

Modulació de la barrera intestinal i de la resposta immunitària per vesícules de membrana i factors secretats per probiòtics i microbiota comensal

Josefa Badia
Laura Baldomà

Grup de “microbiota-host interaction”
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l’Alimentació,
Universitat de Barcelona

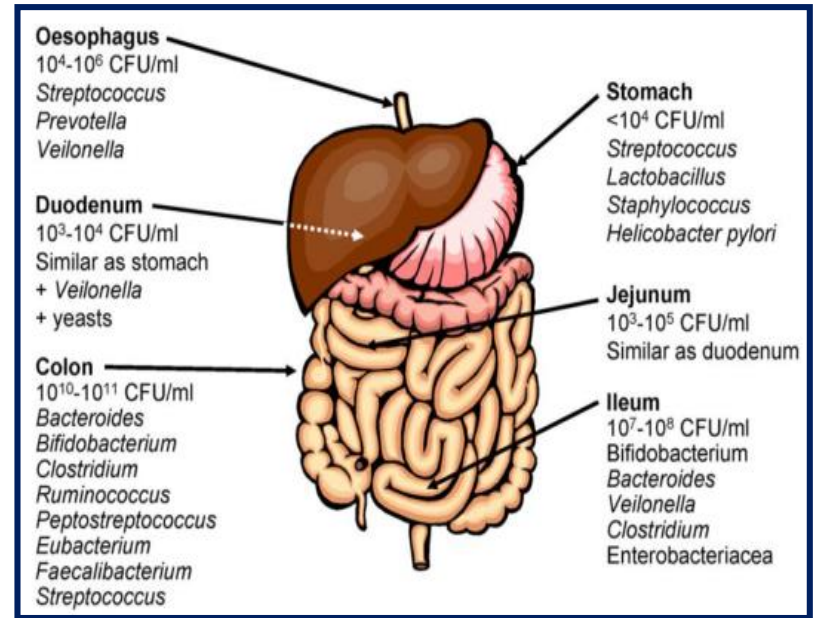
Tracte gastrointestinal i microbiota

El sistema intestinal és el més colonitzat
(bacteris , fongs, virus, protozous)
“Microbiota intestinal”

Espècies diferents de bacteris
(500-1000)
Anaerobis, anaerobis facultatius

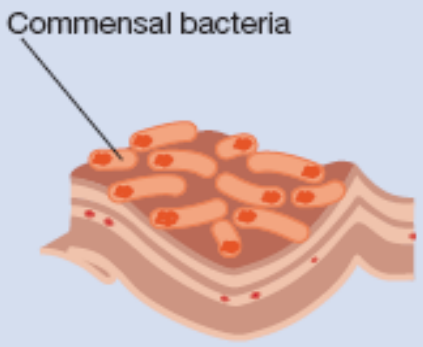
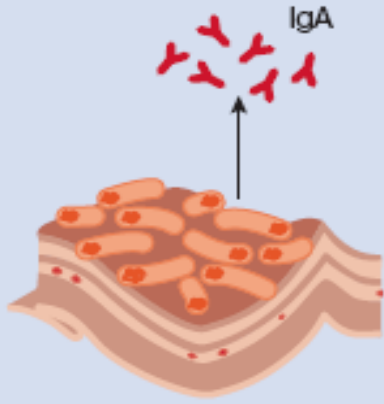
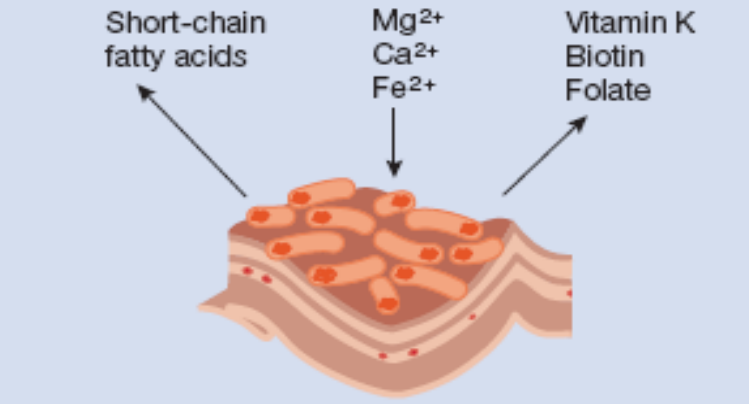
Gran capacitat metabòlica i una
dotació gènica que excedeix 100
vegades la de l'hoste

La microbiota compleix importants
funcions. Es considerada un òrgan



Tiihonen et al *Ageing Res. Rev.* 9: 107–16. (2010) .

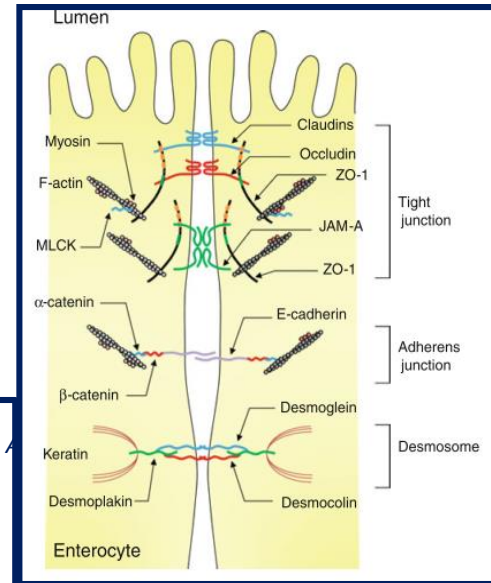
Funcions de la microbiota

Protective functions	Structural functions	Metabolic functions
<ul style="list-style-type: none"> Pathogen displacement Nutrient competition Receptor competition Production of anti-microbial factors e.g., bacteriocins, lactic acids 	<ul style="list-style-type: none"> Barrier fortification Induction of IgA Apical tightening of tight junctions Immune system development 	<ul style="list-style-type: none"> Control IEC differentiation and proliferation Metabolize dietary carcinogens Synthesize vitamins e.g., biotin, folate Ferment non-digestible dietary residue and endogenous epithelial-derived mucus Ion absorption Salvage of energy
 <p>Commensal bacteria</p>	 <p>IgA</p>	 <p>Short-chain fatty acids</p> <p>Mg²⁺ Ca²⁺ Fe²⁺</p> <p>Vitamin K Biotin Folate</p>

O'Hara & Shanahan (2006) *EMBO reports*, 7:688-693

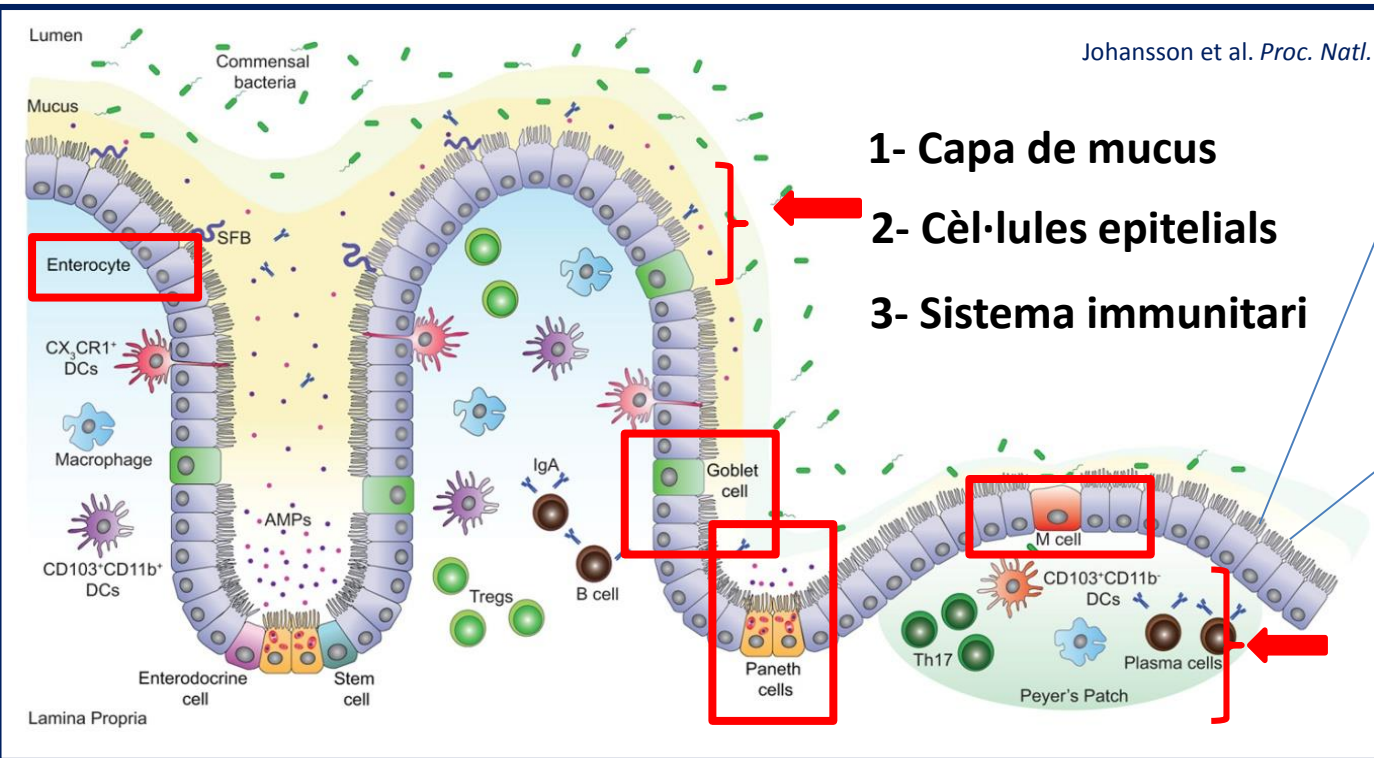
Comunicació microbiota-hoste

Mucosa intestinal

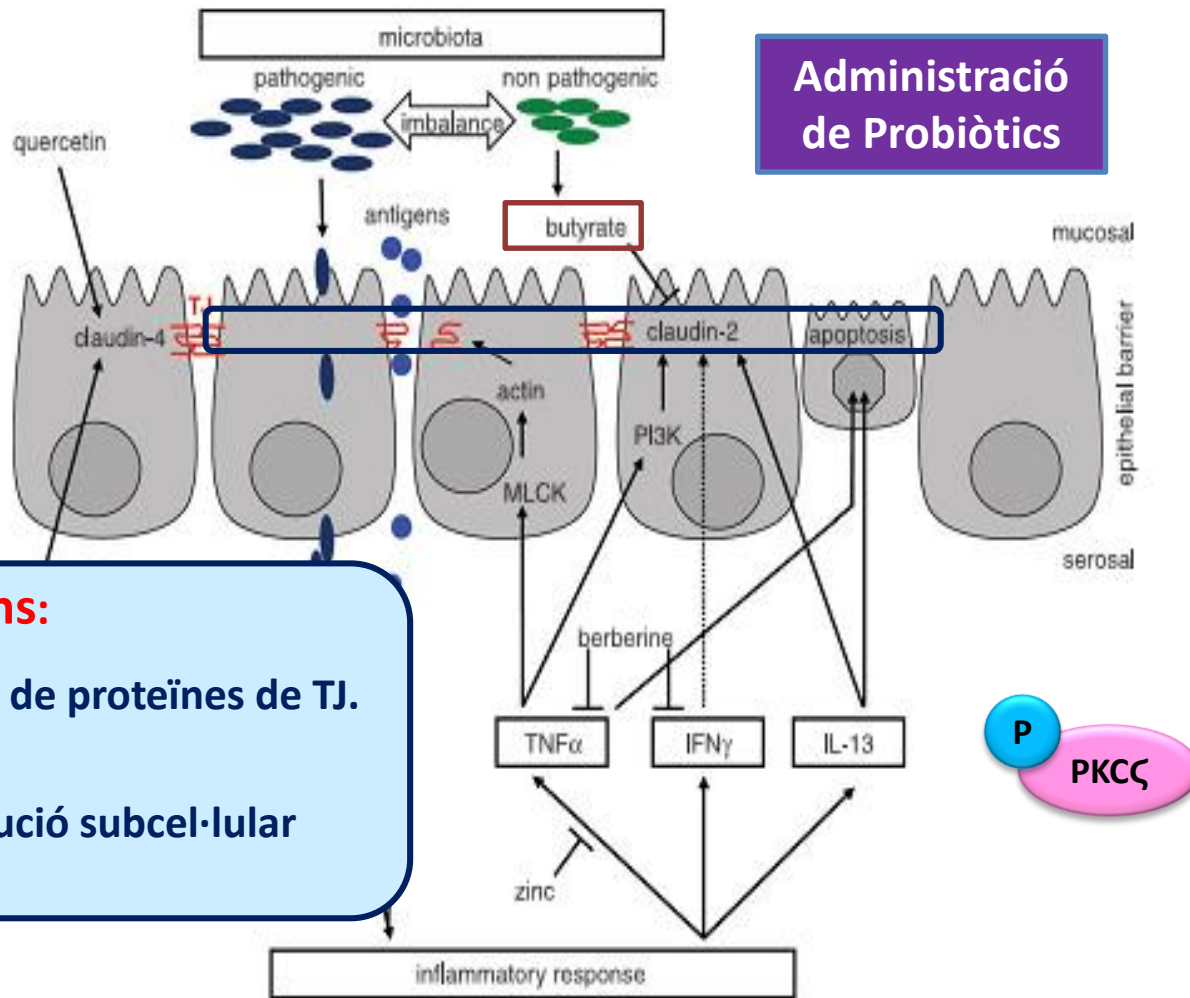


Johansson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- 1- Capa de mucus
- 2- Cèl·lules epitelials
- 3- Sistema immunitari



Comunicació microbiota-hoste

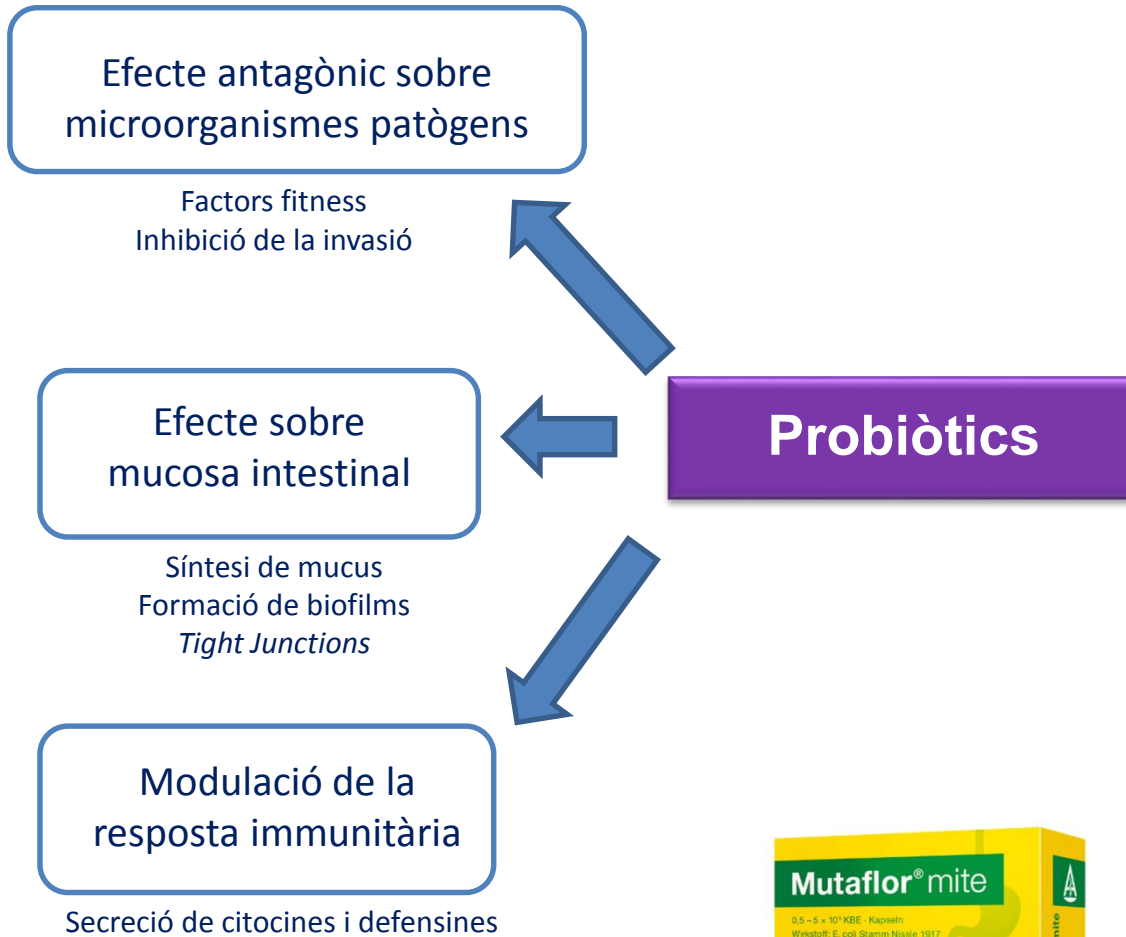


Alteracions:

1. Expressió de proteïnes de TJ.

2. Redistribució subcel·lular (PKC ζ)

Microorganismes probiòtics



Saccharomyces boulardii

Lactobacillus:

- *Lactobacillus GG (LGG)*
- *L. acidophilus LA-1*
- *L. casei*
- *L. plantarum*
- *L. debrueckii bulgaricus*

Bifidobacterium:

- *B. longum*
- *B. infantis*
- *B. termophilum*
- *B. bifidum*

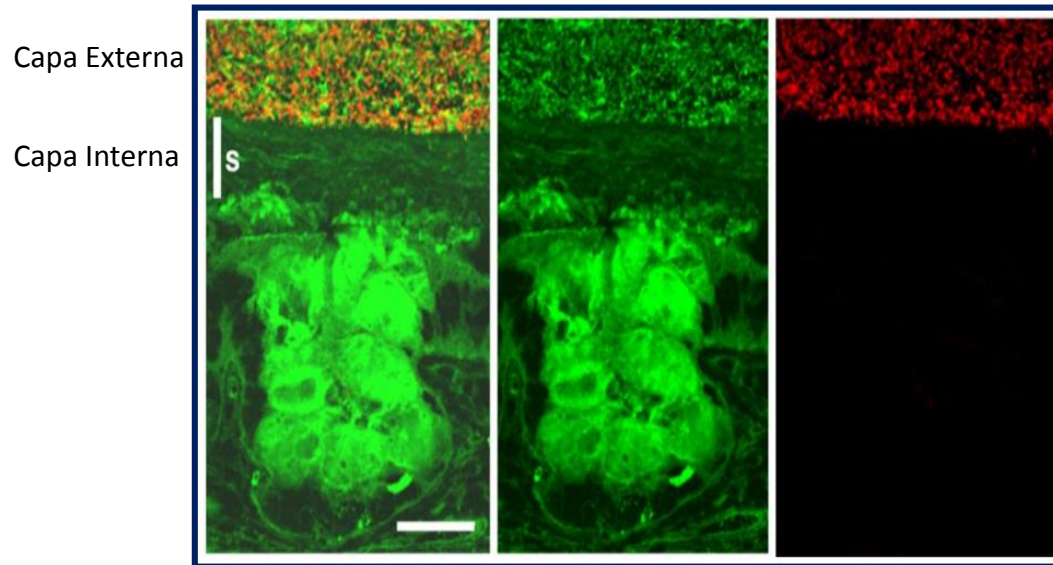
Streptococcus:

- *S. salivarius*

Escherichia coli:

- *E. coli Nissle 1917 (EcN)*

Comunicació entre la microbiota i l'epiteli intestinal



Johansson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 15064–9. (2008)

Epiteli Intestinal:

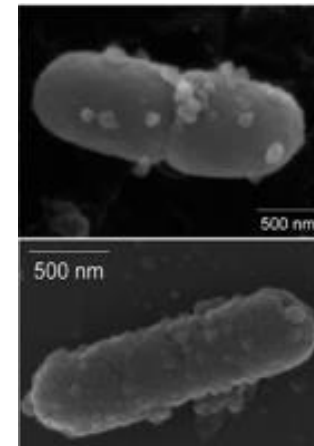
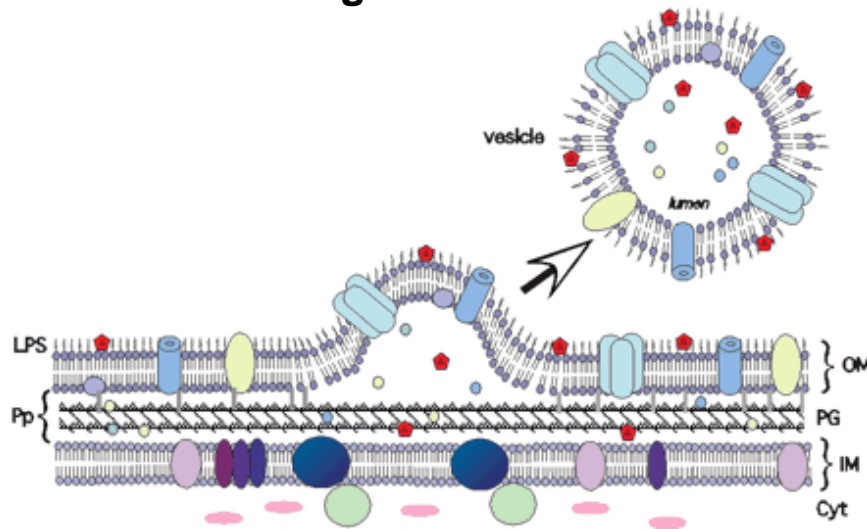
- Superfície d'interacció amb els bacteris

Factors secretats pels bacteris :

- Proteïnes i altres factors secretats
- Vesícules de membrana externa (OMVs)

Vesícules de membrana externa

Bacteris Gram-negatius



Kuehn, M. J., & Kesty, N. C. (2005). *Genes Dev.* 19, 2645-2655.

