, el cual permite la activación de NOD-1 (Kaparakis *et al.*, 2010). No obstante, en células epiteliales de colon humano las OMVs de microbiota pueden activar la producción y

secreción de mediadores de la inflamación a través vías de señalización acopladas a receptores TLR extracelulares (TLR-2, TLR-5) e, incluso, a otros receptores intracelulares (TLR-9, TLR-7), que reconocen otros patrones microbianos y conducen también a la activación del NF- κ B. Por tanto NOD-1, forma parte de la red de vías de señalización reguladas por las OMVs secretadas por la microbiota intestinal. En este caso, al no tratarse de bacterias invasivas, las OMVs permiten la internalización del PGN, que actúa como ligando específico de NOD-1.

La implicación de la vía de señalización de NOD-1 en la respuesta inmune inducida por OMVs en células epiteliales implica el reclutamiento de NOD-1 hacia las membranas de los endosomas que albergan las OMVs internalizadas (Irving *et al.*, 2014). Como herramienta para demostrar esta interacción utilizamos la microscopía confocal de inmunofluorescencia, técnica que permite establecer la colocalización de dos o más componentes en el interior de la célula. Como ya se ha comentado anteriormente la colocalización de las OMVs internalizadas en células HT-29 con la proteína EEA-1 indicaba la localización de estas vesículas en endosomas tempranos como ruta normal del tráfico intracelular asociado a procesos de endocitosis. En ausencia de OMVs, NOD-1 se encuentra localizado difusamente en el citosol de las células HT-29, mientras que en células incubadas en presencia de OMVs, NOD-1 colocaliza con el marcador de endosomas tempranos, la proteína EEA1. Esto indica que el PGN de las vesículas presentes en los endosomas promueve el reclutamiento de NOD-1 hacia este compartimento endosomal, un paso crítico para la activación de las cascadas de fosforilación que llevarán a activar NF- κ B. De hecho, diferentes métodos de marcaje fluorescente para visualizar las OMVs internalizadas (anticuerpos anti-LPS, marcaje específico de PGN con BODIPY-FL, OMVs marcadas con rodamina R-18) nos han permitido demostrar su colocalización con NOD-1 a nivel de endosomas.

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros autores (Kufer *et al.*, 2008; Irving *et al.*, 2014) que describen la localización subcelular de NOD-1 a nivel de citosol y cercano a la membrana plasmática en células epiteliales humanas. En células estimuladas con OMVs de *H. pylori* y *P. aeruginosa*, el PGN asociado a estas vesículas colocaliza con NOD-1 y RIP2 en endosomas tempranos, proporcionando pruebas de interacciones directas entre NOD-1 y PGN.

Respecto a la implicación de NOD-2, nuestros resultados indican que probablemente este receptor no es importante en la señalización y activación de NF- κ B activada por OMVs en células epiteliales de colon humano (células Caco-2) ya que estas presentan menor expresión de NOD-2 y los niveles de mRNA para IL-6 y IL-8 no fueron regulados por vesículas en células silenciadas para este receptor (células NOD-2 *knockdown*). Dada la mayor expresión de NOD-1 en estas células, los efectos del silenciamiento de NOD-2, en caso que este receptor estuviera también implicado, no serían aparentes. Estos

resultados son compatibles con la información disponible en la bibliografía. Así, se ha demostrado que en la mayoría de células epiteliales la expresión de NOD-2 a nivel de mRNA es baja (Kim, Lee, and Kagnoff 2004). Además, entre las poblaciones de células epiteliales primarias, la expresión de NOD-2 parece estar limitada a las células *Paneth*, que se encuentran en la base de las criptas intestinales (Ogura *et al.*, 2003).

6.5. APORTACIONES RELEVANTES DEL ESTUDIO

Evidencias recientes demuestran la implicación de la microbiota intestinal en el control del desarrollo y maduración del sistema digestivo y del sistema inmunitario, con importantes repercusiones en el estado de salud del individuo. En la actualidad, 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. Sin embargo, en muchos casos se desconoce cuáles son los factores microbianos y las bases moleculares que median estos efectos. La aplicación de la microbiota intestinal o de productos derivados de la microbiota en la prevención de la salud requiere un conocimiento profundo de los mecanismos moleculares implicados en la interacción microbiota-huésped (Jia *et al.*, 2008; Shanahan, 2011). En este contexto, las vesículas secretadas por la microbiota intestinal se vislumbran como mediadores importantes de los procesos de señalización a nivel de la mucosa intestinal, aunque los estudios en este campo eran muy escasos al inicio de este trabajo. El estudio desarrollado en esta tesis doctoral ha sido pionero en este sentido. En la figura 42 se presenta un resumen de los resultados más relevantes y novedosos alcanzados durante el desarrollo de este proyecto de tesis. Hemos descrito por primera vez la internalización a través de endocitosis mediada por clatrina de las OMVs generadas por cepas de *E. coli* comensales y probióticas (ECOR12 y EcN) en células de epitelio intestinal. A través de esta vía de internalización, las OMVs son dirigidas hacia los lisosomas a través de compartimentos endocíticos. Durante el tráfico intracelular, y en concreto a nivel de endosomas, las OMVs activan al receptor citosólico NOD1, iniciando una cascada de señalización que conduce a la activación de una respuesta inflamatoria. Las vesículas de estas cepas no afectan la viabilidad celular, ni causan daño oxidativo en el DNA. Sin embargo, las OMVs de la cepa probiótica causan de manera específica roturas de doble cadena en el DNA, las cuales son reparadas por previo reclutamiento de la histona H2AX fosforilada (γ H2AX). Los efectos genotóxicos y anti-inflamatorios de EcN se han atribuido a la colibactina (Olier *et al.*, 2012). Se desconoce si este péptido genotóxico es exportado y entregado a las células del huésped mediante su secreción a través de las OMVs.

En conjunto podemos concluir que las OMVs representan una estrategia efectiva utilizada por bacterias de la microbiota intestinal para comunicarse con las células de la

mucosa intestinal, promoviendo la liberación y entrega de mediadores que inducen respuestas inmunitarias y de defensa en el huésped. Los efectos beneficiosos del probiótico EcN sobre la homeostasis intestinal in vivo, en especial la regulación de la respuesta inmunitaria y la función de la barrera intestinal pueden ser mediados por las OMVs secretadas.

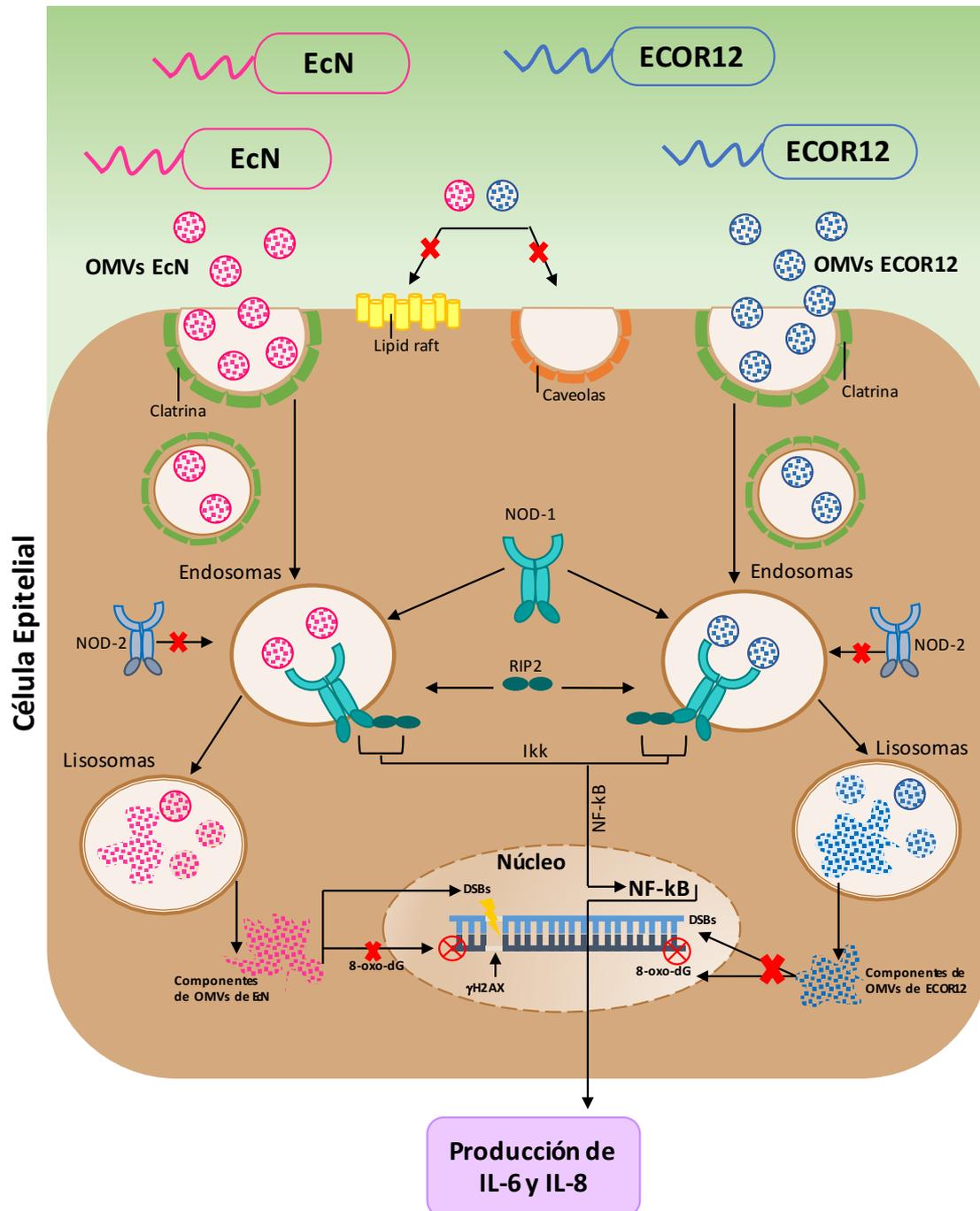


Figura 42. Aportaciones relevantes del estudio

7 CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Las OMVs del probiótico EcN y de cepas comensales de *E. coli* son internalizadas en células de epitelio intestinal a través de endocitosis mediada por clatrina.

