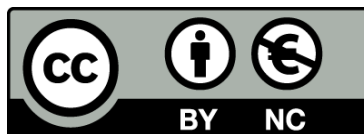




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

**Modulación de la barrera epitelial intestinal por  
vesículas de membrana y factores solubles secretados  
por cepas probióticas y comensales de *Escherichia coli***

Carina Shianya Alvarez Villagomez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

**Dra. Laura Baldomà Llavines y Dra. Josefa Badía Palacín**

**MODULACIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL INTESTINAL POR VESÍCULAS DE  
MEMBRANA Y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR CEPAS  
PROBIÓTICAS Y COMENSALES DE *Escherichia coli*.**

**CARINA SHIANYA ALVAREZ VILLAGOMEZ**

**2017**





**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA**

**MODULACIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL INTESTINAL POR VESÍCULAS DE  
MEMBRANA Y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR CEPAS  
PROBIÓTICAS Y COMENSALES DE *Escherichia coli*.**

**Memoria presentada por CARINA SHIANYA ALVAREZ VILLAGOMEZ para optar al  
título de Doctor por la Universidad de Barcelona.**

**Dra. Laura Baldomà Llavines**

**Dra. Josefa Badía Palacín**

**Carina Shianya Alvarez Villagomez  
2017**



*A mi esposo, por todo y por tanto  
y a mis Padres, por su apoyo incondicional.*

*“No hay viaje en esta tierra que no  
pueda realizar una persona si pone todo  
su empeño en ello.”*

**H. Rider Haggard**



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Barcelona por su aceptación en el programa de Doctorado en Biotecnología.

A mis directoras de tesis: La Dra. Laura Baldomà y la Dra. Pepita Badía por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por toda su enseñanza, por compartir su extraordinaria experiencia científica, por la dedicación y confianza que me brindaron a lo largo de mi trabajo. *Laura, gràcies perquè has estat per mi un gran exemple de dedicació i d'amor per la ciència. Pepita, moltes gràcies perquè sempre m'has impulsat a donar el millor de mi.*

A la Dra. Rosa Giménez, porque además de su tutoría ha sido una gran compañera de trabajo y un apoyo invaluable en todos los sentidos. *Rosa, gràcies per escoltar, per la teva empatia, per la teva calor humana i per la teva amistat, sempre et portaré en el meu cor.*

A los técnicos de laboratorio Andrés Camps y Kim Duran, así como a Ma. José, Maite y Ma. Brugues, secretarias del departamento de Bioquímica y Fisiología, por su amable labor por ayudar y facilitar la realización del trabajo experimental y administrativo.

A Laura A. y Lorena por su asesoría en los protocolos y técnicas de laboratorio. A Ma. José y Ma. Alexandra, por su ayuda en el laboratorio y por el trabajo en equipo. A Luisa Miro, por su ayuda y asesoría en el manejo de cultivos celulares. A Manel Bosch, por su ayuda en el manejo de la microscopía confocal y en el análisis de imágenes. Y a mis compañeros de departamento con quienes compartí conocimientos, experiencias, material y también gratos momentos de convivencia.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) y a la Secretaría de Educación Pública (SEP), México, por la asignación de la beca PISA (Programa Institucional de Superación Académica) y la beca PRODEP (Programa para el Desarrollo Profesional Docente).

Al Dr. José Manuel Piña Gutiérrez, rector de la UJAT, y a la Mtra. Rosa Martha Padrón López, directora de la División de Ciencias Biológicas (DACBIOL-UJAT), porque en su compromiso por mejorar la calidad y competitividad de sus profesores, me beneficiaron con su aprobación y apoyo para la realización de mis estudios de doctorado.

Un cariñoso agradecimiento a mis padres y hermanos, por su amor y apoyo constante en todos los objetivos que me he planteado en la vida. En especial a mi padre José Antonio Alvarez, por creer en mi e impulsarme siempre a seguir adelante y alcanzar mis sueños.

Un afectuoso agradecimiento al Sr. Jorge Arturo y la Sra. Ma. Antonia, porque tanto a Sergio como a mí, nos impulsaron a alcanzar esta meta y nos han apoyado en todo momento.

De manera especial quiero agradecer a mi esposo Sergio, por ser mi compañero en este proyecto, porque gracias a su amor, motivación, paciencia, ayuda y apoyo incondicional ha sido posible. *Gracias amor, por la entrega que me demuestras cada día para hacerme feliz.*









## PRESENTACIÓN

El epitelio gastrointestinal es la superficie más extensa del cuerpo humano y es el hábitat de aproximadamente  $10^{14}$  bacterias comensales, que en su conjunto constituyen la microbiota intestinal. Este elevado número de bacterias, que supera diez veces el número de células que componen el cuerpo humano, representa un desafío permanente para la integridad de la superficie epitelial. En estas condiciones, la conservación de la integridad del epitelio que impida la translocación de microorganismos comensales y patógenos al tejido subyacente es fundamental para mantener la homeostasis intestinal. La disfunción de la barrera intestinal permite la entrada de antígenos que pueden desencadenar respuestas inmunes indeseables desarrollando una variedad de enfermedades inflamatorias o metabólicas. Para mantener la función de barrera, el epitelio dispone de diversos mecanismos que incluyen la producción de una capa de mucina que cubre su superficie previniendo el contacto directo del epitelio con las bacterias comensales, la secreción de péptidos antimicrobianos que limitan la colonización bacteriana y la formación de complejos de proteínas denominadas *Tight junctions* (TJ), que participan en la unión estrecha entre las células epiteliales y forman una barrera semipermeable.

El mantenimiento o mejora de la función de barrera intestinal es una propiedad beneficiosa que ejercen algunas bacterias comensales y probióticas. Estudios recientes han demostrado que ciertos probióticos reducen la permeabilidad intestinal través del fortalecimiento de las TJ y son capaces de restaurar la integridad de las TJ que han sido dañadas por patógenos.

Sin embargo, como no existe un contacto directo entre la microbiota y el epitelio intestinal es importante identificar los factores microbianos que son capaces de acceder al epitelio y modular su función. En este contexto, las proteínas secretadas, así como las vesículas de membrana externa (OMVs) liberadas por bacterias gram-negativas se vislumbran como mediadores en la señalización intestinal, modulando el correcto funcionamiento de la barrera epitelial.

Esta tesis se centra en la identificación de factores secretados por cepas de *Escherichia coli* comensales y probióticas con capacidad de modular la integridad de la barrera epitelial intestinal a nivel de expresión y estructura de TJ.

Para la realización de este estudio, se seleccionó la cepa probiótica *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Esta cepa es un buen colonizador del intestino humano. Se comercializa como un agente probiótico (con el nombre de Mutaflor®) con probada eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales en humanos.

EcN aporta un efecto protector frente a los reordenamientos de las proteínas de TJ de las células epiteliales del intestino inducidos por la infección con patógenos tales como EPEC o *Salmonella*. Además, EcN modula positivamente la barrera epitelial intestinal a través de la regulación positiva y redistribución de las TJ ZO-1, ZO-2 y claudina-14. No se conocen los factores de EcN que regulan ZO-1 y ZO-2, mientras que la regulación positiva de claudina-14 ha sido atribuida a la proteína secretada TcpC (Hering et al., 2014).

Debido a que en EcN el efecto positivo sobre la función de la barrera intestinal fue asociado a la proteína TcpC, se abordaron estudios encaminados a identificar otras cepas de *E. coli* comensales de origen intestinal humano, no citotóxicas, que porten en su genoma el gen *tcpC*. Este estudio permitió seleccionar la cepa ECOR63 que, al igual que el probiótico EcN, promueve un incremento de la resistencia transepitelial en monocapas de células de epitelio intestinal. El análisis de la expresión de la fusión del promotor de *tcpC* al gen reportero *gfp* evidenció que el gen *tcpC* se expresa por crecimiento en los medios de cultivo LB y DMEM, y también *in vivo* en el tracto intestinal de ratones.

Puesto que no hay información disponible sobre el mecanismo de secreción de TcpC (en forma libre o asociada a vesículas) nos planteamos llevar a cabo ensayos de inmunodetección de la proteína en las distintas fracciones secretadas. Desafortunadamente, ninguno de los cuatro anticuerpos diseñados contra péptidos inmunogénicos de TcpC resultó eficaz o específico para la detección de la proteína nativa. Por ello, para analizar a qué fracción extracelular se encuentra asociado el efecto de esta proteína se construyeron mutantes *tcpC* de las cepas EcN y ECOR63. A partir de cultivos celulares de las cepas EcN y ECOR63 de tipo salvaje y de sus respectivos mutantes *tcpC*, se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos y se fraccionaron en OMVs aisladas y en sobrenadantes libres de OMVs (COF-SN). El efecto de estas fracciones extracelulares sobre la barrera epitelial se evaluó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER), la expresión de varias proteínas de TJ y su localización subcelular en monocapas de células T-84 y Caco-2, como modelo *in vitro* de epitelio intestinal integro (barrera epitelial intacta).

Los resultados muestran que en EcN y ECOR63 la capacidad de refuerzo de la barrera epitelial está mediada tanto por las OMVs como por los COF-SN, los cuales contienen los factores secretados de manera soluble. En el caso de los COF-SN de EcN el efecto es dependiente de TcpC, mientras que en ECOR63, además de TcpC, pueden existir otros factores liberados responsables de mediar el refuerzo de la barrera epitelial. Para las OMVs de ambas cepas, este efecto es independiente de TcpC. Además, los resultados

obtenidos en presencia de un inhibidor de ERK 1/2 (*extracellular signal regulated kinase*) sugieren que las OMVs y los COF-SN de EcN y ECOR63 refuerzan la barrera epitelial a través de la activación de la vía de señalización de ERK 1/2.

A nivel de expresión de genes y de proteínas de TJ, las OMVs y los COF-SN de ambas cepas promueven la regulación positiva de ZO-1 y claudina-14. Asimismo, promueven la regulación negativa de claudina-2, una proteína vinculada con el aumento en la permeabilidad paracelular y el desarrollo de trastornos intestinales. Los efectos mediados por las OMVs son independientes de TcpC. En cambio, la proteína TcpC presente en los COF-SN contribuye a la regulación positiva de ZO-1 y claudina-14, pero no tiene ningún efecto sobre la regulación de claudina-2. La cepa ECOR63, además de TcpC, secreta otros factores activos que contribuyen al refuerzo de las TJ.

Las fracciones secretadas (COF-SN y OMVs) de ambas cepas, además de reforzar la función de barrera en un modelo celular de epitelio íntegro, también mostraron actividad protectora de la barrera epitelial en un modelo de barrera dañada por infección con la cepa *E. coli* enteropatógena (EPEC). Las infecciones con EPEC provocan la alteración de la integridad de la barrera epitelial, causan una regulación negativa de las proteínas de TJ ZO-1, ZO-2, ocludina, y claudina-14, además de un reordenamiento alterado de las proteínas ZO-1 y ocludina a nivel subcelular. Sin embargo, los resultados de la infección con EPEC en presencia de las fracciones secretadas de EcN y ECOR63 mostraron que tanto los COF-SN como las OMVs de ambas cepas evitan la disminución de la expresión a nivel de mRNA de ocludina y claudina-14. A nivel de redistribución subcelular, ambas fracciones de EcN y ECOR63 suprimieron claramente el efecto de producido por EPEC, manteniendo la localización de ZO-1 y ocludina en la zona de las TJ.

De manera general, los resultados obtenidos en este trabajo, nos llevan a concluir que factores secretados de manera libre, entre ellos TcpC, o a asociados a las OMVs, de la cepa probiótica EcN y de la cepa comensal ECOR63 tienen el potencial de regular la función de barrera del epitelio intestinal mediante refuerzo de las TJ. Además, tienen la capacidad de proteger del daño causado por EPEC a diferentes niveles que implican al menos: (i) regulación de la expresión de proteínas de TJ, (ii) redistribución subcelular de las proteínas TJ a través de mecanismos de regulación post-transcripcional.

La identificación de los factores extracelulares liberados por cepas microbianas probióticas y comensales, así como la comprensión de los mecanismos moleculares a través de los cuales estos factores regulan la estructura y función de las TJ, puede conducir al desarrollo de enfoques terapéuticos y preventivos eficaces contra enfermedades asociadas a defectos en la barrera epitelial intestinal.



## ABREVIATURAS

|                                |                                                                               |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>aa</b>                      | <i>Aminoácidos</i>                                                            |
| <b>Amp</b>                     | <i>Ampicilina</i>                                                             |
| <b>Bisacrilamida</b>           | <i>N, N'-Metileno-bisacrilamida</i>                                           |
| <b>BSA</b>                     | <i>Albúmina de suero bovino</i>                                               |
| <b>CF-SN</b>                   | <i>Cell Free Supernatans (sobrenadantes libres de células)</i>                |
| <b>COF-SN</b>                  | <i>Cell-OMVs Free Supernatans (sobrenadantes libres de células y de OMVs)</i> |
| <b>Ct</b>                      | <i>Ciclo umbral</i>                                                           |
| <b>DMEM</b>                    | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                                       |
| <b>DMSO</b>                    | <i>Dimetilsulfóxido</i>                                                       |
| <b>dNTP</b>                    | <i>Desoxirribonucleótido trifosfato</i>                                       |
| <b>DO</b>                      | <i>Densidad óptica</i>                                                        |
| <b>DTT</b>                     | <i>Ditiotreitol</i>                                                           |
| <b>EC</b>                      | <i>Extractos celulares</i>                                                    |
| <b>ECEI</b>                    | <i>E. coli enteroinvasiva</i>                                                 |
| <b>ECOR</b>                    | <i>Colección de Referencia de cepas de E. coli</i>                            |
| <b>EDTA</b>                    | <i>Etilendiaminotetracetato</i>                                               |
| <b>EGTA</b>                    | <i>Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético</i>          |
| <b>EHEC</b>                    | <i>E. coli Enterohemorrágica</i>                                              |
| <b>EPEC</b>                    | <i>E. coli Enteropatógena</i>                                                 |
| <b>ERK</b>                     | <i>Quinasa regulada por señal extracelular</i>                                |
| <b>FBS</b>                     | <i>Suero fetal bovino</i>                                                     |
| <b>GST</b>                     | <i>Glutation S-Transferasa</i>                                                |
| <b>HEPES</b>                   | <i>Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico</i>                    |
| <b>HRP</b>                     | <i>Horseradish peroxidase</i>                                                 |
| <b>IU</b>                      | <i>Unidades de intensidad relativa</i>                                        |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b> | <i>Interferón <math>\gamma</math></i>                                         |
| <b>IPTG</b>                    | <i>Isopropil <math>\beta</math>-D-tiogalactopiranosido</i>                    |
| <b>JAMs</b>                    | <i>Junctional adhesión molecules</i>                                          |
| <b>Km</b>                      | <i>Kanamicina</i>                                                             |
| <b>LB</b>                      | <i>Medio de cultivo Luria-Bertani</i>                                         |
| <b>MOI</b>                     | <i>Multiplicidad de infección</i>                                             |
| <b>MS</b>                      | <i>Espectrometría de masas</i>                                                |
| <b>OM</b>                      | <i>Outer membrane (membrana externa)</i>                                      |
| <b>OMVs</b>                    | <i>Vesículas de Membrana Externa</i>                                          |
| <b>PAGE</b>                    | <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i>                                |
| <b>PBS</b>                     | <i>Tampón fosfato salino</i>                                                  |
| <b>PCR</b>                     | <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>                                    |

|                |                                                                                          |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PKC</b>     | <i>Proteína quinasa C</i>                                                                |
| <b>PVDF</b>    | <i>Fluoruro de polivinilideno</i>                                                        |
| <b>Rf</b>      | <i>Rifampicina</i>                                                                       |
| <b>RT-qPCR</b> | <i>Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a transcripción reversa</i> |
| <b>SD</b>      | <i>Desviación estándar</i>                                                               |
| <b>SDS</b>     | <i>Dodecilsulfato sódico</i>                                                             |
| <b>SM</b>      | <i>Medio mineral basal</i>                                                               |
| <b>TAE</b>     | <i>Tampón Tris-Acetato-EDTA</i>                                                          |
| <b>TBE</b>     | <i>Tampón Tris-Borato-EDTA</i>                                                           |
| <b>TBS</b>     | <i>Tampón Tris-salino</i>                                                                |
| <b>TCA</b>     | <i>Ácido tricloroacético</i>                                                             |
| <b>TE</b>      | <i>Tampón Tris-HCl, EDTA</i>                                                             |
| <b>TEMED</b>   | <i>N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina</i>                                                 |
| <b>TER</b>     | <i>Resistencia eléctrica transepitelial</i>                                              |
| <b>TFB</b>     | <i>Tampón de transformación</i>                                                          |
| <b>TLRs</b>    | <i>Toll-like receptors</i>                                                               |
| <b>TJ</b>      | <i>Tight junction (uniones estrechas)</i>                                                |
| <b>Tris</b>    | <i>Tris (hidroximetil) aminometano</i>                                                   |
| <b>U</b>       | <i>Unidad de actividad enzimática</i>                                                    |
| <b>UFC</b>     | <i>Unidad formadora de colonias</i>                                                      |
| <b>X-Gal</b>   | <i>5-Bromo-4-cloro-3-indolil-<math>\beta</math>-D-galactopiranósido</i>                  |
| <b>ZO</b>      | <i>Zonula occludens</i>                                                                  |

# ÍNDICE

---





# ÍNDICE

|                                                                             | Página    |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>PRESENTACIÓN.....</b>                                                    | <b>i</b>  |
| <b>ABREVIATURAS.....</b>                                                    | <b>vi</b> |
| <b>ÍNDICE.....</b>                                                          | <b>ix</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                 | <b>3</b>  |
| <b>1.1. INTERACCION DEL EPITELIO INTESTINAL CON LA MICROBIOTA.....</b>      | <b>3</b>  |
| <b>1.1.1. SISTEMA DE BARRERA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL .....</b>          | <b>4</b>  |
| 1.1.1.1. <i>Capa de Mucus.....</i>                                          | <b>5</b>  |
| 1.1.1.2. <i>Células epiteliales.....</i>                                    | <b>8</b>  |
| 1.1.1.2.1. <i>Tight junctions.....</i>                                      | <b>9</b>  |
| 1.1.1.3. <i>Sistema inmunitario.....</i>                                    | <b>14</b> |
| <b>1.1.2. COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DE LA MICROBIOTA HUMANA.....</b>            | <b>17</b> |
| 1.1.1.4. <i>Composición de la microbiota. ....</i>                          | <b>17</b> |
| 1.1.1.5. <i>Funciones de la microbiota .....</i>                            | <b>20</b> |
| 1.1.1.5.1. <i>Función metabólica. ....</i>                                  | <b>20</b> |
| 1.1.1.5.2. <i>Función estructural .....</i>                                 | <b>20</b> |
| 1.1.1.5.3. <i>Función protectora .....</i>                                  | <b>21</b> |
| <b>1.2. PROBIÓTICOS.....</b>                                                | <b>22</b> |
| <b>1.2.1. <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (EcN).....</b>                | <b>25</b> |
| 1.2.1.1. <i>Mecanismos vinculados con el efecto probiótico de EcN.....</i>  | <b>27</b> |
| <b>1.3. VESICULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>1.3.1. BIOGENESIS DE LAS OMVs.....</b>                                   | <b>31</b> |
| <b>1.3.2. REGULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE OMVs.....</b>                      | <b>32</b> |
| <b>1.3.3. VIAS DE INTERNALIZACION DE LAS OMVs.....</b>                      | <b>33</b> |
| <b>1.3.4. FUNCIONES DE LAS OMVs.....</b>                                    | <b>35</b> |
| 1.3.4.1. <i>Funciones de las OMVs provenientes de cepas patógenas.....</i>  | <b>36</b> |
| 1.3.4.2. <i>Funciones de las OMVs provenientes de cepas comensales.....</i> | <b>37</b> |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                    | <b>41</b> |