Actuen com vehicles d'alliberament a distància:

- Proteïnes i altres components de la membrana externa.
- Proteïnes de periplasma
- Algunes proteïnes citosòliques
- DNA i RNA
- Metabolits

Funcions de les vesícules

Bacteria-Bacteria Interactions

Antibiotic resistance

- Beta-lactamase: AmpC, Bla
- Multi-drug efflux systems: Mex, Mtr, TolC

Nutrient acquisition

- Siderophore transport: FecA, FhuA, FhuE, FiuA, FptA
- Amino acid transport: ArtI, BraC, FliY, GlnH, HisJ
- Fatty acid transport: FadL

Killing competing bacteria

- Murein hydrolases: MltA, MltB
- Endopeptidase L5: AlpB

Bacteria-Host Interactions

Promote inflammatory responses

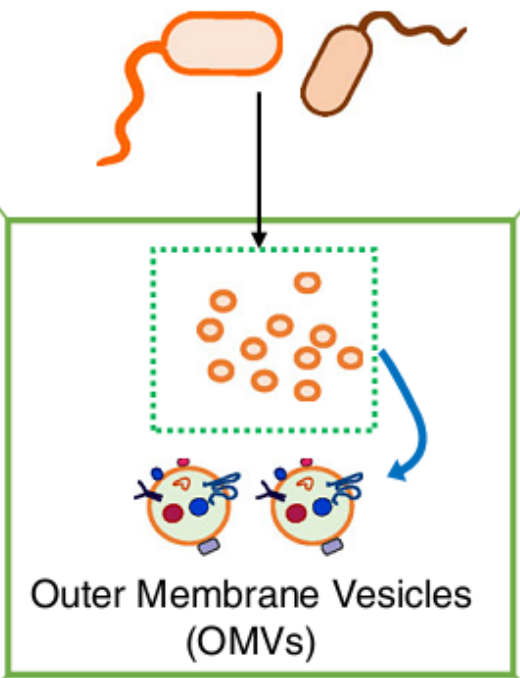
- Lipoproteins
- Lipopolysaccharides (LPS)
- Other virulence factors

Adhesion to host cells

- Adhesins: Ata, BabA, SabA
- Porins: OmpA

Virulence factor delivery

- Toxins: Cif, ClyA, EitA, EitB, LtxA, StxA, StxB
- Digestive enzymes: LasB, PhoA, PlcH



Outer Membrane Vesicles (OMVs)

OMVs commensal strains

Contribute to intestinal health by immunomodulating host responses

Aportacions sobre l'efecte de factors secretats per *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) i soques comensals sobre la barrera intestinal

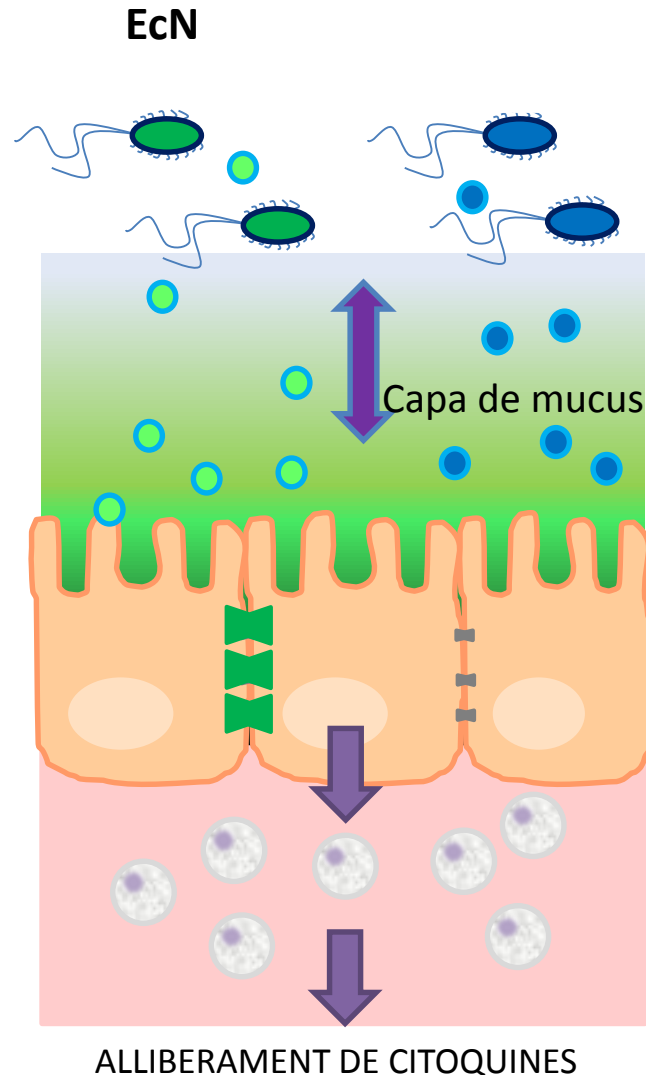
AILLAR LES OMVS I CARACTERITZAR EL SEU PROTEOMA

INTERNALITZACIÓ DE LES OMVs

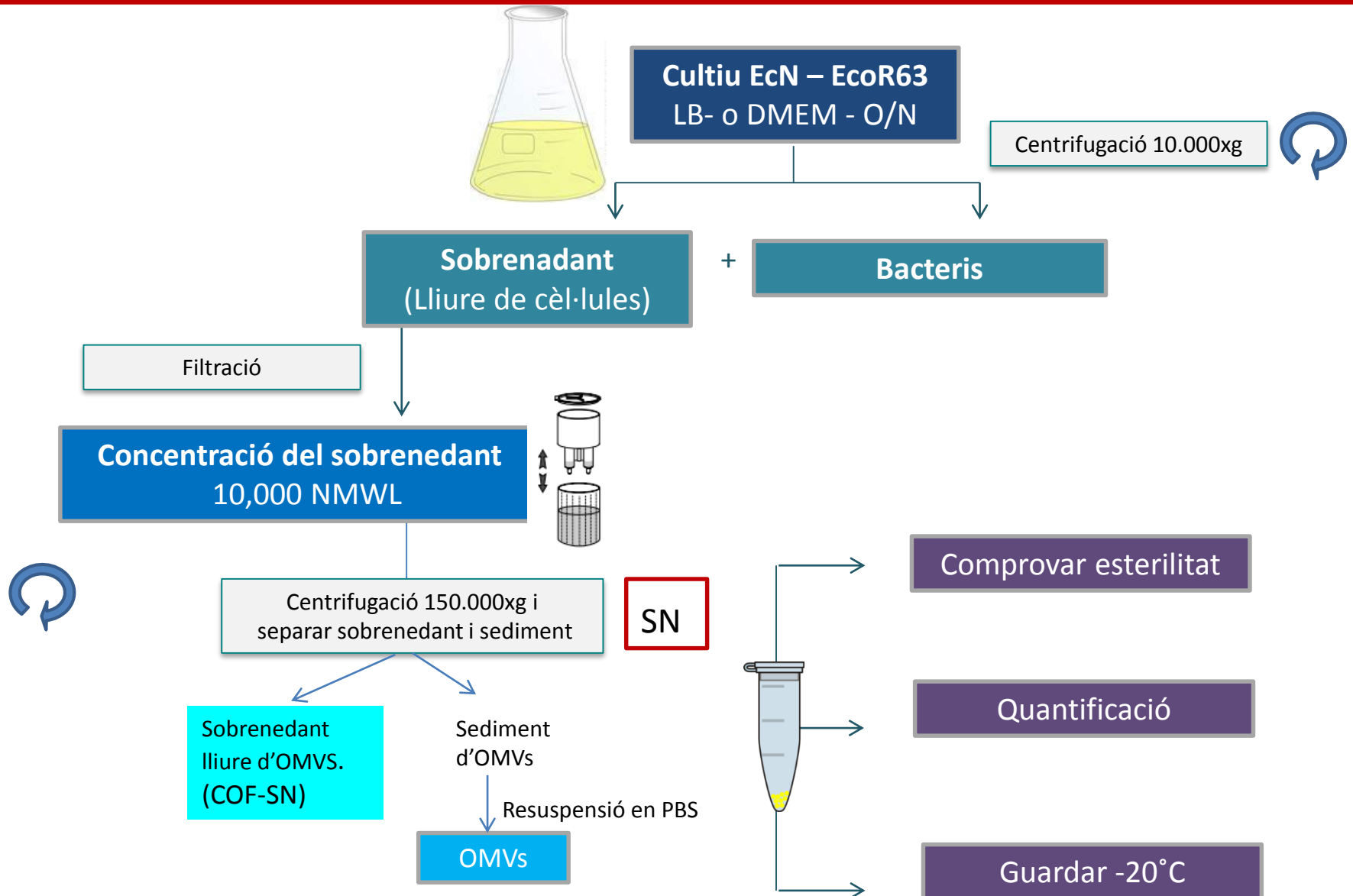
EFFECTES DE LES OMVs I ALTRES FACTORS SECRETATS SOBRE LA BARRERA INTESTINAL

Reforç de les *tight junctions* (EcN)

Modulació de la resposta immunitària

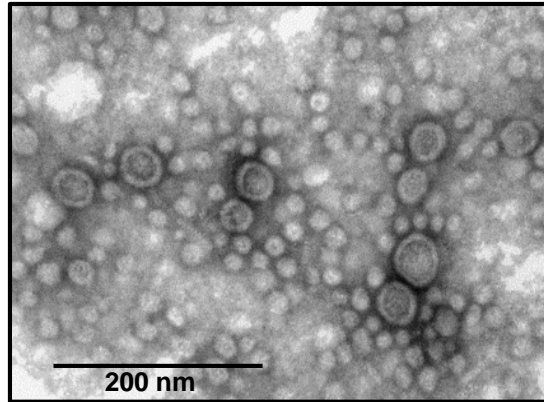


Obtenció de vesícules i factors secretats solubles

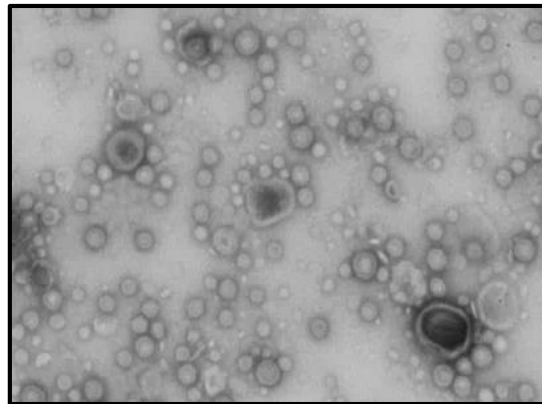


Vesícules de membrana externa

Microscòpia electrònica
de transmissió TEM

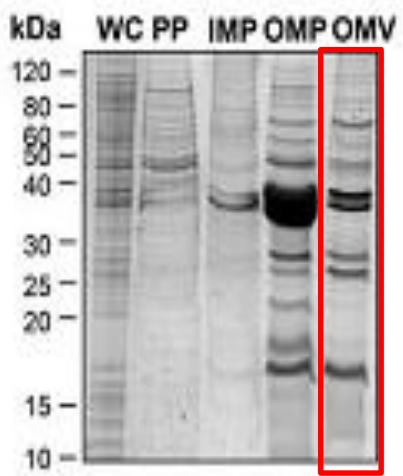


EcN OMVs



EcoR12 OMVs

Proteoma de la soca Nissle 1917



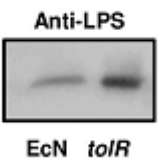
MS



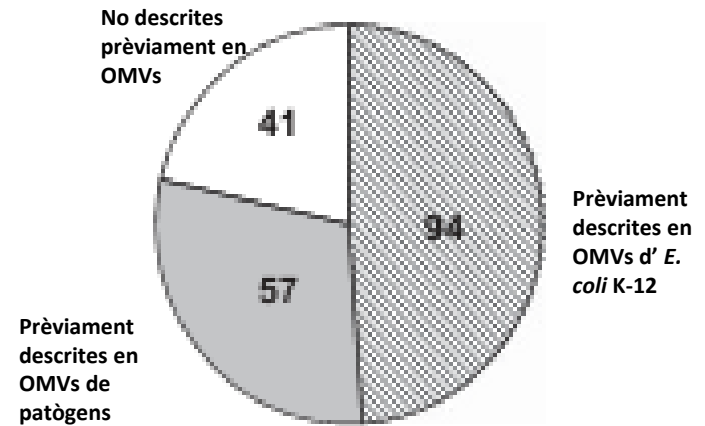
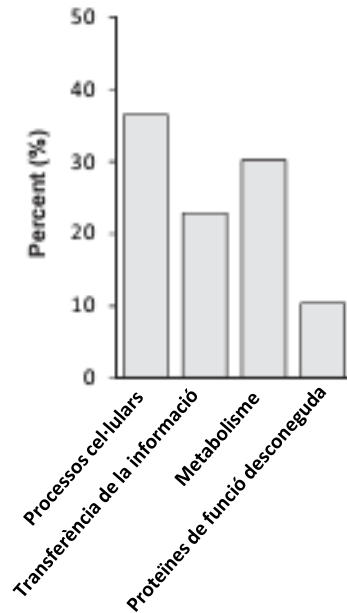
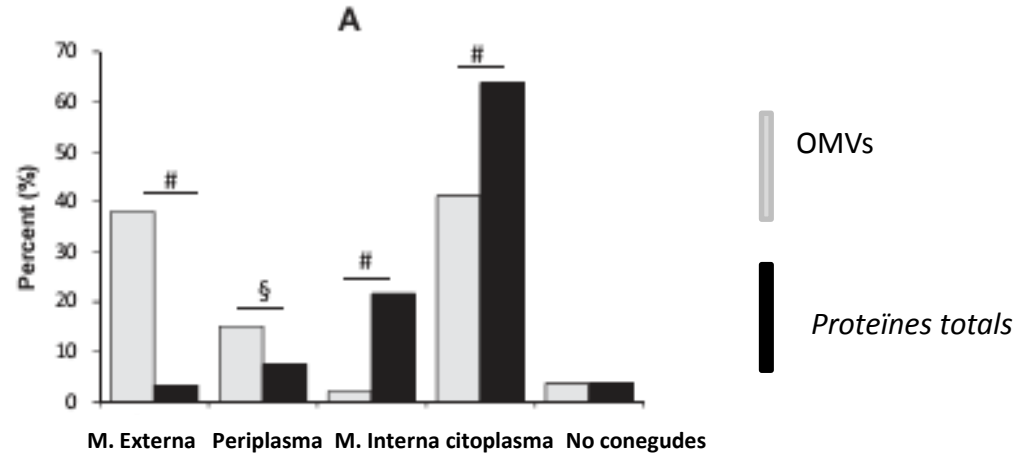
Identificació de proteïnes



Classificació en grups funcionals i predicció *in silico* de la funció



Anàlisi proteòmic de OMVs en DMEM



Funcions de les vesícules a EcN

Bacteria-Bacteria Interactions

Protecció a antibiòtics, virus, bacteris i d'altres

Resistència: **BtuB**, **OmpF**, **OmpA**

Estres oxidatiu: **DsbC**, **TrxA**, **HslU**

Adquisició de nutrients

Receptors : **Vitamina B12 (BtuB)**

Captadors de ferro: **IutA**, **Iron**, **FecA**

Transportadors ABC de:

- Nutrients: **BtuB**, **FadL**

- Ions inorgànics: **FhuA**

- Aminoàcids i sucres: **GlnH**, **MetQ**, **MalE**

Mort bacteriana

Murein hidrolases: **MltA**, **MltB**, **EmtA**

Bacteria-Host Interactions

Promouen respostes inflamatòries

Lipopolisacàrid: **LPS**

Proteases: **Pic**

Adhesió a la cèl.lula hoste

Adhesió: **Fim1C**, **OmpA**, **Iha**, **Ag43**

Flagel: **FliC**, **FliD**, **FlgK**, **FlgE**, **FlgG**

Porines: **OmpA**, **OmpF**, **OmpC**, **OmpX**

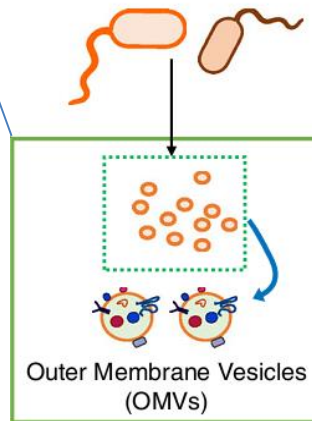
Metabolic enzymes: **AsnB**, **Eno**, **GapA**