2. Las vesículas internalizadas via clatrina colocalizan con marcadores específicos de endosomas y lisosomas, lo que demuestra su tráfico intracelular a través de estos compartimentos endocíticos.

3. Las vesículas aisladas de la cepa mutante EcN *tolR::cm* (con fenotipo hipervesiculante) presentan alteraciones en la composición de proteínas, que son compatibles con las modificaciones a nivel de estructuras de la membrana externa resultantes de la deficiencia en TolR.

4. Las vesículas generadas por el mutante EcN *tolR::cm* son altamente heterogéneas y presentan una menor capacidad de interacción e internalización en células epiteliales, lo que limita su uso para estudios funcionales.

5. Las OMVs del probiótico EcN y de la cepa comensal ECOR12 reducen la tasa de proliferación sin afectar la viabilidad celular.

6. Las OMVs de EcN y ECOR12 no promueven en el núcleo de la célula huésped la formación de aductos 8-oxo-DG, uno de las lesiones mayoritarias generadas por daño oxidativo en el DNA.

7. Las OMVs de la cepa probiótica EcN causan roturas de doble cadena en el DNA, que se reparan mediante el reclutamiento de γ H2AX. Estos efectos genotóxicos pueden ser atribuidos a factores específicos de la cepa probiótica, no identificados hasta el presente.

8. La disminución en la expresión de las citoquinas IL-6 y IL-8 en células Caco-2 *Knockdown* en NOD-1 incubadas con OMVs respecto a las células control no silenciadas demuestran la implicación de NOD-1 en la señalización intracelular inducida por las OMVs de EcN y ECOR12.

9. El silenciamiento de NOD-2 no causó diferencias en la producción regulada de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a las OMVs de EcN y ECOR12, lo que sugiere que NOD-2 no está implicado en la señalización mediada por las vesículas de estas cepas de la microbiota intestinal.

10. La colocalización de OMVs con NOD-1, así como la colocalización de NOD-1 con EEA-1 en presencia de OMVs indican que estas vesículas promueven el reclutamiento de NOD-1 hacia los endosomas tempranos donde tiene lugar su activación para iniciar la cascada de señalización que conduce a la respuesta inflamatoria.

8 REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

Abreu, M. T. *et al.* (2001) 'Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide', *The Journal of Immunology*, 167(3), pp. 1609–1616. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1609.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) 'Pathogen Recognition and Innate Immunity', *Cell*, 124(4), pp. 783–801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Alvarez, C.-S. *et al.* (2016) 'Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells', *Frontiers in Microbiology*, 7(December), p. 1981. doi: 10.3389/fmicb.2016.01981.

Arumugam, M. *et al.* (2011) 'Enterotypes of the human gut microbiome', *Nature* May, 12(4737346), pp. 174–180. doi: 10.1038/nature09944.

Assimakopoulos, S. F., Papageorgiou, I. and Charonis, A. (2011) 'Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases', *World J gastrointest Pathophysiol.*, 2(6), pp. 123–137. doi: 10.4291/wjgp.v2.i6.

Bager, R. J. *et al.* (2013) 'Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*', *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), pp. 565–572. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.09.005.

Behnsen, J. *et al.* (2013) 'Probiotics: Properties, examples, and specific applications', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(3), p. a010074. doi: 10.1101/cshperspect.a010074.

Berleman, J. and Auer, M. (2013) 'The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery', *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.12048.

Bernadac, A. *et al.* (1998) 'Escherichia coli tol-pal mutants form outer membrane vesicles', *Journal of Bacteriology*, 180(18), pp. 4872–4878.

Bertani, G. (2004) 'GUEST COMMENTARY Lysogeny at Mid-Twentieth Century : P1 , P2 , and Other Experimental Systems', *Journal of bacteriology*, 186(3), pp. 595–600. doi: 10.1128/JB.186.3.595.

Bielaszewska, M. *et al.* (2013) 'Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin Employs Outer Membrane Vesicles to Target Mitochondria and Cause Endothelial and Epithelial Apoptosis.', *PLoS pathogens*, 9(12), p. e1003797. doi: 10.1371/journal.ppat.1003797.

Bielig, H. *et al.* (2014) 'Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1- and NOD2-dependent NF- κ B activation', *Infection and Immunity*. Elsevier Inc., 12(3), pp. 4299–309. doi: 10.1074/jbc.M112.408302.

Bomberger, J. M. *et al.* (2009) 'Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles.', *PLoS pathogens*, 5(4), p. e1000382. doi: 10.1371/journal.ppat.1000382.

Bonnington, K. E. and Kuehn, M. J. (2014) 'Protein selection and export via outer membrane vesicles', *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.011.

Butel, M.-J. (2014) 'Probiotics, gut microbiota and health.', *Médecine et maladies infectieuses*. Elsevier Masson SAS, 44(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002.

Camilleri, M. *et al.* (2012) 'Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease.', *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(6), pp. 503–12. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x.

Chatterjee, D. and Chaudhuri, K. (2013) 'Vibrio cholerae O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses.', *The Journal of biological chemistry*, 288(6), pp. 4299–309. doi: 10.1074/jbc.M112.408302.

Cheng, L. K. *et al.* (2010) 'Gastrointestinal system', *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2(1), pp. 65–79. doi: 10.1002/wsbm.019.

Chitcholtan, K., Hampton, M. B. and Keenan, J. I. (2008) 'Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*', *Carcinogenesis*, 29(12), pp. 2400–2405. doi: 10.1093/carcin/bgn218.

Chu, H. *et al.* (2016) 'Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease', *Science*, 352(6289), pp. 1116–1120. doi: 10.1126/science.aad9948.

Chul Kim, K. (2012) 'Role of epithelial mucins during airway infection', *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 100(2), pp. 130–134. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.

Clarke, T. B. *et al.* (2010) 'Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity.', *Nature medicine*. Nature Publishing Group, 16(2), pp. 228–31. doi: 10.1038/nm.2087.

Deatherage, B. L. *et al.* (2009) 'Biogenesis of bacterial membrane vesicles', *Molecular Microbiology*, 72(6), pp. 1395–1407. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x.

Duriez, P. *et al.* (2001) 'Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically

distributed among geographically distinct human populations', *Microbiology*, 147(6), pp. 1671–1676. doi: 10.1099/00221287-147-6-1671.

Ellis, T. N., Leiman, S. A. and Kuehn, M. J. (2010) 'Naturally Produced Outer Membrane Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Elicit a Potent Innate Immune Response via Combined Sensing of Both Lipopolysaccharide and Protein Components', *INFECTION AND IMMUNITY*, 78(9), pp. 3822–3831. doi: 10.1128/IAI.00433-10.

Fábrega, M. J. *et al.* (2016) 'Activation of immune and defense responses in the intestinal mucosa by outer membrane vesicles of commensal and probiotic *Escherichia coli* strains', *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00705.

Faghihi, A. H. *et al.* (2015) 'Efficacy of Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in Patients with Irritable Bowel Syndrome: a Double Blind Placebo-controlled Randomized Trial.', *Acta medica Indonesiana*, 47(3), pp. 201–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586385>.

FAO, E. and OMS, E. (2006) 'Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación', *Estudios FAO alimentación y nutrición*, 85, p. 52. Available at: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf> (Accessed: 8 May 2017).

FAO and WHO (2001) 'Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria "Health and Nutritional Properties of probiotics in Food including powder milk with live lactic Acid Bacteri', *Córdoba, Argentina. October*, pp. 1–34.

Feerick, C. L. and McKernan, D. P. (2016) 'Understanding the regulation of pattern recognition receptors in inflammatory diseases - a "Nod" in the right direction', *Immunology*. doi: 10.1111/imm.12677.

Fiocca, R. *et al.* (1999) 'Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium', *Journal of Pathology*, 188(2), pp. 220–226. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<220::AID-PATH307>3.0.CO;2-C.

Franchi, L. *et al.* (2010) 'Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense', *Cancer*, 227(1), pp. 106–128. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x.Function.

Girardin, S. E. *et al.* (2003) 'Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2', *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), pp. 41702–41708. doi: 10.1074/jbc.M307198200.

Glasser, A.-L. *et al.* (2001) 'Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death', *INFECTION AND IMMUNITY*, 69(9), pp. 5529–5537. doi: 10.1128/IAI.69.9.5529–5537.2001.

Guarner, F. (2011) 'Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino', *Gastroenterología y Hepatología*, 34(3), pp. 147–154. doi: 10.1016/j.gastrohep.2010.11.009.

Guarner, F. and Malagelada, J. R. (2003) 'Gut flora in health and disease', *Lancet*, pp. 512–519. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.

Guttsches, A.-K. *et al.* (2012) 'Anti-inflammatory modulation of immune response by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in human blood mononuclear cells', *Innate Immunity*, pp. 204–216. doi: 10.1177/1753425910396251.

Hafez, M. *et al.* (2009) 'The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in mediating interactions with intestinal epithelial cells and chemokine induction', *Infection and Immunity*, 77(7), pp. 2995–3003. doi: 10.1128/IAI.00040-09.

Hammer, A. M. *et al.* (2015) 'The First Line of Defense.', *Alcohol Research: Current Reviews*, 37(2), p. e-1-014. Available at: <http://o-search.ebscohost.com.library.ucc.ie/login.aspx?direct=true&db=ssf&AN=109311459&site=ehost-live>.

Hancock, V., Dahl, M. and Klemm, P. (2010) 'Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation', *Journal of Medical Microbiology*, 59(4), pp. 392–399. doi: 10.1099/jmm.0.008672-0.

Hao, W.-L. and Lee, Y.-K. (2004) 'Microflora of the Gastrointestinal Tract: A Review', in *Public Health Microbiology*. New Jersey: Humana Press, pp. 491–502. doi: 10.1385/1-59259-766-1:491.

Helander, H. F. and Fandriks, L. (2014) 'Surface area of the digestive tract - revisited', *Scand J Gastroenterol*, 49(6), pp. 681–689. doi: 10.3109/00365521.2014.898326.

Henry, T. *et al.* (2004) 'Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria', *Research in Microbiology*, 155(6), pp. 437–446. doi: 10.1016/j.resmic.2004.04.007.

Hering, N. a *et al.* (2013) 'Tcpc protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC ζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells.', *Mucosal immunology*, 0(July). doi: 10.1038/mi.2013.55.

Hooper, L. V. (2001) 'Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine', *Science*, 291(5505), pp. 881–884. doi: 10.1126/science.291.5505.881.