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. MATERIALES.....</b>                                                            | <b>45</b> |
| 3.1. CEPAS BACTERIANAS.....                                                          | 45        |
| 3.2. VECTORES.....                                                                   | 46        |
| 3.3. LINEAS CELULARES. ....                                                          | 47        |
| 3.4. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES. ....                                              | 47        |
| 3.4.1. REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS CULTIVOS CELULARES.....                            | 47        |
| 3.5. OLIGONUCLEOTIDOS.....                                                           | 47        |
| 3.6. SONDAS TaqMan®.....                                                             | 48        |
| 3.7. ANTICUERPOS.....                                                                | 48        |
| 3.8. SOPORTE INFORMÁTICO .....                                                       | 48        |
| 3.8.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....                                                   | 48        |
| 3.8.2. BASES DE DATOS.....                                                           | 49        |
| <b>4. MÉTODOS.....</b>                                                               | <b>53</b> |
| 4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....                                                    | 53        |
| 4.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO<br>BACTERIANO.....             | 53        |
| 4.1.1.1. Composición de medios de cultivo.....                                       | 53        |
| 4.1.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS.....                                       | 54        |
| 4.1.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....                                         | 55        |
| 4.1.3.1. Métodos químicos.....                                                       | 55        |
| 4.1.3.1.1. Método del TFB.....                                                       | 55        |
| 4.1.3.1.2. Método del CaCl <sub>2</sub> . ....                                       | 56        |
| 4.1.3.2. Métodos físicos. ....                                                       | 57        |
| 4.1.3.2.1. Electroporación. ....                                                     | 57        |
| 4.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....                                    | 58        |
| 4.1.4.1. Transformación por choque térmico.....                                      | 58        |
| 4.1.4.2. Por electroporación.....                                                    | 59        |
| 4.1.5. CONJUGACIÓN. ....                                                             | 59        |
| 4.1.6. OBTENCIÓN DE MUTANTES.....                                                    | 61        |
| 4.1.6.1. Selección de mutantes espontáneos.....                                      | 61        |
| 4.1.6.2. Mutantes knockout por disrupción génica.....                                | 61        |
| 4.1.6.2.1. Mutantes knockout mediante pUTmini-Tn5-Tc y conjugación.....              | 62        |
| 4.1.6.2.2. Mutantes knockout mediante pUTmini-Tn5-Tc y la recombinasa<br>λRed.....   | 65        |
| 4.1.7. OBTENCIÓN DE FRACCIONES BACTERIANAS SECRETADAS (CF-SN,<br>COF-SN y OMVs)..... | 67        |

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.7.1. Obtención de sobrenadantes totales libres de células (Cell Free Supernatans): CF-SN.....    | 67        |
| 4.1.7.2. Obtención de OMVs y sobrenadantes libres de OMVs (COF-SN: Cell-OMVs Free Supernatants)..... | 67        |
| <b>4.2. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....</b>                                                       | <b>68</b> |
| 4.2.1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....                                                     | 69        |
| 4.2.2. EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES TRAS TRIPSINIZACIÓN...                                    | 70        |
| 4.2.3. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS LINEAS CELULARES.....                                                 | 72        |
| 4.2.4. DESCONGELACIÓN DE LAS LINEAS CELULARES.....                                                   | 73        |
| 4.2.5. RECUENTO Y SIEMBRA DE CÉLULAS.....                                                            | 74        |
| 4.2.6. INCUBACIÓN DE MONOCAPAS DE CÉLULAS EPITELIALES CON CULTIVOS Y FACTORES SECRETADOS.....        | 74        |
| 4.2.6.1. Incubación con cultivos bacterianos.....                                                    | 75        |
| 4.2.6.2. Incubación con fracciones secretadas (CF-SN, COF-SN y OMVs).....                            | 76        |
| 4.2.7. MEDICION DE LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL EN MONOCAPAS DE CÉLULAS T-84 Y Caco-2.....          | 76        |
| <b>4.3. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. ....</b>                                               | <b>78</b> |
| 4.3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES (EC).....                                                    | 78        |
| 4.3.1.1. Obtención de extractos celulares bacterianos.....                                           | 78        |
| 4.3.1.2. Obtención de extractos celulares eucariotas.....                                            | 79        |
| 4.3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY.....                                             | 80        |
| 4.3.3. PRECIPITACION DE PROTEINAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA).....                               | 81        |
| 4.3.4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS).....            | 81        |
| 4.3.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT.....                                              | 83        |
| 4.3.6. EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST.....                                   | 85        |
| 4.3.6.1. Expresión.....                                                                              | 85        |
| 4.3.6.2. Purificación.....                                                                           | 86        |
| <b>4.4. TÉCNICAS DE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA Y ANALISIS DE IMÁGENES.....</b>                     | <b>87</b> |
| 4.4.1. VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS, FUSIONADAS A GFP POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA.....            | 87        |
| 4.4.2. MARCAJE MEDIANTE INMUNOLocalización.....                                                      | 87        |
| 4.4.3. MICROSCOPIA CONFOCAL Y ANALISIS DE IMÁGENES.....                                              | 89        |
| <b>4.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....</b>                                                       | <b>90</b> |
| 4.5.1 OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.....                                                                 | 91        |
| 4.5.2 OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....                                                               | 91        |

|                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA.....                                                                                         | 91  |
| 4.5.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....                                                                                        | 91  |
| 4.5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). ....                                                                           | 92  |
| 4.5.6. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....                                                                       | 94  |
| 4.5.6.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa mediante electroforesis.....                                        | 95  |
| 4.5.6.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....                                                     | 95  |
| 4.5.6.3. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.....                                                                | 95  |
| 4.5.7. SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES.....                                                                                    | 95  |
| 4.5.8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA.....                                                                                     | 95  |
| 4.5.9. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA (OBTENCIÓN DE DNA RECOMBINANTE).....                                            | 96  |
| 4.5.9.1. Fusión de promotores al gen <i>gfpmut3.1</i> .....                                                                      | 96  |
| 4.6. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA.....                                                                                          | 97  |
| 4.6.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....                                                                                              | 97  |
| 4.6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA.....                                                                             | 97  |
| 4.6.3. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL RNA. ....                                                                                       | 98  |
| 4.6.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA ACOPLADA A TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-qPCR).....                          | 99  |
| 4.6.4.1. RT-qPCR por SYBR Green.....                                                                                             | 99  |
| 4.6.4.2. RT-qPCR por sondas TaqMan. ....                                                                                         | 101 |
| 4.6.4.3. Cálculo de la expresión génica en niveles relativos de mRNA.....                                                        | 102 |
| 4.7. COLONIZACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATONES CON CEPAS BACTERIANAS.....                                              | 103 |
| 4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. ....                                                                                                 | 104 |
| 5. RESULTADOS.....                                                                                                               | 109 |
| 5.1. SELECCIÓN DE CEPAS COMENSALES DE LA COLECCIÓN ECOR CON EFECTOS POSITIVOS SOBRE LA FUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL.....        | 109 |
| 5.1.1. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS ECOR QUE CONTIENEN EL GEN <i>tcpC</i> .....                                           | 109 |
| 5.1.2. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE <i>TcpC</i> EN CULTIVOS DE LAS CEPAS ECOR <i>tcpC</i> POSITIVAS.....                          | 111 |
| 5.1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>tcpC</i> MEDIANTE FUSIONES DE PROMOTOR AL GEN REPORTERO <i>gfp</i> .....                   | 116 |
| 5.1.3.1. Análisis <i>in vitro</i> .....                                                                                          | 116 |
| 5.1.3.2. Análisis <i>in vivo</i> .....                                                                                           | 117 |
| 5.1.4. LAS CEPAS ECOR QUE CONTIENEN EL GEN <i>tcpC</i> INCREMENTAN LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL EN MONOCAPAS DE CÉLULAS T-84... | 120 |

|                                                                                                                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.2. MODULACIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL POR OMVs Y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR LAS CEPAS EcN Y ECOR63.....</b>                                        | <b>121</b> |
| 5.2.1. EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA ELECTRICA TRANSEPITELIAL DE MONOCAPAS DE CELULAS T-84.....                                                                 | 121        |
| 5.2.2. ANÁLISIS POR RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE TJ EN CÉLULAS T-84 Y Caco-2.....                                                                  | 127        |
| 5.2.3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS DE TJ EN CÉLULAS T-84.....                                                                                      | 129        |
| 5.2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCION SUBCELULAR DE PROTEÍNAS DE TJ POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....                                                    | 131        |
| <b>5.3. PROTECCIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL FRENTE AL DAÑO CAUSADO POR ENTEROPATÓGENOS MEDIANTE OMVs y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS DE EcN Y ECOR63.....</b>   | <b>136</b> |
| 5.3.1. EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA ELECTRICA TRANSEPITELIAL EN UN MODELO DE BARRERA EPITELIAL DAÑADA POR EPEC.....                                            | 136        |
| 5.3.2. ANÁLISIS POR RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE TJ EN UN MODELO DE BARRERA EPITELIAL DAÑADA CON EPEC.....                                         | 139        |
| 5.3.3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA REDISTRIBUCION SUBCELULAR DE PROTEÍNAS DE TJ EN UN MODELO DE BARRERA EPITELIAL DAÑADA CON EPEC.....            | 141        |
| <b>6. DISCUSIÓN.....</b>                                                                                                                                      | <b>147</b> |
| 6.1. REFUERZO DE LA BARRERA INTESTINAL POR BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS.....                                                                            | 147        |
| 6.2. EFECTO POSITIVO DE ECN SOBRE LA BARRERA INTESTINAL: IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA TcpC.....                                                                 | 148        |
| 6.3. LAS OMVs DE EcN Y CEPAS COMENSALES DE E. coli MODULAN LA BARRERA INTESTINAL DE MANERA INDEPENDIENTE DE TcpC.....                                         | 150        |
| 6.4. LAS OMVs Y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR EcN Y ECOR63 PROTEGEN LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA EPITELIAL INTESTINAL DAÑADA POR CEPAS ENTEROPATÓGENAS..... | 157        |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>                                                                                                                                   | <b>165</b> |
| <b>8. REFERENCIAS.....</b>                                                                                                                                    | <b>169</b> |
| <b>9. ANEXOS.....</b>                                                                                                                                         | <b>187</b> |

|                                                     |                |
|-----------------------------------------------------|----------------|
| <b>9.1. OLIGONUCLEÓTIDOS.....</b>                   | <b>187</b>     |
| <b>9.2. SONDAS TAQMAN.....</b>                      | <b>188</b>     |
| <br><b>10. PUBLICACIONES.....</b>                   | <br><b>191</b> |
| <b>10.1. PARTICIPACIÓN EN OTRA PUBLICACIÓN.....</b> | <b>205</b>     |

# 1. INTRODUCCIÓN

---





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. INTERACCIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL CON LA MICROBIOTA

El tracto gastrointestinal de aproximadamente 400m<sup>2</sup> es la superficie del cuerpo humano que separa el lumen intestinal del tejido subyacente (Van Spaendonk et al., 2017). Desde la boca hasta el recto está revestido por el epitelio intestinal, una sola capa de células especializadas de diferentes tipos, que se hallan organizando criptas y vellosidades.

El epitelio intestinal constituye una barrera frente al medio externo con doble función. Por una parte, desempeña funciones biológicas esenciales tales como la absorción, secreción y transporte de agua, de nutrientes y de electrolitos (Guzman et al., 2013). Por otra parte, proporciona protección y defensa frente a toxinas antigénicas y a la microbiota intestinal presentes en el compartimento luminal. La microbiota intestinal esta compuesta por una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente de bacterias pero también de hongos, virus y protozoos (Guarner, 2011). El número de bacterias comensales en el intestino del adulto se estima en un total de 10<sup>13</sup>-10<sup>14</sup>, un número que supera en un factor de 10 al número de células que componen el cuerpo humano.

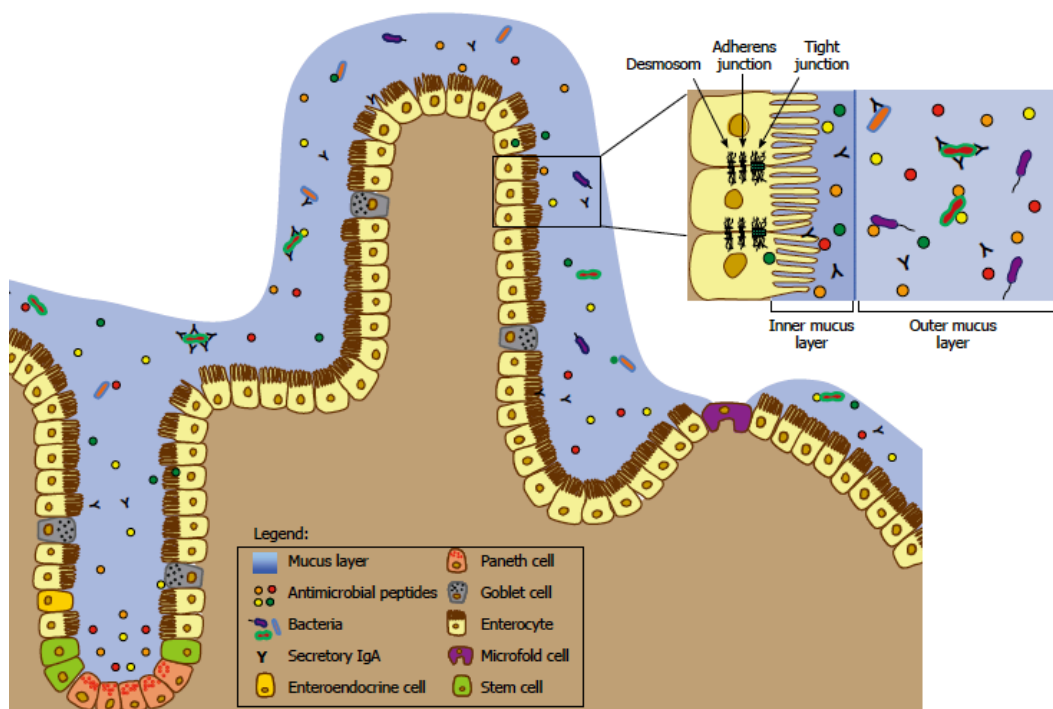
Así pues, la función del epitelio intestinal se desarrolla en un entorno único en el que, entre otros, se encuentran presentes e interactuando de manera sinérgica los metabolitos de la dieta, las bacterias de la microbiota y sus metabolitos derivados. Aunque las bacterias comensales contribuyen significativamente a la digestión de los nutrientes, a la síntesis de vitaminas y al desarrollo de los tejidos, su alto número representa un desafío permanente para la integridad de la superficie epitelial manteniendo el sistema inmune constantemente en alerta. En estas condiciones, la integridad del epitelio tiene un papel importante en la preservación de la salud, puesto que contribuye activamente al mantenimiento de la homeostasis intestinal y a la defensa antimicrobiana del huésped (Zhang et al., 2015). Para mantener la función de barrera, el epitelio dispone de diversos mecanismos: la producción de una capa de mucina firmemente adherida a su superficie que evita el contacto directo del epitelio con las bacterias comensales (Hansson y Johansson, 2010); la secreción de péptidos antimicrobianos que limitan la colonización y la adhesión bacteriana (Muniz, Knosp, and Yeretssian 2012); y la formación de complejos de proteínas que forman las *Tight Junctions* (TJ) y que participan en la unión estrecha entre las células. Estas proteínas sellan el espacio intercelular y regulan el transporte paracelular promoviendo una barrera selectiva (Van Spaendonk et al., 2017). Además de estos mecanismos, algunas

células intestinales especializadas pueden detectar señales microbianas y coordinan las diferentes respuestas de las células del sistema inmunitario del intestino y, que abarcan desde la tolerancia a cepas comensales, hasta la inmunidad adaptativa frente a patógenos (Peterson y Artis, 2014).

Existe un gran interés en identificar los factores y condiciones que influyen en el mantenimiento y en el correcto funcionamiento de la barrera epitelial, así como en la prevención de la disbiosis que conduciría en una desprotección del huésped. También podrían tener un profundo impacto en el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales, entre ellas la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o incluso el desarrollo de cáncer colorrectal (Antoni et al. 2014).

### 1.1.1. SISTEMA DE BARRERA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Para prevenir la adhesión e invasión perjudicial de microorganismos, el epitelio intestinal sano está equipado con una barrera de defensa que implica diversos mecanismos protectores específicos e inespecíficos que colectivamente constituyen una barrera compleja y eficaz.



**FIGURA 1.1. Componentes de la barrera intestinal.** La barrera intestinal es una estructura compleja compuesta por tres componentes: capa de mucus, diferentes tipos de células epiteliales y sistema inmune. Imagen obtenida de Antoni et al., 2014.

A continuación se presenta una descripción de la estructura, función y propiedades de los componentes de la barrera intestinal: capa de mucus, células epiteliales y sistema inmune (FIGURA 1.1).

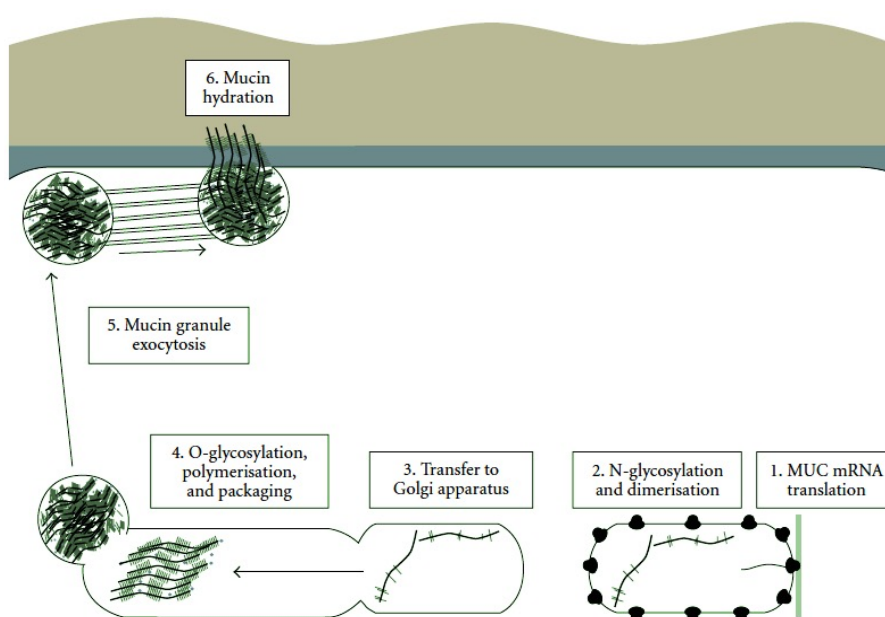
#### **1.1.1.1. Capa de Mucus**

El tracto gastrointestinal está cubierto por una capa de mucus que tiene propiedades diferentes según su localización en el estómago, intestino delgado o colon. La capa de mucus que cubre toda la superficie de las células epiteliales es la primera línea de defensa contra la enorme cantidad de bacterias que residen en el intestino. Puesto que la capa de mucus exhibe también propiedades antimicrobianas, actúa no sólo como una barrera física sino también como una barrera química y es importante para reducir la exposición del sistema inmunológico a los antígenos. Sin embargo, el peligro potencial para el epitelio no es totalmente exógeno, ya que el huésped secreta moléculas potencialmente nocivas para el intestino, como son el ácido clorhídrico, enzimas digestivas y sales biliares. En este sentido, el mucus también es importante para proteger al huésped de la auto-digestión (Pelaseyed et al., 2014). Aparte de su función protectora, también tiene gran capacidad lubricante y es importante para mantener hidratada la superficie del epitelio.

La capa de mucus se compone de proteínas, carbohidratos y lípidos, pero también contiene defensinas o péptidos antimicrobianos que son secretados por las células *Paneth* presentes en la capa de células epiteliales situadas en las criptas. La composición del mucus es principalmente agua (más del 98%). La formación de la capa de mucus la produce un tipo de células especializadas denominadas células caliciformes o *goblet cells* a través de la síntesis de mucina (FIGURA 1.2), una proteína de alto peso molecular altamente glicosilada que forma polímeros de gran tamaño. Este tipo de ensamblaje forma una matriz hidrofílica tridimensional, extendida y rígida, que le confiere al mucus las propiedades similares a las de un gel. Las mucinas MUC2, MUC5AC, MUC6 y MUC5B son los componentes principales del mucus del intestino, del estómago y de las glándulas salivales, respectivamente. Además de las mucinas formadoras de gel que son secretadas al medio están las mucinas transmembrana MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 y MUC17 que se encuentran todas en el tracto gastrointestinal y forman parte del glicocáliz. Varios tipos de defectos en la estructura de la capa interna del mucus permiten que mayor número de bacterias penetren y alcancen el epitelio. La importancia funcional de las mucinas se resalta por el hecho de que los ratones con deficiencia de MUC2, uno de los principales componentes de las mucinas, desarrollan espontáneamente colitis (Hansson y Johansson, 2010; Johansson et al., 2008; Kim y Ho,

2010; Zhang et al., 2015).