Factors immunomoduladors i de virulència

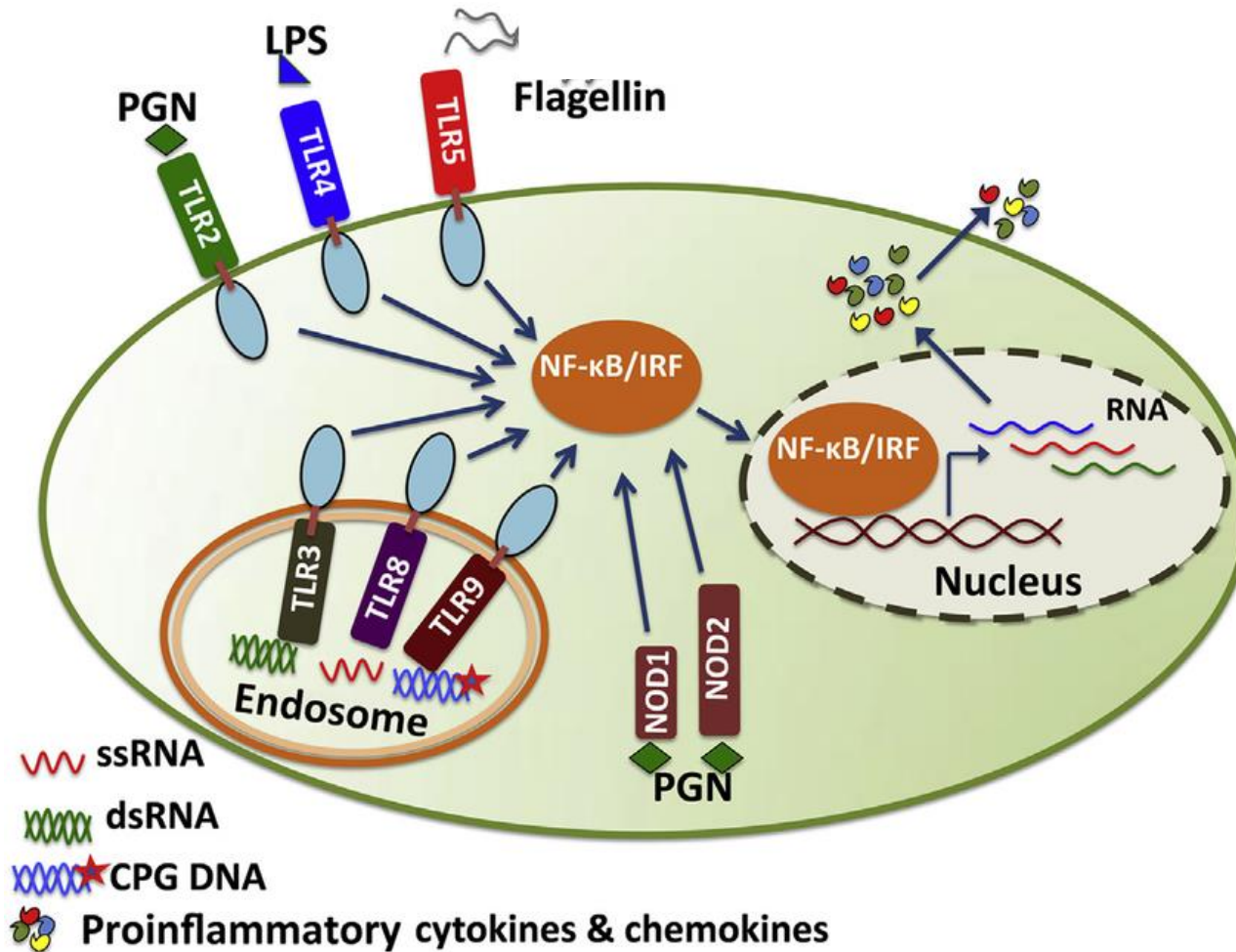
Proteïnes Metabòliques: **CadA**

(disminueix l'adhesió d'altres bacteris)

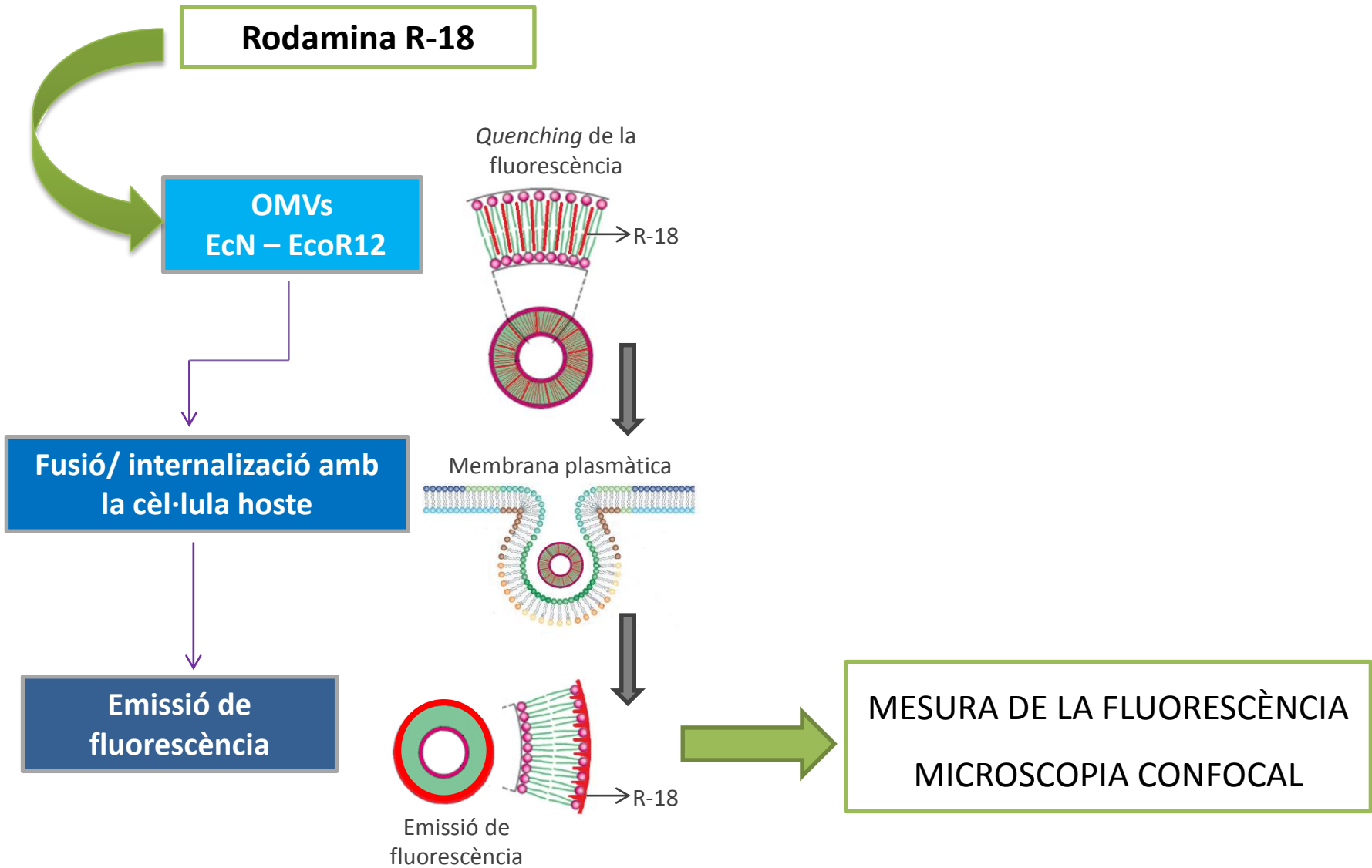
Altres: **PpiA** (evita reconeixement per macròfags)



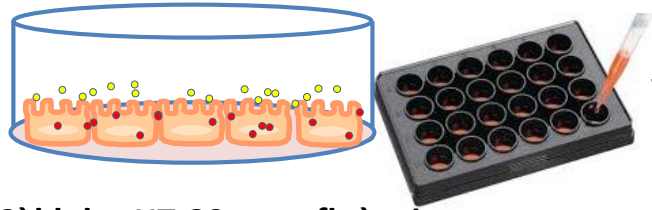
Receptors que reconeixen patrons microbians (PRR)



Internalització



Entrada d'OMVs a l'interior cel·lular

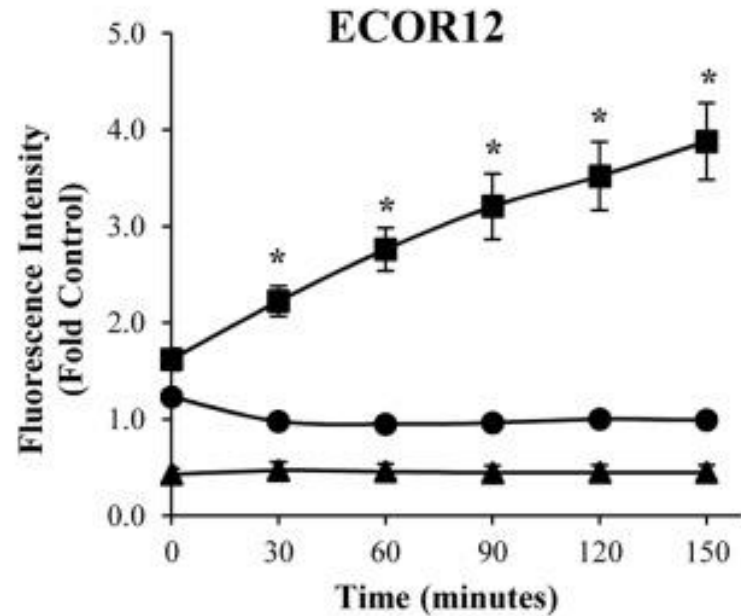
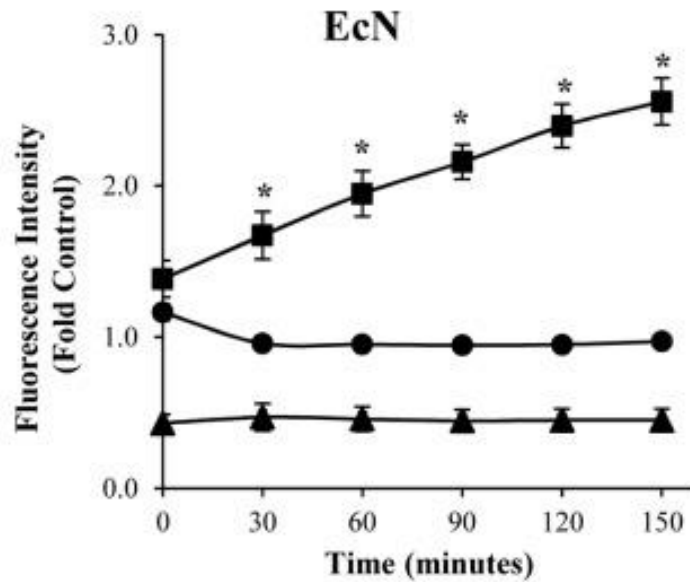


Cèl·lules HT-29 a confluència



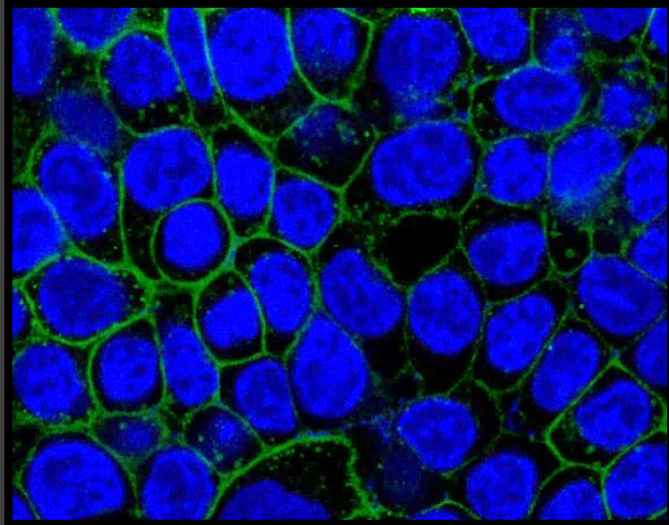
Modulus™ Microplate

A



Internalització

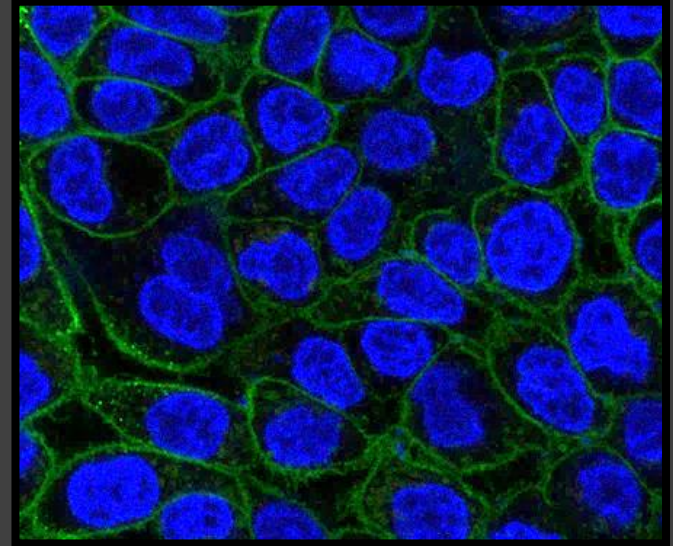
HT-29 Control



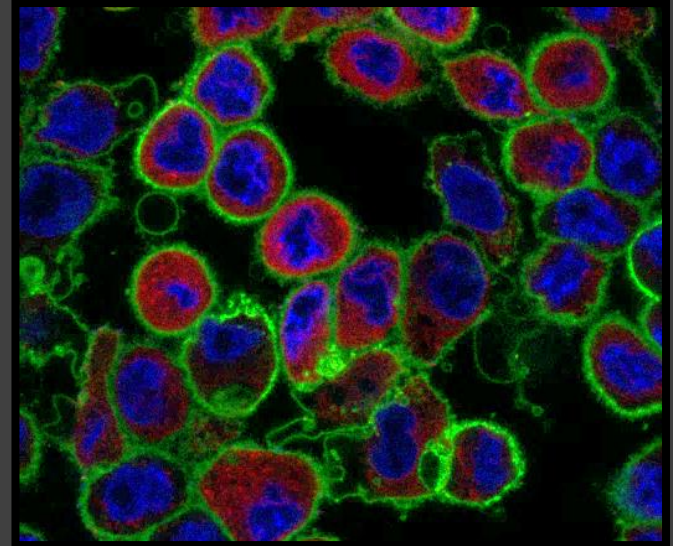
OMVs EcN

90 min

4°C



37°C

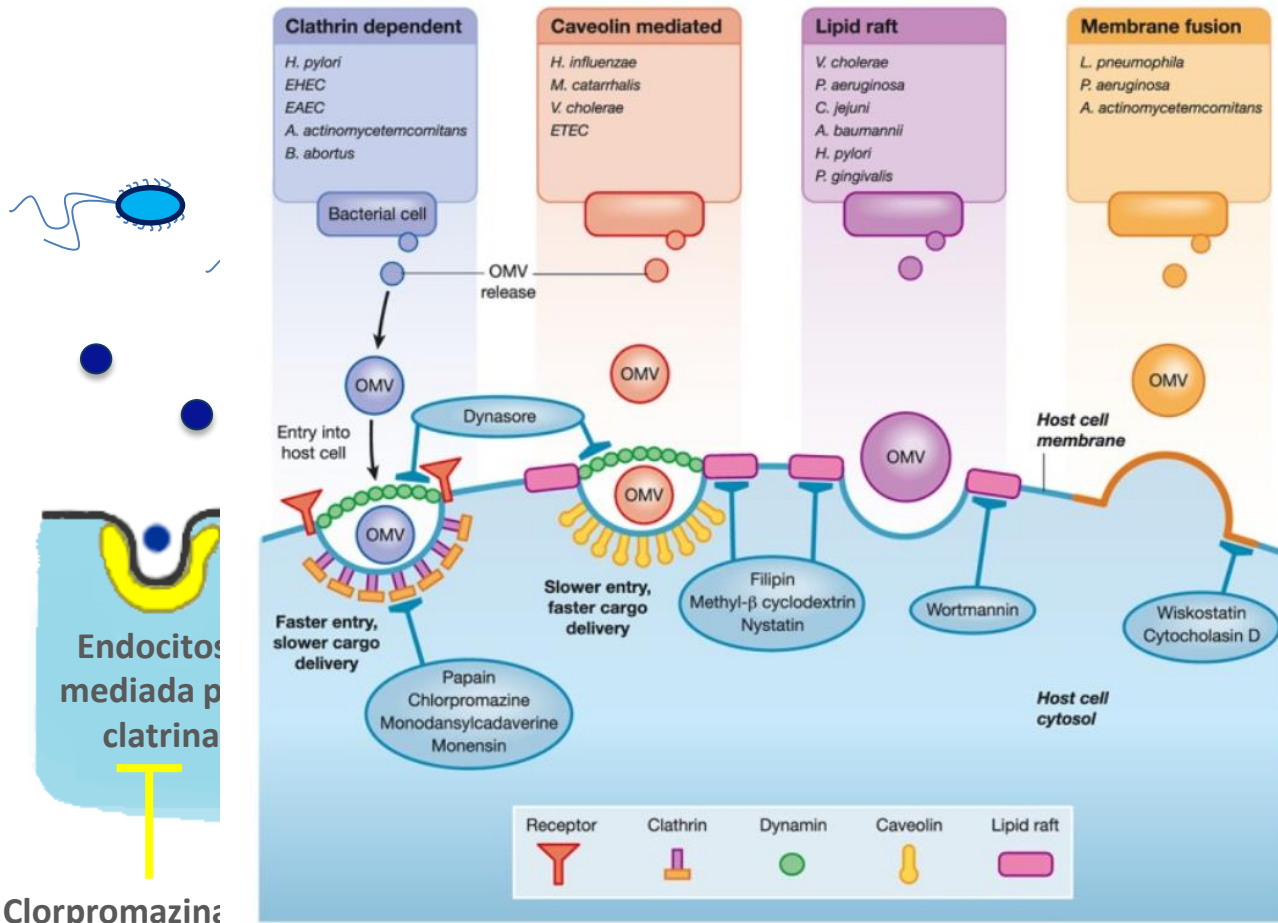


Membrana cel·lular amb WGA Alexa Fluor 488

Nucli DAPI

OMVs marcadés amb Rodamina R-18

Vies d' internalització d'OMVs



Endocitosis mediada per clatrina
 Clorpromazina

INHIBIDORS

ules
de

5

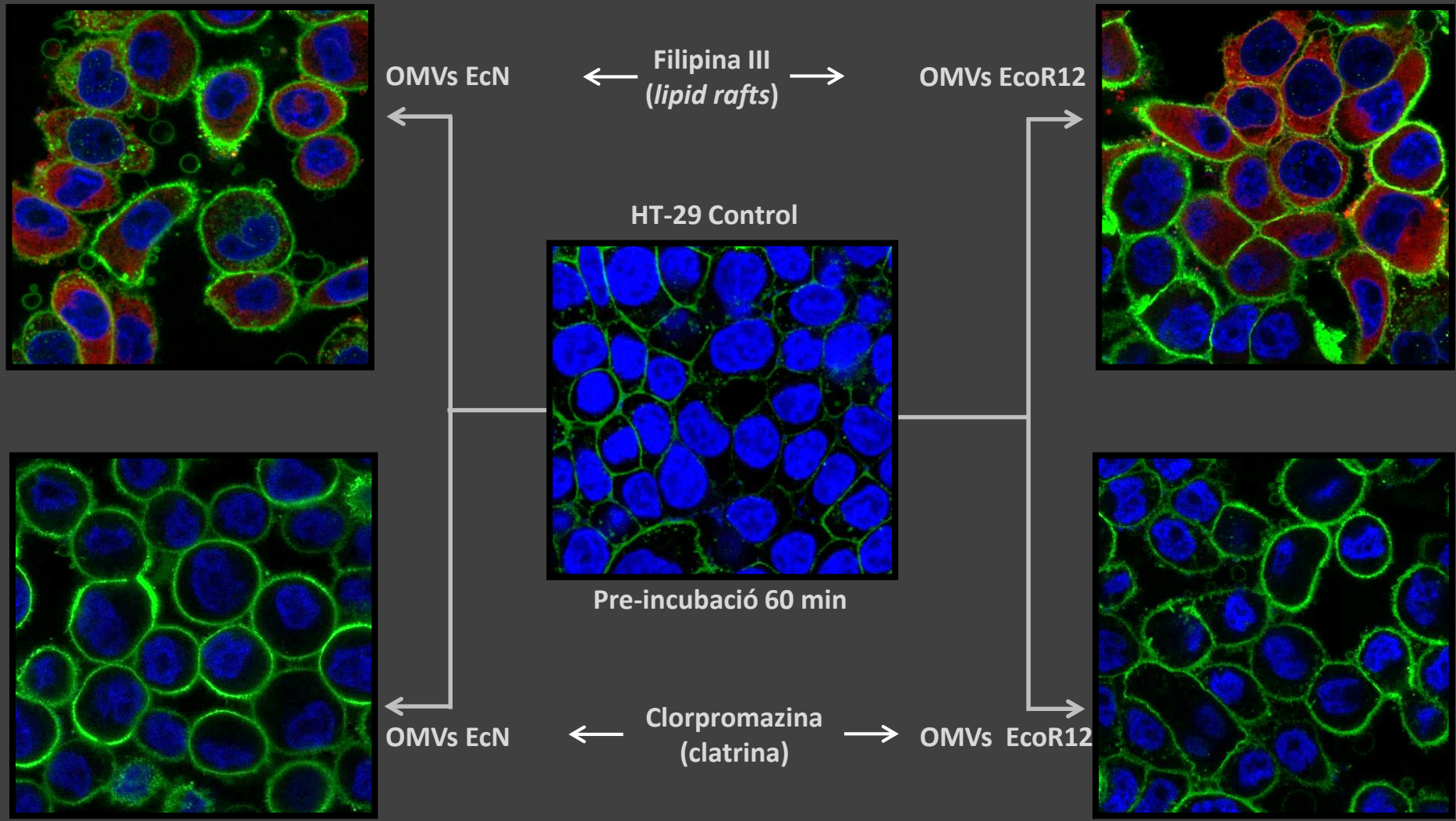
Kestv et al (2004) EMBO J. 23:4538-4549

O'Donoghue and Krachler. [Cell Microbiol. 2016 Nov; 18\(11\): 1508-1517.](#)