Huang, Q. *et al.* (2014) 'Alteration of vascular permeability in burn injury', *Medical Express*, 1(2), pp. 62–76. doi: 10.5935/MedicalExpress.2014.02.03.

Irving, A. T. *et al.* (2014) 'The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 15(5), pp. 623–635. doi:

10.1016/j.chom.2014.04.001.

Jacobi, C. a and Malfertheiner, P. (2011) 'Escherichia coli nissle 1917 (Mutaflor): New insights into an old probiotic bacterium', *Digestive Diseases*, pp. 600–607. doi: 10.1159/000333307.

Jandhyala, S. M. *et al.* (2015) 'Role of the normal gut microbiota', *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), pp. 8836–8847. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.

Jia, W. *et al.* (2008) 'Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting', *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), pp. 123–129. doi: 10.1038/nrd2505.

Johansson, M. E. V *et al.* (2008) 'The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), pp. 15064–9. doi: 10.1073/pnas.0803124105.

Johansson, M. E. V and Hansson, G. C. (2016) 'Immunological aspects of intestinal mucus and mucins', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, advance on(10), pp. 639–649. doi: 10.1038/nri.2016.88.

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', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), pp. 4659–4665. doi: 10.1073/pnas.1006451107.

Juárez Carvajal, E. *et al.* (2009) 'Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares', *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 22(4), pp. 366–378.

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', *Journal of Bacteriology*, 177(14), pp. 3998–4008.

Kang, C. sung *et al.* (2013) 'Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially *Akkermansia muciniphila*, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis', *PLoS ONE*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0076520.

Kaparakis-Liaskos, M. and Ferrero, R. L. (2015) 'Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles', *Nature Reviews Immunology*, 15(6), pp. 375–387. doi: 10.1038/nri3837.

Kaparakis, M. *et al.* (2010) 'Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells', *Cellular Microbiology*, 12(3), pp. 372–385. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01404.x.

Keita, A. V and Söderholm, J. D. (2010) 'The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors', *Neurogastroenterology and Motility*, 22(7), pp. 718–733. doi:

10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x.

Kesty, N. C. *et al.* (2004) 'Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells.', *The EMBO journal*, 23(23), pp. 4538–49. doi: 10.1038/sj.emboj.7600471.

Kim, J. G., Lee, S. J. and Kagnoff, M. F. (2004) 'Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition by Toll-Like Receptors Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition', *Infection and Immunity*, 72(3), pp. 1487–1495. doi: 10.1128/IAI.72.3.1487.

Kim, J. H. *et al.* (2015) 'Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 40, pp. 97–104. doi: 10.1016/j.semcd.2015.02.006.

Kim, J. and Khan, W. (2013) 'Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections', *Pathogens*, 2(1), pp. 55–70. doi: 10.3390/pathogens2010055.

Klimentová, J. and Stulík, J. (2015) 'Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria', *Microbiological Research*, 170, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.micres.2014.09.006.

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*.', *Journal of Bacteriology*, 92(4), pp. 1206–1217.

Kufer, T. A. *et al.* (2008) 'The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction', *Cellular Microbiology*, 10(2), pp. 477–486. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01062.x.

Kulkarni, H. M. and Jagannadham, M. V. (2014a) 'Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria', *Microbiology (United Kingdom)*. doi: 10.1099/mic.0.079400-0.

Kulkarni, H. M. and Jagannadham, M. V. (2014b) 'Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria', *Microbiology (United Kingdom)*, 160(2014), pp. 2109–2121. doi: 10.1099/mic.0.079400-0.

Kulp, A. J. *et al.* (2015) 'Genome-wide assessment of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*', *PLoS ONE*, 10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0139200.

Kulp, A. and Kuehn, M. J. (2010) 'Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles.', *Annual review of microbiology*, 64, pp. 163–84. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.

Kunsmann, L. *et al.* (2015) 'Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain.', *Scientific reports*, 5(August), p. 13252. doi:

10.1038/srep13252.

Laparra, J. M. and Sanz, Y. (2010) 'Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals', *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 61(3), pp. 219–225. doi: 10.1016/j.phrs.2009.11.001.

Lee, J. *et al.* (2009) 'pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), pp. 23818–23829. doi: 10.1074/jbc.M109.033670.

Lee, J., Kim, O. Y. and Ghoo, Y. S. (2016) 'Proteomic profiling of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles: Current perspectives', *Proteomics - Clinical Applications*, 10(9–10), pp. 897–909. doi: 10.1002/prca.201600032.

Liu, C. *et al.* (2001) 'Peptidoglycan recognition proteins: A novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules', *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), pp. 34686–34694. doi: 10.1074/jbc.M105566200.

Lowry, O. *et al.* (1951) 'Protein measurement with the Folin Phenol Reagent', *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp. 265–275.

MacDonald, I. a and Kuehn, M. J. (2012) 'Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways.', *Research in microbiology*. Elsevier Masson SAS, 163(9–10), pp. 607–18. doi: 10.1016/j.resmic.2012.10.020.

Macia, E. *et al.* (2006) 'Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin', *Developmental Cell*. Elsevier Inc, 10(6), pp. 839–850. doi: 10.1016/j.devcel.2006.04.002.

Manavalan, B., Basith, S. and Choi, S. (2011) 'Similar structures but different roles-an updated perspective on TLR structures', *Frontiers in Physiology*, JUL(July), pp. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2011.00041.

Martínez-Cuesta. M. C , Peláez. C, R. T. (2012) 'Probióticos En la Salud humana', *Grupo de Biología Funcional de Bacterias Lácticas. CSIC-UAM*, pp. 3–13. Available at: http://www.sepy.es/pdf/probioticos_y_Salud_humana_sepy2012.pdf (Accessed: 8 May 2017).

Martinon, F. and Tschopp, J. (2005) 'NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens', *Trends in Immunology*, 26(8), pp. 447–454. doi: 10.1016/j.it.2005.06.004.

Martinon, F. and Tschopp, J. (2007) 'Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation.', *Cell Death & Differentiation*, 14(1), pp. 10–22. doi: 10.1038/sj.cdd.4402038.

McBroom, A. J. *et al.* (2006) 'Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability', *Journal of Bacteriology*, 188(15), pp. 5385–5392. doi: 10.1128/JB.00498-06.

McClure, R. and Massari, P. (2014) 'TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens.', *Frontiers in immunology*, 5(August), p. 386. doi: 10.3389/fimmu.2014.00386.

McDermott, A. J. and Huffnagle, G. B. (2014) 'The microbiome and regulation of mucosal immunity', *Immunology*, 142(1), pp. 24–31. doi: 10.1111/imm.12231.

Mesaki, K. *et al.* (2011) 'Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement', *PLoS ONE*, 6(5). doi: 10.1371/journal.pone.0019764.

Mettlen, M. *et al.* (2009) 'Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis.', *Biochemical Society transactions*, 37, pp. 1022–1026. doi: 10.1042/BST0371022.

Mills, K. H. G. (2011) 'TLR-dependent T cell activation in autoimmunity', *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/nri3095.

Moon, D. C. *et al.* (2012) 'Acinetobacter baumannii outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles.', *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 50(1), pp. 155–60. doi: 10.1007/s12275-012-1589-4.

Moore, C. B. *et al.* (2008) 'NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity.', *Nature*, 451(7178), pp. 573–7. doi: 10.1038/nature06501.

Morales, P., Brignardello, J. and Gotteland, M. (2010) 'The association of intestinal microbiota with obesity [La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad]', *Revista Medica de Chile*, 138(8), pp. 1020–1027. doi: 10.4067/S0034-98872010000800013.

Nevot, M. *et al.* (2006) 'Ultrastructural Analysis of the Extracellular Matter Secreted by the Psychrotolerant Bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3', *Microbial Ecology*, 51(4), pp. 501–507. doi: 10.1007/s00248-006-9065-5.

Nieves, W. *et al.* (2014) 'A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis', *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(5), pp. 747–754. doi: 10.1128/CVI.00119-14.

Núñez, G. (2011) 'Intracellular sensors of microbes and danger', *Immunological Reviews*, 243(1), pp. 5–8. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01058.x.

O'Hara, A. M. and Shanahan, F. (2006) 'The gut flora as a forgotten organ', *EMBO reports*, 7(7), pp. 688–693. doi: 10.1038/sj.embor.7400731.

O'donoghue, E. J. *et al.* (2016) 'Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells', *CELLULAR MICROBIOLOGY*, 18(11), pp. 1508–1517. doi: 10.1111/cmi.12655.

Ochman, H. and Selander, R. K. (1984) 'Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations', *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 157(2), pp. 690–693.

-
- Ogura, Y. *et al.* (2003) 'Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis.', *Gut*, 52(11), pp. 1591–7. doi: 10.1136/gut.52.11.1591.
- Ohashi, Y. and Ushida, K. (2009) 'Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action', *Animal Science Journal*, 80(4), pp. 361–371. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00645.x.
- Olier, M. *et al.* (2012) 'Genotoxicity of escherichia coli nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity', *Gut Microbes*, 3(6), pp. 501–509. doi: 10.4161/gmic.21737.
- Olofsson, A. *et al.* (2014) 'Uptake of Helicobacter pylori vesicles is facilitated by clathrin-dependent and clathrin-independent endocytic pathways.', *mBio*, 5(3), pp. e00979-14. doi: 10.1128/mBio.00979-14.
- Parker, H. *et al.* (2010) 'Uptake of Helicobacter pylori outer membrane vesicles by gastric epithelial cells.', *Infection and immunity*, 78(12), pp. 5054–61. doi: 10.1128/IAI.00299-10.
- Perez-Cruz, C. *et al.* (2015) 'Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria', *PLoS ONE*, 10(1), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0116896.
- Pérez-Cruz, C. *et al.* (2013) 'New type of outer membrane vesicle produced by the gram-negative bacterium Shewanella vesiculosa M7T: Implications for DNA content', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), pp. 1874–1881. doi: 10.1128/AEM.03657-12.
- Pérez-Cruz, C. *et al.* (2016) 'Membrane Vesicles Released by a hypervesiculating Escherichia coli Nissle 1917 tolR Mutant Are Highly Heterogeneous and Show Reduced Capacity for Epithelial Cell Interaction and Entry', *PLoS ONE*, 11, pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0169186.
- Perez-Lopez, A. *et al.* (2016) 'Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(3), pp. 135–148. doi: 10.1038/nri.2015.17.
- Proell, M. *et al.* (2008) 'The Nod-Like Receptor (NLR) family: A tale of similarities and differences', *PLoS ONE*, 3(4), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0002119.
- Ramiro-Puig, E. *et al.* (2008) 'El intestino: pieza clave del sistema inmunitario', *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. Sociedad Española de Patología Digestiva / Arán Ediciones, S.L., 100(1), pp. 29–34. doi: 10.4321/S1130-01082008000100006.
- Reister, M. *et al.* (2014) 'Complete genome sequence of the gram-negative probiotic escherichia coli strain Nissle 1917', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 187, pp. 106–107. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.442.
- Renelli, M. *et al.* (2004) 'DNA-containing membrane vesicles of Pseudomonas
-

aeruginosa PAO1 and their genetic transformation potential', *Microbiology*, 150(7), pp. 2161–2169. doi: 10.1099/mic.0.26841-0.