Por otra parte, existen carbohidratos complejos que se encuentran enlazados a las proteínas MUC. Estos carbohidratos están constituidos por oligosacáridos formados a partir de monosacáridos unidos entre sí por enlaces que el propio huésped no puede escindir. De esta manera, el recubrimiento superficial del intestino es esencialmente inerte frente a la degradación proteolítica del huésped. Las mucinas del colon están cargadas negativamente ya que sus carbohidratos contienen numerosos residuos de sulfato y ácido siálico. Estos residuos ofrecen a las mucinas una protección adicional contra el ataque bacteriano y la degradación enzimática. (Pearson y Brownlee, 2010).

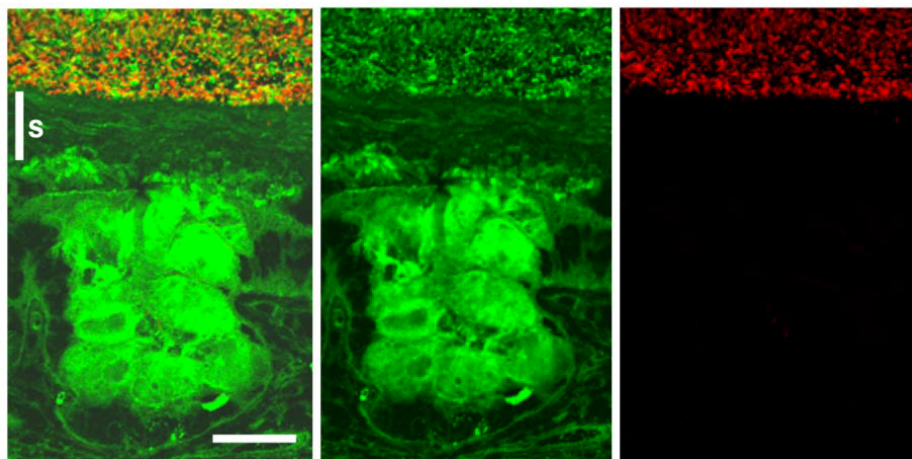


**FIGURA 1.2. Síntesis y secreción de mucina colónica.** Principales etapas posttranscripcionales involucrados en la síntesis y secreción de mucina colónica por parte de las *globet cell*. Imagen extraída de Pearson y Brownlee, 2010.

Recientemente, estudios proteómicos de explantes de distintas fracciones de tejido comprendidas entre el estómago y el colon distal de ratones, han permitido identificar proteínas asociadas al mucus. Rodríguez-Piñeiro et al., (2013) identificaron por espectrometría de masas 1300 proteínas en el mucus. No se encontraron diferencias en la composición o abundancia de proteínas entre ambos sexos, pero sí a lo largo del tracto gastrointestinal, lo que podría indicar su especialización según la localización. Por su parte Bergström et al., (2016) identificaron la proteína de 16 kDa parecida a lectina ZG16 (proteína de granulos de zimógeno 16) como un componente abundante en el mucus, y cuya función principal es la de crear un mecanismo para mantener a las bacterias más alejadas del epitelio del colon. También se ha descrito que las *globet cells*

intestinales no sólo secretan mucina, sino también una serie de proteínas típicas del mucus como son: CLCA1, FCGBP, AGR2, TFF3CLCA1, FCGBP, AGR2 y TFF3 cuyas funciones se han relacionado con la protección de la mucosa, con procesos de reparación de la misma y con una actividad antibacteriana local que impide el crecimiento excesivo bacteriano y limita la translocación de microbios comensales (Pelaseyed et al., 2014).

La capa de mucus, su organización y sus propiedades tales como el espesor, crecimiento en el tiempo, propiedades adhesivas y penetrabilidad, difieren a lo largo del tracto gastrointestinal. En el intestino delgado, la capa de mucus es delgada, no adherente y con una organización de mucus suelto que permite la penetración fácil de los nutrientes, pero limita el número de bacterias que pueden llegar al epitelio. En el colon, el mucus forma una capa gruesa de 200  $\mu\text{m}$  de espesor en seres humanos y de 50  $\mu\text{m}$  en ratones, que se divide en dos secciones distintas con propiedades propias de cada una de ellas (FIGURA 1.3).



**FIGURA 1.3. Marcaje por inmunotinción de la capa de mucus colónico de ratón.** La inmunotinción con el anticuerpo anti-MUC2 (verde fluorescente) y con la sonda bacteriana EUB338-Alexa Fluor 555 (rojo fluorescente) muestran el marcaje de una *globet cell* (MUC2 positiva), una capa estratificada del mucus epitelial y la presencia en rojo, de bacterias que sólo pueden detectarse en la capa externa (derecha). La capa interna del mucus genera una separación espacial entre las células y la microbiota. En la primera imagen (izquierda) se muestran los dos marcajes superpuestos. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . Imagen obtenida de Johansson et al., 2008.

La capa interna se encuentra densamente empaquetada y firmemente unida al epitelio. Es impermeable a las partículas del tamaño de una bacteria lo que impide que las bacterias penetren en un colon sano y atraviesen la capa interna. La capa interna es estéril y evita eficazmente el contacto directo del epitelio con la comunidad microbiana luminal. Esta capa de mucus interna se renueva constantemente por la secreción de las

*globet cells* y el mucus migra hacia el exterior en forma de capas. Por el contrario, la capa externa es más laxa, tiene un volumen cuatro veces expandido en comparación con la capa interna debido a las escisiones proteolíticas de la mucina MUC2 y es donde cohabitan las bacterias asociadas a la superficie, lo que la convierte en el hábitat de las bacterias comensales. Además, la barrera del mucus colónico puede actuar como una fuente de energía y nutrientes. Algunas bacterias comensales están equipadas con un gran repertorio de genes involucrados en la degradación enzimática de los polisacáridos de la mucina, dando lugar a monosacáridos que son absorbidos (Antoni et al., 2014; Ermund et al., 2013; Hansson y Johansson 2010; Johansson et al., 2008).

Es posible que las bacterias que residen dentro del mucus también tengan un impacto en la fisiología y fisiopatología de la mucosa. Las bacterias raramente interactúan directamente con el epitelio colónico en condiciones fisiológicas normales. Por ello es probable que la difusión de los subproductos bacterianos a través de la barrera de mucus hacia el epitelio actúen como mediadores en la producción de la mucosa, dirigiendo la secreción de mucina, la exocitosis de los gránulos de mucina y la proliferación de las *globet cell* (Pearson y Brownlee, 2010).

#### **1.1.1.2. Células epiteliales**

El epitelio intestinal está formado por una sola capa de células procedentes de varios linajes celulares específicos como son: los enterocitos, las células *microfold* (M), las células enteroendocrinas, las células *Paneth* y las *globet cells* (Guzman, Conlin, and Jobin, 2013). Para incrementar la superficie de absorción de los nutrientes, el epitelio del intestino delgado se organiza en criptas y vellosidades, mientras que el colon tiene una superficie significativamente menos amplia, sin vellosidades y de estructura más plana. El epitelio intestinal está constantemente renovándose. En el caso de los humanos, el epitelio se renueva aproximadamente cada 4-5 días debido a la proliferación y diferenciación de las células madre pluripotentes que residen en la base de las criptas epiteliales (Van der Flier y Clevers, 2009; Wells et al., 2011).

La mayoría de las células que componen el epitelio intestinal son los enterocitos (más del 80%) que están adaptados para mantener una función metabólica y digestiva. La diversidad de funciones que lleva a cabo el epitelio intestinal se refleja en la presencia de otras células especializadas. Las células enteroendocrinas representan un enlace entre los sistemas neuroendocrino central y entérico a través de la secreción de numerosos reguladores hormonales. Estas células endocrinas secretan las hormonas peptídicas que intervienen en el tropismo celular, la reparación de tejidos, la angiogénesis, la diferenciación de los enterocitos y la polarización a lo largo del eje

cripta-vellosidad. Las células *Paneth* que llevan el nombre del fisiólogo austriaco Joseph Paneth, se encuentran normalmente en el intestino delgado donde se localizan en el fondo de las criptas y contienen un gran número de gránulos secretores de factores antimicrobianos, que utilizan para proteger a las células epiteliales de la infección por microorganismos. Entre estos factores, se encuentran la lisozima, la fosfolipasa A2, las lectinas de tipo C, la  $\beta$ -defensina-2 y las  $\alpha$ -defensinas, estas últimas son las más abundantes. Las *globet cells* están especializadas en la secreción y segregación de moléculas bioactivas como las mucinas y otras proteínas involucradas en la formación, protección y reparación de la capa de mucus. La proporción de estas células respecto a las demás células epiteliales aumenta desde el duodeno (4%) hasta el colon distal (16%) de manera similar al número de microorganismos presentes desde el intestino proximal al colon (Bevins y Salzman, 2011; Kim y Ho, 2010; Wells et al., 2011)

Las células enteroendocrinas, las células *Paneth* y las *globet cells*, están especializadas para mantener la función digestiva del epitelio, así mismo, establecen una barrera física y bioquímica al contacto microbiano con la superficie epitelial y con las células inmunes subyacentes. En su conjunto, las diversas funciones de las células epiteliales constituyen una barrera dinámica para el medio luminal, que protege al huésped de la infección y de la exposición continua a estímulos potencialmente inflamatorios (Pearson y Brownlee, 2010).

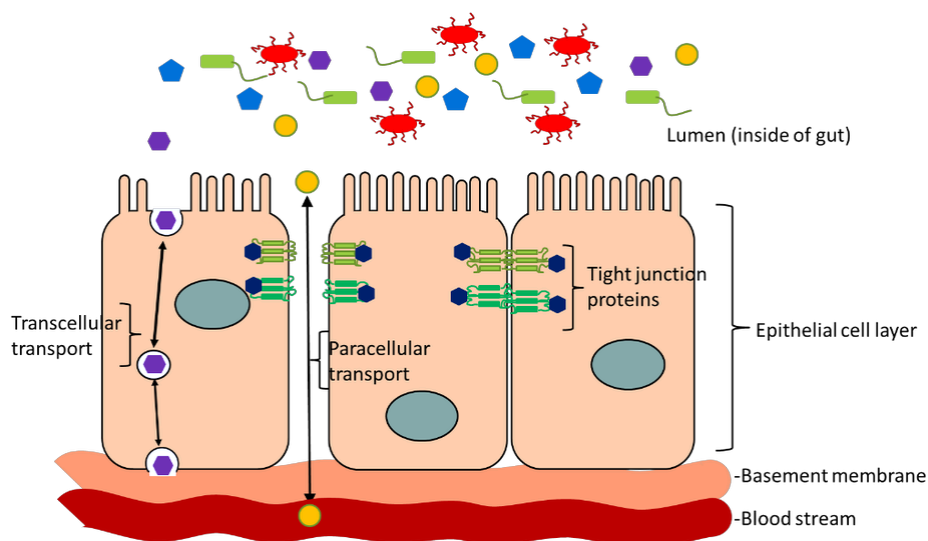
#### **1.1.1.2.1. Tight junctions**

Las células del epitelio intestinal deben permanecer estrechamente unidas para formar una barrera hermética que permita separar el contenido luminal, impida el acceso de microorganismos o sustancias nocivas a las células inmunitarias y regule el paso de nutrientes específicos. Con el fin de establecer una barrera eficaz, los espacios intercelulares están sellados por unión entre proteínas de células adyacentes (Yu et al., 2015). Estas uniones altamente dinámicas que están siendo constantemente remodeladas debido a estímulos externos, tales como residuos de alimentos, bacterias patógenas y bacterias comensales, regulan la permeabilidad paracelular y son cruciales para la integridad de la barrera epitelial (Ulluwishewa et al., 2011).

El epitelio intestinal permite el paso selectivo de sustancias a través de dos vías principales: la vía transcelular y la vía paracelular (FIGURA 1.4). La vía transcelular está implicada en la absorción y transporte de nutrientes, azúcares, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos de cadena corta, minerales y vitaminas. Como la membrana celular es impermeable, este proceso está predominantemente mediado por transportadores o canales específicos ubicados en las membranas apicales y basolaterales. La vía



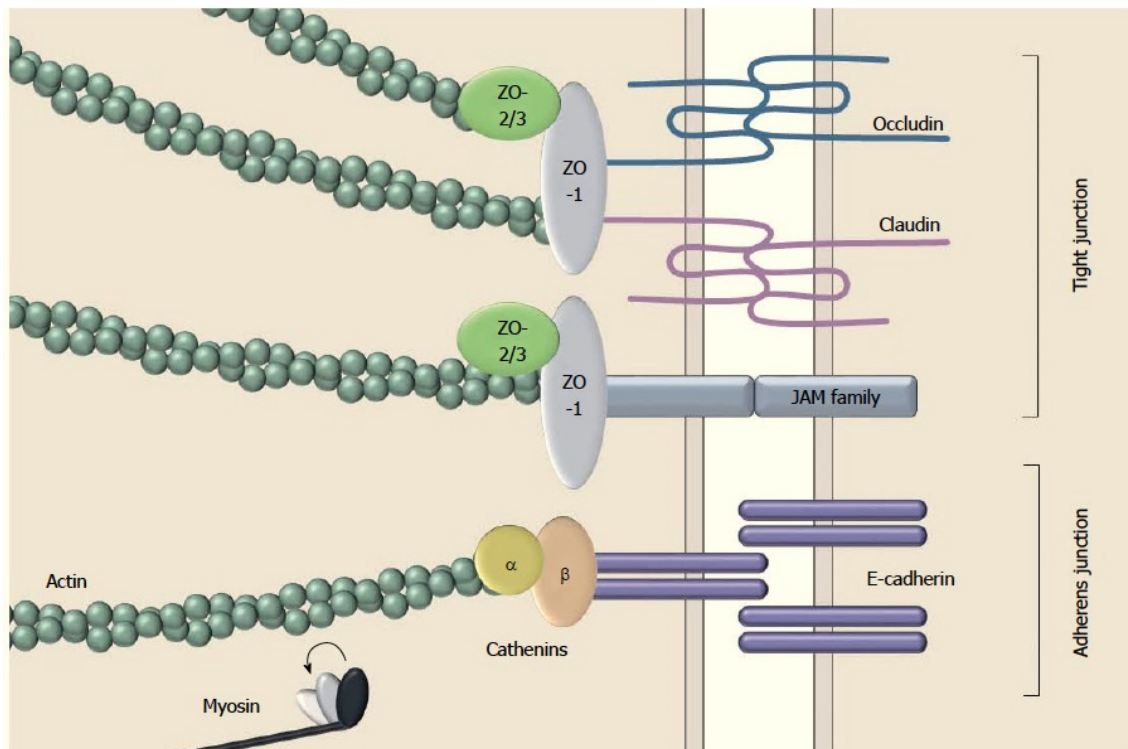
paracelular está asociada con el transporte selectivo de iones, solutos y agua a través del espacio intercelular entre las células epiteliales adyacentes, evitando al mismo tiempo la translocación de antígenos luminales, microorganismos y sus toxinas. Este transporte está regulado particularmente por las uniones estrechas llamadas *Tight junctions* (TJ) (por su nombre en inglés), compuestas por complejas redes de proteínas ubicadas en la zona apical (Suzuki, 2013).



**FIGURA 1.4. Vías implicadas en la permeabilidad del epitelio intestinal. Existen dos vías: i) La permeabilidad transcelular que permite el movimiento de solutos a través de las células epiteliales, ii) la permeabilidad paracelular asociada con el transporte selectivo de iones, solutos o agua a través del espacio intercelular entre células epiteliales adyacentes. Esta última está regulada por las *tight junctions* localizadas en la parte apical de la membrana de las células.** Imagen obtenida de: *Blog of the UNC Center of Excellence for Eating Disorders* (<https://uncexchanges.org/2017/04/03/leaky-gut-a-potential-contributor-to-the-brain-gut-microbiota-axis/>)

Las uniones entre las células epiteliales intestinales están compuestas, a nivel ultraestructural, por 3 tipos de complejos adherentes: los desmosomas, las uniones adherentes o *junctional adhesion* (AJ) y las TJ (FIGURA 1.5). Estos complejos consisten en proteínas transmembrana que interactúan extracelularmente con proteínas de las células adyacentes e intracelularmente con proteínas adaptadoras que se unen al citoesqueleto de actina. Los desmosomas y las AJ (compuestas de caderinas y cateninas) se sitúan por debajo de las TJ, están implicados en una fuerte adhesión célula-célula y en la señalización-comunicación intracelular, pero no determinan la permeabilidad paracelular. Las TJ, por otro lado, son el complejo apical que mantiene la polaridad de la célula y la especialización de las membranas apical y basolateral, son las responsables de sellar el espacio intercelular y de regular el transporte paracelular selectivo. Los complejos AJ y TJ también son importantes en la regulación de la proliferación y

diferenciación celular, limitan el crecimiento y la apoptosis, y regulan la homeostasis en general siendo así un complejo multifuncional (Dejana, 2004; Chiba et al., 2008).



**FIGURA 1.5. Uniones intercelulares de células del epitelio intestinal.** Las uniones intercelulares están formadas por 3 complejos de proteínas adhesivas: Los desmosomas, las AJ y las TJ. Las TJ se componen de 4 tipos de proteínas transmembrana: occludina, claudinas, proteínas JAMs y tricelulina, y de proteínas citosólicas adaptadoras: ZO-1, ZO-2 y ZO-3 que conectan las proteínas transmembrana a los filamentos de actina del citoesqueleto. La actina interactúa con la miosina para inducir una contracción, seguida de la apertura del espacio intercelular. Imagen obtenida de Van Spaendonk et al., 2017.

La observación por microscopía electrónica de transmisión reveló que las TJ aparecen como una serie de sitios de fusión entre las membranas plasmáticas de células adyacentes. Por microscopía electrónica basada en la criofractura se observó que las TJ se estructuran como redes continuas de filamentos intramembranosos que se localizan tanto en la cara citoplasmática como en la extracelular. A partir de estas observaciones iniciales, se ha determinado que los complejos de proteínas de TJ están compuestos por más de 50 proteínas agrupadas en 5 tipos: las proteínas transmembrana tales como la occludina, claudinas, proteínas JAM o *junctional adhesión molecules* y tricelulina; y las proteínas citosólicas como las zonula occludens (ZO) ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (FIGURA 1.5). Las interacciones entre las proteínas de las TJ incluyen aquellas que implican a proteínas en la misma membrana (en *cis*) y aquellas que implican proteínas en células adyacentes (en *trans*). Además, las proteínas TJs pueden formar interacciones homofílicas (con proteínas TJ del mismo tipo) o heterofílicas (entre proteínas TJ no idénticas) (Groschwitz

y Hogan, 2009; Weflen et al., 2009).

La ocludina es una proteína de aproximadamente 60 kDa que contiene 4 dominios transmembrana, forma un bucle intracelular y dos bucles extracelulares con los extremos NH<sub>2</sub> y COOH terminal dentro del citoplasma. El dominio C-terminal es rico en residuos de serina, treonina y tirosina, que con frecuencia son fosforilados por varias proteínas quinasas, entre ellas la PKCζ. La defosforilación de estos residuos ya sea por el agotamiento del calcio, o por patógenos parece provocar la desestabilización de las TJ. Por lo tanto, la fosforilación dinámica de la ocludina parece desempeñar un papel importante en el ensamblaje y desensamblaje de las TJ, sin embargo, se desconoce el papel preciso que ejercen las diferentes isoformas de PKC. Además de los sitios de fosforilación, la región C-terminal se une directamente con las proteínas citoplasmáticas ZO-1 que actúan como adaptadores citoplásmicos para unirse al citoesqueleto de actina; esta interacción es esencialmente importante para el ensamblaje de las TJ (Jain et al., 2011).