E. coli enterohemorràgica

Bielaszewska et al. (2013) PLoS Pathog. 12:e1003797

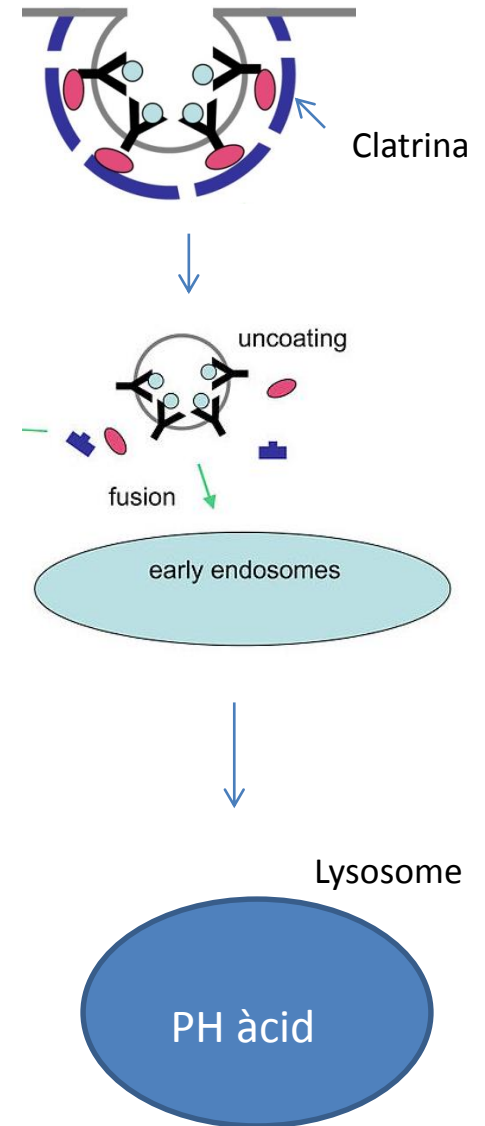
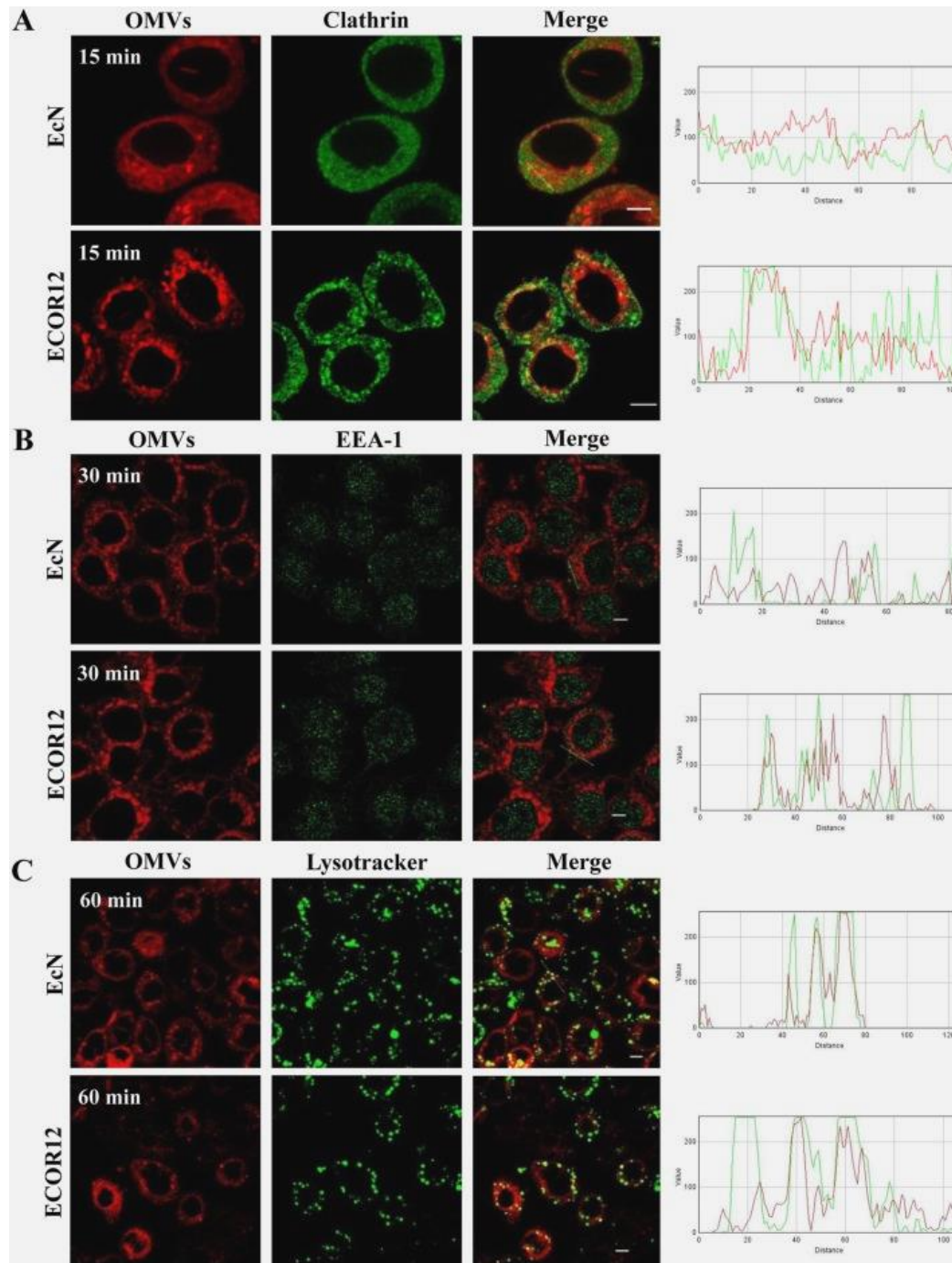
Internalització per endocitosis



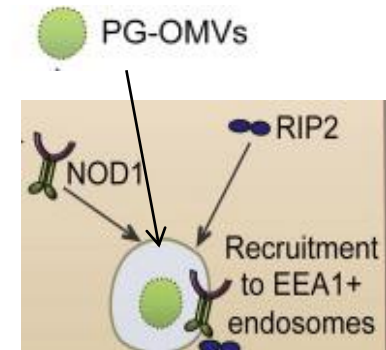
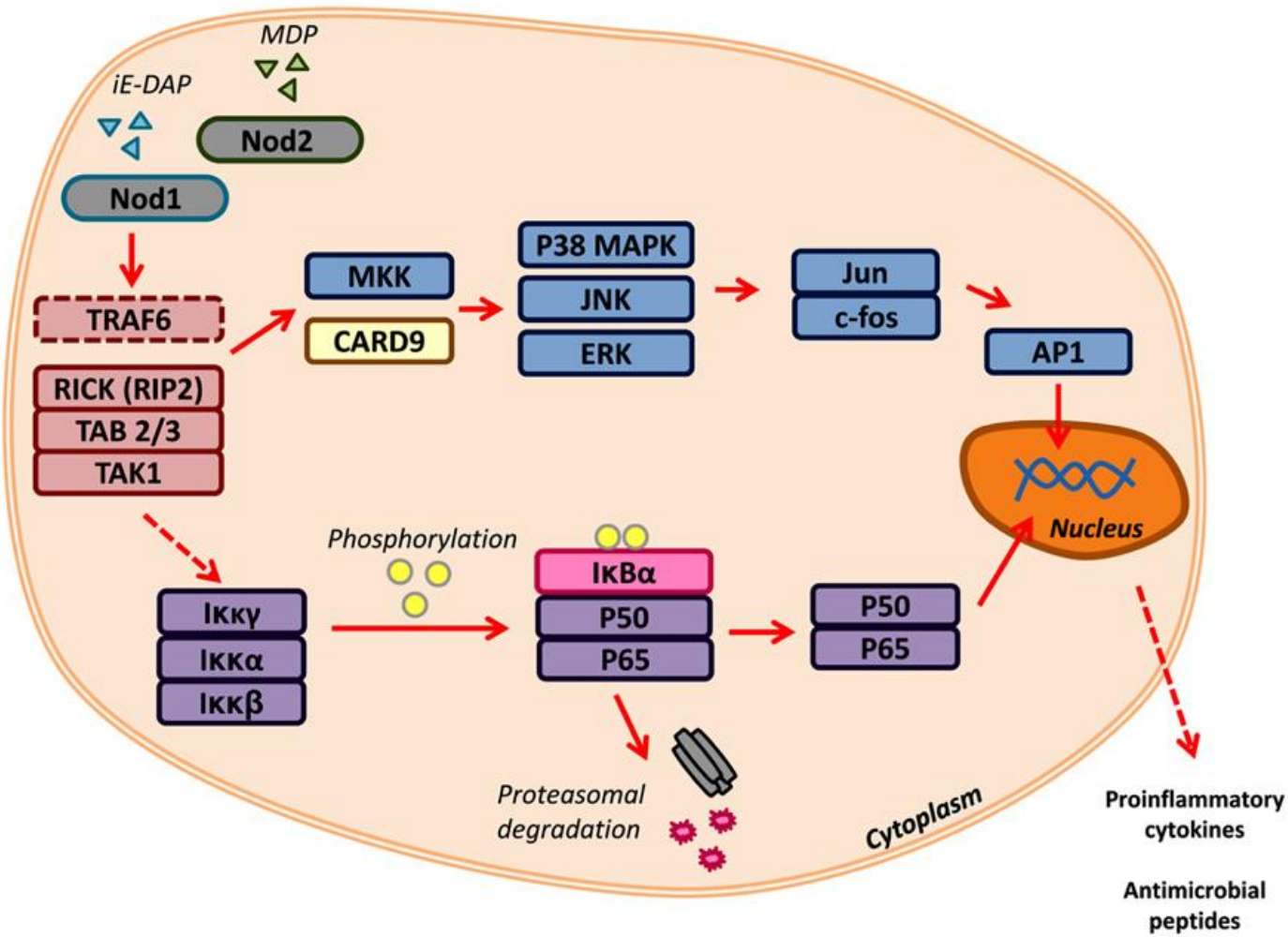
Membrana cel·lular amb WGA Alexa Fluor 488

Nucli DAPI

OMVs marcadés amb R-18

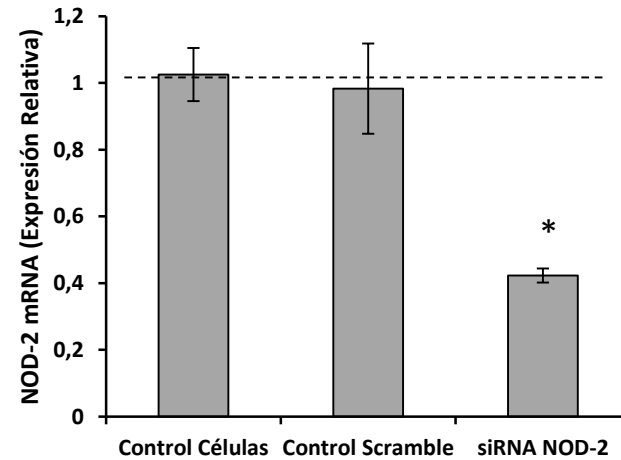
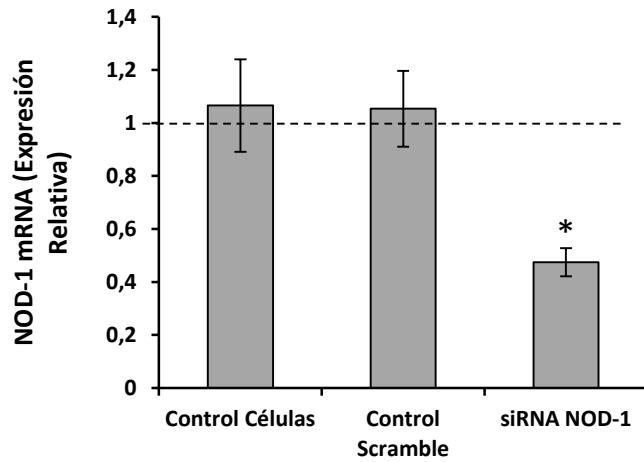
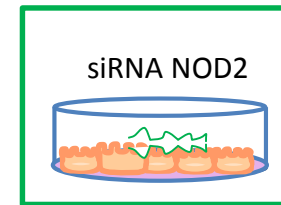
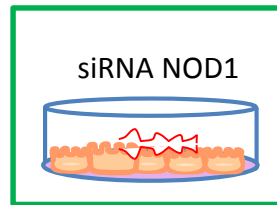
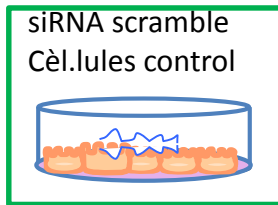