Rewatkar, P. V *et al.* (2015) 'Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems?', *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 92–108. doi: 10.1016/j.addr.2015.01.003.

Rodríguez, J. M. *et al.* (2015) 'The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life.', *Microbial ecology in health and disease*, 26, p. 26050. doi: 10.3402/mehd.v26.26050.

Roier, S. *et al.* (2016) 'A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria.', *Nature communications*, 7, p. 10515. doi: 10.1038/ncomms10515.

Rompikuntal, P. K. *et al.* (2012) 'Perinuclear localization of internalized outer membrane vesicles carrying active cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.', *Infection and immunity*, 80(1), pp. 31–42. doi: 10.1128/IAI.06069-11.

von Rosenvinge, E. C. *et al.* (2013) 'Microbial biofilms and gastrointestinal diseases', *Pathogens and Disease*, 67(1), pp. 25–38. doi: 10.1111/2049-632X.12020.

Rund, S. A. *et al.* (2013) 'Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104: H4 and O157: H7', *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 303(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.11.006.

Salzman, N. H. (2011) 'Microbiota-immune system interaction: An uneasy alliance', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 14(1), pp. 99–105. doi: 10.1016/j.mib.2010.09.018.

Sanz, Y. and De Palma, G. (2009) 'Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function.', *International reviews of immunology*, 28(6), pp. 397–413. doi: 10.3109/08830180903215613.

Scaldaferri, F. *et al.* (2013) 'Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility.', *BioMed research international*, 2013, p. 435268. doi: 10.1155/2013/435268.

Schaar, V. *et al.* (2011) 'Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells', *Cellular Microbiology*, 13(3), pp. 432–449. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01546.x.

Schlee, M. *et al.* (2007) 'Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin', *Infection and Immunity*, 75(5), pp. 2399–2407. doi: 10.1128/IAI.01563-06.

Schultz, M. (2008) 'Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease',

-
- Inflammatory Bowel Diseases*, 14(7), pp. 1012–1018. doi: 10.1002/ibd.20377.
- Schwechheimer, C. and Kuehn, M. J. (2015) 'Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions.', *Nature reviews. Microbiology*. Nature Publishing Group, 13(10), pp. 605–19. doi: 10.1038/nrmicro3525.
- Schwechheimer, C., Kulp, A. and Kuehn, M. J. (2014) 'Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content.', *BMC microbiology*, 14, p. 324. doi: 10.1186/s12866-014-0324-1.
- Sekirov, I., Russell, S. and Antunes, L. (2010) 'Gut microbiota in health and disease', *Physiological Reviews*, 90(3), pp. 859–904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009.
- Shanahan, F. (2011) 'The gut microbiota in 2011: Translating the microbiota to medicine', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. Nature Publishing Group, 9(2), pp. 72–74. doi: 10.1038/nrgastro.2011.250.
- Sharma, V., Garg, S. and Aggarwal, S. (2013) 'Probiotics and {Liver} {Disease}', *The Permanente Journal*, 17(4), pp. 62–67. doi: 10.7812/TPP/12-144.
- Shaw, P., Lamkanfi, M. and Kanneganti, T.-D. (2010) 'NOD-like receptor signaling beyond the inflammasome.', *European journal of immunology*, 40(3), pp. 624–627. doi: 10.1002/eji.200940211.NOD-like.
- Shen, L. *et al.* (2011) 'Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo', *Annu Rev Physiol.*, 73(4), pp. 283–309. doi: 10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus.
- Shen, Y. *et al.* (2012) 'Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection.', *Cell host & microbe*. Elsevier Inc., 12(4), pp. 509–20. doi: 10.1016/j.chom.2012.08.004.
- Soto, S. M. (2006) 'Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(8), pp. 479–480. doi: 10.1157/13092461.
- Spiller, R. (2008) 'Review article: Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 28(4), pp. 385–396. doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03750.x.
- Suzuki, T. (2013) 'Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions.', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(4), pp. 631–59. doi: 10.1007/s00018-012-1070-x.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) 'Pattern Recognition Receptors and Inflammation', *Cell*. Elsevier Inc., 140(6), pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tang, D. *et al.* (2012) 'PAMPs and DAMPs: Signal Os that spur autophagy and immunity', *Immunological Reviews*, 249(1), pp. 158–175. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.

Tattoli, I. *et al.* (2008) 'NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production.', *EMBO reports*, 9(December 2007), pp. 293–300. doi: 10.1038/sj.embor.7401161.

Ting, J. P. Y. *et al.* (2008) 'The NLR gene family: An official nomenclature', *Immunity*, 28(3), pp. 285–287. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.005.The.

Trebichavsky, I. *et al.* (2010) 'Modulation of natural immunity in the gut by Escherichia coli strain Nissle 1917.', *Nutrition reviews*, 68(8), pp. 459–64. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00305.x.

Trejo-de la O, a, Hernández-Sancén, P. and Maldonado-Bernal, C. (2014) 'Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer.', *Genes and immunity*, (February), pp. 199–209. doi: 10.1038/gene.2014.10.

Turner, L. *et al.* (2015) 'Increased Outer Membrane Vesicle Formation in a Helicobacter pylori tolB Mutant', *Helicobacter*, 20(4), pp. 269–283. doi: 10.1111/hel.12196.

Tyrer, P. C., Frizelle, F. a and Keenan, J. I. (2014) 'Escherichia coli-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells.', *Infectious agents and cancer*, 9(1), p. 2. doi: 10.1186/1750-9378-9-2.

Unal, C. M., Schaar, V. and Riesbeck, K. (2011) 'Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine.', *Seminars in immunopathology*, 33(5), pp. 395–408. doi: 10.1007/s00281-010-0231-y.

Vanaja, S. K. *et al.* (2016) 'Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation', *Cell*. Elsevier Inc., 165(5), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.015.

Vejborg, R. M. *et al.* (2010) 'A virulent parent with probiotic progeny: Comparative genomics of Escherichia coli strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972', *Molecular Genetics and Genomics*, 283(5), pp. 469–484. doi: 10.1007/s00438-010-0532-9.

Viala, J. *et al.* (2004) 'Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island', *Nat. Immunol.*, 5(11), pp. 1166–1174. doi: 10.1038/ni1131.

Wang, F. *et al.* (2006) 'IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction.', *Gastroenterology*, 131(4), pp. 1153–63. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.022.

Wang, L.-H., Rothberg, K. G. and Anderson, R. G. W. (1993) 'Mis-Assembly of Clathrin Lattices on Endosomes Reveals a Regulatory Switch for Coated Pit Formation', *The Journal of Cell Biology*, 123, pp. 1107–1117.

Wassenaar, T. M. (2016) 'Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*',

European Journal of Microbiology and Immunology, 6(3), pp. 147–161. doi: 10.1556/1886.2016.00029.

Zihni, C. *et al.* (2016) 'Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(9), pp. 564–580. doi: 10.1038/nrm.2016.80.

Zyrek, A. a *et al.* (2007) 'Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair', *Cellular Microbiology*, 9(3), pp. 804–816. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x.

9 ANEXOS

9. ANEXOS

Anexo 1: Proteínas asociadas a vesículas aisladas de cultivos de la cepa EcN y EcN *to/R* en medio LB.

BAND: 1										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	#Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P04949	Flagellin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fliC PE=1 SV=2 - [FLIC_ECOLI]	3730.90	33.13	1	3	25	1083	498	51.3	4.73
Q08860	Flagellin OS=Shigella flexneri GN=fliC PE=3 SV=1 - [FLIC_SHIFL]	3271.18	36.00	1	2	24	931	550	56.6	4.77
P06179	Flagellin OS=Salmonella typhimurium (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720) GN=fliC PE=1 SV=4 - [FLIC_SALTY]	387.07	8.48	2	2	5	108	495	51.6	5.00
POAC42	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=sdhA PE=3 SV=1 - [SDHA_ECOL6]	151.93	51.70	1	23	23	54	588	64.4	6.27
POAG68	30S ribosomal protein S1 OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=rpsA PE=3 SV=1 - [RS1_ECOL6]	142.05	57.45	1	24	24	42	557	61.1	4.98
P00363	Fumarate reductase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=frdA PE=1 SV=3 - [FRDA_ECOLI]	137.88	53.32	1	23	23	44	602	65.9	6.28
A1AJ51	60 kDa chaperonin 1 OS=Escherichia coli O1:K1 / APEC GN=groL1 PE=3 SV=1 - [CH601_ECOK1]	70.12	46.17	1	18	18	24	548	57.3	4.94
POADY2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ppiD PE=3 SV=1 - [PPID_ECOL6]	61.67	24.24	1	13	13	22	623	68.1	5.07
660510676	heat shock protein 90 [Escherichia coli Nissle 1917]	46.34	32.69	3	17	17	18	624	71.4	5.21
660511934	serine/threonine protein kinase [Escherichia coli Nissle 1917]	45.26	28.73	2	14	14	17	644	74.4	5.85
POABK0	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=cydA PE=3 SV=1 - [CYDA_ECOL6]	45.12	18.39	1	8	8	15	522	58.2	6.81
POA911	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ompA PE=3 SV=1 - [OMPA_ECO57]	42.90	36.13	1	8	8	13	346	37.2	6.42