Las claudinas son proteínas integrales de membrana de entre 22 y 27 kDa que conforman una familia multigénica de al menos 24 subtipos en humanos. Poseen cuatro dominios transmembrana con los extremos NH<sub>2</sub> y COOH situados en el citoplasma y dos bucles extracelulares implicados en las interacciones homofílicas y heterofílicas para la formación de las TJ. La secuencia genética dentro del primer bucle se conserva entre los miembros de la familia mientras que las colas citoplasmáticas tienen secuencias que divergen entre las claudinas. Esta variación permite que las claudinas tengan varios sitios potenciales de fosforilación, al mismo tiempo que permite que existan diferentes modos de ensamblaje que aumenta la diversidad de estructuras y funciones que pueden adoptar las TJ. Los dominios intracelulares de las claudinas interactúan con otras claudinas produciendo diferentes combinaciones de unión, y al igual que la ocludina, también se unen con las proteínas citosólicas de la ZO para anclarse al citoesqueleto de actina. Sin embargo, las claudinas no sólo contribuyen a la formación de las fibrillas que propician una unión hermética entre las células epiteliales, sino que además, contribuyen a la formación de canales selectivos de iones (Turksen y Troy, 2004). En el intestino, las claudinas-1, -3, -4, -5, -7, -8 y -12 refuerzan las TJ y disminuyen la permeabilidad paracelular, mientras que la claudina-2 juega un papel opuesto formando poros paracelulares (Lu et al., 2013). Un aumento de la expresión de claudina-2 en las células epiteliales se correlaciona con el aumento de la permeabilidad celular que contribuye al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales y al cáncer de colon. Algunos patógenos bacterianos entéricos como *Salmonella* pueden aumentar el mRNA de claudina-2 para provocar la alteración de la estructura de las TJ y facilitar la invasión bacteriana (Zhang et al., 2013).

Las JAMs, son proteínas transmembrana glicosiladas que pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig), conservan dos dominios extracelulares de tipo Ig, una única

región transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal. La familia JAM se divide en dos subgrupos basados en las similitudes de sus secuencias. El primer subgrupo está constituido por JAM-A, JAM-B y JAM-C, y el segundo subgrupo está formado por *coxsackie*, el receptor de adenovirus (CAR), la molécula de adhesión selectiva de células endoteliales (ESAM) y JAM4. Ambos grupos contienen en su extremo C-terminal dominios de unión a ZO-1 o a integrinas. Las JAM-A, JAM-B y JAM-C interactúan con las integrinas  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$  (LFA-1),  $\alpha\text{4}\beta\text{1}$  (VLA-4) y  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$  (Mac-1) y al igual que otras proteínas transmembrana, también interactúan con los filamentos de actina. Dado que las JAMs se expresan en células endoteliales, epiteliales y células sanguíneas, funcionan como moléculas de adhesión célula-célula no sólo entre los mismos tipos de células sino también entre tipos distintos de células a través de interacciones homofílicas y heterofílicas. Las interacciones homofílicas JAM-A o JAM-B regulan la formación de TJ funcionales mientras que las interacciones JAM heterofílicas juegan un papel en la adhesión de leucocitos-células epiteliales o endoteliales. En las células del epitelio intestinal, JAM-A, JAM-4 y CAR participan en la formación de las TJs y regulan la función de barrera reduciendo la permeabilidad paracelular (Ebnet et al., 2004).

La tricelulina es una proteína formada por cuatro dominios transmembrana. Su secuencia C-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos es 32% idéntica a la de la ocludina y su dominio citoplasmático N-terminal es más largo. Mediante *splicing* alternativo se generan múltiples isoformas de la tricelulina. Esta proteína es regulada por fosforilación y participa en la función de barrera epitelial (Chiba et al., 2008).

Las ZO son un grupo importante de proteínas citosolicas implicadas en el agrupamiento y en la estabilización de las proteínas transmembrana. Tal como ya se ha indicado anteriormente se dividen en 3 subtipos estrechamente relacionados: la ZO-1, ZO-2 y ZO-3 con un tamaño de 220, 160 y 130 kDa, respectivamente. Las ZO contienen tres dominios PDZ (PDZ1, PDZ2, PDZ3). El dominio PDZ1 de las proteínas ZO interactúa con las claudinas, PDZ2 interactúa con otras proteínas ZO para formar dímeros y PDZ3 interactúa con las JAMs. Estas proteínas forman una estructura de placa subyacente a la membrana plasmática que actúa como un andamiaje que conecta las proteínas transmembrana, en sus extremos C-terminal, con el anillo de actina-miosina, una estructura del citoesqueleto formada por actina-F y miosina II (una proteína motora), que convierte la energía química del ATP en energía mecánica. Este conjunto de proteínas rodean el polo apical de las células epiteliales y proyectan filamentos de actina que interactúan con las TJ, por lo tanto, las contracciones del sistema actina-miosina también contribuyen a regular la estructura de las TJ y la permeabilidad paracelular. Las proteínas ZO desempeñan un papel central en la función de las TJ porque pueden interactuar con complejos de señalización para regular la reorganización del citoesqueleto, la polaridad celular, la señalización celular y el tráfico de vesículas (Groschwitz y Hogan, 2009; Turksen y Troy, 2004; Ulluwishewa et al., 2011).

La integridad de las TJ juega un papel crítico en la patogénesis de las enfermedades intestinales y sistémicas. La disrupción de la barrera epitelial o un defecto en el ensamblaje o funcionamiento de las TJ propicia un aumento en la permeabilidad de citoquinas pro-inflamatorias, antígenos y patógenos que pueden deteriorar la barrera intestinal generando como resultado un estado de inflamación crónico y como consecuencia daño tisular. Por el contrario, algunos factores alimentarios, nutrientes y factores secretados por la microbiota comensal y probióticos pueden participan en la regulación de las TJ y algunos de ellos podrían ser utilizados y desarrollados como herramientas preventivas y terapéuticas en las enfermedades asociadas con una barrera intestinal defectuosa.

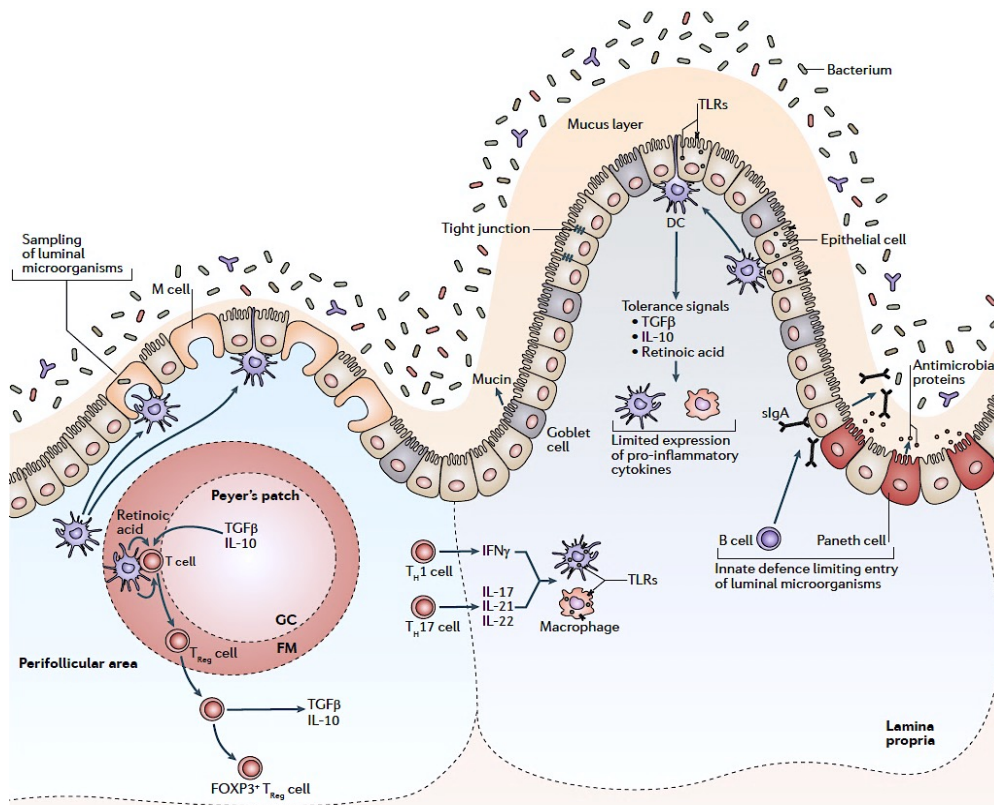
### **1.1.1.3. Sistema inmunitario**

Como se ha descrito anteriormente, el tracto gastrointestinal está expuesto a un entorno de constante cambio coordinado por la presencia de alimentos y antígenos microbianos (de bacterias comensales o patógenos), que puede ser beneficioso o perjudicial para el huésped. Este entorno dinámico representa un desafío para el sistema inmunitario intestinal. Por esta razón el organismo ha desarrollado mecanismos de defensa a diferentes niveles que van desde la tolerancia, la supresión o la inmunidad activa, que en su conjunto, aseguran el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Las alteraciones en el sistema inmunitario intestinal derivadas de deficiencias nutricionales o de alteraciones en la composición de la microbiota (disbiosis), pueden comprometer la funcionalidad de las células inmunitarias aumentando el riesgo de infección y conduciendo a estados patológicos como son las alergias alimentarias y las enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Agace y McCoy, 2017; Groschwitz y Hogan, 2009).

El ambiente intestinal modula la diferenciación del sistema inmunológico para controlar la defensa contra los patógenos y la tolerancia a las especies comensales. El sistema inmunitario incluye tres compartimentos diferenciables anatómicamente: estructuras organizadas (placas de Peyer y folículos linfoides), GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) y el epitelio superficial (FIGURA 1.6). Las estructuras organizadas son lugares de inducción de la respuesta, mientras que la lámina propia y el epitelio contienen células maduras y efectoras.

En primer lugar, la inmunidad innata proporciona la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores y confiere protección al desencadenar respuestas inflamatorias y antimicrobianas. En la vía que induce la inmunidad innata, la detección microbiana por parte de las células epiteliales, células dendríticas (DC) y macrófagos se produce por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a bacterias

comensales y patógenos (PAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tales como los receptores de tipo Toll (TLRs) ligados a membrana, los receptores citosólicos de tipo NOD (NLRs) y receptores de lectina tipo C (CLR). En general, los PRR detectan a los microorganismos a través de sus estructuras características, como son lipoproteínas (reconocidas por TLR1, TLR2 y TLR6), lipopolisacárido (reconocido por TLR4), componentes del peptidoglicano (reconocido por NOD-1 y NOD-2), DNA bacteriano, RNA (reconocido por TLR3 y TLR7) y flagelina (reconocido por TLR5) (Von Bernuth et al., 2008). Tras la unión del ligando, los TLR a través de la proteína adaptadora MyD88, inician una cascada de señalización que finalmente conduce a la activación y entrada de factores de transcripción al núcleo celular. Entre estos factores está el factor nuclear kappa beta ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ). Estos factores activan en el núcleo la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos. Los receptores intracelulares NOD, por su parte, pueden modular la apoptosis y las respuestas inflamatorias (Jacobs y Braun, 2014; Lavelle et al., 2010; Muniz et al., 2012)



**FIGURA 1.6. Composición y mecanismos de tolerancia y defensa del sistema inmune intestinal.** El sistema inmune intestinal está compuesto por las placas de Peyer, folículos linfoides, GALT y receptores presentes en las células epiteliales. Los mecanismos de defensa inmunitaria limitan la entrada de microorganismos en los tejidos intestinales. La activación de los PRRs sobre las células inmunes induce vías que median la muerte microbiana, activan células proinflamatorias y células inmunitarias adaptativas. Imagen obtenida de Bron et al., 2011.



Por otra parte, la inmunidad adaptativa está contenida dentro de la lámina propia y en las Placas de Peyer del intestino delgado. La lámina propia es un tejido muy vascularizado y con drenaje linfático, cuyas funciones incluyen la de facilitar la distribución sistémica de nutrientes, establecer tolerancia inmune hacia antígenos ino cuos y microbianos, y proporcionar defensa inmune contra los organismos patógenos que surgen de las poblaciones bacterianas que habitan en el lumen intestinal. Por encima de las Placas de Peyer se encuentran las células M que censan constantemente a los microorganismos o a los antígenos lumbinales y los transportan desde la luz intestinal hasta el tejido linfoide subyacente de los domos de los folículos. Las Placas de Peyer y los folículos están separados por tejido conectivo y células inmunitarias, predominantemente células B (células presentadoras de antígeno (APCs) que producen anticuerpos, incluyendo la inmunoglobulina A (IgA), macrófagos, células dendríticas (DC) y células T (Caballero y Pamer, 2015; Mowat y Agace, 2014).

Las APCs presentan los antígenos procesados a los linfocitos T activando la expansión de clones de células T más afines al antígeno. De esta manera, las células T dan lugar a la formación de distintos linfocitos *helper* (Th) como son los Th1 y Th2; o a las T reguladoras (TReg). Las células TReg desempeñan un papel central en la inmunotolerancia porque segregan citoquinas reguladoras de carácter antiinflamatorio como la interleuquina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), en respuesta a antígenos que se reconocen como no patógenos, evitando así, desencadenar reacciones inflamatorias que producirían lesiones en el tejido intestinal del huésped (Coombes y Powrie, 2008; Guarner, 2011).

Los macrófagos y las DCs presentes en la lámina propia del intestino grueso y del intestino delgado son células fagocitarias con una alta actividad. Los macrófagos están implicados principalmente en la eliminación de desechos celulares y patógenos, pero también pueden actuar como APCs para iniciar la inmunidad adaptativa, mientras que las DCs son APCs especializadas que regulan tanto la inmunidad adaptativa como innata. Las DC juegan un papel importante en determinar si la respuesta a un antígeno particular será inflamatoria o antiinflamatoria. Se encuentran a lo largo de la lámina propia y en las Placas de Peyer en un estado inmaduro que puede activar la vía del NF- $\kappa$ B, lo que conduce a la maduración, activación y exposición de las DC a los PAMPs y a otros estímulos. Las DCs activadas maduras expresan moléculas coestimuladoras, entre ellas CD80 y CD86. Estas pueden modular la activación, la expansión clonal y la diferenciación de las células T (Bron et al., 2011; Mcdermott y Huffnagle, 2014).

La interacción entre el epitelio, los macrófagos y las DCs en respuesta a la microbiota luminal, y la resultante diferenciación y proporción de células T, conducen a la

homeostasis intestinal. Cada barrera inmunitaria en el intestino contiene una serie de células inmunes que controlan la inmunidad de los tejidos, de esta manera, el sistema inmune innato y el sistema adaptativo forman una línea de defensa esencial para eliminar la microbiota que haya superado las barreras anteriores (Muniz et al., 2012).

### 1.1.2. COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DE LA MICROBIOTA HUMANA

#### 1.1.2.1. Composición de la microbiota

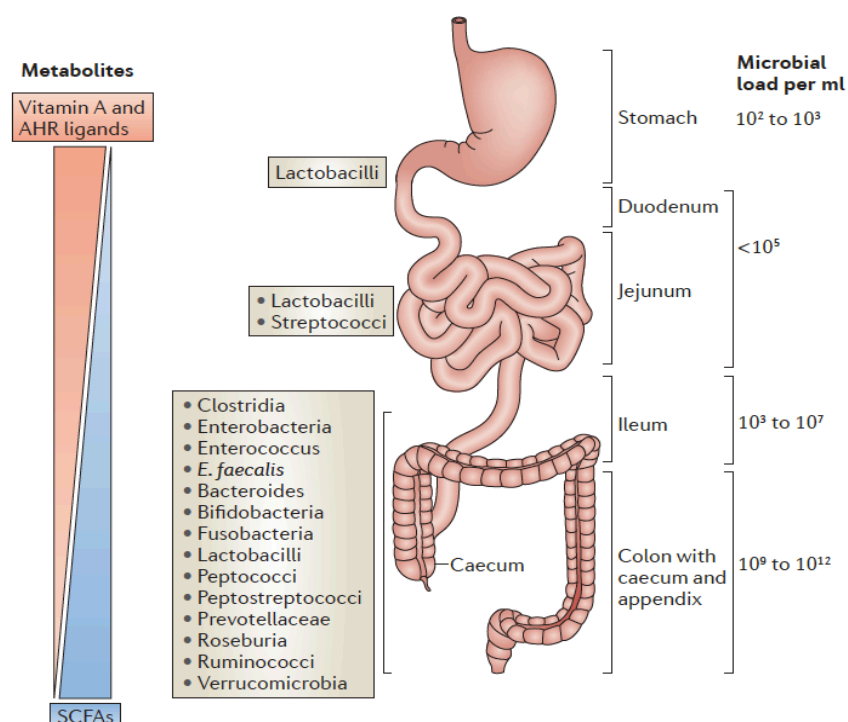
La microbiota intestinal humana está compuesta de un número aproximado de  $10^{14}$  microorganismos, la gran mayoría bacterias comensales, que en su conjunto conforman un total de 500 a 1000 especies diferentes. La mayoría de las especies microbianas que habitan en el tracto gastrointestinal son organismos anaerobios estrictos y, por tanto difíciles de cultivar *in vitro*, lo que en el pasado ha supuesto una limitación importante de cara a establecer la composición y distribución de la microbiota intestinal. No obstante, los métodos moleculares modernos como la secuenciación a gran escala del RNA ribosómico 16S a partir de RNA bacteriano amplificado extraído de heces o de biopsias intestinales, el desarrollo de sondas moleculares para la hibridación *in situ* fluorescente, los microarrays y las técnicas de secuenciación masiva de DNA han permitido recientemente identificar y clasificar las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal. La mayoría de los miembros de esta amplia comunidad microbiana pertenecen al dominio Bacteria, aunque también se encuentran los dominios Archaea, virus y formas eucariotas como las levaduras. Así mismo, los principales *phylum* en los que se distribuyen la mayoría de las especies son Firmicutes (gram-positivos), Bacteroidetes (gram-negativos), Proteobacteria (gram-negativos) y Actinobacteria (gram-positivos) (O'Hara y Shanahan, 2006).

La distribución y densidad de la microbiota es diferente a lo largo del intestino dependiendo de las condiciones ambientales particulares de cada sección. De manera general, la densidad microbiana aumenta desde el tracto gastrointestinal superior hasta el inferior, es decir, aumenta a medida que se desciende dentro del tracto gastrointestinal hasta que alcanza su máximo de colonización en el colon que contiene la mayor diversidad y carga microbiana (FIGURA 1.7). Esta variación también se presenta entre la mucosa y el lumen, donde la mucosa parece albergar una microbiota diferente. Además, la proporción de microorganismos anaerobios / aerobios es menor en las superficies mucosas que en el lumen (Agace y McCoy, 2017).

En el estómago las secreciones ácidas destruyen la mayor parte de los microorganismos ingeridos, impidiendo la colonización, cuyos valores oscilan entre  $10^2$  y  $10^3$  bacterias/ml.



Las actividades motoras propulsivas del intestino delgado proximal, así como las secreciones biliares y pancreáticas dificultan también la colonización de esta parte del sistema digestivo que cuenta con un número aproximado de  $10^5$  bacterias/ml. Las especies aeróbicas son predominantes en el intestino delgado superior. De manera progresiva la densidad bacteriana aumenta a lo largo del yeyuno y del íleon, desde alrededor de  $10^4$  bacterias/ml en el yeyuno hasta  $10^7$  bacterias/ml en el extremo ileal, con un predominio de aerobios gram-negativos y algunos anaerobios estrictos. Finalmente, el intestino grueso es el sitio principal de la colonización microbiana en el cuerpo humano. En el colon el tiempo de tránsito es más lento (de entre 2 y 4 días) lo que brinda a los microorganismos la oportunidad de proliferar, fermentando los sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas. Las estimaciones sugieren que la tasa de colonización del colon es elevada, de alrededor de  $10^{11}$ - $10^{12}$  microorganismos /gr de contenido luminal (concentración  $10^5$  veces mayor que en el íleon), lo que contribuye al 60% de la masa fecal. Además, el colon es el sitio de mayor diversidad de especies, observándose marcadas diferencias entre las especies encontradas en el colon proximal y distal. El colon está poblado mayoritariamente por bacterias anaerobias debido a la baja concentración de oxígeno presente (Guarner, 2011; O'Hara y Shanahan, 2006; Tiihonen et al., 2010).