Vies de Senyalització a través de receptors intracel·lulars NOD1 i NOD2

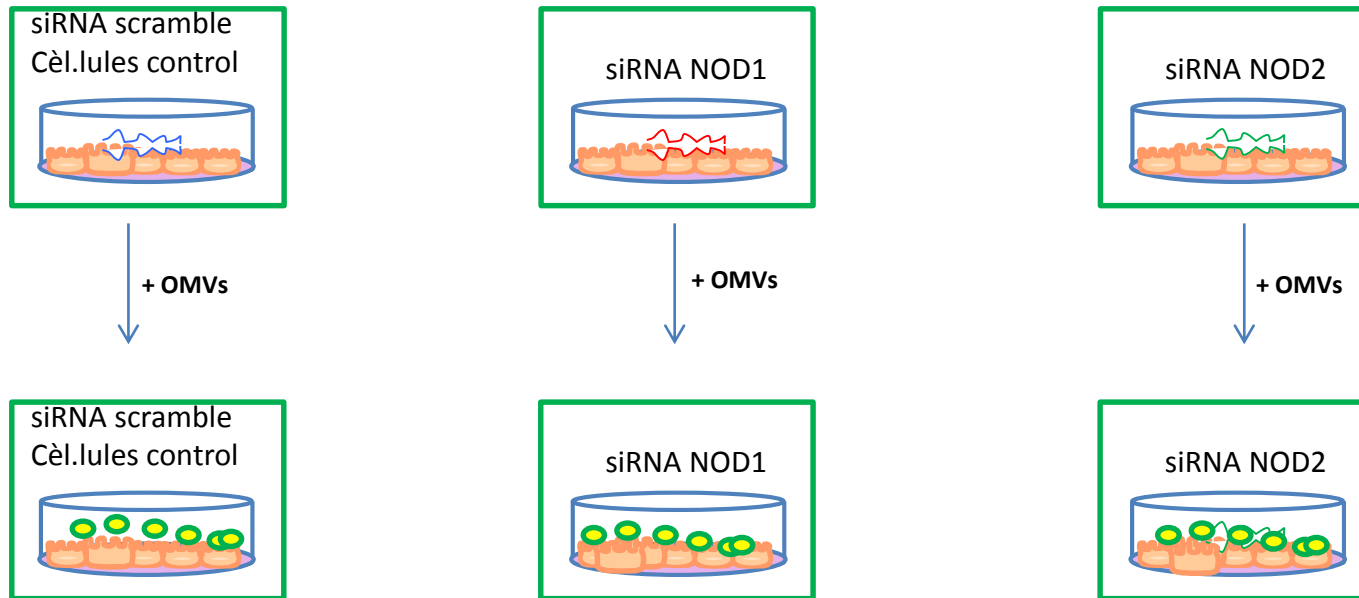



IL-6
IL-8

Obtenció i caracterització de T-84 Konckdown en NOD1 o NOD2

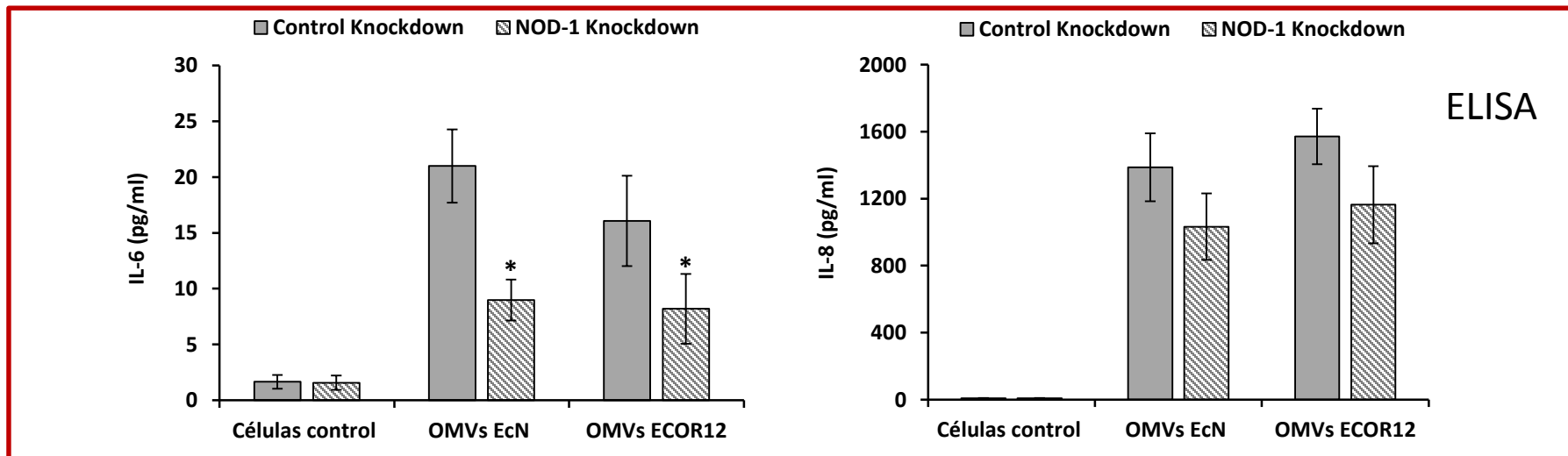
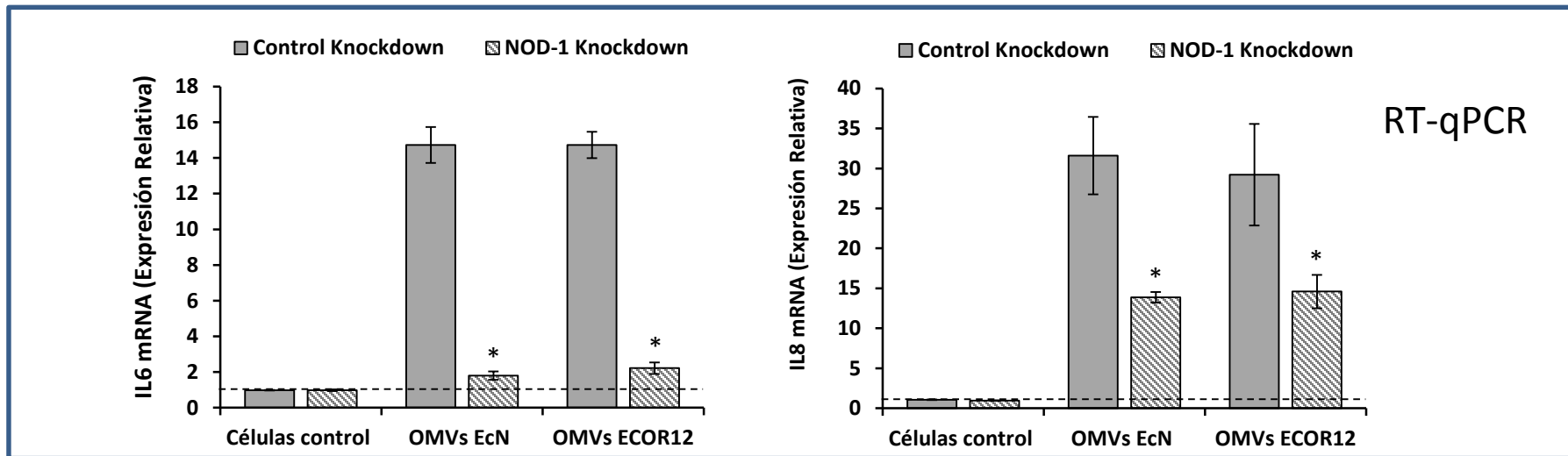


Obtenció i caracterització de T-84 Konckdown en NOD1 o NOD2



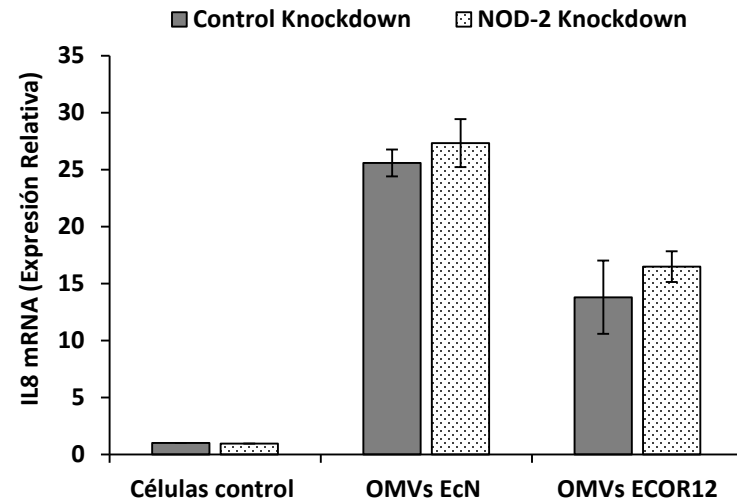
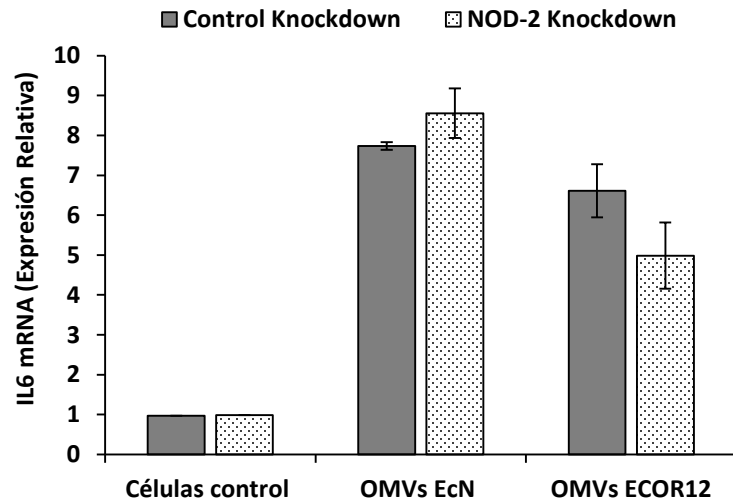
- 1)  Cèl.lules: Anàlisi de l'expressió del mRNA de IL6 i IL8 per RT-qPCR
- 2) **Sobrenedant:** determinació per ELISA de les proteïnes de IL-6 i IL-8

Participació de NOD1 en la senyalització per OMVs

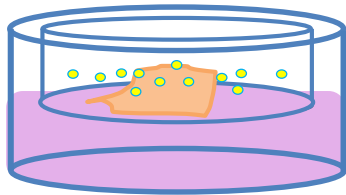


La senyalització en cèl.lules T-84 per OMVs d'EcN i EcoR63 no depèn de NOD2

RT-qPCR



Factors que incrementen la funció de barrera de la mucosa intestinal



RT-qPCR

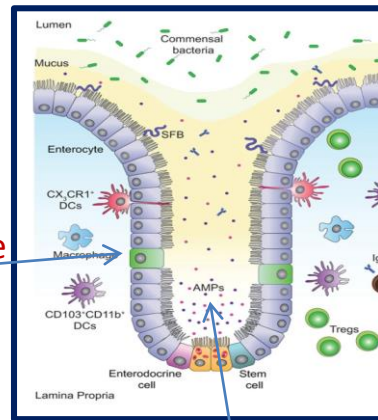
MODEL *EX VIVO*:
TEIXIT COLÒNIC HUMÀ

Producció de mucus

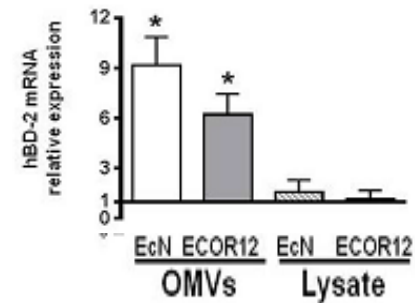
Secreció de pèptids antimicrobians

Muc2

Globet Cells
productores de
Mucina



β -defensina 2



β -defensina 2 ↑

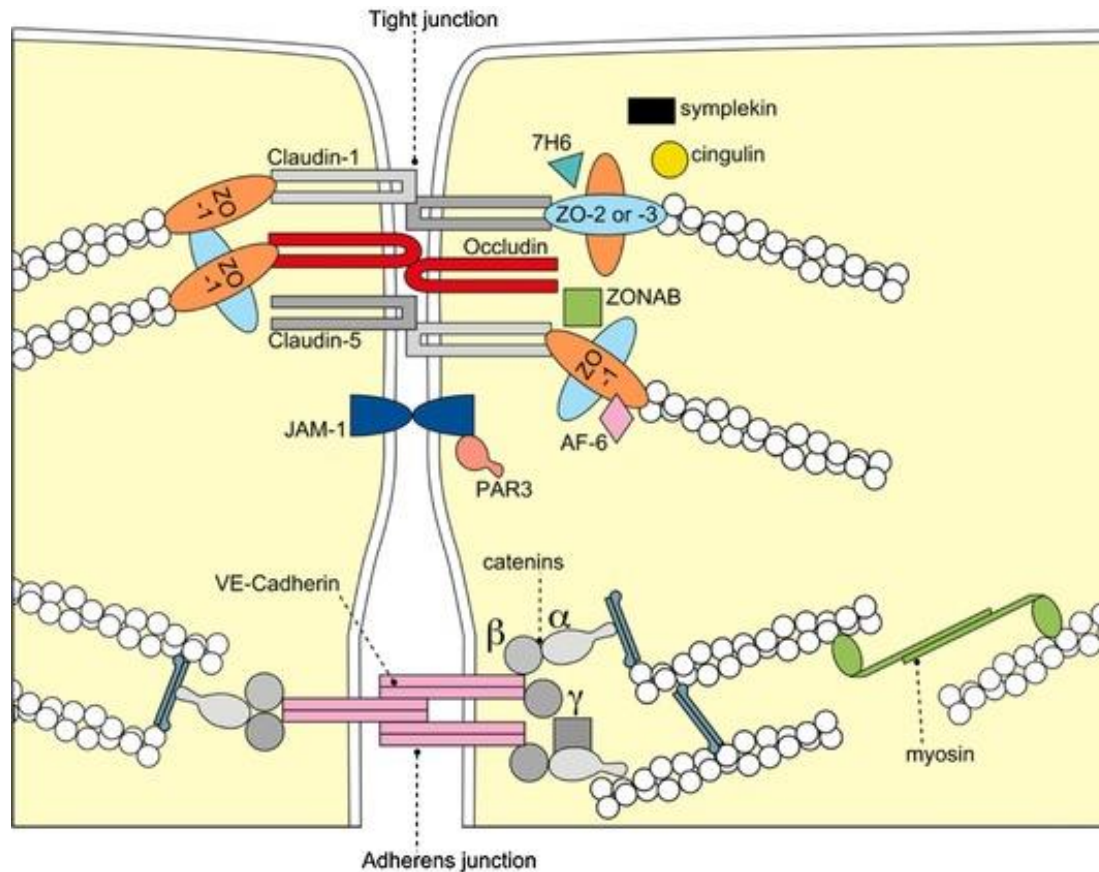
Muniz et al. *Frontiers in Immunology*, 3, 310. (2012).

Fabrega et al. (2016). *Front Microbiol.* 11;7:705.

Funció de Barrera

- ✓ La formació de *tight junctions*
- ✓ Modulació del sistema immunitari

Tight Junctions



Funció *tight junctions*:

- eviten la difusió de substàncies tòxiques o la invasió per microorganismes.
- controlen el moviment de fluids i soluts a través de l'espai paracel·lular.

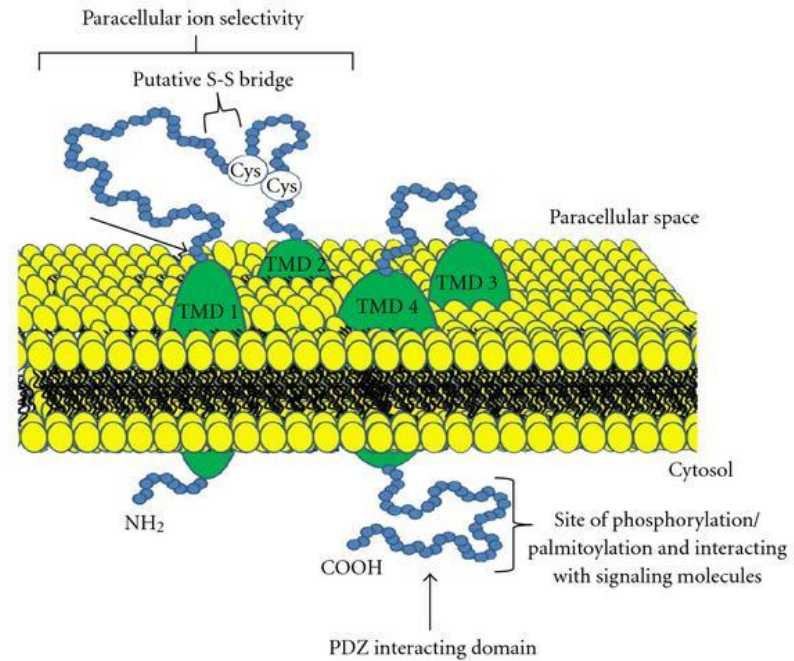
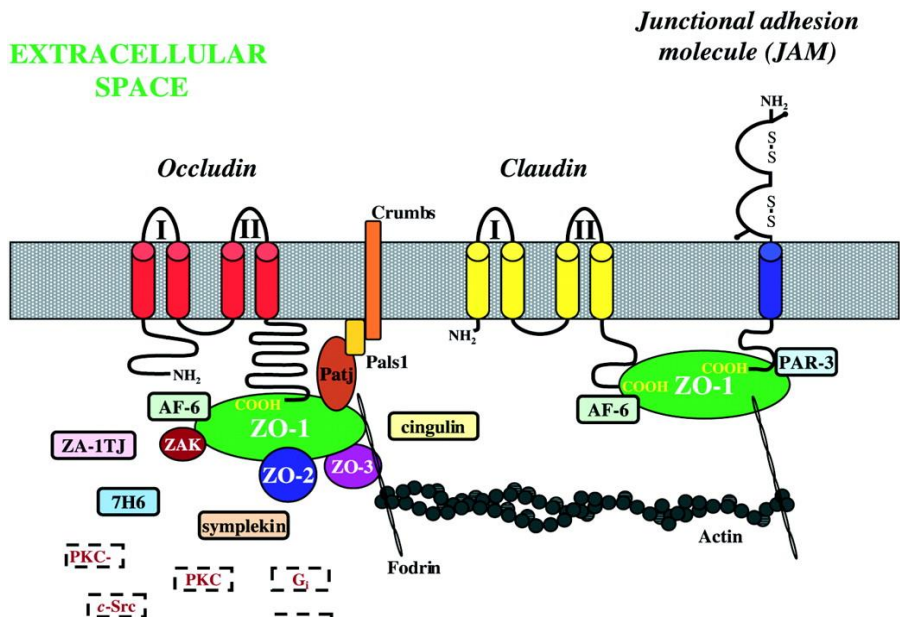
Tight Junctions