P33599	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoC PE=1 SV=3 - [NUOCD_ECOLI]	40.39	26.01	2	11	11	16	596	68.2	6.42
P11557	Cell division protein DamX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=damX PE=1 SV=2 - [DAMX_ECOLI]	31.60	17.29	1	5	5	11	428	46.1	5.81
POAA26	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=trxA PE=3 SV=2 - [THIO_ECOL6]	31.23	47.71	1	4	4	10	109	11.8	4.88
P68649	P21 prophage-derived major head protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=c1575 PE=3 SV=1 - [HEAD_ECOL6]	30.31	25.15	1	7	7	13	342	38.5	6.35
POABK4	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=cydB PE=3 SV=1 - [CYDB_ECO57]	19.98	7.92	1	3	3	7	379	42.4	7.40
446846139	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase [Escherichia coli]	17.76	16.27	3	5	5	6	498	55.2	4.83
660513081	transketolase [Escherichia coli Nissle 1917]	16.46	6.33	2	4	4	6	663	72.2	5.73
A7ZHT6	Proline--tRNA ligase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=proS PE=3 SV=1 - [SYP_ECO24]	12.11	8.74	7	4	4	4	572	63.6	5.19
A7ZHA4	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=3 SV=1 - [DNAK_ECO24]	12.02	9.56	3	5	5	6	638	69.1	4.97
P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	11.39	33.33	1	2	2	3	78	8.3	9.25
A7ZSL4	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tuf1 PE=3 SV=1 - [EFTU1_ECO24]	10.01	10.91	3	3	3	3	394	43.3	5.45
660514545	2', 3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase [Escherichia coli Nissle 1917]	9.85	10.05	2	4	4	4	647	70.8	5.73
P58229	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gadC PE=3 SV=1 - [GADC_ECO57]	9.33	6.85	3	3	3	3	511	55.1	8.65
A7ZNT3	Methionine--tRNA ligase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=metG PE=3 SV=1 - [SYM_ECO24]	9.32	2.81	11	2	2	3	677	76.2	5.86
P75882	Uncharacterized lipoprotein GfcD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gfcD PE=3 SV=1 - [GFCD_ECOLI]	8.89	7.45	1	4	4	4	698	78.6	6.18
P31554	LPS-assembly protein LptD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptD PE=1 SV=2 - [LPTD_ECOLI]	8.53	3.57	3	3	3	3	784	89.6	5.14

P0AAI3	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsH PE=1 SV=1 - [FTSH_ECOLI]	7.95	6.37	2	2	2	2	644	70.7	6.24
P06996	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOLI]	7.55	4.90	3	2	2	3	367	40.3	4.82
P13036	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fecA PE=1 SV=2 - [FECA_ECOLI]	7.03	2.71	1	2	2	4	774	85.3	5.94
P45464	Penicillin-binding protein activator LpoA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoA PE=1 SV=1 - [LPOA_ECOLI]	4.51	3.10	2	2	2	2	678	72.8	5.41
P09373	Formate acetyltransferase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pf1B PE=1 SV=2 - [PFLB_ECOLI]	0.00	2.11	1	2	2	2	760	85.3	6.01

BAND: 2										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
660511374	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	2190.67	89.17	2	13	38	577	360	39.6	5.12
660512129	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	1891.84	89.17	1	12	33	487	360	39.6	4.79
P21420	Putative outer membrane porin protein NmpC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nmpC PE=5 SV=2 - [NMPC_ECOLI]	1611.94	46.30	1	1	23	407	365	40.3	4.87
660511075	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	1387.25	79.43	2	15	39	463	350	37.5	6.16
P0A911	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ompA PE=3 SV=1 - [OMPA_ECO57]	864.03	76.30	1	5	29	296	346	37.2	6.42
660511055	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	787.33	91.71	1	29	31	208	362	39.3	4.97
Q8CVW1	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOL6]	601.38	63.73	1	10	21	159	375	41.2	4.83
P06996	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOLI]	369.16	61.58	1	11	21	99	367	40.3	4.82
660512682	lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	118.80	69.77	1	19	19	31	344	36.8	5.76

660512120	flagellin [Escherichia coli Nissle 1917]	78.52	33.78	1	15	15	20	595	60.9	4.91
P68649	P21 prophage-derived major head protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=c1575 PE=3 SV=1 - [HEAD_ECOL6]	78.11	70.76	1	21	21	26	342	38.5	6.35
660511285	flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA [Escherichia coli Nissle 1917]	69.36	47.67	8	11	11	17	365	38.2	9.23
P0AFK9	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=potD PE=1 SV=1 - [POTD_ECOLI]	66.75	35.63	1	19	19	29	348	38.8	5.39
660512844	murein hydrolase effector LrgB [Escherichia coli Nissle 1917]	65.93	46.81	2	12	12	18	361	40.3	9.06
P29744	Flagellar hook-associated protein 3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=flgL PE=3 SV=2 - [FLGL_ECOLI]	64.78	61.83	1	13	13	17	317	34.3	4.79
P0AEE6	D-galactose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=mgIB PE=3 SV=1 - [DGAL_ECOL6]	58.10	45.78	1	15	15	20	332	35.7	6.02
660510730	protease [Escherichia coli Nissle 1917]	57.76	42.90	1	14	14	18	317	35.6	5.80
660514327	maltose-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	52.98	43.14	1	11	11	17	306	31.9	8.02
660510987	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	48.60	41.62	1	12	12	14	370	40.8	6.20
P60424	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=rplB PE=3 SV=2 - [RL2_ECO57]	40.27	39.19	1	10	10	16	273	29.8	10.93
660513999	phosphate ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	37.37	38.15	1	10	10	13	346	37.0	8.47
660513815	D-xylose transporter subunit XylF [Escherichia coli Nissle 1917]	21.40	32.12	2	5	5	8	330	35.7	5.64
660511756	hypothetical protein ECOLIN_08655 [Escherichia coli Nissle 1917]	19.23	24.52	2	6	6	7	314	33.9	9.28
660511794	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	17.94	52.90	1	4	4	4	155	15.6	8.84
660512096	sugar ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	15.57	27.36	1	7	7	8	329	35.5	7.47
P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	15.42	48.72	1	3	3	4	78	8.3	9.25
660514022	D-ribose transporter subunit RbsB [Escherichia coli Nissle 1917]	14.82	17.91	2	3	3	4	296	30.9	7.47
660511649	hypothetical protein ECOLIN_08075 [Escherichia coli Nissle 1917]	14.00	20.96	2	7	7	7	353	38.7	9.31
P0AA25	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2 - [THIO_ECOLI]	11.37	47.71	1	4	4	4	109	11.8	4.88
660512030	peptidase S14 [Escherichia coli Nissle 1917]	9.45	5.56	1	2	2	2	648	70.5	5.38
B1IUL5	Maltoporin OS=Escherichia coli (strain ATCC 8739 / DSM 1576 / Crooks) GN=lamB PE=3 SV=1 - [LAMB_ECOLC]	8.81	8.07	7	3	3	3	446	50.0	5.03

B1IQP3	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain ATCC 8739 / DSM 1576 / Crooks) GN=mdh PE=3 SV=1 - [MDH_ECOLC]	7.51	9.94	7	2	2	3	312	32.3	5.77
P39356	Uncharacterized transcriptional regulator YjhU OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjhU PE=3 SV=2 - [YJHU_ECOLI]	7.33	7.93	1	2	2	2	328	36.1	6.80
POA9B4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gapA PE=3 SV=2 - [G3P1_ECO57]	7.21	7.85	1	2	2	2	331	35.5	7.11
660510578	hypothetical protein ECOLIN_02230 [Escherichia coli Nissle 1917]	7.03	9.34	2	3	3	3	364	40.3	9.57
660513102	L-asparaginase II [Escherichia coli Nissle 1917]	6.47	11.21	1	2	2	2	348	36.9	6.04
660513135	autotransporter [Escherichia coli Nissle 1917]	6.42	2.47	2	2	2	2	1295	139.9	6.33
660512958	murein transglycosylase [Escherichia coli Nissle 1917]	5.35	8.49	2	2	2	2	365	40.4	9.03
POABC4	Modulator of FtsH protease HflC OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=hflC PE=3 SV=1 - [HFLC_ECOL6]	4.29	8.38	1	2	2	2	334	37.6	6.68

BAND: 3										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
660511933	MltA-interacting protein MipA [Escherichia coli Nissle 1917]	300.62	54.44	2	13	13	79	248	27.8	5.59
POAEQ3	Glutamine-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glnH PE=1 SV=1 - [GLNH_ECOLI]	131.53	70.16	1	20	20	40	248	27.2	8.51
660510895	molybdate transporter [Escherichia coli Nissle 1917]	93.11	71.60	1	21	21	34	257	27.4	7.47
660510996	arginine ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	82.89	68.72	2	15	15	25	243	26.9	6.10
POAEM9	L-cystine-binding protein FliY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fliY PE=1 SV=1 - [FLIY_ECOLI]	81.74	44.74	1	15	15	23	266	29.0	6.64
P33235	Flagellar hook-associated protein 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=flgK PE=1 SV=3 - [FLGK_ECOLI]	73.33	25.23	1	11	11	20	547	57.9	4.69
660511075	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	73.07	62.86	2	19	19	23	350	37.5	6.16
Q8CVW1	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOL6]	72.55	41.60	1	13	15	20	375	41.2	4.83