**FIGURA 1.7. Distribución de los géneros bacterianos más comunes en los diferentes compartimentos del tracto gastrointestinal.** La distribución y densidad de la microbiota bacteriana, expresada en bacterias por ml, es diferente en cada sección anatómica a lo largo del tracto gastrointestinal. Imagen obtenida de Mowat y Agace, 2014.

Las variaciones en la composición de la microbiota no solo se manifiestan a lo largo del eje del tracto gastrointestinal, sino también entre individuos. Estudios taxonómicos a nivel de especie han revelado que existe una gran riqueza y una gran variabilidad bacteriana a nivel inter-individual, de forma que podemos considerar que cada individuo es un huésped con un perfil bacteriano único.

Antes del nacimiento, los seres humanos crecen y se desarrollan en el ambiente controlado que proporciona el útero materno, de tal manera que el intestino fetal es estéril. La colonización microbiana comienza durante la ruptura de las membranas y la iniciación del nacimiento y está influenciada por el tipo de parto, la dieta infantil, los niveles de higiene y la medicación. Las enterobacterias y las bifidobacterias son los colonizadores tempranos, aunque existen diferencias en la composición de la microbiota intestinal inicial dependiendo de la alimentación de los lactantes, es decir, entre los lactantes alimentados con leche materna y los alimentados con leche de fórmula. Posteriormente, los grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal vienen con el destete y con la introducción de alimento sólido. Por lo tanto, los cambios más drásticos en la composición de la microbiota intestinal tienen lugar en la infancia y se caracteriza por la inestabilidad. Después de esto, sólo se producen cambios relativamente pequeños y ya se pueden diferenciar los microorganismos que están presentes de manera estable en la microbiota de un individuo denominados "núcleo individual", de los que son detectados en la microbiota de la mayoría de las personas llamado "núcleo común". La individualidad y estabilidad de la microbiota intestinal se mantiene a lo largo de la edad adulta del huésped, produciéndose de nuevo cambios en la vejez. Un estudio comparativo de la microbiota en adultos ha conducido a establecer patrones que permiten diferenciar la población en 3 enterotipos distintos de acuerdo con la distribución y prevalencia de los 3 géneros siguientes: *Bacteroides* (enterotipo tipo 1), *Prevotella* (enterotipo tipo 2) y *Ruminococcus* (enterotipo tipo 3). Esta categorización parece ser independiente del sexo, edad, nacionalidad o índice de masa corporal de los individuos. Aunque la base para este tipo de agrupamiento aún no se encuentra definida, se supone que podría estar relacionada principalmente con los patrones dietéticos. Por ejemplo, el enterotipo tipo 1 ha sido asociado con una dieta rica en proteínas y grasa, y en contraste el enterotipo tipo 2 se asocia más con el consumo de hidratos de carbono. Sin embargo, se supone que otros factores, además de la dieta, como son la ingesta de fármacos, la exposición a antibióticos, los viajes y el estilo de vida, forman parte de las variables que determinan y explican la composición de la flora fecal individual (Becker et al., 2015; Robles-Alonso y Guarner, 2013a; Robles-Alonso y Guarner, 2013b).

### **1.1.2.2. Funciones de la microbiota**

La importancia de la microbiota y su influencia sobre la fisiología intestinal ha sido demostrada en estudios comparativos de animales libres de gérmenes (*germ-free*) y de animales colonizados. Las funciones generales de la microbiota se clasifican en metabólicas, estructurales y de protección.

#### **1.1.2.2.1. Función metabólica**

La microbiota intestinal desempeña un importante papel en el desarrollo y funcionamiento óptimo de las actividades metabólicas del huésped y contribuye a mantener la salud y el estado de bienestar. En la actualidad se acepta que la microbiota intestinal proporciona una actividad metabólica colectiva igual a un órgano. Por ello se le puede considerar como un órgano dentro de otro órgano. De hecho, análisis metagenómicos recientes indican que el genoma bacteriano comensal (metagenoma) supera ampliamente el genoma humano (hasta 500 veces), lo que implica que la gran variedad de genes microbianos codifiquen miles de funciones biológicas que interactúan de forma bidireccional con las funciones biológicas del huésped (O'Hara y Shanahan, 2006; Sonnenburg y Bäckhed, 2016).

De esta manera, los simbioses pueden mejorar la capacidad del huésped para adquirir nutrientes del medio o proporcionar las vías para la síntesis de compuestos orgánicos esenciales. La gran mayoría de las bacterias en el colon son anaerobios estrictos y, por lo tanto, derivan energía de la fermentación de sustratos no digeribles, tales como carbohidratos vegetales complejos (fibra dietética), suministrando energía y nutrientes para ambas comunidades, el huésped y las bacterias simbioses. Las células epiteliales en el colon distal obtienen el 60-70% de sus requerimientos energéticos de los productos de fermentación bacteriana. Durante la fermentación se producen metabolitos esenciales como son la biotina, vitamina K y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como el acetato, propionato y butirato. El butirato es de particular interés ya que puede modular el crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales. Los SCFA también contribuyen a la homeostasis del huésped acidificando el pH luminal e inhibiendo así el crecimiento de patógenos (Robles Alonso y Guarner, 2013a; Sonnenburg y Bäckhed, 2016).

#### **1.1.2.2.2. Función estructural**

La microbiota fortifica la barrera intestinal induciendo la síntesis de IgA y promoviendo el fortalecimiento de las TJ entre las células.

---

Además, la presencia de la microbiota en el intestino tiene un impacto decisivo sobre el desarrollo y maduración del sistema inmunitario. Para mantener un óptimo sistema de defensa, el huésped ha de interpretar de manera precisa el ambiente luminal para distinguir los organismos comensales de los patógenos y generar señales que se transmiten a las células inmunocompetentes del tejido subyacente, para así regular la activación de una respuesta inmune que controle la invasión o para mantener un estado de inmunotolerancia frente a bacterias comensales. Las interacciones entre los microorganismos, el epitelio y los tejidos linfoides intestinales son múltiples, continuas y con características diversas, de modo que adaptan constantemente los mecanismos locales y sistémicos de la inmunidad al ambiente microbiano (Garrett et al., 2010).

La activación de los mecanismos de defensa depende en primer lugar del reconocimiento rápido de los patrones moleculares asociados a bacterias comensales y patógenos, a través de receptores que detectan componentes estructurales de las bacterias o virus. Esto se realiza en el medio extracelular mediante los TLR de la membrana y en el medio intracelular mediante los receptores intracelulares, como por ejemplo de tipo NOD, entre otros. La activación de estos receptores impulsa vías de señalización que llevarán a la secreción de citoquinas y quimioquinas que actuarán como sensores generando la respuesta innata y adaptativa. En segundo lugar, las células M censan los microorganismos que atraviesan la capa densa de mucus, los captan y los presentan al tejido linfoide subyacente que contiene las células presentadoras de antígeno. Estas células presentan los antígenos a los linfocitos T dando lugar a la estimulación de linfocitos T *helper* encargados de secretar citoquinas anti-inflamatorias reguladoras (IL-10, TGF-beta) que mantendrán un estado de inmunotolerancia frente a las bacterias de la microbiota. Como tercera línea de defensa, las células dendríticas intestinales pueden muestrear directamente el contenido intestinal extendiendo dendritas entre los enterocitos superficiales sin interrumpir las TJ, pueden ingerir a las bacterias comensales, procesarlas y presentar los antígenos a otras células del sistema inmunitario presentes en los ganglios linfáticos mesentéricos donde se induce una respuesta inmune local a las bacterias comensales (O'Hara y Shanahan, 2006; Guarner, 2011).

#### **1.1.2.2.3. Función protectora**

La microbiota comensal ejerce un papel de resistencia frente a la colonización de bacterias oportunistas ya que compite por la disponibilidad de nutrientes. Además, la microbiota comensal es capaz de inducir la síntesis y liberación de proteínas o péptidos antibacterianos por parte del epitelio intestinal. Las células *Paneth*, los colonocitos, los

neutrófilos del colon entre otros, pueden expresar moléculas antimicrobianas (lectinas de tipo C, defensinas y catelicidinas) que funcionan en la defensa del huésped. Las defensinas son los péptidos antimicrobianos más ampliamente expresados. Las proteínas antimicrobianas son moléculas efectoras fundamentales de inmunidad innata, estas proteínas tienen actividad antibiótica directa contra una amplia gama de bacterias y otros microbios, y son retenidas en la capa de mucus limitando el acceso de los microorganismos. La función de muchas de estas proteínas consiste en inhibir la adhesión, causar la muerte bacteriana a través de enzimas que actúan sobre la pared bacteriana, o en competir por la captación de hierro (lipocalina 1). La expresión de estas proteínas está regulada por diferentes señales bacterianas y algunas se expresan constitutivamente (Bevins, 2006; Garrett et al., 2010).

Si bien la microbiota intestinal tiene importantes funciones fisiológicas, también puede ser una amenaza considerable para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, ya que alteraciones en la distribución de las especies que la componen (disbiosis) se han asociado con enfermedades metabólicas, autoinmunidad, alergias y cáncer. Las técnicas de secuenciación masiva recientes han permitido obtener información detallada sobre la composición y dinámica de la microbiota y asociar determinados cambios fisiológicos y fisiopatológicos con la presencia, ausencia, número y distribución relativa de cepas bacterianas en el intestino. Parece existir una variación sustancial en los niveles de colonización de ciertos grupos microbianos en diferentes enfermedades o patologías. Así por ejemplo, en determinadas disbiosis se observa como bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* disminuyen mientras que los géneros *Fusobacterium*, o *Clostridium*, así como bacterias coliformes y los enterococos incrementan. Sin embargo, la relación directa de estos desequilibrios con el desarrollo de las enfermedades aún se desconoce. Actualmente, se están estudiando nuevas estrategias para revertir el desequilibrio en la microbiota y potenciar su efecto beneficioso sobre la salud intestinal. Algunas de las opciones terapéuticas prometedoras incluyen la manipulación de la microbiota intestinal a través del trasplante de microbiota fecal o a través de la administración de probióticos. Ambas estrategias van encaminadas a corregir la disbiosis y restablecer la homeostasis intestinal (Baumler y Sperandio, 2016; Becker et al., 2015; Caballero y Pamer, 2015; Tiihonen et al., 2010).

## 1.2. PROBIÓTICOS

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron en 2001 la definición de probióticos, como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades

adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped.

El primer informe científico sobre las bacterias probióticas data de 1907, cuando Elie Metchnikoff, ganador del premio Nobel, observó una correlación entre la ingesta de bacterias productoras de ácido láctico en el yogur y una mayor longevidad en las poblaciones de campesinos búlgaros. Al mismo tiempo, Henry Tissier señaló que la población microbiana gastrointestinal de los bebés sanos amamantados contenía una bacteria en forma de "Y" denominada "Bifidus", la cual estaba ausente en los bebés alimentados con leche de fórmula y que padecían de diarrea. Pero no fue hasta 1994, cuando la Organización Mundial de la Salud consideró que los probióticos podrían constituir un sistema de defensa inmunitaria importante cuando los antibióticos comúnmente administrados no eran efectivos debido al desarrollo de resistencias (Alok et al., 2017; Bron et al., 2011).

La acumulación de evidencias científicas obtenidas a lo largo de los años de estudios *in vivo*, *in vitro* y ensayos clínicos demuestra los efectos beneficiosos de los probióticos en la mejora y prevención de los trastornos intestinales y sistémicos, tales como la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros, la prevención de la diarrea asociada a antibióticos, la diarrea infecciosa aguda en adultos, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome de colon irritable, alergias, obesidad, diabetes tipo 2 y diferentes tipos de cáncer. Para ejercer dichos efectos beneficiosos sobre el intestino los probióticos regulan y mejoran la ecología microbiana, la supervivencia de células epiteliales, la función inmune (para combatir tanto alergias como la exposición a sustancias tóxicas) y la función de barrera (previniendo la colonización por parte de patógenos). Por estas razones, la administración de probióticos posee un gran potencial como agente terapéutico o como una alternativa al tratamiento estándar de las enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, la enorme complejidad de las relaciones entre las microbiota y las células del intestino ha dificultado descifrar los mecanismos de acción de los probióticos, que al día de hoy siguen siendo discutidos y se encuentran bajo investigación. Se conocen bien los efectos de los probióticos, pero en muchos casos se desconoce cuáles son los factores microbianos y las bases moleculares que median estos efectos, lo que puede limitar el uso de probióticos en la preservación de la salud. Por todo ello, el campo de la investigación en probióticos ha progresado hacia estudios moleculares de las interacciones entre el huésped y los microorganismos, pero todavía se requiere la caracterización exhaustiva y detallada de las moléculas bacterianas (inmunomoduladoras) que median las respuestas moleculares y fisiológicas del huésped (Becker et al. 2015).

Actualmente, el gran interés por las bacterias probióticas ha conducido a un aumento

en la producción de alimentos funcionales y de medicamentos que contienen estas bacterias. Dado su origen intestinal, estas bacterias sensibles se enfrentan a enormes desafíos para estar en un estado altamente viable durante el procesamiento, almacenamiento y tránsito gastrointestinal hasta llegar al sitio de acción en el intestino humano. La formulación más común de los probióticos es como productos frescos de fermentación o como suplementos bacterianos liofilizados. Aunque el número de bacterias que se requieren para generar una respuesta deseada en el huésped varía dependiendo de la cepa, formulación y tipo de aplicación, generalmente se recomienda que los productos probióticos contengan al menos  $10^7$  microorganismos / gr o ml. Como los probióticos deben llegar vivos a su sitio de destino, la preparación comercial de los cultivos probióticos debe permitir que las bacterias sobrevivan a las condiciones de estrés durante la producción industrial incluyendo el estrés oxidativo, térmico, osmótico y por disolvente, así como a las tensiones del procesamiento a los que se ven sometidos durante la liofilización. Las tensiones a las que se enfrentan los probióticos continúan después de la preparación, ya que se requiere que las células sobrevivan durante la vida útil del producto. Adicionalmente, después del consumo se encuentran condiciones de estrés durante el tránsito a través de las diferentes partes del tracto gastrointestinal del consumidor, incluyendo el bajo pH gástrico, la exposición a la bilis y a enzimas digestivas en el duodeno. Sin embargo, como todas las bacterias, las probióticas conservan un gran número de mecanismos moleculares para combatir el estrés ambiental, a menudo letal, que encuentran durante el procesamiento y después de la ingesta (Corcoran et al., 2008; Bron et al., 2011).

Es importante señalar que los efectos y beneficios para la salud ejercidos por los probióticos son específicos de la cepa. Las propiedades de una cepa no se pueden extrapolar a otra, ni siquiera a cepas de la misma especie. Los probióticos predominantes son las bacterias, aunque también se pueden encontrar en menor medida las levaduras. Los probióticos más comúnmente utilizados provienen principalmente de los géneros gram-positivos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque otras especies como el probiótico gram-negativo *Escherichia coli* Nissle 1917 se utilizan también (Tabla 1.1). Se han identificado más de 100 especies de *Lactobacillus* como *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. Rhamnous* y *L. salivarius* que producen enzimas hidrolíticas para metabolizar proteínas e hidratos de carbono. Otras especies de *Lactobacillus* ayudan en la síntesis de vitamina B, vitamina K, favorecen la descomposición de las sales biliares, ayudan en la mejora de la inmunidad innata y adquirida, así como también, contribuyen a la inhibición de mediadores proinflamatorios. La fórmula probiótica VSL#3 (Ewaschuk et al., 2008) que consiste en una mezcla de *Streptococcus thermophilus*, 4 especies de *Lactobacillus*, y 3 especies de *Bifidobacterium* mejora la colitis inducida por DSS en un modelo animal. Así mismo,



cepas como *E. coli* Nissle 1917 (Wang et al., 2014; Toloza et al., 2015), *L. Plantarum* (Anderson et al., 2010), *L. acidophilus* y *S. thermophilus* mejoran la función de barrera intestinal (determinada por el aumento en la resistencia eléctrica transepitelial (TER)) en monocapas de células epiteliales de intestino humano, y la combinación de los dos últimos atenúa la disrupción de barrera inducida por *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) en células HT29 (Resta-Lenert y Barrett, 2003). *L. plantarum* DSM 2648 reduce el efecto negativo de *E. coli* enteropatógena (EPEC) sobre la TER y reduce su adhesión a células de epitelio intestinal Caco-2 (Anderson et al., 2010). El pretratamiento con *L. rhamnosus* GG previene la disminución de TER inducida por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y contraresta la redistribución de las proteínas de TJ en células T-84 (Johnson-Henry et al., 2008).

**Tabla 1.1. Probióticos utilizados comúnmente.** Tabla modificada de Alok et al., 2017.

| <i>Lactobacillus</i> sp.             | <i>Bifidobacterium</i> sp.          | Otras                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>     | <i>Bifidobacterium animalis</i>     | <i>Bacillus cereus</i>                    |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LGG) | <i>Bifidobacterium infantis</i>     | <i>Saccheromyces boulardii</i>            |
| <i>Lactobacillus gasseri</i>         | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i>              |
| <i>Lactobacillus casei</i>           | <i>Bifidobacterium longum</i>       | <i>Streptococcus thermophilus</i>         |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>         | <i>Bifidobacterium breve</i>        | <i>Streptococcus salivarius</i>           |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i>      | <i>Bifidobacterium termophilum</i>  | <i>Clostridium butyricum</i>              |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>       |                                     | <i>Propionibacterium freundendreichii</i> |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i>       |                                     | <i>Ruminococcus gnavus</i>                |
| <i>Lactobacillus lactis</i>          |                                     |                                           |
| <i>Lactobacillus brevis</i>          |                                     | <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917       |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>      |                                     |                                           |

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

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), es una bacteria probiótica gram-negativa identificada y descrita en 1917 por el Dr. Alfred Nissle de Friburg, Alemania. A pesar de presentar el serotipo (O6: K5: H1) característico de las cepas de *E. coli* asociadas a infecciones del tracto urinario, no es patógena. Esta cepa fue aislada de las heces de un soldado, que a diferencia de sus compañeros, sobrevivió a un brote de diarrea causado por *Shigella*, durante la Primera Guerra Mundial. Desde principios de la década de 1920, se vende en Europa central como un agente probiótico, registrado con el nombre de "Mutaflor®". Se administra para el tratamiento de diversas enfermedades del tracto gastrointestinal en humanos. Su uso ha sido recomendado para la prevención de enfermedades

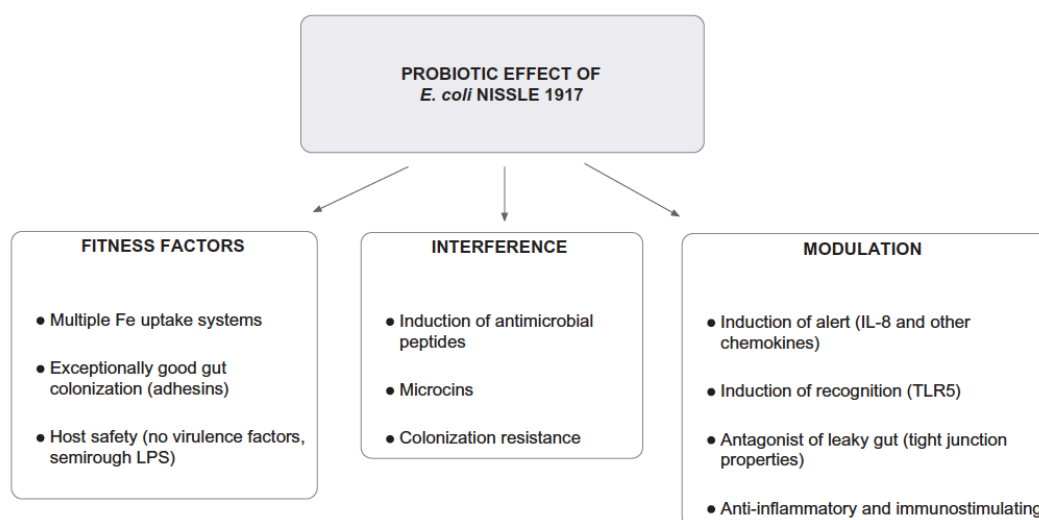


diarreicas causadas por patógenos como *Shigella*, *Salmonella* o *E. coli*. Es particularmente eficaz en el tratamiento enfermedades infecciosas del intestino incluyendo la diarrea en niños, la diarrea asociada con VIH y en el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa. Esta cepa es un buen colonizador del intestino humano y permanece en el colon durante meses después de la administración. Así mismo, afecta positivamente la homeostasis gastrointestinal y el equilibrio microbiano. EcN promueve la modulación anti-inflamatoria de la respuesta inmune y refuerza la función de la barrera epitelial a través de la regulación positiva y redistribución de las proteínas de TJ. Además, cumple con todos los requisitos necesarios para ser reconocido como un organismo seguro para uso humano (Jacobi y Malfertheiner, 2011; Scaldaferri et al., 2016).