Claudines: 27 components

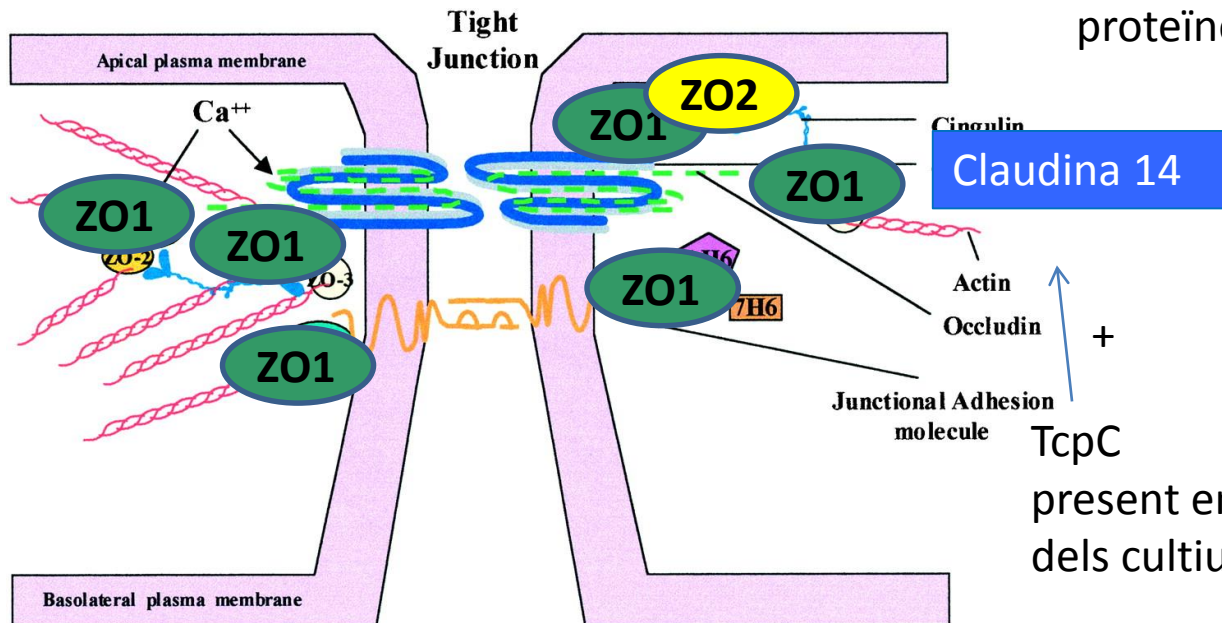
Cohesió: Claudina 1,3, 4,5, 18

Permeabilitat paracel.lular: Claudina 2,10,14, 15

Senyalització per controlar l' homeòstasi



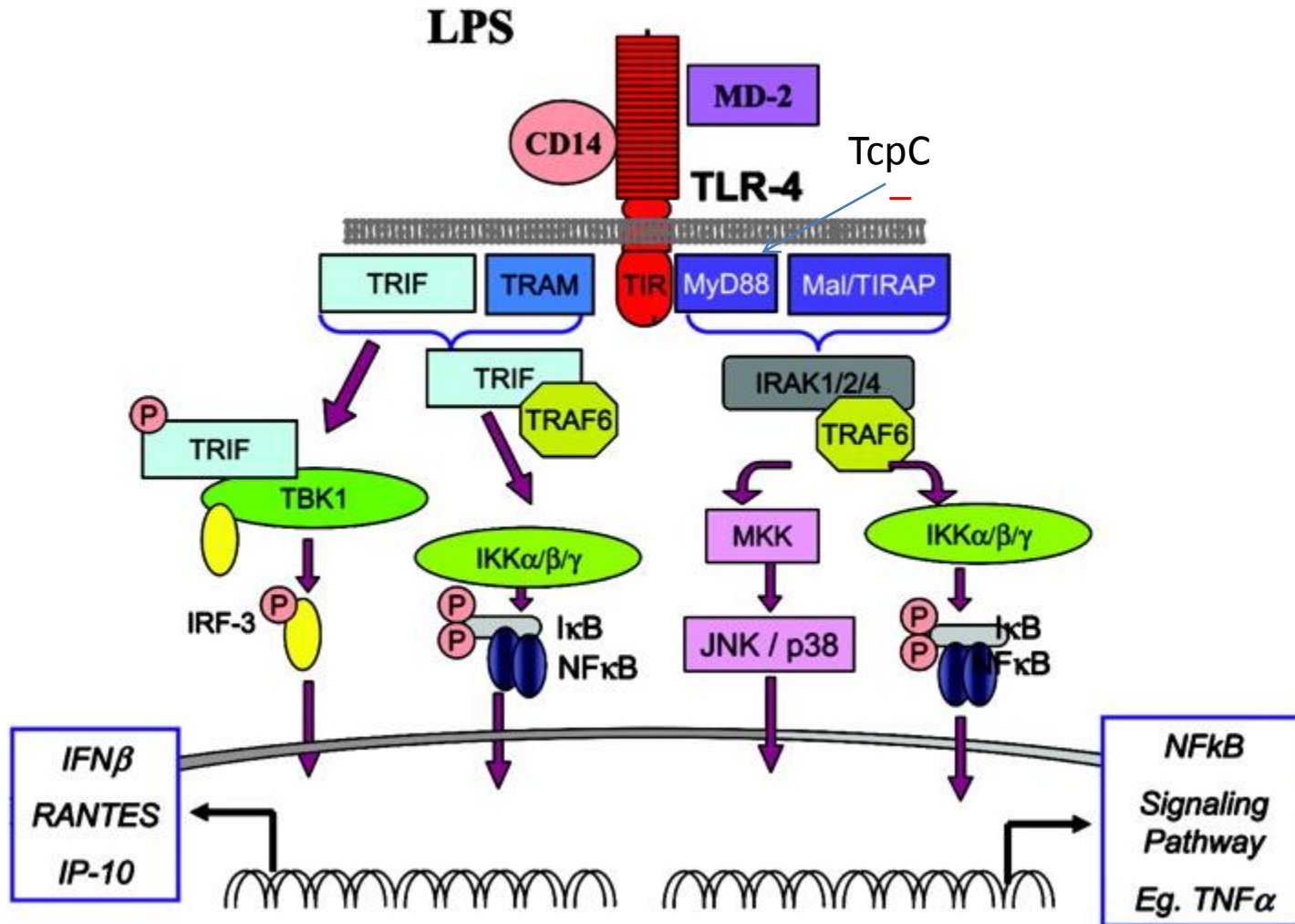
Tight Junctions



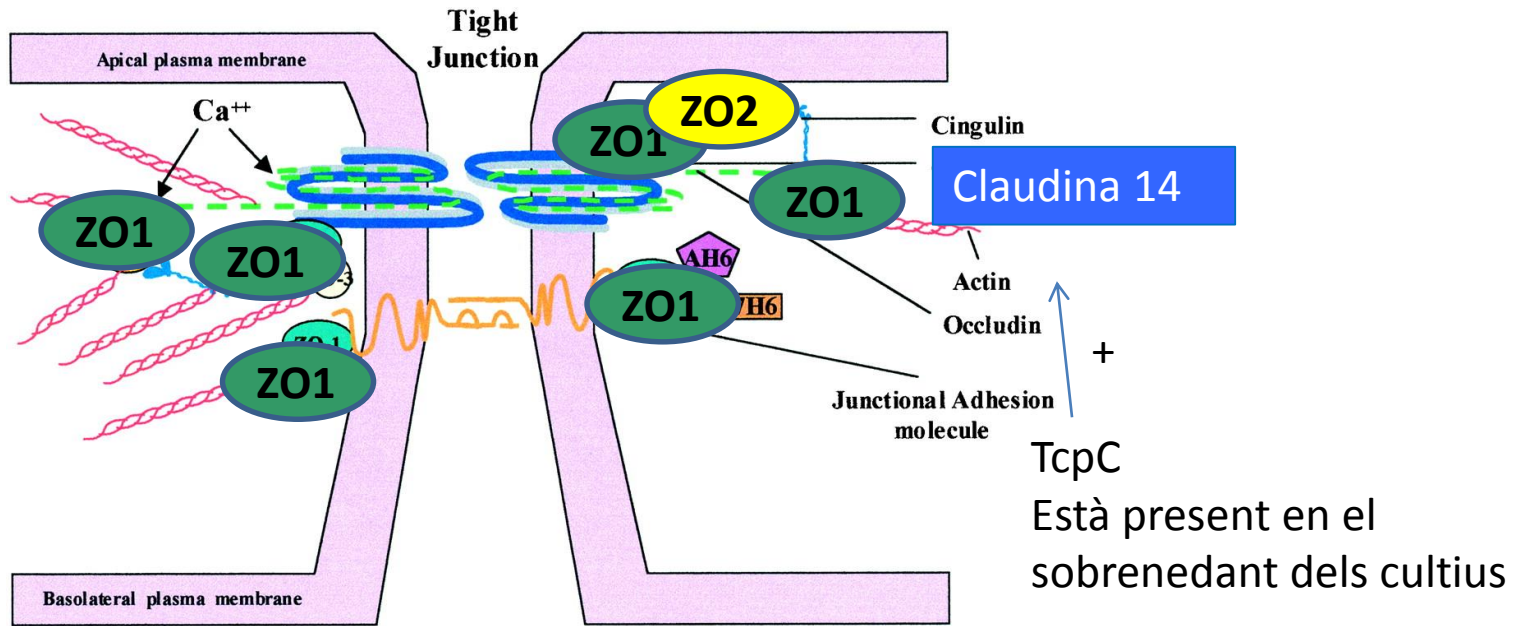
EcN regula la barrera intestinal incrementant l'expressió de proteïnes de *tight junctions*

TcpC present en el sobrenedant dels cultius

Tight Junctions



Tight Junctions

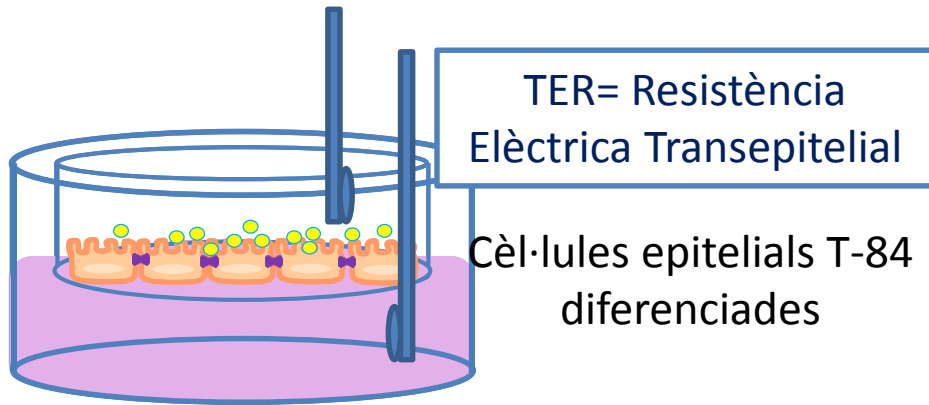


Es regulen ZO1, ZO2 i Claudina 14 per factors secretats?

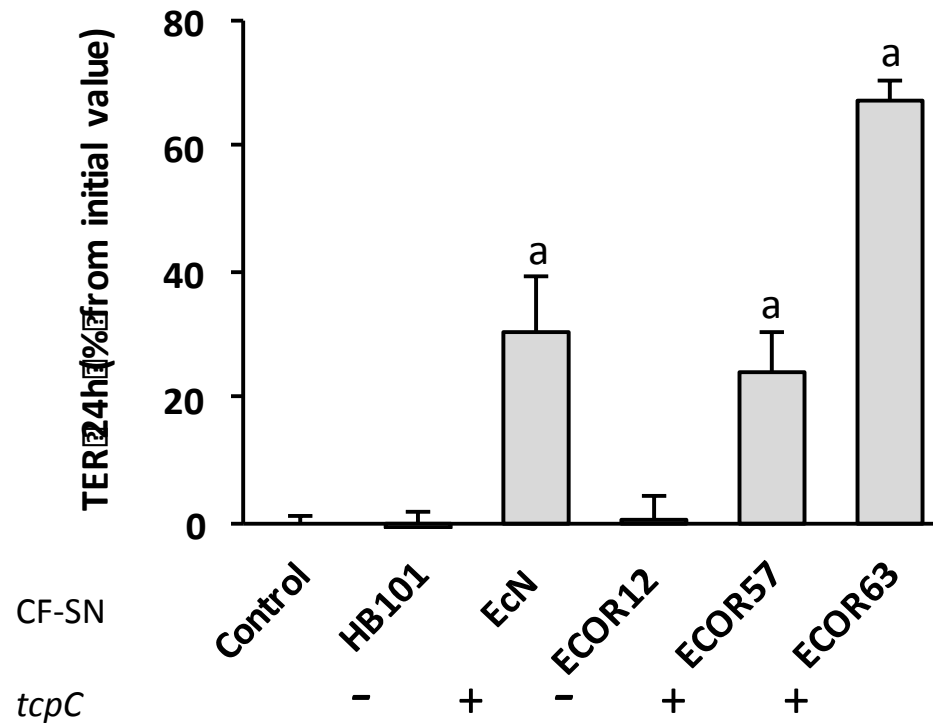
Participa TcpC en aquesta regulació?

Hi ha altres claudines regulades?

Funció de TcpC sobre la barrera epitelial



Sobrenedants de soques *tcpC*⁺ i *tcpC*⁻



Funció de factors secretats sobre la barrera epitelial en cèl·lules T-84

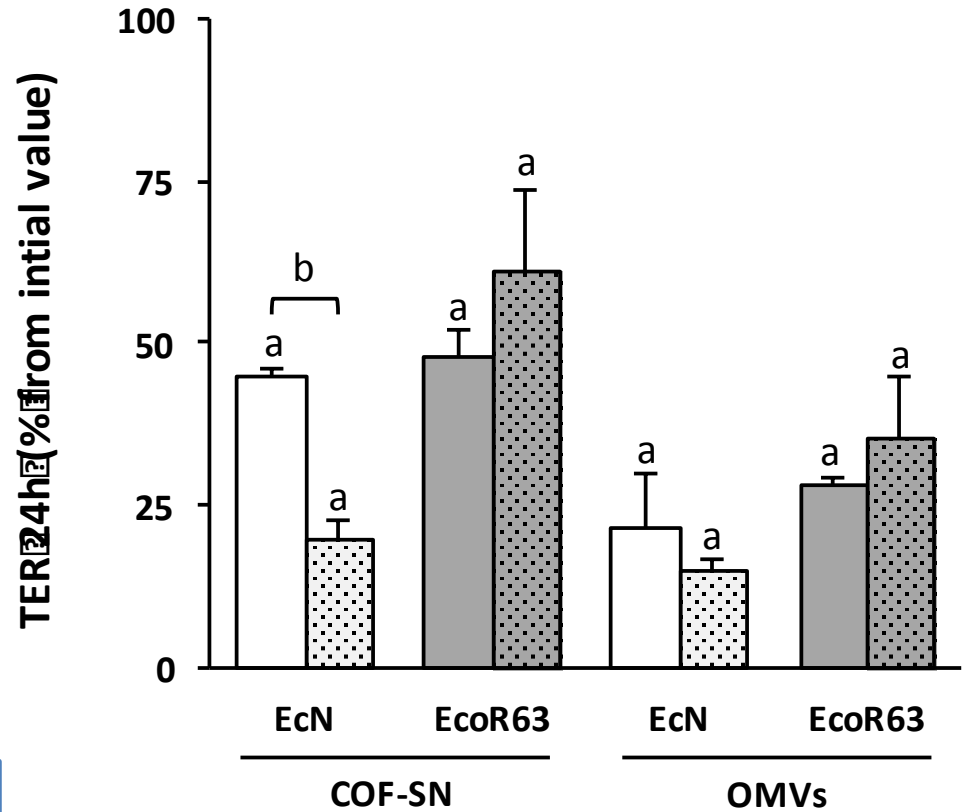
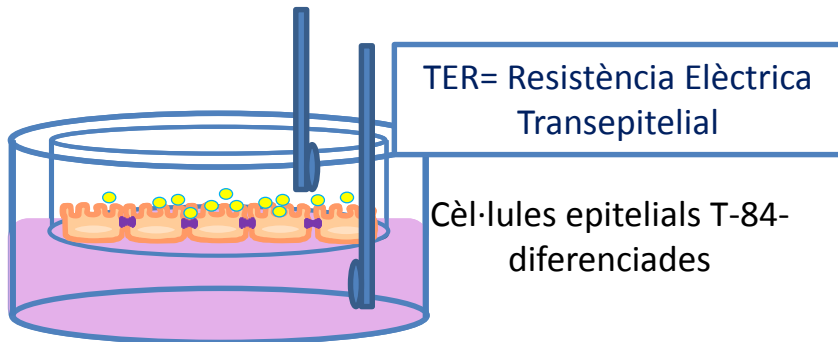
EcN -----> EcN *tcpC*

EcoR63 ---> EcoR63 *tcpC*

Cultius en DMEM



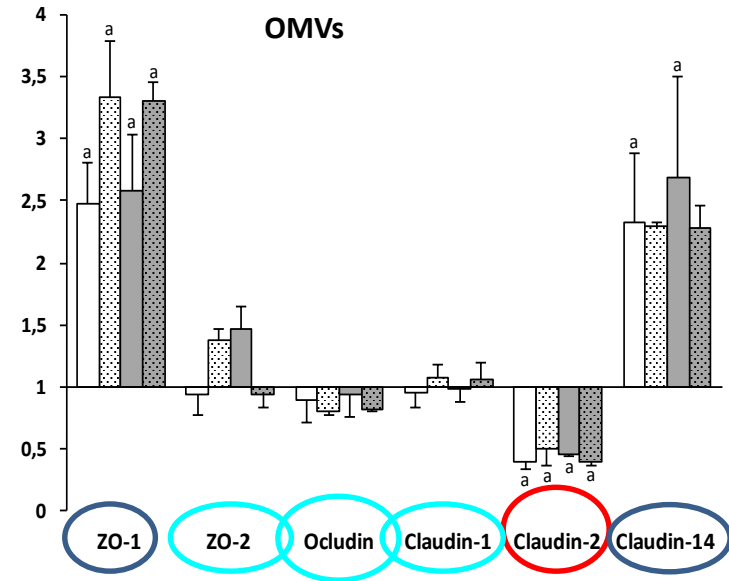
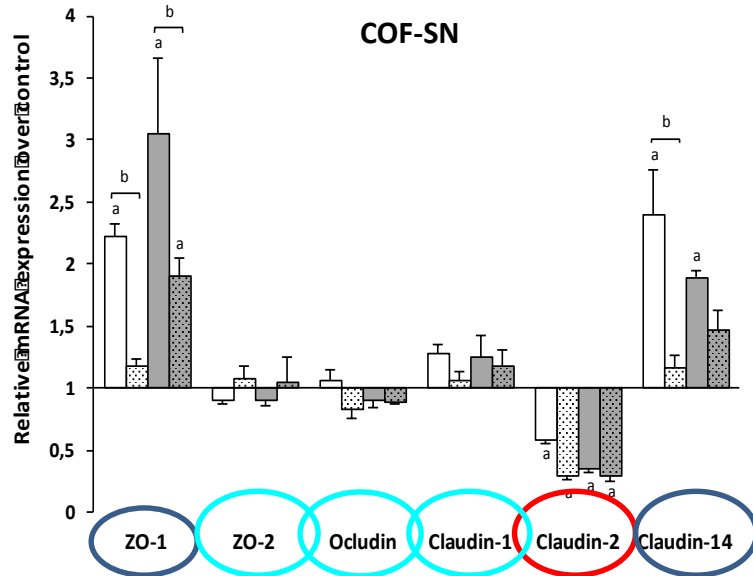
COF-SN OMVs



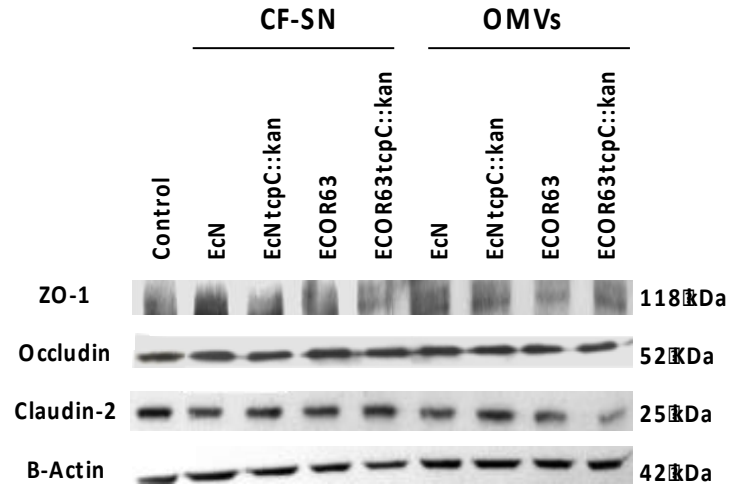
Anàlisi transcripcional de gens que codifiquen proteïnes de les *Tight Junctions*

RT-PCR

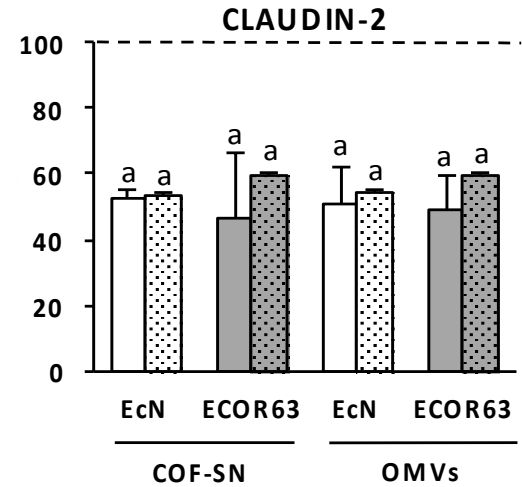
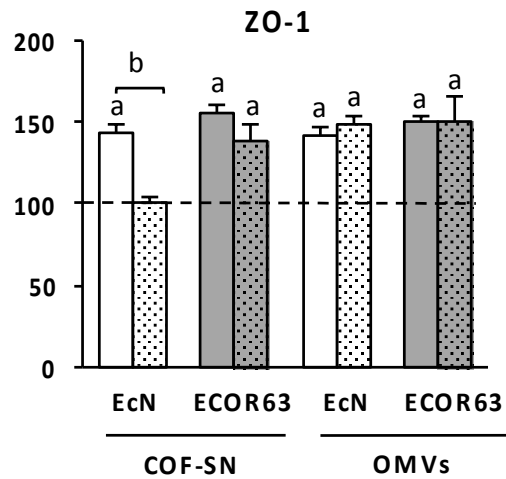
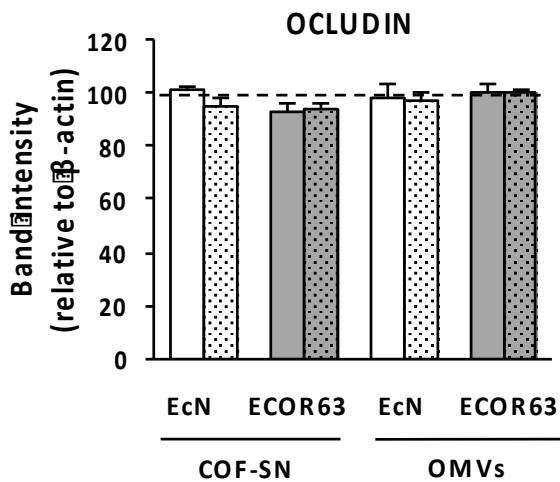
(A) T-84 cells