660513082	metalloprotease [Escherichia coli Nissle 1917]	71.65	57.94	1	12	15	20	252	26.9	6.14
660510364	copper homeostasis protein [Escherichia coli Nissle 1917]	68.25	55.08	1	12	12	21	236	25.8	5.01
P0AC04	Outer membrane protein assembly factor BamD OS=Escherichia coli O157:H7 GN=bamD PE=3 SV=1 - [BAMD_ECO57]	50.27	48.16	1	13	13	17	245	27.8	6.60
441711325	SSU ribosomal protein S4p (S9e) [Escherichia coli Nissle 1917]	49.07	37.13	2	9	9	14	202	23.0	10.02
660513145	N-acetylneuraminic acid channel protein [Escherichia coli Nissle 1917]	47.80	32.20	2	8	9	17	236	27.8	9.09
660512237	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	47.63	42.02	1	11	11	14	257	29.2	8.22
660511794	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	42.35	64.52	1	5	5	9	155	15.6	8.84
B7UP93	Flagellar L-ring protein OS=Escherichia coli O127:H6 (strain E2348/69 / EPEC) GN=flgH PE=3 SV=1 - [FLGH_ECO27]	42.26	43.10	1	9	9	12	232	24.6	8.15
660511055	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	36.61	32.87	1	8	9	10	362	39.3	4.97
660511374	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	35.41	23.61	2	3	6	9	360	39.6	5.12
P04949	Flagellin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fliC PE=1 SV=2 - [FLIC_ECOLI]	34.73	18.67	2	7	7	10	498	51.3	4.73
660511308	penicillin-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	30.64	29.58	2	4	4	7	213	22.5	6.93
P58320	Thiol:disulfide interchange protein DsbG OS=Escherichia coli O157:H7 GN=dsbG PE=3 SV=1 - [DSBG_ECO57]	26.89	49.19	2	9	9	9	248	27.5	7.88
660510993	arginine ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	26.13	39.09	2	7	7	8	243	26.8	7.36
47600595	FocH protein [Escherichia coli Nissle 1917]	25.56	32.44	3	6	6	7	299	32.1	8.10
660510775	ribonuclease I [Escherichia coli Nissle 1917]	25.45	23.13	2	5	5	7	268	29.6	8.57
660514022	D-ribose transporter subunit RbsB [Escherichia coli Nissle 1917]	20.83	29.05	2	6	6	6	296	30.9	7.47
660510614	nucleoside-specific channel-forming protein Tsx [Escherichia coli Nissle 1917]	20.69	12.24	2	4	4	6	294	33.6	5.45
P25894	Metalloprotease LoiP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=loiP PE=1 SV=2 - [LOIP_ECOLI]	19.88	29.37	1	3	6	6	252	26.8	6.13
660513012	hypothetical protein ECOLIN_15455 [Escherichia coli Nissle 1917]	19.70	28.29	2	6	6	6	251	26.5	10.11
P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	18.41	48.72	1	3	3	5	78	8.3	9.25
Q0TA25	Maltoporin OS=Escherichia coli O6:K15:H31 (strain 536 / UPEC) GN=lamb PE=3 SV=1 - [LAMB_ECOL5]	17.75	16.14	2	4	4	4	446	49.9	5.08
660513135	autotransporter [Escherichia coli Nissle 1917]	17.34	4.71	2	5	5	5	1295	139.9	6.33
660510866	succinate dehydrogenase [Escherichia coli Nissle 1917]	16.75	31.93	1	5	5	5	238	26.8	6.73

B5YTP1	50S ribosomal protein L3 OS=Escherichia coli O157:H7 (strain EC4115 / EHEC) GN=rplC PE=3 SV=1 - [RL3_ECO5E]	16.49	28.71	1	4	4	5	209	22.2	9.91
P68649	P21 prophage-derived major head protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=c1575 PE=3 SV=1 - [HEAD_ECOL6]	14.64	14.91	1	4	4	5	342	38.5	6.35
660514359	acid phosphatase [Escherichia coli Nissle 1917]	12.73	10.55	2	3	3	4	237	26.1	7.43
P58297	Flagellar hook-associated protein 2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=fliD PE=3 SV=2 - [FLID_ECO57]	11.90	6.67	3	2	2	3	465	48.1	5.08
660512583	ABC transporter permease [Escherichia coli Nissle 1917]	10.77	13.15	2	2	2	3	251	28.0	5.05
660511873	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	10.55	11.51	2	2	2	3	252	27.6	5.15
441712030	Glycoprotein-polysaccharide metabolism [Escherichia coli Nissle 1917]	10.53	23.78	2	2	2	3	185	18.8	6.64
Q8FA51	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=deoD PE=3 SV=2 - [DEOD_ECOL6]	10.40	21.34	2	4	4	4	239	25.9	5.66
P0AA25	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2 - [THIO_ECOLI]	10.34	33.94	1	3	3	3	109	11.8	4.88
B7UK43	50S ribosomal protein L4 OS=Escherichia coli O127:H6 (strain E2348/69 / EPEC) GN=rplD PE=3 SV=1 - [RL4_ECO27]	10.29	14.93	1	4	4	5	201	22.1	9.73
B1IQP3	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain ATCC 8739 / DSM 1576 / Crooks) GN=mdh PE=3 SV=1 - [MDH_ECOLC]	10.12	16.35	7	3	3	3	312	32.3	5.77
P0A918	Outer membrane protein X OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompX PE=3 SV=1 - [OMPX_ECOL6]	9.38	30.99	1	3	3	3	171	18.6	7.17
Q8CVU7	Long-chain fatty acid transport protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=fadL PE=3 SV=2 - [FADL_ECOL6]	9.35	8.52	2	2	2	3	446	48.6	5.00
A7ZSK3	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=rpsC PE=3 SV=1 - [RS3_ECO24]	9.11	8.58	1	2	2	3	233	26.0	10.27
660514327	maltose-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	8.88	12.75	2	3	3	4	306	31.9	8.02
P60424	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=rplB PE=3 SV=2 - [RL2_ECO57]	7.85	12.09	1	2	2	2	273	29.8	10.93
660514080	phospholipase A [Escherichia coli Nissle 1917]	7.83	11.07	2	3	3	3	289	33.1	5.20
660513039	protein-disulfide isomerase [Escherichia coli Nissle 1917]	6.35	19.92	2	4	4	4	236	25.6	6.79
660514592	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	6.35	15.38	2	3	4	4	182	21.7	6.80
585317687	elongation factor Tu, partial [Escherichia coli]	6.07	9.32	4	2	2	2	311	34.3	4.97

446861951	MULTISPECIES: hypothetical protein [Enterobacteriaceae]	5.64	13.78	2	2	2	2	225	24.1	6.99
-----------	---	------	-------	---	---	---	---	-----	------	------

BAND: 4										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
B1X6S1	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12 / DH10B) GN=tolB PE=3 SV=1 - [TOLB_ECODH]	1023.26	68.14	1	34	34	291	430	45.9	7.59
446967036	MULTISPECIES: bifunctional glucose-1-phosphatase/inositol phosphatase [Escherichia]	187.96	77.00	1	30	30	55	413	45.7	6.02
660510335	serine endoprotease [Escherichia coli Nissle 1917]	177.24	66.24	1	32	32	50	474	49.3	8.56
660511075	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	123.99	70.86	2	22	22	35	350	37.5	6.16
660510796	rare lipoprotein A [Escherichia coli Nissle 1917]	119.03	46.41	1	14	14	32	362	37.5	5.73
660512894	lipoprotein NlpD [Escherichia coli Nissle 1917]	103.11	34.56	2	20	20	31	379	40.2	9.51
A7ZJA8	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=sucC PE=3 SV=1 - [SUCC_ECO24]	89.49	61.34	1	19	19	26	388	41.4	5.52
A1AFB0	Phosphoglycerate kinase OS=Escherichia coli O1:K1 / APEC GN=pgk PE=3 SV=1 - [PGK_ECOK1]	67.24	59.69	2	16	16	22	387	41.1	5.22
Q8CVW1	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOL6]	62.19	41.60	1	13	15	17	375	41.2	4.83
660513476	serine endoprotease DegQ [Escherichia coli Nissle 1917]	58.41	42.86	1	11	11	15	455	47.2	5.95
660510904	acyl-CoA thioesterase [Escherichia coli Nissle 1917]	57.27	28.57	1	8	8	14	427	46.0	6.27
B1IUL5	Maltoporin OS=Escherichia coli (strain ATCC 8739 / DSM 1576 / Crooks) GN=lamB PE=3 SV=1 - [LAMB_ECOLC]	46.84	26.23	6	8	8	11	446	50.0	5.03
660513288	hypothetical protein ECOLIN_16915 [Escherichia coli Nissle 1917]	46.64	24.95	1	9	9	14	493	53.7	5.66
A1AIF3	Elongation factor Tu 2 OS=Escherichia coli O1:K1 / APEC GN=tuf2 PE=3 SV=1 - [EFTU2_ECOK1]	42.42	54.57	3	16	16	19	394	43.3	5.45
POAE10	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ahpC PE=3 SV=2 - [AHPC_ECO57]	37.99	40.64	1	5	5	12	187	20.7	5.17
POABZ6	Chaperone SurA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=surA PE=1 SV=1 - [SURA_ECOLI]	36.57	24.53	1	9	9	11	428	47.3	6.98
POABH8	Citrate synthase OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=gltA PE=3 SV=1 - [CISY_ECOL6]	34.61	26.70	1	8	8	10	427	48.0	6.68

660511097	phosphoanhydride phosphorylase [Escherichia coli Nissle 1917]	34.18	24.08	1	7	7	9	436	47.5	6.61
P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	33.51	60.26	1	7	7	12	78	8.3	9.25
660511055	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	31.51	13.54	1	4	4	8	362	39.3	4.97
A1A7M1	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli O1:K1 / APEC GN=bamA PE=3 SV=1 - [BAMA_ECOK1]	26.95	10.49	4	6	6	8	810	90.6	5.15
P63883	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=amiC PE=1 SV=1 - [AMIC_ECOLI]	26.66	21.58	1	5	5	7	417	45.6	9.58
660511374	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	23.19	22.50	2	3	5	6	360	39.6	5.12
660511794	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	21.00	61.29	1	5	5	5	155	15.6	8.84
Q8CVU7	Long-chain fatty acid transport protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=fadL PE=3 SV=2 - [FADL_ECOL6]	19.84	17.94	2	5	5	6	446	48.6	5.00
660512682	lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	18.48	15.41	2	3	3	5	344	36.8	5.76
A1AGY4	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB OS=Escherichia coli O1:K1 / APEC GN=ugpB PE=3 SV=1 - [UGPB_ECOK1]	13.55	9.82	2	4	4	5	438	48.5	7.84
660512687	hypothetical protein ECOLIN_13675 [Escherichia coli Nissle 1917]	12.18	7.39	3	2	2	4	487	53.9	7.68
660512708	membrane biogenesis protein [Escherichia coli Nissle 1917]	10.39	9.44	2	3	3	3	392	41.9	4.91
660513063	oxidative stress defense protein [Escherichia coli Nissle 1917]	9.75	18.29	2	5	5	6	246	26.6	6.71
660514260	vitamin B12/cobalamin outer membrane transporter [Escherichia coli Nissle 1917]	9.33	6.35	4	3	3	4	614	68.3	5.74
441714533	Glucuronide transport facilitator UidC [Escherichia coli Nissle 1917]	8.11	5.78	3	2	2	3	415	45.8	8.70
441715475	Antigen 43 precursor [Escherichia coli Nissle 1917]	7.82	6.06	7	2	2	2	495	52.4	6.01
660513193	polysialic acid transporter [Escherichia coli Nissle 1917]	6.00	4.84	3	2	2	2	558	60.3	7.91
660514323	sugar ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	5.83	5.30	2	2	2	2	396	43.3	6.13
P65293	Uncharacterized lipoprotein YgdI OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ygdI PE=3 SV=1 - [YGDI_ECOL6]	5.48	41.33	2	2	2	2	75	8.2	5.97
P0AA25	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2 - [THIO_ECOLI]	4.13	22.94	1	2	2	2	109	11.8	4.88
660510578	hypothetical protein ECOLIN_02230 [Escherichia coli Nissle 1917]	3.87	5.22	2	2	2	2	364	40.3	9.57