Con el fin de analizar las propiedades de EcN se han realizado diversos estudios que han permitido su caracterización tanto a nivel fenotípico como a nivel genético. EcN presenta un lipopolisacárido (LPS) semi-rugoso con cadenas laterales de O6 acortadas que le confiere sensibilidad al suero. No produce toxinas conocidas, y su flagelo le permite, junto con la expresión de varias adhesinas y fimbrias, competir eficazmente con patógenos para los sitios de unión en el intestino del huésped. El genoma EcN ha sido secuenciado (tamaño del genoma 5,441,200 pb) y se estima que contiene 5,324 secuencias codificantes. Los análisis genómicos comparativos indican que EcN proviene de un ancestro uropatógeno, al igual que cepa *E. coli* CFT073 y que mediante procesos evolutivos tales como delecciones, inserciones (mediante transferencia horizontal de genes) y mutaciones en su genoma, ha perdido factores de virulencia y en cambio ha ganado genes que le confieren su capacidad probiótica. EcN contiene en su genoma 108 secuencias codificantes específicas, 166 secuencias que están ausentes en CFT073 y posee alrededor de 903 secuencias codificantes ausentes en la cepa de laboratorio de *E. coli* K-12, MG1655. Los genes vinculados a la peculiaridad genómica de EcN se agrupan principalmente en cuatro grandes islas genómicas y muchos otros grupos de genes más pequeños. EcN cuenta con un amplio repertorio de factores de adaptación o *fitness* que promueven su competitividad, lo que probablemente explica su éxito como probiótico. Entre estos factores se encuentran microcinas, sistemas de captación de hierro, adhesinas y proteasas que contribuyen a la colonización del intestino. Sin embargo, a pesar de las exitosas aplicaciones terapéuticas de EcN, sólo se dispone de información limitada de algunos estudios experimentales sobre los mecanismos moleculares y celulares subyacentes responsables de los efectos beneficiosos sobre el huésped (Cress et al., 2013; Grozdanov et al., 2004; Reister et al., 2014; Sun et al., 2005).

### 1.2.1.1. Mecanismos vinculados con el efecto probiótico de EcN

La falta de factores de virulencia específicos de cepas uropatógenas, tales como la  $\alpha$ -hemolisina y adhesinas del tipo P-fimbria, combinado con la expresión de un gran número de factores *fitness*, factores de interferencia y factores moduladores (FIGURA 1.8), hacen de EcN una cepa probiótica capaz de ejercer diversos efectos beneficiosos sobre el huésped.



**FIGURA 1.8.** Efectos probióticos de *Escherichia coli* Nissle 1917. Imagen obtenida de Trebichavsky et al., 2010.

En primer lugar, los factores *fitness* están constituidos por una amplia variedad de proteínas y moléculas que promueven la competitividad bacteriana, la supervivencia y contribuyen a la colonización del intestino humano. Dentro de los factores *fitness* se encuentran seis sistemas diferentes de captación de hierro que resultan ventajosos para que EcN pueda competir con otras bacterias intestinales por la adquisición de hierro dentro del sistema gastrointestinal, donde este metal es limitante. Es de destacar que el hierro es necesario para mantener la viabilidad celular y la adaptación de la bacteria al medio intestinal. Se encuentran además, la expresión de varias adhesinas tales como FimA, F1C y curli que aumentan su adhesión a las células epiteliales y, por tanto, a la colonización y persistencia en el tracto intestinal del huésped (FIGURA 1.9). Las adhesinas FimA y F1C son muy importantes en la formación de biofilms (Lasaro et al., 2009).

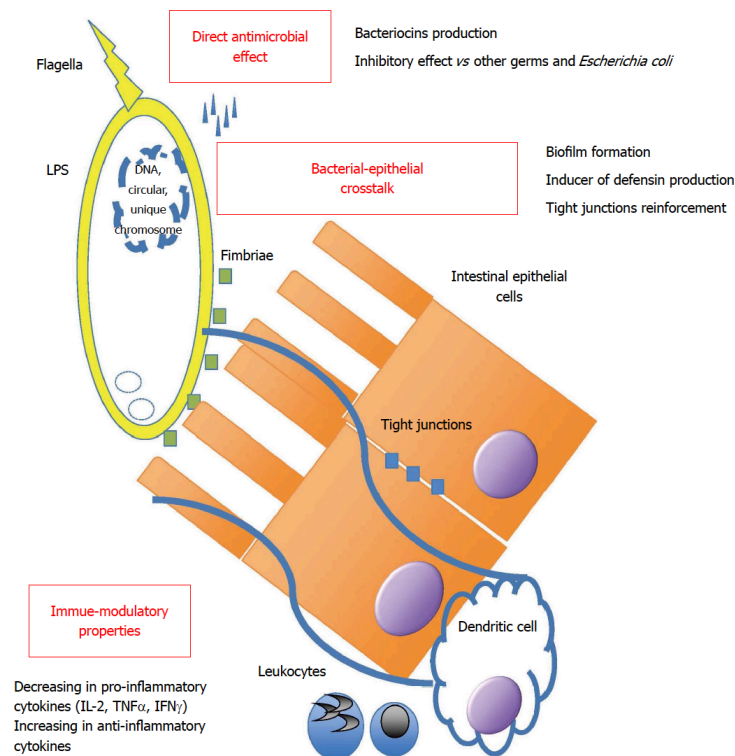
En segundo lugar, los factores de interferencia de EcN consisten en mecanismos antimicrobianos que interfieren con la invasión de las células epiteliales intestinales humanas por diferentes patógenos bacterianos. Estos mecanismos incluyen la producción de dos microcinas (MccH47 y MccM) que son eficaces en la competencia

contra enterobacterias antagónicas; y la síntesis de proteasas que pueden ayudar a su supervivencia y a su capacidad de colonizar eficazmente el intestino humano (Jacobi y Malfertheiner, 2011).

Por último, los factores de modulación de EcN regulan la expresión de las respuestas antimicrobianas ejercidas por las células de la mucosa intestinal. Por un lado, EcN interacciona y modula el sistema inmunitario promoviendo una disminución de las citoquinas proinflamatorias (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) y el aumento en las citoquinas antiinflamatorias (FIGURA 1.9). Este probiótico puede además reducir la expansión de células T recién reclutadas en la mucosa intestinal y disminuir la inflamación intestinal, pero no afecta a las células T activadas vinculadas al tejido, lo que permite eliminar los antígenos deletéreos con el fin de mantener la homeostasis inmunológica (Scaldaferri et al., 2016). Por otra parte, EcN posee una proteína estructural del flagelo, la flagelina H1 biológicamente muy efectiva que es reconocida por el receptor de membrana TLR5. La señalización de TLR5 induce la secreción de interleuquina-8 (IL-8) por parte de los enterocitos. IL-8 es una citoquina antimicrobiana relevante que actúa como un quimioatrayente de neutrófilos, asegurando la fagocitosis de patógenos *in situ*. La flagelina H1 también activa la respuesta del huésped para contrarrestar la adhesión e invasión de patógenos a través de la síntesis del péptido antimicrobiano inducible  $\beta$ -defensina-2 humana (hBD-2) (Schlee et al., 2007). Este péptido antimicrobiano posee un gran espectro de acción sobre microorganismos gram-negativos, gram-positivos, levaduras y virus. Adicionalmente, EcN expresa en su superficie celular un polisacárido capsular, llamado antígeno K5, típico de cepas *E. coli* patógenas del sistema urinario y causantes de infecciones extraintestinales. Esta cápsula media la interacción de EcN con los enterocitos del huésped e induce varias quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la CCL5 (o RANTES) que atrae a células T, eosinófilos y basófilos, las proteínas inflamatorias de macrófagos 2- $\alpha$  y 2- $\beta$  (MIP-2 $\alpha$  y MIP-2 $\beta$ ) y la proteína inducible IFN- $\gamma$ . Estimula también la expresión de TLR5, moléculas CD14 importantes para el reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos y las moléculas de señalización MyD88 y TRIF junto con la inducción de IL-8 en células epiteliales intestinales. La pérdida de este polisacárido capsular reduce drásticamente el nivel de inducción de quimioquinas después de la interacción con el huésped (Hafez et al., 2009).

Dentro de los efectos moduladores de este probiótico se encuentra también la capacidad de mejorar la integridad de barrera del epitelio intestinal, a través de fortalecer las TJ de células epiteliales adyacentes mediante la regulación positiva de varios de sus componentes (FIGURA 1.9). Estudios *in vivo* e *in vitro* han revelado que EcN promueve una mayor expresión de las proteínas ZO-1, ZO-2 (Ukena et al., 2007;

ZyreK et al., 2007), aunque los factores microbianos que median estos efectos no son todavía conocidos. Más recientemente se ha descrito que EcN media la regulación positiva de la proteína claudia-14 de las TJ, y este efecto ha sido atribuido a la proteína TcpC (Hering et al., 2014).



**FIGURA 1.9. Estructura y mecanismos básicos de acción de *Escherichia coli* Nissle 1917.** LPS: lipopolisacárido; IL - 2: interleuquina - 2; TNF: Factor de necrosis tumoral; IFN: Interferón. Imagen obtenida de Scaldaferri et al., 2016.

Por otra parte, se ha observado que EcN aporta también un efecto protector contra los reordenamientos de las proteínas de TJ de las células epiteliales intestinales inducidos por la infección con patógenos tales como EPEC o *Salmonella* (Otte y Podolsky, 2004). La destrucción y reordenamiento de las TJ conduce a un estado conocido como "intestino permeable", que se caracteriza por el incremento en la permeabilidad paracelular que provoca la translocación de microorganismos y sus productos a través del epitelio intestinal, lo que conduce al desarrollo de enfermedades inflamatorias y probablemente a otras alteraciones graves. En modelos murinos de colitis experimental inducida por DSS (sulfato sódico de dextrano), el tratamiento con EcN reduce la pérdida de peso corporal así como el daño macroscópico y microscópico asociado a la colitis, mejora el índice de actividad de la enfermedad y contrarresta el incremento de permeabilidad intestinal a través de la regulación positiva de proteínas de TJ, (Kamada et al., 2005, Ukena et al., 2007). En los ensayos realizados sobre monocapas de células

epiteliales como modelo de barrera dañada por la infección con EPEC, se observó que la co-incubación de EPEC con EcN o la adición de EcN después de EPEC, inhibió la disociación de ZO-2 de la estructura de las TJ, resultando en una protección significativa frente a la disfunción de la barrera intestinal promovida por este patógeno (Zyrek et al., 2007).

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

Una de las estrategias desarrolladas por las bacterias gram-negativas para facilitar su interacción con otras células bacterianas, así como con las células del huésped, es la producción y secreción de vesículas de membrana externa (OMVs). Particularmente en el contexto del sistema gastrointestinal, donde las bacterias que constituyen la microbiota no se encuentran en contacto directo con las células epiteliales del huésped debido a la existencia de barreras físicas y químicas que lo protegen, la secreción de OMVs representa claramente un mecanismo para interactuar con el huésped. Las OMVs pueden difundir a través de la capa de mucina y por tanto permiten la interacción a distancia con las células epiteliales, evitando el riesgo y las desventajas del contacto intercelular directo. En general, la liberación de vesículas facilita la interacción de la bacteria con una amplia área de su entorno sin gastar energía en moverse y permite que las OMVs accedan a ambientes que son inaccesibles a toda la bacteria. A diferencia de otros sistemas de secreción, las OMVs pueden actuar como vehículos de entrega y transferir una gama diversa de moléculas bioquímicamente activas a células proximales, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y factores de virulencia. De hecho, es bien conocido que las OMVs pueden entrar y liberar su carga dentro de las células huésped. De esta manera, a parte de las proteínas secretadas por la microbiota, las OMVs son capaces de difundir a través de la capa de mucina, acceder al epitelio y modular su función (Ellis y Kuehn, 2010; Donoghue y Krachler, 2016; Kuehn y Kesty, 2005).

Las OMVs se identificaron por primera vez en la década de 1960, mientras se realizaba una observación de bacterias gram-negativas mediante microscopía electrónica. En un principio se creyó que las OMVs correspondían a restos celulares derivados de la muerte celular, pero más tarde se descubrió que las OMVs contenían proteínas recién sintetizadas y que se liberaban sin que existiera lisis bacteriana. En los últimos 40 años de investigación se ha demostrado que las OMVs son liberadas por las bacterias gram-negativas durante todas las fases de crecimiento en los diversos entornos en los que las bacterias residen, ya sean cultivos de laboratorio en medio líquido o en agar, en entornos naturales incluyendo los fluidos y tejidos del huésped. En la actualidad se acepta que las OMVs son un sistema de secreción generalizado utilizado por todas las

bacterias, si bien los mecanismos moleculares implicados en su producción, así como algunas de sus funciones son todavía poco conocidos (Bonnington y Kuehn, 2014; Lee et al., 2016; Unal et al., 2011).

Las OMVs son estructuras membranosas de forma esférica con un tamaño que varía entre 10 a 300 nm de diámetro. Y como su nombre indica, se originan a partir de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, y por tanto, están formadas por una bicapa lipídica. La capa exterior de la membrana externa (OM) está compuesta principalmente de lipopolisacárido (LPS), mientras que el folíolo o capa interna está compuesto de fosfolípidos. Las OMVs contienen además glicerofosfolípidos, proteínas de la membrana externa, así como componentes del periplasma bacteriano, aunque también se ha observado la presencia de proteínas de la membrana interna, proteínas citosólicas, además de metabolitos, DNA y RNA (Ellis y Kuehn, 2010; MacDonald y Kuehn, 2012).

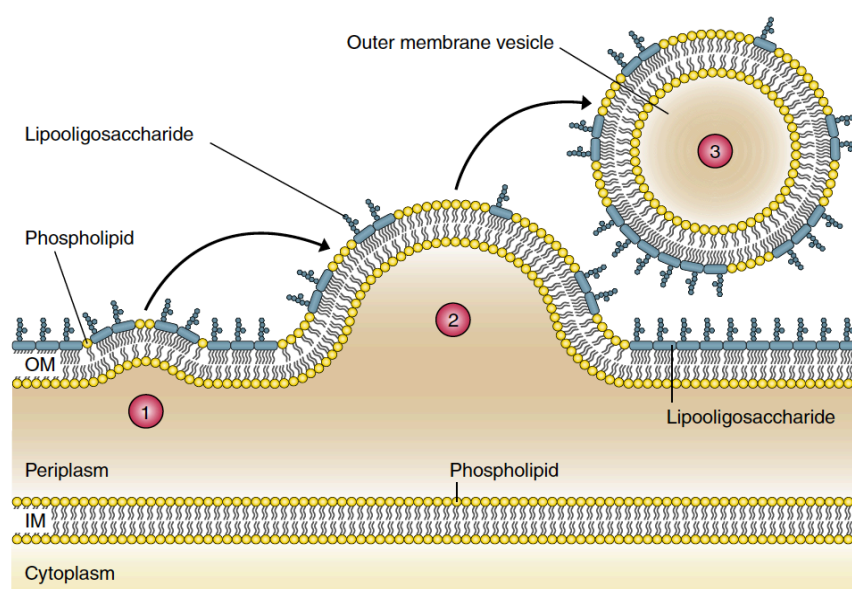
Las OMVs se consideran una vía de secreción insoluble de moléculas biológicamente activas en un ambiente protegido de las condiciones externas. Estas vesículas están preparadas para desempeñar un amplio rango de funciones relacionadas con procesos biológicos involucrados tanto en la patogénesis y adhesión a las células del huésped, como en la supervivencia bacteriana frente a situaciones de estrés. Entre estas funciones está su contribución a la formación de *biofilms*, *quorum sensing*, adquisición de nutrientes, transferencia horizontal de genes, secreción de proteínas y mediadores diversos que contribuyen a la activación y/o supresión inmunológica tras su internalización en las células huésped (Kulp y Kuehn, 2010; Mashburn y Whiteley, 2005).

### 1.3.1. BIOGÉNESIS DE LAS OMVs

En base a diversos estudios genéticos, bioquímicos y microscópicos, se han sugerido varios modelos para explicar la biogénesis de las OMVs. Estos modelos están basados en alteraciones en la unión covalente del peptidoglicano a la membrana externa (OM) como consecuencia de la acumulación de fragmentos de peptidoglicano o proteínas mal plegadas en el periplasma, que ejercen presión hacia la OM, lo que conduce a su curvatura y posterior liberación de vesículas al medio extracelular. Otros modelos proponen que debido a las diferencias en la tasa de crecimiento entre la pared celular y la membrana externa, surgen regiones con interacciones pared-membrana externa relajadas dando paso a la formación de vesículas (Lee et al., 2016; Zhou et al., 1998).

Estos modelos dependen de condiciones de estrés o manipulación genética, y no siempre son aplicables a todas las bacterias gram-negativas. Recientemente se ha

descrito un nuevo modelo basado en la acumulación de fosfolípidos en la cara externa de la OM, que promueve la curvatura hacia el exterior generando la vesiculación (FIGURA 1.10) (Roier et al., 2016). La asimetría de la OM (LPS en la cara exterior y fosfolípidos en la cara interna) se mantiene gracias a un sistema de transporte tipo ABC muy conservado en las bacterias gram-negativas. Mutaciones en este sistema o condiciones de crecimiento que reprimen su expresión incrementan la producción de OMVs. La limitación de hierro, condición habitual en los tejidos del huésped, es uno de los factores que regula negativamente la expresión del sistema de transporte de fosfolípidos. Precisamente, para muchos patógenos la producción de OMVs incrementa en los estados iniciales de la infección. Este modelo puede representar un mecanismo general aplicable a todas las bacterias gram-negativas, incluso las de la microbiota intestinal, puesto que la asimetría de la OM depende en todas ellas de la función y regulación de este sistema de transporte.



**FIGURA 1.10. Modelo general de formación de OMVs en bacterias gram-negativas.** Etapa 1: Acumulación de fosfolípidos en la cara exterior de la membrana externa (OM) como consecuencia de la expresión reducida del sistema de transporte de fosfolípidos. Etapa 2: La expansión asimétrica en la membrana externa inicia una curvatura hacia fuera. Etapa 3: La protuberancia en la membrana externa se aprieta en su base para formar una OMV que finalmente es liberada. Esta vesícula está enriquecida en fosfolípidos incorporados a la envuelta externa. Imagen obtenida de Roier et al., 2016.

### 1.3.2. REGULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE OMVs

Actualmente, no se conoce ninguna condición de crecimiento en la que no ocurra la formación de OMVs, (Kulp y Kuehn, 2010), aunque ciertas variaciones pueden tener un



efecto drástico sobre su producción. Las bacterias producen vesículas en todas las fases del crecimiento celular; sin embargo, durante la fase exponencial la producción es más elevada puesto que la alta tasa de división celular conlleva al aumento de la tasa de crecimiento de la pared bacteriana, lo que favorece la vesiculación. Las especies patógenas generalmente liberan más OMVs que sus contrapartes no patógenas, posiblemente como una adaptación para mejorar su virulencia (Rakoff-Nahoum et al., 2014).