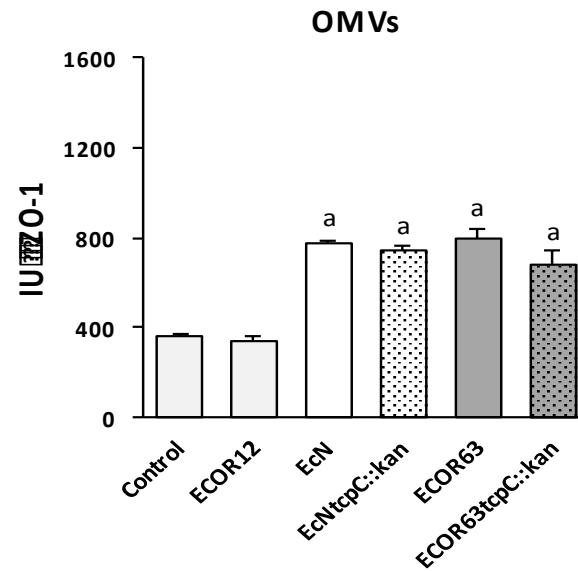
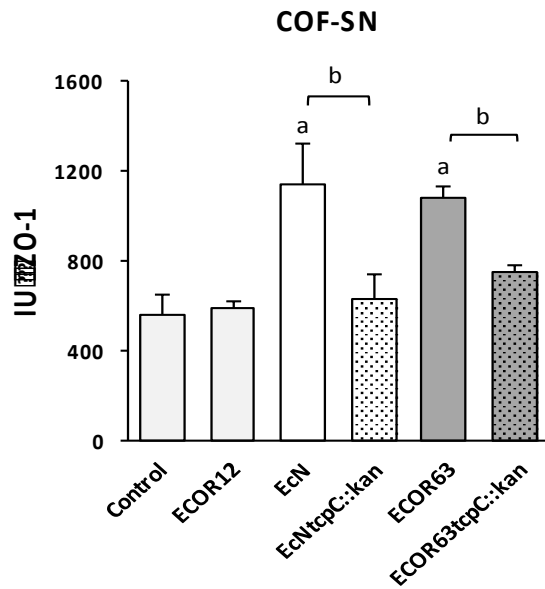
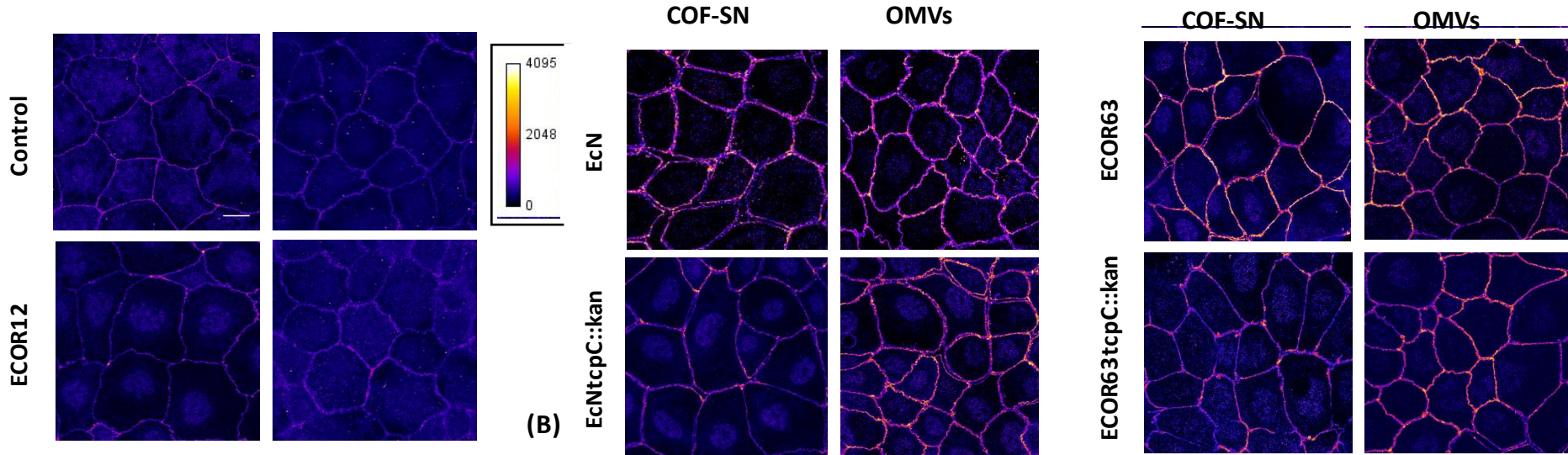
Anàlisi de l'expressió de proteïnes de les *Tight Junctions* en cèl·lules T-84



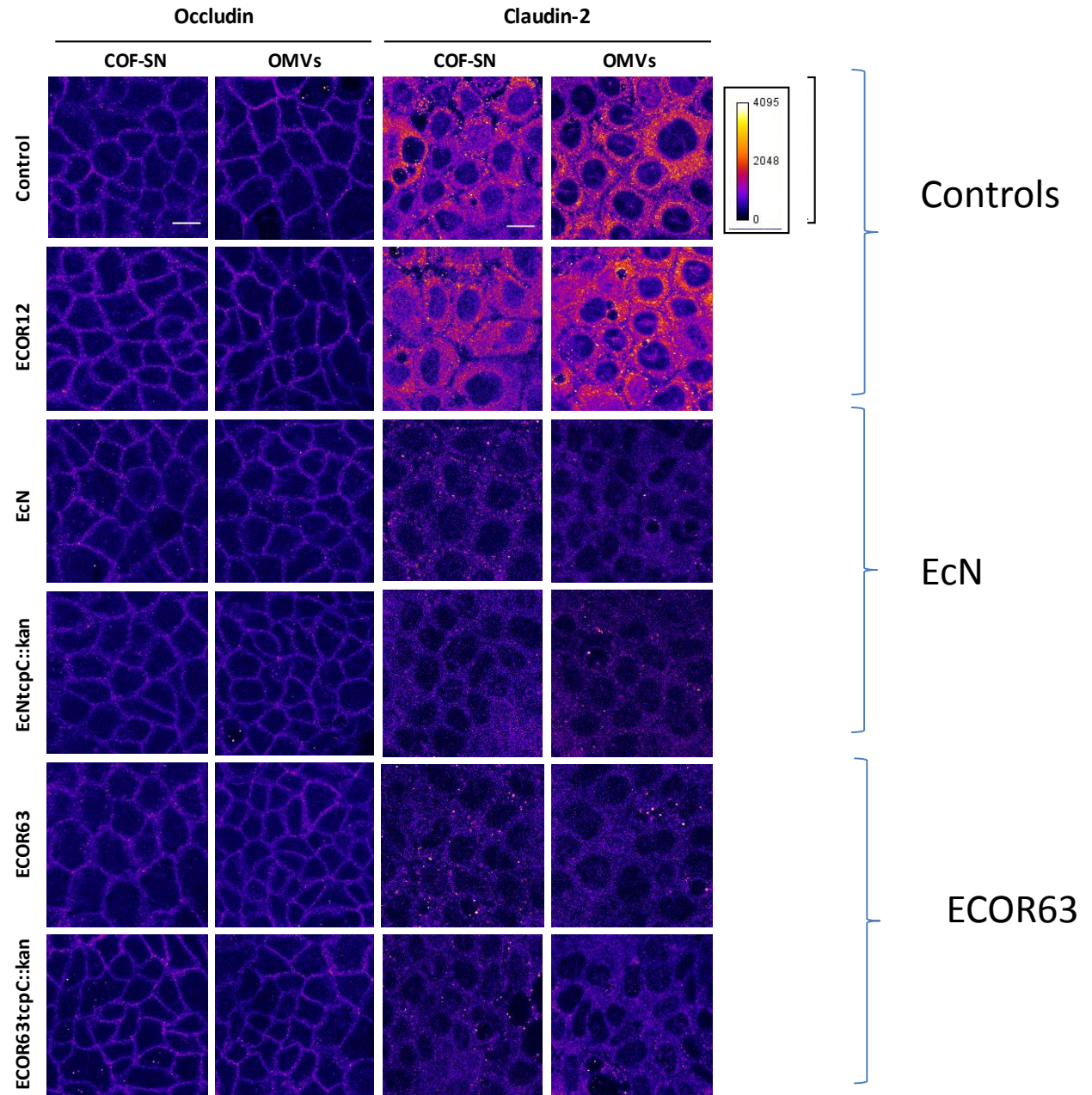
Western-Blot



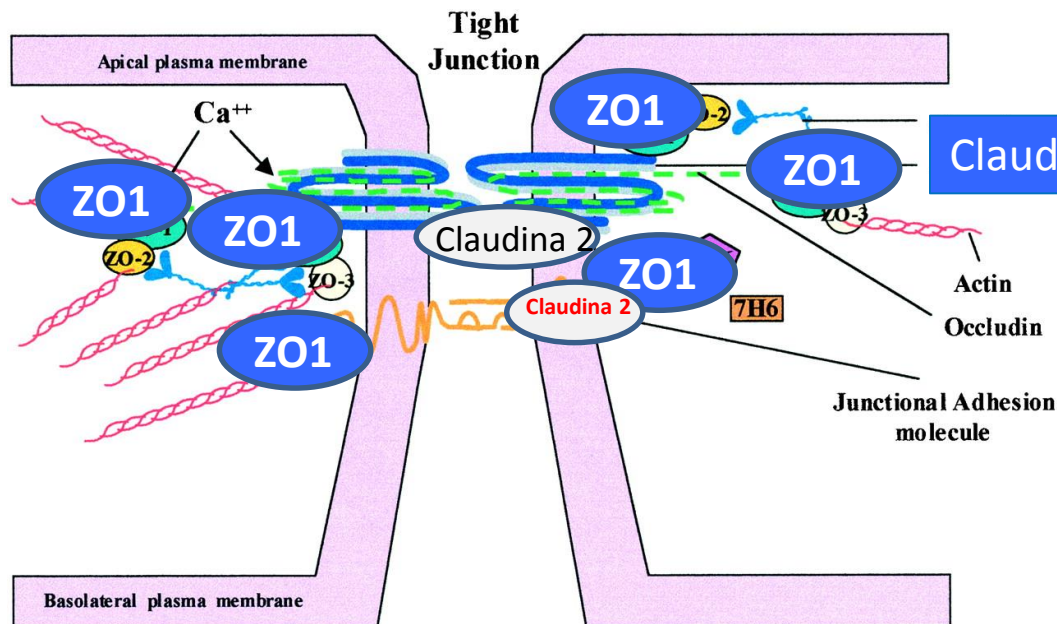
Anàlisi per microscopia de fluorescència de ZO1



Anàlisi per microscòpia confocal de fluorescència d'Ocludina i de Claudina-2



Efectes de les OMVs i COF-SN sobre proteïnes de les *tight junctions*



COF-SN

↓ TcpC dependent

ZO1 ↑¹
Claudina 14 ↑

Claudina 2 ↓

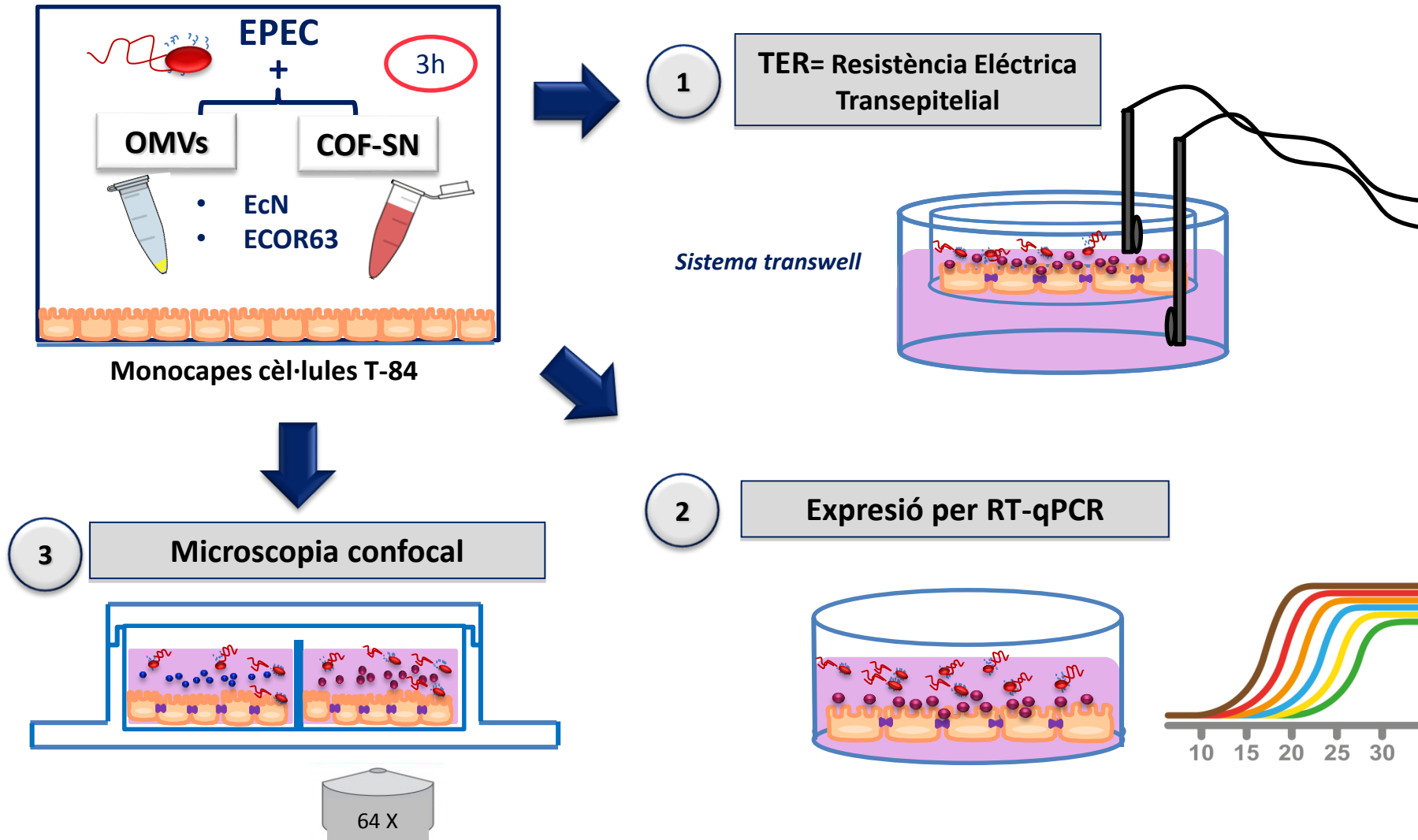
Occludin =
Claudina 1 =
ZO2 =

↑ TcpC independent

OMVs

Si els factors secretats COF-SN i OMVs protegeixen dels efectes nocius d'EPEC?

Disseny experimental



1

EPEC disminueix un 50%TER

La presència d'OMVs i COF-SN eviten la seva disminució

2

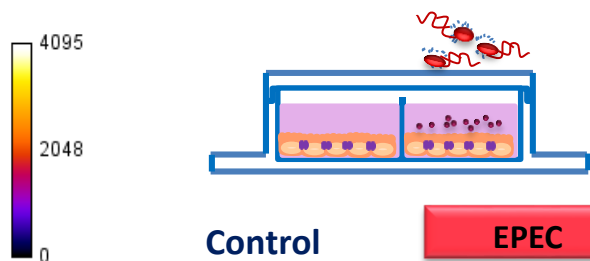
EPEC disminueix l'expressió a nivell de transcripció de ZO1, ZO2, ocludina i Claudina 14

La presència d'OMVs i COF-SN eviten la disminució produïda per EPEC de la expressió a nivell de mRNA de :

- Ocludina
- Claudina-14

Anàlisi per microscòpia confocal de fluorescència d'Ocludina, ZO-1

3 Microscopia confocal



EPEC



Control

EPEC

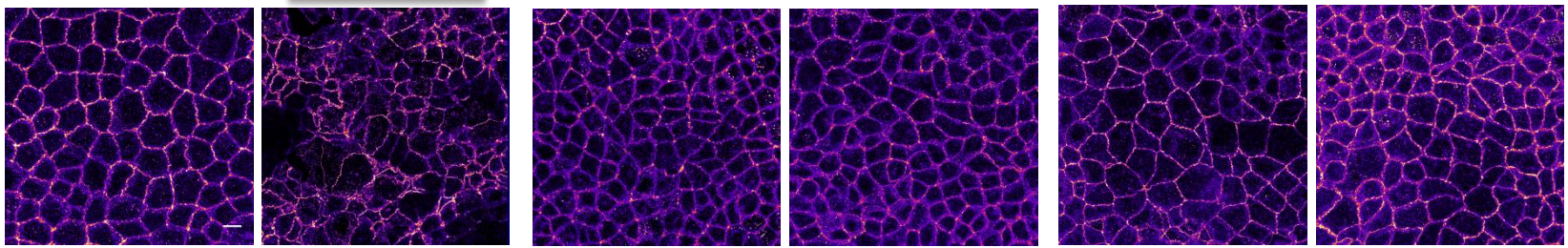
EcN

ECOR63

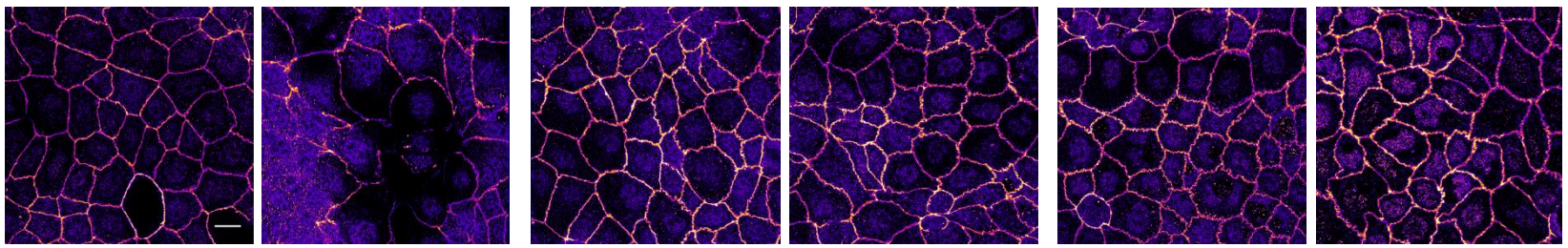
EcN

ECOR63

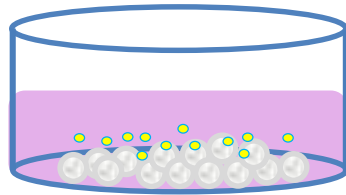
Ocludina



ZO-1

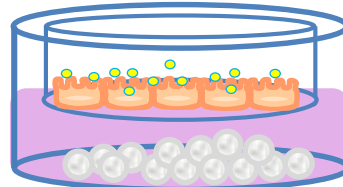


Modulació sobre el sistema immunitari

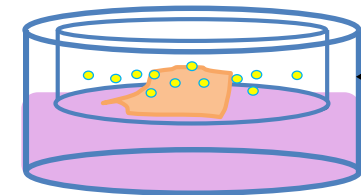


**MODEL DE BARRERA
INTESTINAL DANYADA**

Monocapa
Caco-2
← PBMCs
(sist. Immunitari)