BAND: 5										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
660511374	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	2519.07	89.17	2	13	40	650	360	39.6	5.12
660512129	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	2134.01	89.17	1	12	34	520	360	39.6	4.79
660511075	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	2066.55	79.43	2	40	40	666	350	37.5	6.16
P21420	Putative outer membrane porin protein NmpC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nmpC PE=5 SV=2 - [NMPC_ECOLI]	1782.87	46.85	1	1	24	457	365	40.3	4.87
Q8CVW1	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOL6]	645.82	72.27	1	20	23	175	375	41.2	4.83
660511055	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	208.29	90.06	1	22	24	55	362	39.3	4.97
660512682	lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	172.42	72.38	1	21	21	45	344	36.8	5.76
660512844	murein hydrolase effector LrgB [Escherichia coli Nissle 1917]	84.65	58.45	2	15	15	21	361	40.3	9.06
P0A9B4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gapA PE=3 SV=2 - [G3P1_ECO57]	64.29	56.19	1	16	16	21	331	35.5	7.11
B1LGK2	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain SMS-3-5 / SECEC) GN=mdh PE=3 SV=1 - [MDH_ECOSM]	46.21	44.55	3	11	11	12	312	32.3	6.11
B1X6S1	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12 / DH10B) GN=tolB PE=3 SV=1 - [TOLB_ECODH]	45.64	28.84	2	11	11	15	430	45.9	7.59
660510987	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	44.69	38.11	1	10	10	12	370	40.8	6.20
660513999	phosphate ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	44.35	45.66	1	12	12	13	346	37.0	8.47
P0ADS7	Uncharacterized protein YggE OS=Escherichia coli O157:H7 GN=yggE PE=4 SV=1 - [YGGE_ECO57]	43.96	48.78	1	13	13	17	246	26.6	6.57
660511325	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	41.66	32.47	2	11	11	14	348	38.8	5.39
Q8FLD1	Transaldolase B OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=talB PE=3 SV=3 - [TALB_ECOL6]	39.43	42.59	2	10	10	11	317	35.2	5.21
660511649	hypothetical protein ECOLIN_08075 [Escherichia coli Nissle 1917]	30.67	38.81	1	12	12	12	353	38.7	9.31

P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	23.48	48.72	1	3	3	6	78	8.3	9.25
660510730	protease [Escherichia coli Nissle 1917]	21.00	15.77	1	4	4	6	317	35.6	5.80
660510492	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	19.53	10.26	1	2	4	11	351	38.9	5.07
660510904	acyl-CoA thioesterase [Escherichia coli Nissle 1917]	16.93	12.65	1	4	4	5	427	46.0	6.27
660510335	serine endoprotease [Escherichia coli Nissle 1917]	15.77	14.14	2	4	4	4	474	49.3	8.56
660510881	peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	12.88	26.59	2	3	3	3	173	18.8	6.80
P0AA25	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2 - [THIO_ECOLI]	11.32	19.27	1	2	2	4	109	11.8	4.88
P0A991	Fructose-bisphosphate aldolase class 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fbaB PE=1 SV=2 - [ALF1_ECOLI]	9.01	8.86	1	2	2	2	350	38.1	6.73
660510578	hypothetical protein ECOLIN_02230 [Escherichia coli Nissle 1917]	5.41	5.49	2	2	2	4	364	40.3	9.57

BAND: 6										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
660511075	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	3017.33	79.43	2	17	42	971	350	37.5	6.16
P0A911	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ompA PE=3 SV=1 - [OMPA_ECO57]	1697.76	62.72	1	2	27	581	346	37.2	6.42
Q8CVW1	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOL6]	381.83	89.60	1	23	26	114	375	41.2	4.83
660511374	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	316.71	74.44	2	7	21	88	360	39.6	5.12
660511055	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	117.90	60.50	1	16	17	29	362	39.3	4.97
B5YSW2	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 (strain EC4115 / EHEC) GN=mdh PE=3 SV=1 - [MDH_ECO5E]	103.04	83.65	1	20	20	30	312	32.3	5.77
660510987	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	102.23	57.03	1	16	16	26	370	40.8	6.20
660510730	protease [Escherichia coli Nissle 1917]	90.82	57.10	1	20	20	30	317	35.6	5.80

660512682	lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	72.35	58.14	2	14	14	20	344	36.8	5.76
660514327	maltose-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	61.99	52.61	2	12	12	21	306	31.9	8.02
660513102	L-asparaginase II [Escherichia coli Nissle 1917]	53.01	42.24	1	11	11	17	348	36.9	6.04
660513063	oxidative stress defense protein [Escherichia coli Nissle 1917]	48.79	57.32	1	13	13	20	246	26.6	6.71
B1X6S1	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12 / DH10B) GN=tolB PE=3 SV=1 - [TOLB_ECODH]	48.23	42.79	1	13	13	15	430	45.9	7.59
P0ABK6	Cysteine synthase A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=cysK PE=3 SV=2 - [CYSK_ECO57]	46.98	52.63	1	10	10	12	323	34.5	6.06
660511756	hypothetical protein ECOLIN_08655 [Escherichia coli Nissle 1917]	40.52	38.22	2	9	9	13	314	33.9	9.28
P0AEE6	D-galactose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=mgIB PE=3 SV=1 - [DGAL_ECOL6]	39.34	37.95	1	10	10	13	332	35.7	6.02
660511019	thioredoxin reductase [Escherichia coli Nissle 1917]	36.57	42.99	2	9	9	10	321	34.6	5.50
A7ZHR0	Elongation factor Ts OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tsf PE=3 SV=1 - [EFTS_ECO24]	33.98	36.40	1	9	9	11	283	30.4	5.29
660510904	acyl-CoA thioesterase [Escherichia coli Nissle 1917]	27.84	27.17	1	6	6	7	427	46.0	6.27
660510335	serine endoprotease [Escherichia coli Nissle 1917]	27.75	17.72	1	5	5	7	474	49.3	8.56
660512640	thiosulfate transporter subunit [Escherichia coli Nissle 1917]	24.73	14.20	2	5	5	8	338	37.6	8.76
660510578	hypothetical protein ECOLIN_02230 [Escherichia coli Nissle 1917]	20.36	27.20	1	7	7	7	364	40.3	9.57
660514023	ribokinase [Escherichia coli Nissle 1917]	18.51	26.54	3	4	4	5	309	32.3	5.08
P69799	PTS system mannose-specific EIIB component OS=Escherichia coli O157:H7 GN=manX PE=3 SV=2 - [PTNAB_ECO57]	17.51	14.24	1	4	4	5	323	35.0	6.02
P0A9B4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gapA PE=3 SV=2 - [G3P1_ECO57]	17.50	36.25	1	6	6	6	331	35.5	7.11
660512708	membrane biogenesis protein [Escherichia coli Nissle 1917]	17.03	11.22	2	2	2	4	392	41.9	4.91
P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	15.96	48.72	1	3	3	4	78	8.3	9.25
660514323	sugar ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	13.66	7.07	2	2	2	4	396	43.3	6.13
660510881	peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	11.42	25.43	2	3	3	3	173	18.8	6.80
660513516	amino acid ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	10.35	17.30	3	5	5	5	341	37.0	5.49
660513815	D-xylose transporter subunit XylF [Escherichia coli Nissle 1917]	9.92	22.42	2	3	3	4	330	35.7	5.64

660511794	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	8.85	28.39	1	2	2	2	155	15.6	8.84
660512096	sugar ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli Nissle 1917]	7.78	14.29	1	4	4	4	329	35.5	7.47
585317687	elongation factor Tu, partial [Escherichia coli]	7.74	11.58	4	2	2	2	311	34.3	4.97

BAND: 7										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
660510881	peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	691.79	84.97	1	20	20	216	173	18.8	6.80
P0ADA6	Uncharacterized lipoprotein YajG OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=yajG PE=3 SV=1 - [YAJG_ECOL6]	426.17	62.50	1	9	9	132	192	20.9	8.63
660513746	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	179.41	61.70	1	8	8	53	188	20.9	7.42
Q8CVW1	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompC PE=1 SV=1 - [OMPC_ECOL6]	135.67	63.47	1	22	24	38	375	41.2	4.83
P64598	Uncharacterized protein YraP OS=Escherichia coli O157:H7 GN=yraP PE=3 SV=1 - [YRAP_ECO57]	121.84	65.45	1	14	14	34	191	20.0	8.98
P37665	Probable lipoprotein YiaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yiaD PE=1 SV=2 - [YIAD_ECOLI]	86.78	71.23	1	10	10	18	219	22.2	9.80
660511794	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	82.70	77.42	1	10	10	24	155	15.6	8.84
P0AA91	Uncharacterized lipoprotein YeaY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yeaY PE=3 SV=1 - [YEAY_ECOLI]	72.50	52.33	1	12	12	24	193	20.9	9.54
660511374	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	70.74	47.78	2	5	13	22	360	39.6	5.12
660511055	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	68.65	52.76	1	14	15	20	362	39.3	4.97
660511075	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	65.86	55.71	2	17	17	21	350	37.5	6.16
Q8FJM0	DNA protection during starvation protein OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=dps PE=3 SV=4 - [DPS_ECOL6]	63.55	64.07	1	12	12	20	167	18.7	5.83
P69776	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1 - [LPP_ECOLI]	60.26	60.26	1	7	7	19	78	8.3	9.25