La producción de OMVs puede también variar en función de los cambios ambientales. En particular, los niveles de vesiculación aumentan durante las situaciones de estrés bacteriano, tales como las que se experimentan durante la colonización de los tejidos del huésped (Ellis y Kuehn, 2010). Asimismo, las altas temperaturas (que hacen a las membranas más fluidas), el tratamiento con antibióticos (gentamicina y cloranfenicol), la presencia de péptidos antimicrobianos, la limitación de nutrientes como lisina y  $Mg^{2+}$ , la infección por bacteriófagos y el estrés que sufre la envoltura celular debido a la acumulación de proteínas en el periplasma, causan una sobreproducción de OMVs (Unal et al., 2011).

Adicionalmente, la producción de OMVs puede estar regulada por determinados genes. Recientemente, se ha demostrado que determinados mutantes para las proteínas de la envoltura celular producen un fenotipo de hipovesiculación o hipervesiculación. Las mutaciones en los genes *ypjA* y *nlpA* reducen significativamente la producción de vesículas (Kulp y Kuehn, 2010). Por el contrario, la mutación del gen *tolR* en la cepa EcN promueve un incremento en la producción de OMVs (Pérez-Cruz et al., 2016).

### 1.3.3. VIAS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS OMVs

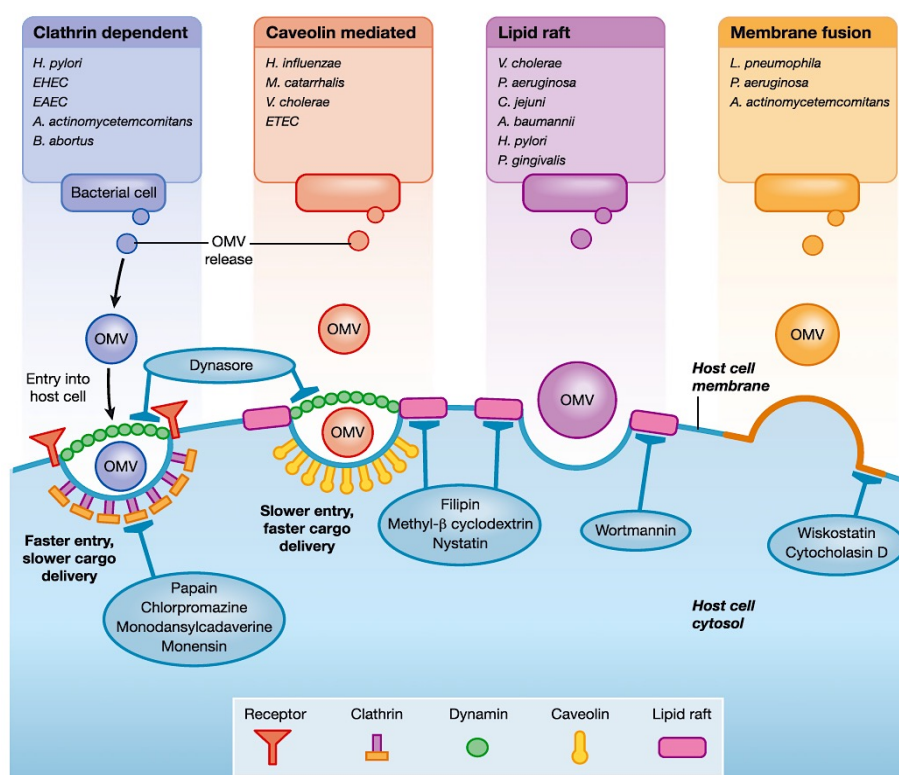
El mecanismo principal que permite que las OMVs atraviesen la membrana de una célula huésped para entrar en ella y liberar su contenido es la endocitosis. La endocitosis se diferencia en tres vías principales dependiendo de la composición y procedencia de las vesículas: endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis mediada por caveolina o través de balsas lipídicas. Las OMVs de tamaño superior a  $1\mu m$  pueden internalizarse dentro de la célula huésped mediante la fusión de membranas (FIGURA 1.11) (Donoghue y Krachler, 2016).

La vía de la endocitosis mediada por clatrina se produce a través de la formación de fosas revestidas con clatrina de hasta 200 nm de diámetro en la superficie de las células epiteliales y se desencadena por unión de un ligando a los receptores de la superficie



celular. La entrada de OMVs a través de esta vía puede ser inhibida mediante el uso de fármacos tales como la clorpromazina que previene la formación de fosas revestidas con clatrina o mediante inhibidores de la dinamina que evitan la escisión del endosoma de la membrana (FIGURA 1.11) (Vercauteren et al., 2010).

Se ha descrito que las OMVs de determinadas cepas patógenas que transportan factores de virulencia utilizan la endocitosis mediada por clatrina para entrar en la célula huésped a través de las interacciones toxina-receptor, como es el caso de la toxina *shiga*, la toxina del cólera y la adhesina *arg-gingipain* (RgP) de *Porphyromonas gingivalis*. En el caso de las OMVs derivadas de cepas de la microbiota intestinal de humanos, se ha descrito que particularmente la cepa probiótica EcN y la cepa comensal *E. coli* ECOR12 también se internalizan en las células epiteliales del huésped a través de endocitosis mediada por clatrina (Cañas et al., 2016).



**FIGURA 1.11. Vías de internalización de las OMVs en las células huésped.** Las vías de internalización de OMVs pueden requerir zonas recubiertas de clatrina, formación de caveolas, uso de balsas lipídicas o fusión directa de membrana. La entrada de las OMVs puede verse afectada por el uso de inhibidores contra componentes de estas vías. Imagen obtenida de Donoghue y Krachler, 2016.

Otra de las vías de internalización utilizada por las OMVs de una gran variedad de especies es la vía de las balsas lipídicas también llamadas *lipid rafts*. Las balsas lipídicas

son dominios de la membrana plasmática enriquecidas con esfingolípidos y colesterol. El agrupamiento de dichos dominios permite la formación de invaginaciones en la célula huésped, dando lugar a la entrada de vesículas y otras partículas. Los dominios ricos en colesterol son interrumpidos por el uso de sustancias químicas como la metil- $\beta$ -ciclodextrina que secuestra el colesterol de la membrana celular, o la filipina y nistatina que se unen al colesterol e impiden la formación de las balsas lipídicas (FIGURA 1.11) (Pelkmans, 2005; Vercauteren et al., 2010).

La vía de internalización mediada por caveolina se produce cuando las balsas lipídicas se enriquecen con caveolina. La oligomerización de la caveolina permite la formación de invaginaciones en forma de cueva en la membrana celular de alrededor de 80 nm de diámetro, denominadas caveolas. Al igual que en la endocitosis mediada por clatrina, la dinamina está involucrada en la escisión de las invaginaciones de la membrana, permitiendo la internalización de las caveolas (FIGURA 1.11). Se ha sugerido esta vía como el mecanismo preferencial de invasión para muchos patógenos, ya que se piensa que las caveolas internalizadas evitan su fusión con los compartimentos lisosómicos y su posterior degradación facilitando su presencia dentro de la célula (Pelkmans, 2005; Rewatkar et al., 2015).

Finalmente, la internalización mediante la fusión de membranas se describe como otro de los mecanismos utilizados por las OMVs para entrar en las células huésped, a pesar de que las membranas de las OMVs y de las células epiteliales sean constitutivamente diferentes. Esta vía está restringida a vesículas con tamaño superior a 1  $\mu$ m (Bomberger et al., 2009).

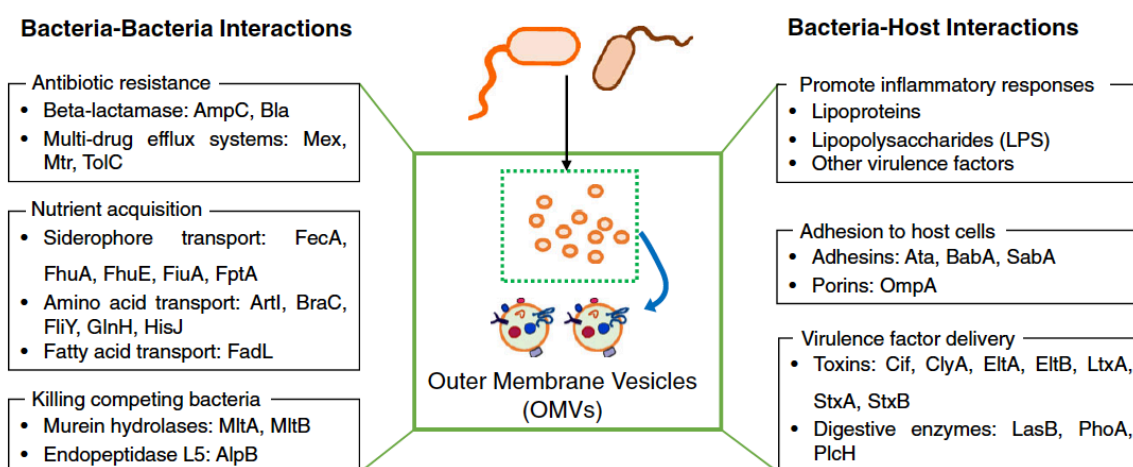
#### 1.3.4. FUNCIONES DE LAS OMVs

La investigación sobre la composición molecular de las OMVs ha permitido deducir sus funciones. De hecho, las proteínas asociadas a las vesículas contribuyen significativamente a esas funciones, y por lo tanto ha habido muchos esfuerzos encaminados a su identificación. Mediante métodos bioquímicos incluyendo PAGE seguida de tinción de proteínas y análisis proteómicos realizados en los últimos años, se han identificado miles de proteínas presentes en las OMVs (Lee et al., 2016).

La mayoría de los estudios que describen las funciones de las OMVs se centran en aquellas que derivan de cepas virulentas. Sin embargo, en los últimos cinco años ha existido un interés creciente en estudiar las funciones de las OMVs derivadas de cepas comensales, así como en deducir cuál es su papel dentro de la regulación de la homeostasis intestinal.

### 1.3.4.1. Funciones de las OMVs provenientes de cepas patógenas

En cuanto a las OMVs provenientes de cepas patógenas, se ha descrito que estas contienen una amplia variedad de factores de virulencia que incluyen toxinas y enzimas, así como antígenos no proteicos tal como el LPS (Kuehn y Kesty, 2005). Estos factores presentes en las OMVs son utilizados para mediar la interacción bacteria-bacteria o bacteria-huésped ya sea estimulando directamente a las células diana o transfiriendo su contenido (FIGURA 1.12) (Lee et al., 2016).



**FIGURA 1.12. Funciones fisiopatológicas de las OMVs de bacterias gram-negativas.** Se propusieron las funciones de OMVs bacterianas gram-negativas en base a las proteínas vesiculares identificadas. Imagen obtenida de Lee et al., 2016.

Dentro de las diversas capacidades de las OMVs para interactuar con otras bacterias se encuentran la resistencia a los antibióticos, la eliminación de bacterias competidoras y la adquisición de nutrientes. Las vesículas permiten el intercambio de productos bacterianos tales como el DNA resistente a DNasas y enzimas. Por ejemplo, las OMVs derivadas de *P. aeruginosa* y *Moraxella catarrhalis* transfieren la enzima  $\beta$ -lactamasa a las bacterias sensibles a los antibióticos betalactámicos (como penicilinas y cefalosporinas) para contribuir a su supervivencia. Las vesículas de *P. aeruginosa* y *Shigella flexneri* integran LPS de forma estable, a las superficies de otras bacterias gram-negativas. Las bacterias gram-negativas pueden eliminar a las bacterias competidoras, que se encuentran en el mismo nicho ecológico, mediante la secreción de factores antimicrobianos a través de las OMVs. Las proteínas que median el transporte de sideróforos, aminoácidos y ácidos grasos, así como la xilanasas y celulasas (encontradas en algunas vesículas) pueden ayudar a que las OMVs participen en la adquisición de nutrientes y, por lo tanto, proporcionan una ventaja de supervivencia para las bacterias

(Ellis y Kuehn, 2010).

Por otra parte, las OMV desempeñan varias funciones durante las interacciones bacteria-huésped, tales como la inducción de respuestas inflamatorias, la adhesión a las células epiteliales y la administración de toxinas y otros factores de virulencia a las células huésped. Las OMVs contienen varios patrones moleculares asociados a patógenos, incluyendo lipoproteínas y LPS, que contribuyen a promover respuestas inflamatorias en el huésped. Además, las OMVs liberadas por una cepa patógena podrían causar inflamación aumentada, resultando en la exposición de las proteínas de la matriz extracelular del huésped y en la regulación positiva de los receptores de la superficie de las células epiteliales que son beneficiosas para la colonización por otras cepas. Por lo tanto, se entiende que los cambios proinflamatorios mediados por las vesículas en el tejido huésped pueden allanar el camino para la adherencia y supervivencia de patógenos colonizadores. Algunas OMVs transportan una gran cantidad de adhesinas (Ata, BabA y SabA) y porinas (OmpA) que les ayudan a interactuar con la membrana plasmática del huésped y permiten que se fusionen con la membrana de las células huésped para que puedan internalizarse o suministren su carga a las células eucariotas. Además, las OMVs portan diversos factores de virulencia tales como la toxina citolisina (ClyA) de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la toxina vacuolizante (VacA) de *Helicobacter pylori*, la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* y la hemolisina (Hly) de *Salmonella typhi*. También contienen enzimas digestivas como la fosfatasa alcalina, elastasa, y fosfolipasa hemolítica C que pueden desempeñar funciones en la modulación de la respuesta inmune del huésped. Las toxinas y enzimas empaquetadas dentro de las OMVs tienen varias ventajas sobre sus homólogos solubles o asociados a células, ya que se encuentran inmersas en un mecanismo de protección contra las proteasas y los anticuerpos del huésped, evitando su degradación y permitiendo aumentar su estabilidad (Bomberger et al., 2009; Ellis y Kuehn, 2010; Haurat et al., 2015; Kesty y Kuehn, 2004).

#### **1.3.4.2. Funciones de las OMVs provenientes de cepas comensales**

El papel de las OMVs producidas por cepas de la microbiota humana ha recibido mucha atención en los últimos años. Recientemente se ha demostrado que contribuyen a la salud intestinal ya sea mediante la inmunomodulación de las respuestas del huésped o mediante la obtención de nutrientes para los microorganismos de la microbiota (Haurat et al., 2015).

Estudios recientes aportan evidencias sobre la importancia de las OMVs como

herramientas de suministro de moléculas moduladoras en el intestino. Por ejemplo, en el caso de los miembros del género *Bacteroides* (conocido por contribuir a la salud intestinal), se encontró que el transporte de ciertos polisacáridos a través de las OMVs activan la secreción de interleucina-10 a través de las células T reguladoras, lo que resulta ser importante para la inmunotolerancia del huésped. Por otra parte, se demostró que las OMVs de algunos miembros del género *Bacteroides* están involucradas en una compleja red dedicada al procesamiento de nutrientes en el intestino humano. Mediante análisis proteómicos se ha revelado el empaquetamiento selectivo de un gran número de carbohidratos y enzimas con actividad hidrolasa en respuesta a estímulos externos. Los monosacáridos, oligosacáridos y aminoácidos resultantes de la actividad de las enzimas hidrolíticas están disponibles para que otras bacterias los utilicen y de esta manera pueden ayudar a asegurar los nutrientes en beneficio de toda la comunidad bacteriana presente en la microbiota (Elhenawy et al., 2014). También se propone que las OMVs son importantes para establecer unidades ecológicas organizadas dentro de la microbiota intestinal (Rakoff-Nahoum et al., 2014). Estos indicios apoyan fuertemente que las OMVs ejercen un papel clave en el establecimiento y equilibrio de la microbiota intestinal.

El análisis del proteoma de las OMVs de la cepa probiótica EcN permitió identificar 192 proteínas, 41 codificadas por genes vinculados exclusivamente a la cepa, 57 comunes a vesículas derivadas de patógenos y 94 descritas en vesículas de *E. coli* K-12, en concreto de la cepa de laboratorio DH5 $\alpha$ . Las funciones de las proteínas encontradas se relacionaron con la adhesión, la modulación del sistema inmunitario y la supervivencia bacteriana, lo que proporcionó pruebas de que las OMVs derivadas de probióticos contienen proteínas que pueden dirigir estas vesículas al huésped y mediar sus efectos beneficiosos sobre la función intestinal (Aguilera et al., 2014).

Sin embargo, es de importancia científica proporcionar una visión más profunda sobre el papel de las OMVs derivadas de cepas comensales y probióticas sobre la interacción huésped- microbiota y mejorar nuestra comprensión sobre sus mecanismos de acción. En este sentido, nuestro grupo ha sido pionero en el análisis de las funciones de las OMVs de EcN y de cepas comensales de *E. coli*. En concreto se ha demostrado que las OMVs de estas cepas se internalizan en las células del epitelio intestinal a través de endocitosis mediada por clatrina (Cañas et al., 2016) y que pueden modular la respuesta de citoquinas/quimiocinas de células epiteliales e inmunitarias intestinales en modelos celulares *in vitro* y *ex vivo* (Fábrega et al., 2016). En esta tesis se analizó el efecto de las OMVs sobre la función de barrera intestinal.

## 2. OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

El probiótico *E. coli* Nissle 1917 (EcN) ejerce un efecto positivo sobre la función de la barrera epitelial intestinal a través de varios mecanismos, entre los que se encuentra la regulación de proteínas de *tight junctions* (TJ). Sin embargo, los factores microbianos que median estos efectos no son del todo conocidos. Los factores secretados por la microbiota tienen un papel relevante en la modulación de la homeostasis intestinal ya que pueden difundir a través de la capa de mucina y acceder a las células del epitelio. Entre los factores secretados por las bacterias gram-negativas se encuentran las vesículas de membrana de externa (OMVs).

El objetivo general de esta tesis fue determinar el efecto de las OMVs y de los factores secretados en forma libre por la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (EcN) y por otras cepas comensales de *E. coli* sobre la regulación de la barrera epitelial intestinal, a nivel de TJ.

Los objetivos específicos fueron:

1. Seleccionar cepas comensales de la colección ECOR con capacidad de reforzar la barrera epitelial.
2. Analizar el efecto de factores secretados (OMVs y factores solubles) aislados de EcN y ECOR63 sobre la regulación de la barrera epitelial intestinal en un modelo celular *in vitro* de barrera intacta:
  - Impacto sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TER).
  - Regulación de la expresión y distribución subcelular de proteínas de TJ.
3. Analizar el efecto de factores secretados (OMVs y factores solubles) aislados de EcN y ECOR63 sobre la regulación de la barrera epitelial intestinal en un modelo celular *in vitro* de barrera dañada por infección con *E. coli* enteropatógena EPEC:
  - Protección frente a la disminución de la TER.
  - Determinar cambios en la expresión de proteínas de TJ.
  - Analizar el reordenamiento de las proteínas de TJ a nivel subcelular.





### **3. MATERIALES**

---



### 3. MATERIALES

#### 3.1. CEPAS BACTERIANAS

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

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

| CEPA                   | DESCRIPCIÓN                                                                                                                                 | REFERENCIA               |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>EcN</b>             | Probiótico, aislado natural de humanos, serotipo (06:K5:H1A1), grupo B2                                                                     | Ardeypharm, Alemania     |
| <b>EcNtcpC::kan</b>    | Mutante <i>knockout</i> del gen <i>tcpC</i> derivado de EcN                                                                                 | Este estudio y Ochman    |
| <b>EcoR63</b>          | Aislada de heces de humano sano, serotipo (ON:HNM), grupo B2                                                                                | Selander (1984)          |
| <b>EcoR63tcpC::kan</b> | Mutante <i>knockout</i> del gen <i>tcpC</i> derivado de EcoR63                                                                              | Este estudio             |
| <b>EcoR12</b>          | Aislada de heces de humano sano, serotipo (O7:H32), grupo A                                                                                 | Ochman y Selander (1984) |
| <b>XL1-Blue</b>        | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac1<sup>q</sup>ZΔM15Tn10(Tc<sup>R</sup>)]</i>                                 | Stratagene               |
| <b>TOP 10</b>          | <i>F<sup>-</sup> ΔmcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i> | Invitrogen               |
| <b>E2348/69</b>        | EPEC, <i>wild type</i> , serotipo (O127:H6)                                                                                                 | Donnenberg               |
| <b>DH5αF'</b>          | <i>φ80d lacZΔM15 recA1 endA1 λ- gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- mK+) phoA supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169</i>                                | Gibco BRL                |
| <b>EB6193</b>          | <i>RP4-2 tet: Mu -1 kan::Tn7 leu-63::IS10 recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA(ΔMul):pir+ thi Sp<sup>R</sup>/Sm<sup>R</sup></i>            | R. A Bender              |
| <b>S17(λpir)</b>       | <i>Tp<sup>R</sup> Sm<sup>R</sup> recA thi pro hsdR hsdM<sup>+</sup> RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 λ</i>                                             | Biomedal                 |
| <b>BL-21 (DE3)</b>     | <i>E. coli B, F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3)</i>                               | Amersham Pharmacia       |

### 3.2. VECTORES

Para la realización de este trabajo se han utilizado vectores plasmídicos principalmente para el clonaje de genes y construcción de mutantes por disrupción génica mediante recombinación homóloga.