**MODEL DE BARRERA
INTESTINAL**

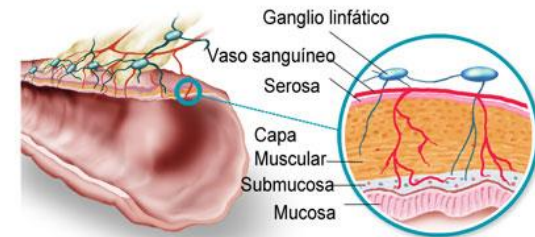
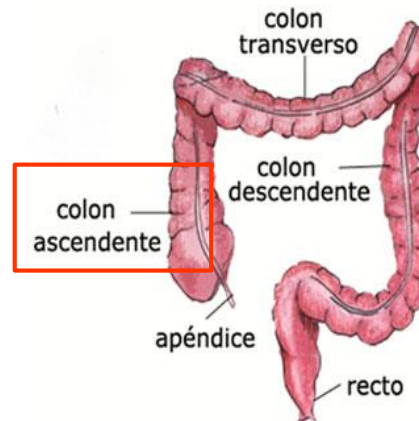


Teixit
colònic

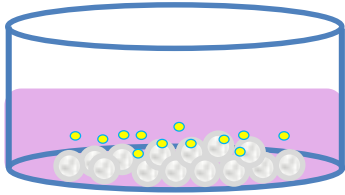
**MODEL *EX VIVO*:
TEIXIT COLÒNIC HUMÀ**



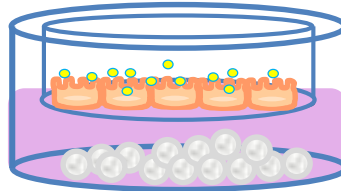
**MODEL EXPERIMENTAL DE
COLITIS INDUÏDA PER DSS EN
RATOLÍ**



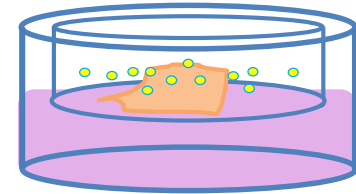
Resposta immunitària



**MODEL DE BARRERA
INTESTINAL DANYADA**



**MODEL DE BARRERA
INTESTINAL**



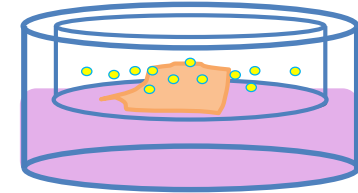
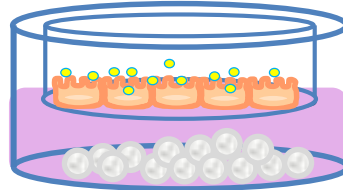
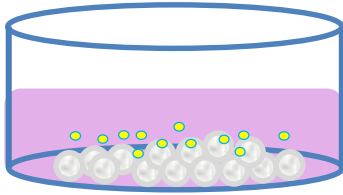
**MODEL *EX VIVO*:
TEIXIT COLÒNIC HUMÀ**



MESURA DE CITOCINES ALLIBERADES AL MEDI

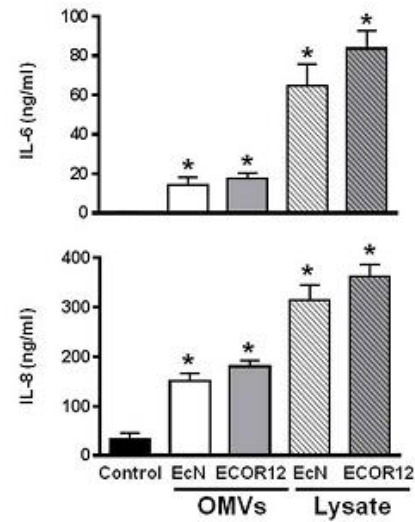
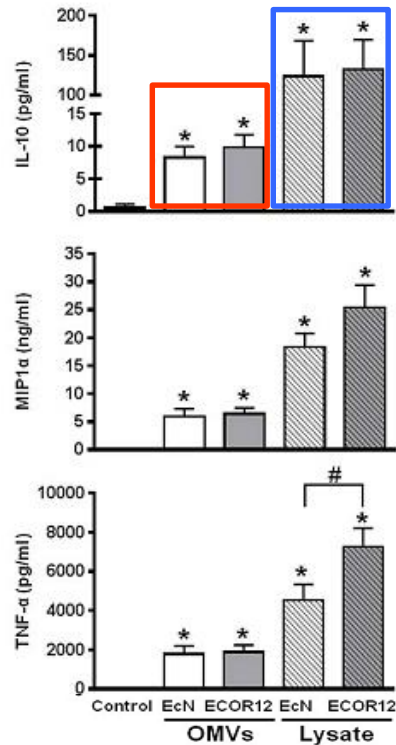
QUANTIFICACIÓ D'RNAm PER RT-qPCR

Resposta immunitària

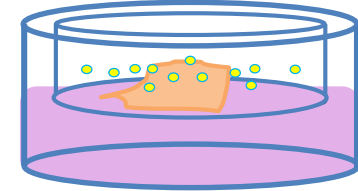
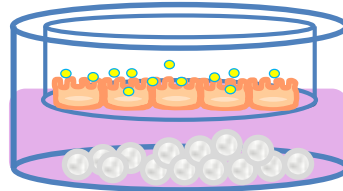
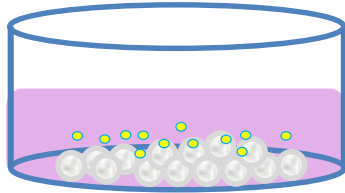


MODEL DE BARRERA DANYADA

CITOCINES SECRETADES

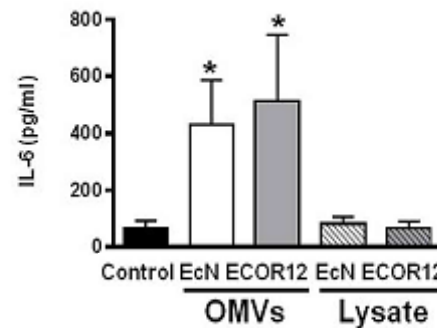
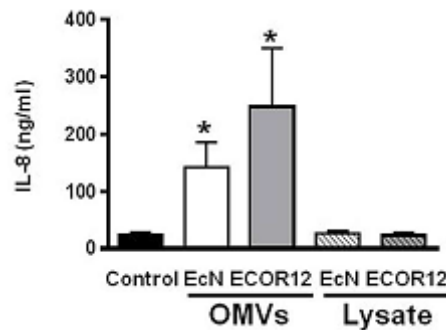
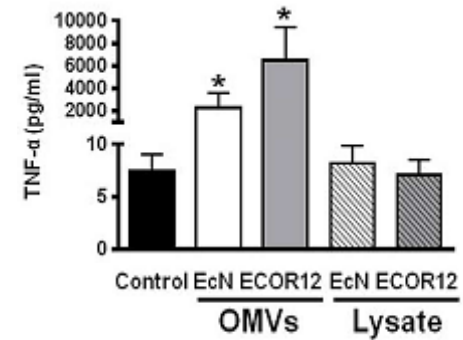
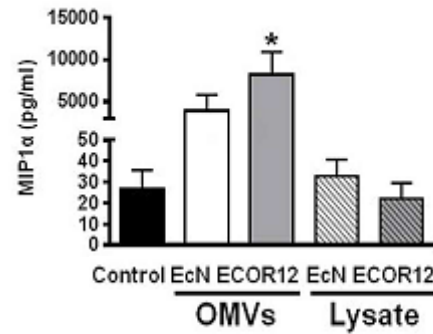
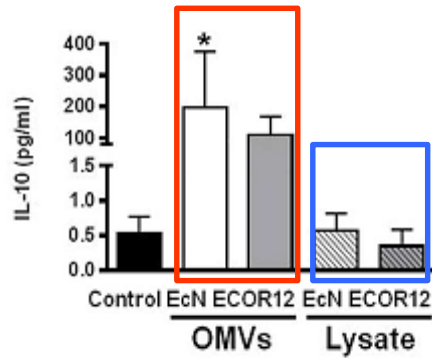


Resposta immunitària

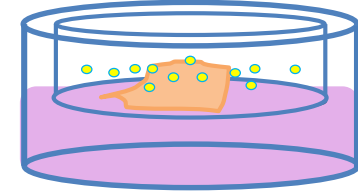
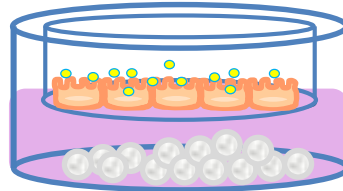
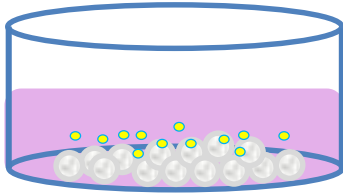


MODEL DE BARRERA INTestinal

CITOCINES SECRETADES



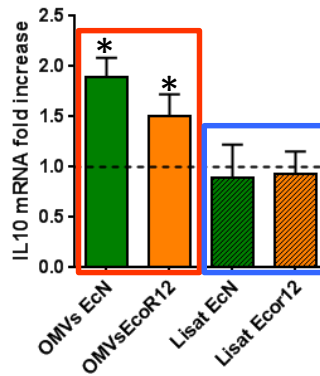
Resposta immunitària



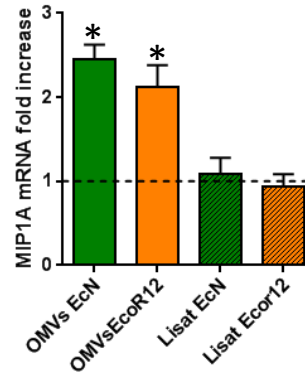
MODEL *EX VIVO*: TEIXIT COLÒNIC HUMÀ

EXPRESSIÓ PER RT-qPCR

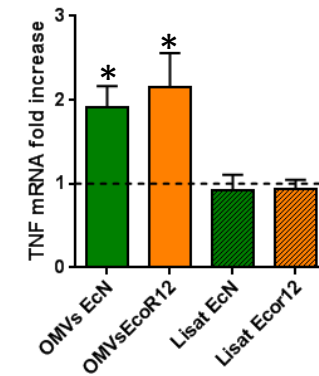
IL10



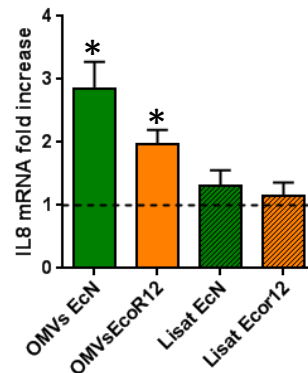
MIP1a



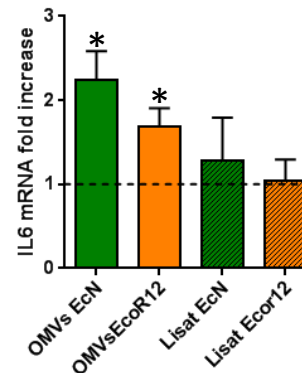
TNF



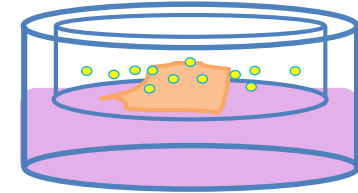
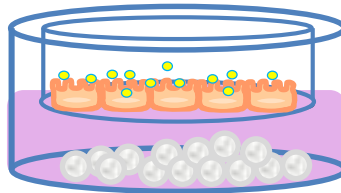
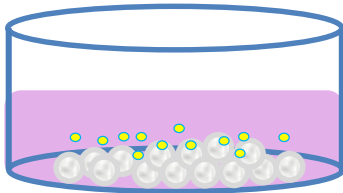
IL8



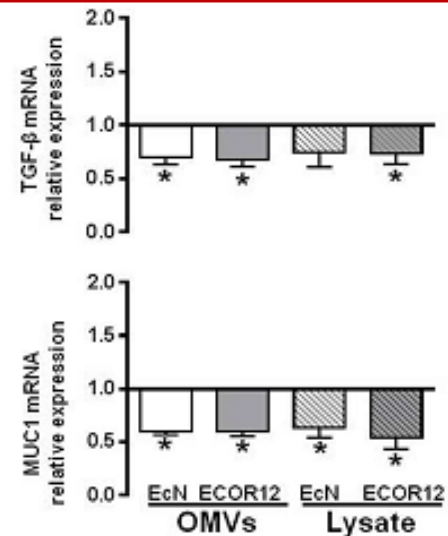
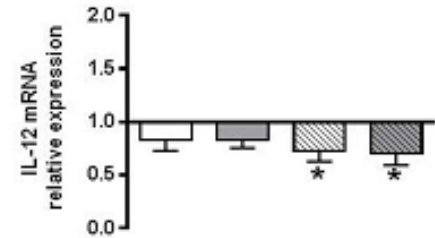
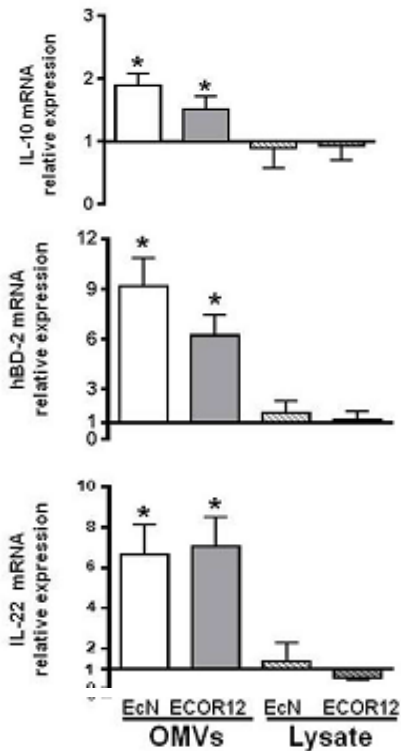
IL6



Resposta immunitària. Anàlisi de l'expressió gènica



MODEL *EX VIVO*: TEIXIT COLÒNIC HUMÀ



Incrementen en determinats càncers

Efecte protector d'OMVs en la colitis experimental induïda per sulfat de dextrà



Control

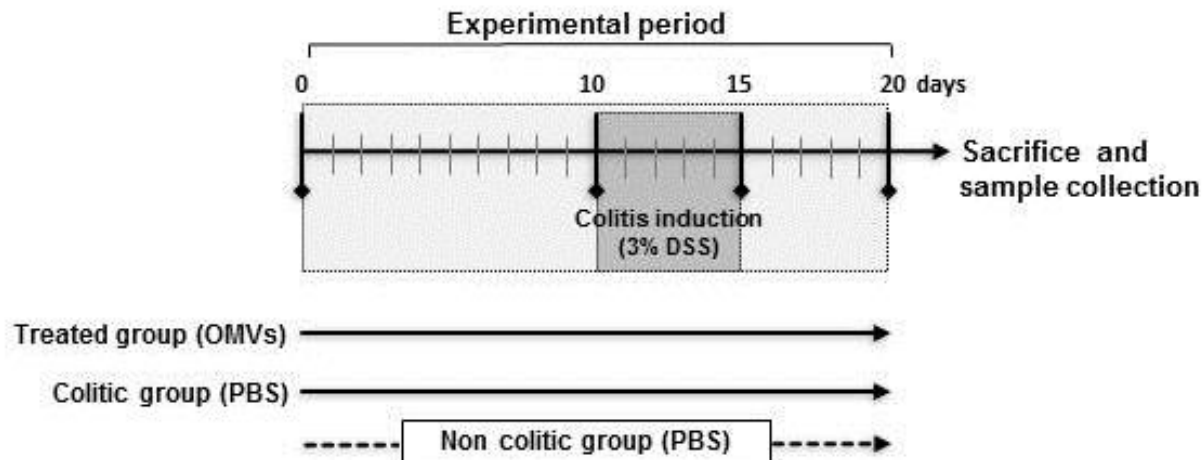


DSS

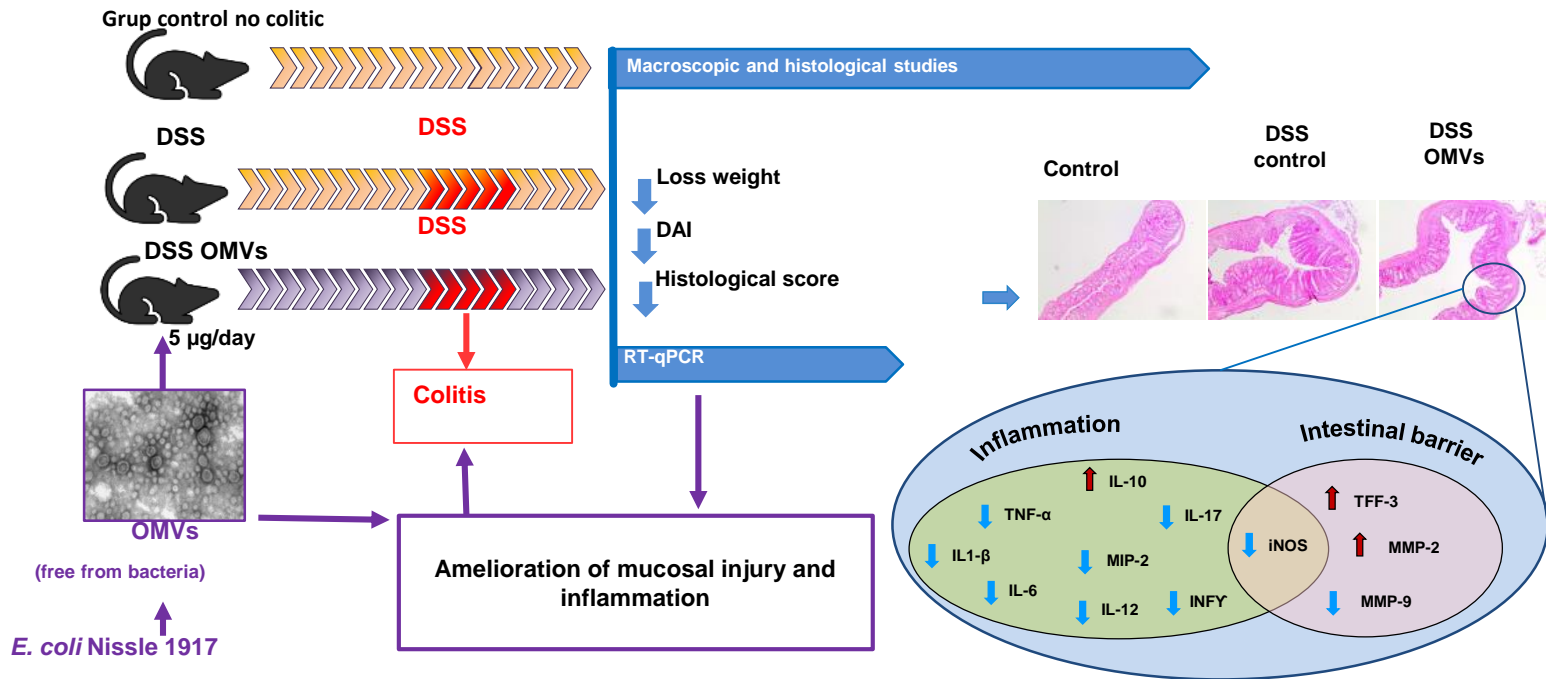


+ OMVs/ + DSS

5 μ g OMVs durant 20 dies



Efecte protector d'OMVs en la colitis experimental induïda per sulfat de dextrà



DAI score: animal body weight, presence of gross blood in the faeces, stool consistence.

Histological score: Ulceration, infiltration, edema and the condition of crypts



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



masterfarm
masterdiet
farmadiet
otc master