660511162	hypothetical protein ECOLIN_05375 [Escherichia coli Nissle 1917]	60.00	40.31	1	4	4	19	129	14.7	10.1
										4
P0A7W3	30S ribosomal protein S5 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=rpsE PE=3 SV=2 - [RS5_ECO57]	51.61	74.25	1	11	11	15	167	17.6	10.1
										1
660512129	porin [Escherichia coli Nissle 1917]	45.38	30.83	1	3	9	13	360	39.6	4.79
P0AFL5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ppiA PE=3 SV=1 [PPIA_ECO57]	43.25	48.95	1	5	5	12	190	20.4	8.85
P0A918	Outer membrane protein X OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ompX PE=3 SV=1 - [OMPX_ECOL6]	41.16	49.71	1	7	7	10	171	18.6	7.17
660511071	hypothetical protein ECOLIN_04885 [Escherichia coli Nissle 1917]	39.31	63.64	1	7	7	11	187	20.7	6.10
441712030	Glycoprotein-polysaccharide metabolism [Escherichia coli Nissle 1917]	38.31	34.59	2	4	4	9	185	18.8	6.64
P0ABD4	Bacterioferritin OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=bfr PE=3 SV=1 - [BFR_ECOL6]	37.44	65.19	1	10	10	12	158	18.5	4.81
660511889	transcriptional regulator [Escherichia coli Nissle 1917]	34.56	69.64	1	6	6	10	112	12.0	7.87
A1A7M1	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli O1:K1 / APEC GN=bamA PE=3 SV=1 - [BAMA_ECOK1]	34.05	13.09	3	10	10	11	810	90.6	5.15
P0A864	Thiol peroxidase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=tpx PE=3 SV=2 - [TPX_ECO57]	33.05	45.24	1	6	6	8	168	17.8	4.92
660512125	lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	31.98	59.12	2	7	7	10	137	15.0	4.98
660510998	lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	29.76	56.14	1	9	9	11	171	18.9	6.90
660512645	RpoE-regulated lipoprotein [Escherichia coli Nissle 1917]	29.17	41.88	2	6	6	8	191	20.8	5.22
B7MFR4	LPS-assembly lipoprotein LptE OS=Escherichia coli O45:K1 (strain S88 / ExPEC) GN=lptE PE=3 SV=1 - [LPTE_ECO45]	28.59	50.78	1	10	10	13	193	21.3	8.68
P0ADV2	Lipopolysaccharide export system protein LptA OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=lptA PE=3 SV=1 - [LPTA_ECOL6]	28.07	37.30	1	7	7	11	185	20.1	8.98
B7MS65	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase OS=Escherichia coli O81 (strain ED1a) GN=fabA PE=3 SV=1 - [FABA_ECO81]	26.97	50.00	1	8	8	10	172	19.0	6.57
B7L6I9	50S ribosomal protein L20 OS=Escherichia coli (strain 55989 / EAEC) GN=rpIT PE=3 SV=1 [RL20_ECO55]	25.13	47.46	1	8	8	10	118	13.5	11.4
										7
660514474	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	23.50	44.07	2	9	9	9	177	19.9	8.41

B7MIX0	50S ribosomal protein L1 OS=Escherichia coli O45:K1 (strain S88 / ExPEC) GN=rplA PE=3 SV=1 - [RL1_ECO45]	23.11	23.93	2	4	4	6	234	24.7	9.64
660511792	lysozyme inhibitor [Escherichia coli Nissle 1917]	23.07	55.14	3	5	5	6	107	12.3	8.16
660511149	hypothetical protein ECOLIN_05310 [Escherichia coli Nissle 1917]	22.20	28.35	1	6	6	7	194	21.4	9.33
660512975	type VI secretion protein [Escherichia coli Nissle 1917]	20.70	32.02	1	7	7	10	178	20.5	6.55
B7N185	50S ribosomal protein L15 OS=Escherichia coli O81 (strain ED1a) GN=rplO PE=3 SV=1 - [RL15_ECO81]	20.04	49.31	1	7	7	7	144	15.0	11.18
A8A5E8	30S ribosomal protein S7 OS=Escherichia coli O9:H4 (strain HS) GN=rpsG PE=3 SV=1 - [RS7_ECOHS]	19.42	45.51	1	5	5	8	156	17.6	10.30
POA7V2	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=rpsB PE=3 SV=2 - [RS2_ECO57]	18.85	29.88	1	6	6	8	241	26.7	7.14
660510721	peptidylprolyl isomerase [Escherichia coli Nissle 1917]	18.37	26.22	2	3	3	5	164	18.2	5.80
660513715	hypothetical protein ECOLIN_19190 [Escherichia coli Nissle 1917]	17.54	32.97	2	4	4	6	185	19.8	5.57
A7ZPA8	UPF0304 protein YfbU OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=yfbU PE=3 SV=1 - [YFBU_ECO24]	17.52	30.49	3	6	6	7	164	19.6	6.80
441711325	SSU ribosomal protein S4p (S9e) [Escherichia coli Nissle 1917]	14.56	21.29	2	3	3	4	202	23.0	10.02
POAA25	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2 - [THIO_ECOLI]	14.52	33.94	1	3	3	4	109	11.8	4.88
660512583	ABC transporter permease [Escherichia coli Nissle 1917]	13.45	13.15	2	2	2	3	251	28.0	5.05
POADA9	Osmotically-inducible lipoprotein B OS=Escherichia coli O157:H7 GN=osmB PE=3 SV=1 - [OSMB_ECO57]	13.41	58.33	1	2	2	3	72	6.9	10.01
B7UJW3	50S ribosomal protein L13 OS=Escherichia coli O127:H6 (strain E2348/69 / EPEC) GN=rplM PE=3 SV=1 - [RL13_ECO27]	13.28	40.14	1	6	6	8	142	16.0	9.91
P69412	Outer membrane lipoprotein RcsF OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=rscF PE=3 SV=1 - [RCSF_ECOL6]	12.95	47.76	1	4	4	6	134	14.2	9.13
660511519	membrane protein [Escherichia coli Nissle 1917]	12.79	16.04	2	2	2	3	212	22.9	6.52
B7LHZ6	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain 55989 / EAEC) GN=rplQ PE=3 SV=1 - [RL17_ECO55]	12.31	33.07	2	4	4	5	127	14.4	11.05
660512894	lipoprotein NlpD [Escherichia coli Nissle 1917]	11.42	7.92	2	3	3	4	379	40.2	9.51

174 ANEXOS

P0A9A0	Bacterial non-heme ferritin OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ftnA PE=3 SV=1 -[FTNA_ECO57]	-11.42	18.18	1	2	2	3	165	19.4	4.83
660510335	serine endoprotease [Escherichia coli Nissle 1917]	11.15	12.66	2	3	3	3	474	49.3	8.56
B7UK43	50S ribosomal protein L4 OS=Escherichia coli O127:H6 (strain E2348/69 / EPEC) GN=rpID PE=3 SV=1 - [RL4_ECO27]	10.70	19.90	1	3	3	4	201	22.1	9.73
B7LA78	50S ribosomal protein L10 OS=Escherichia coli (strain 55989 / EAEC) GN=rpIJ PE=3 SV=1 -[RL10_ECO55]	-9.61	21.82	1	3	3	3	165	17.7	8.98
P0ADY9	50S ribosomal protein L16 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=rpIP PE=3 SV=1 -[RL16_ECO57]	-9.40	22.06	1	2	2	2	136	15.3	11.2 2
B5YT26	Outer-membrane lipoprotein carrier protein OS=Escherichia coli O157:H7 (strain EC41159 / EHEC) GN=lolA PE=3 SV=1 - [LOLA_ECO5E]	9.04	13.79	1	2	2	3	203	22.5	6.80
A7ZSK3	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=rpsC PE=3 SV=1 - [RS3_ECO24]	8.58	10.73	1	3	3	4	233	26.0	10.2 7
660511756	hypothetical protein ECOLIN_08655 [Escherichia coli Nissle 1917]	8.48	11.15	2	3	3	3	314	33.9	9.28
B7MNU0	Transcriptional regulator MraZ OS=Escherichia coli O81 (strain ED1a) GN=mraZ PE=3 SV=1 - [MRAZ_ECO81]	7.82	21.71	2	4	4	4	152	17.3	5.80
660512708	membrane biogenesis protein [Escherichia coli Nissle 1917]	7.74	6.38	2	2	2	2	392	41.9	4.91
P0AFH8	Osmotically-inducible protein Y OS=Escherichia coli (strain K12) GN=osmY PE=1 SV=1 -[OSMY_ECOLI]	-7.68	11.44	1	2	2	2	201	21.1	6.81
441712447	L,D-transpeptidase YbiS [Escherichia coli Nissle 1917]	7.37	12.83	2	2	2	2	304	33.1	6.40
585317687	elongation factor Tu, partial [Escherichia coli]	7.25	9.32	4	2	2	3	311	34.3	4.97
660511378	hypothetical protein ECOLIN_06610 [Escherichia coli Nissle 1917]	6.77	37.11	2	2	2	2	97	10.4	8.97
P69784	PTS system glucose-specific EIIA component OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=crr PE=3 SV=2 - [PTGA_ECOL6]	6.65	21.89	1	3	3	3	169	18.2	4.84
B611U8	30S ribosomal protein S9 OS=Escherichia coli (strain SE11) GN=rpsI PE=3 SV=1 -[RS9_ECO5E]	-6.14	15.38	1	2	2	2	130	14.8	10.9 5
B7LA74	50S ribosomal protein L11 OS=Escherichia coli (strain 55989 / EAEC) GN=rpIK PE=3 SV=1 -[RL11_ECO55]	-6.09	16.90	1	2	2	2	142	14.9	9.63

P65293	Uncharacterized lipoprotein Ygdl OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) GN=ygdl PE=3 SV=1 - [YGDI_ECOL6]	6.09	41.33	2	2	2	2	75	8.2	5.97
B7MCS3	50S ribosomal protein L5 OS=Escherichia coli O45:K1 (strain S88 / ExPEC) GN=rplE PE=3 SV=1 - [RL5_ECO45]	5.25	24.58	1	3	3	3	179	20.3	9.48
441714276	Ribonuclease E inhibitor RraA [Escherichia coli Nissle 1917]	4.99	17.39	2	2	2	2	115	12.3	4.21
POACJ0	Leucine-responsive regulatory protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lrp PE=1 SV=2 - [LRP_ECOLI]	4.39	10.37	1	2	2	2	164	18.9	8.78

10 PUBLICACIONES

10. PUBLICACIONES