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

| VECTOR                                   | APLICACIÓN                                                                                                   | DESCRIPCIÓN                                                                                                                                           | REFERENCIA            |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>pUC18 Not</b>                         | Plásmido auxiliar para la clonación con dianas <i>NotI</i>                                                   | Amp <sup>R</sup> , $\alpha$ -LacZ; región de clonación flanqueada por dianas <i>NotI</i>                                                              | Biomedal              |
| <b>pKD4</b>                              | Obtención del <i>Cassette</i> de Km                                                                          | Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , ori, promotor R6K, FRT- <i>kan</i> -FRT                                                                         | Datsenko et al., 2000 |
| <b>pUTminiTn5Tc</b>                      | Mutagénesis dirigida                                                                                         | Amp <sup>R</sup> , <i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RP4, <i>tnp</i> <sup>*</sup> , mini-Tn5 Tc.                                                             | Biomedal              |
| <b>pKD46</b>                             | Expresión de la recombinasa $\lambda$ Red a partir de un promotor inducible por arabinosa.                   | Amp <sup>R</sup> , promotor <i>ara</i> BP-gam-bet-exo, genes $\lambda$ Red <i>recombinasa</i> . Sensible a temperatura $\leq 32$ °C.                  | Datsenko et al., 2000 |
| <b>pBAD-TOPO</b>                         | Vector de clonación del tipo TA para la expresión de proteínas fusionadas al epítipo V5 y His <sub>6</sub> . | Amp <sup>R</sup> , <i>ori</i> pBR322, gen <i>ara</i> C, promotor <i>ara</i> BAD ( <i>P</i> <sub>BAD</sub> ), V5 <i>epitope tag</i> , His <i>tag</i> . | Invitrogen            |
| <b>pGEX-3X</b>                           | Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST.                                                      | GST <i>tag</i> , Amp <sup>R</sup> , <i>laqI</i> <sup>q</sup>                                                                                          | Amersham Pharmacia    |
| <b>PFU34</b>                             | Fusión de promotor al gen reportero <i>gfpmut3.1</i> .                                                       | Amp <sup>R</sup> gen reportero <i>gfpmut3.1</i> .                                                                                                     | Uliczka, 2011         |
| PLÁSMIDO RECOMBINANTE                    | APLICACIÓN                                                                                                   | DESCRIPCIÓN                                                                                                                                           | REFERENCIA            |
| <b>pUC18Not- <i>TcpC</i></b>             | Expresión de la proteína <i>TcpC</i>                                                                         | Gen <i>tcpC</i> clonado en PUC18Not                                                                                                                   | Este estudio          |
| <b>pBAD-TOPO-<br/><i>TcpC</i>-V5-His</b> | Expresión y purificación de la proteína <i>TcpC</i>                                                          | Gen <i>tcpC</i> clonado en pBAD-TOPO                                                                                                                  | Este estudio          |
| <b>pGEX-<i>TcpC</i></b>                  | Expresión y purificación de GST- <i>TcpC</i>                                                                 | Gen <i>tcpC</i> clonado en pGEX-3X                                                                                                                    | Este estudio          |

|                      |                                                                                     |                                 |              |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| (PFU34- $\phi$ tcpC) | Clonación del promotor de <i>tcpC</i> fusionado al gen reportero <i>gfpmut3.1</i> . | Promotor de <i>tcpC</i> clonado | Este estudio |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------|

### 3.3. LÍNEAS CELULARES

- **T-84:** Células epiteliales derivadas de carcinoma colorectal humano. *American Type Culture Collection*; CCL-248.
- **Caco-2:** Células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colón humano. *American Type Culture Collection*; ATCC HTB-37.

### 3.4. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la máxima pureza. La conservación (temperatura, humedad, efecto de la luz) y manipulación (esterilidad, toxicidad, preparación extemporánea) se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante. Los *kits* utilizados han sido suministrados por diferentes casas comerciales, según se detallará oportunamente y salvo que se indique lo contrario, se siguieron los protocolos en ellos incluidos.

#### 3.4.1. REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS CULTIVOS CELULARES

|                                                                |                      |
|----------------------------------------------------------------|----------------------|
| <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose</i> (DMEM)    | Gibco ref. 41966-052 |
| <i>DMEM, high glucose, no glutamine, no phenol red</i>         | Gibco ref. 31053-028 |
| DMEM/F-12 (1:1) GlutaMAX                                       | Gibco ref. 31331-028 |
| <i>Foetal Bovine Serum</i> (FBS)                               | Gibco ref. 10106-169 |
| <i>Penicillin-Streptomycin</i> 10.000UI/ml – 10.000 $\mu$ g/ml | Gibco ref. 15140-122 |
| Tripsina EDTA                                                  | Gibco ref. 25300-054 |
| HEPES <i>Buffer Solution</i> 1M                                | Gibco ref. 15630-056 |
| <i>MEM Non Essential Amino Acids</i> 100X                      | Gibco ref. 11140-035 |
| <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (PBS) 10X                     | Gibco ref. 70013-016 |

### 3.5. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación de

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

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en el ANEXO 1.

### 3.6. SONDAS TaqMan®

Las sondas TaqMan utilizadas para los análisis mediante PCR cuantitativa o en tiempo real, fueron suministrados por Applied Biosystems. Todas las sondas fueron específicas para genes de proteínas TJ humanas. La referencia de cada una de las sondas utilizadas en esta tesis se muestra en ANEXO 2.

### 3.7. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios anti-TcpC se fabricaron por GenScript® y se diseñaron para reaccionar específicamente contra péptidos inmunogénicos dentro de la secuencia de TcpC. Las secuencias aminoacídicas de los péptidos utilizados como antígenos en esta tesis se muestran en la figura 5.3.

Los anticuerpos utilizados en los ensayos de *Western blot* y microscopia confocal para la detección de proteínas TJ, se detallan en las secciones Método 4.3.5 y Método 4.4.2, respectivamente.

### 3.8. SOPORTE INFORMÁTICO

#### 3.8.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. (1997): Este programa se encuentra disponible a través de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y permite hacer un estudio comparativo de las secuencias obtenidas con las descritas en las bases de datos.

- **WEBCUTTER 2.0:** Este programa ha sido utilizado para localizar dianas de restricción en las secuencias de DNA. Está disponible a través de la página web <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2> (Webcutter 2.0, copyright 1997 Max Heiman).
- **SPSS Statistics 20.0 (Chicago, IL, USA).** Este programa se ha utilizado para analizar la significación estadística de los resultados.
- **FIJI (ImageJ).** Es un *software* utilizado para la edición y análisis básicos de imágenes digitales obtenidas mediante microscopia.

### 3.8.2. BASES DE DATOS

Las principales bases de datos utilizadas en este trabajo son:

- **GENBANK:** Es una base de datos de ácidos nucleicos que está producida y mantenida por el NCBI en colaboración con otros organismos como el EMBL Benson et al., (1998) Se puede acceder en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- **SWISS-PROT:** Base de datos de proteínas que incluye información de diferentes fuentes. Se puede acceder en la dirección <http://www.expasy.ch>
- **UniPRO:** Es una base de datos de libre acceso de secuencias de proteína e información funcional. Disponible a través de la página web en <http://www.uniprot.org/>





## 4. MÉTODOS

---



## 4. MÉTODOS

### 4.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

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

Los crecimientos bacterianos se realizaron utilizando medios de cultivo completos o mínimos y a diferentes condiciones de temperatura, en función de la cepa utilizada y del tipo de experimento a realizar. Se utilizaron medios de cultivo líquidos y sólidos. Para los cultivos líquidos se usaron tubos de ensayo o matraces Erlenmeyer, de tal forma que el volumen del medio de cultivo no fuera superior al 20% del volumen total del recipiente utilizado. Las cepas bacterianas cultivadas en medio líquido se incubaron a temperatura óptima y en agitación constante a 250 rpm, en un agitador orbital. El crecimiento bacteriano de dichos cultivos se siguió mediante la lectura de la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 600 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV240. Los medios sólidos se obtuvieron por adición de agar bacteriológico al 1,5% (p/v) a los medios líquidos. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri y el crecimiento se llevó a cabo en un incubador termostatzado a la temperatura deseada. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 30 minutos. Los compuestos termolábiles fueron esterilizados mediante filtración (tamaño de poro: 0,22µm).

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

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizaron dos tipos de medio de cultivo. El medio LB, un medio completo o rico, y el medio DMEM.

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

| <b><u>Medio LB</u></b> |           |
|------------------------|-----------|
| Triptona               | 1,0 % p/v |
| Extracto de levadura   | 0,5 % p/v |
| NaCl                   | 0,5 % p/v |

El medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) es un medio basal ampliamente utilizado para el crecimiento de muchos tipos celulares eucariotas. Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el medio esencial mínimo de Eagle original y no contiene proteínas, lípidos o factores de crecimiento. El medio DMEM utilizado en este trabajo lleva incluido los siguientes componentes:

| <b>Medio DMEM (Gibco)</b> |           |
|---------------------------|-----------|
| Glucosa                   | 4,5 mg/ml |
| L-Glutamina               | 0.4 mM    |

Para el crecimiento de bacterias con resistencia a antibióticos, se adicionaba al medio el antibiótico correspondiente. Se prepararon soluciones *stock* de los antibióticos a una concentración 1000X en solución acuosa para ampicilina, kanamicina o estreptomicina, en solución de etanol al 100% para cloranfenicol o en metanol al 100% para rifampicina. Las soluciones *stock* se conservaron a -20°C hasta su uso, y se adicionaron al medio de cultivo a la concentración final de:

| <b><u>Antibióticos</u></b> | <b><u>Concentración</u></b> |
|----------------------------|-----------------------------|
| Ampicilina                 | 100 µg/ml                   |
| Kanamicina                 | 50 µg/ml                    |
| Rifampicina                | 25 µg/ml                    |
| Tetraciclina               | 12,5 µg/ml                  |
| Estreptomicina             | 100 µg/ml                   |

Para la inducción de la recombinasa  $\lambda$ Red a partir del plásmido pKD46 se adicionó 100 mM L-arabinosa al medio de cultivo.

#### **4.1.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS**

Las cepas bacterianas se crecieron en medio LB hasta fase exponencial, y se congelaron a -80°C en presencia de glicerol a una concentración final del 15%.

---

#### 4.1.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

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

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

##### 4.1.3.1. Métodos químicos

##### 4.1.3.1.1. Método del TFB

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

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

##### Procedimiento:

1. Inocular la cepa en 2 ml de LB e incubar durante 16 horas a 37°C en constante agitación.
2. Realizar una dilución 1/50 de este cultivo en medio LB hasta un volumen final de 10 ml. Incubar en agitación constante a 37°C hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,5.
3. Detener el crecimiento enfriando las células a 4°C durante 10 minutos (A partir de este punto las células han de mantenerse siempre en frío).
4. Recoger las células mediante centrifugación a 4000 xg durante 10 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 3 ml de TFB.
6. Mantener 10 minutos en hielo.
7. Centrifugar 10 minutos a 4000 xg.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 0,8 ml de TFB.

9. Añadir 28 µl de la solución DMSO/DTT. Mantener 10 min en hielo.
10. Adicionar de nuevo 28 µl de la solución DMSO/DTT y mantener en hielo un mínimo de 10 min. A partir de este momento las células ya son competentes.

#### **TFB (*Transformation buffer*)**

|                                            |        |
|--------------------------------------------|--------|
| MES-K pH 6,2                               | 10 mM  |
| Kcl                                        | 100 mM |
| MnCl <sub>2</sub>                          | 45 mM  |
| CaCl <sub>2</sub>                          | 10 mM  |
| Esterilizar por filtración y guardar a 4°C |        |

#### **Solución DMSO/DTT**

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Acetato potásico pH 7,5      | 10 mM   |
| DTT                          | 1 M     |
| DMSO                         | 90% p/v |
| Guardar en alícuotas a -20°C |         |

#### **4.1.3.1.2. Método del CaCl<sub>2</sub>**

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

#### **Procedimiento:**

1. Inocular la cepa en LB. Incubar durante 16 horas a 37°C en constante agitación.
2. Reinocular 1 ml de este cultivo en 100 ml de LB. Incubar a 37°C en constante agitación hasta que el cultivo alcance una DO a 600 nm igual a 0,4 (por encima de este valor disminuye la eficacia de transformación).
3. Mantener el cultivo en hielo durante 10 minutos para detener el crecimiento bacteriano.
4. Recoger las células por centrifugación a 4000 xg durante 10 minutos a 4°C. A partir de este momento las células han de permanecer a 4°C.
5. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 20 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> atemperada a 4°C.
6. Centrifugar a 4000 xg durante 5 minutos a 4°C.
7. Resuspender de nuevo el sedimento celular en 20 ml de solución de CaCl<sub>2</sub>. Mantener en hielo las células resuspendidas durante 30 minutos.
8. Centrifugar a 4000 xg durante 5 minutos a 4°C. Resuspender finalmente el

sedimento celular en 4 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$ . Incubar durante un mínimo de 1 hora en hielo.

9. Alicuotar en fracciones de 200  $\mu\text{l}$ . Guardar a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

| <u>Solución de <math>\text{CaCl}_2</math></u> |         |
|-----------------------------------------------|---------|
| Tris-Hcl pH 7.0                               | 10 mM   |
| $\text{CaCl}_2$                               | 60 mM   |
| Glicerol                                      | 15% v/v |

#### **4.1.3.2. Métodos físicos**

##### **4.1.3.2.1. Electroporación**

Este procedimiento se basa en un método descrito por Dower *et al.*, 1988; en el cual, se utiliza una solución de glicerol al 10% (v/v) para evitar el uso de soluciones salinas que incrementen la conductividad, lo que provocaría la muerte celular por sobrecarga durante la electroporación. Las células se pueden conservar a  $-80^\circ\text{C}$ .

##### Procedimiento:

1. Inocular la cepa en LB. Incubar durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$  en constante agitación.
2. Reinocular la cepa en 10 ml de LB en una dilución 1:50. Incubar a  $37^\circ\text{C}$  en constante agitación hasta que el cultivo alcance una DO a 600 nm igual a 0,75 (por encima de este valor disminuye la eficacia de transformación).
3. Mantener el cultivo durante 10 minutos en hielo para detener el crecimiento bacteriano.
4. Recoger las células por centrifugación a 4000 xg durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . A partir de este momento las células han de permanecer a  $4^\circ\text{C}$ .
5. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 10 ml de glicerol al 10% (v/v) atemperado a  $4^\circ\text{C}$ .
6. Centrifugar a 4000 xg durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .
7. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 10 ml de glicerol al 10% (v/v) atemperado a  $4^\circ\text{C}$ .
8. Centrifugar a 4000 xg durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .
9. Resuspender finalmente el sedimento celular en 1 ml de glicerol al 10% (v/v) atemperado a  $4^\circ\text{C}$ .



10. Alicuotar en fracciones de 100  $\mu$ l e utilizar inmediatamente para su transformación mediante el Método 4.1.4.2 de electroporación.

#### **4.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

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

Las células se transformaron por choque térmico o por electroporación, dependiendo del proceso utilizado en la preparación de células competentes.

##### **4.1.4.1. *Transformación por choque térmico***

Este proceso consiste en provocar la entrada de DNA exógeno al someter las células competentes a cambios bruscos de temperatura. Se aplica para células competentes obtenidas mediante métodos químicos.

##### Procedimiento:

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

---

#### 4.1.4.2. *Por electroporación*

Las células competentes se ponen en contacto con DNA exógeno y se someten a un campo eléctrico para formar poros en la membrana celular, a través de los cuales el DNA puede penetrar al interior celular.

##### Procedimiento:

1. Poner en contacto 100 µl de células obtenidas anteriormente en glicerol al 10% (ver Método 4.1.2.2.1) con el DNA a transformar en una cubeta de electroporación (Bio-Rad) atemperada a 4°C.
2. Someter la mezcla a una descarga eléctrica de 1,8 KV durante 3,4 segundos. En este trabajo se ha utilizado el electroporador *E. coli* Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).
3. Añadir 900 µl de medio LB, transferir a un tubo Eppendorf e incubar a la temperatura adecuada según la cepa transformada durante 1 hora, en constante agitación.
4. Sembrar 100 µl en placas de LB con el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes. Incubar 12-16 horas a la temperatura adecuada.

#### 4.1.5. CONJUGACIÓN

La conjugación bacteriana es el proceso mediante el cual se transfiere material genético desde una bacteria donadora (Hfr) a otra bacteria receptora (F<sup>-</sup>), promovido por determinados tipos de plásmidos y que requiere contacto directo entre ambas, con intervención de estructuras de superficie, largas y delgadas denominadas pilis sexuales. Es a través de estas estructuras por donde tiene lugar la transferencia de material genético a la cepa receptora F<sup>-</sup>. Para que este proceso tenga lugar, las células donadoras han de contener las funciones implicadas en esta transferencia. En este trabajo se han utilizado las cepas donadoras *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* y *E. coli* EB6193  $\lambda$  *pir* en los procesos de conjugación llevados a cabo para la construcción de mutantes *knockout* mediante recombinación homóloga en la cepa receptora EcN. En este caso se transfirió el plásmido pUTmini-Tn5Tc, que contienen el origen de transferencia *oriT* del vector RP4. Para seleccionar los transconjugantes se han de tener en cuenta dos factores. En primer lugar, disponer de un marcador contenido en el material que se transfiere (Ej. Resistencia a antibióticos). En segundo lugar, un marcador de la cepa receptora que no se encuentre en la cepa donadora (Ej. Resistencia a antibióticos o

capacidad de metabolizar determinados compuestos).

El protocolo de conjugación aplicado en este trabajo está basado en el propuesto por Biomedal. Se utilizó la cepa *E. coli* S17-1  $\lambda$  *pir* que es termosensible, por lo que ha de ser incubada a 30°C. Se recomienda emplear esta cepa solamente para la conjugación, por lo que los plásmidos  $\pi$  dependientes se han de mantener en otra cepa, como la cepa EB619.

#### Procedimiento:

1. Inocular una colonia de *E. coli* S17  $\lambda$  *pir*, transformada con el plásmido a transferir, y una colonia de la cepa receptora en 2 ml de LB suplementados con el antibiótico adecuado. Incubar los dos cultivos durante 12-16 horas, en constante agitación a temperatura adecuada.
2. Mezclar en 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM los siguientes volúmenes de ambas cepas:
  - 25  $\mu\text{l}$  Donadora y 25  $\mu\text{l}$  Receptora (Proporción: 1 Donadora/ 1 Receptora)
  - 50  $\mu\text{l}$  Donadora y 25  $\mu\text{l}$  Receptora (Proporción: 2 Donadora/ 1 Receptora)
  - 25  $\mu\text{l}$  Donadora y 50  $\mu\text{l}$  Receptora (Proporción: 1 Donadora/ 2 Receptora).
3. Centrifugar a 4000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Resuspender el sedimento celular en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM y depositarlo, sin extenderlo, sobre una placa de LB. Incubar durante 12-16 horas a 30°C.
5. Recoger la mezcla de conjugación y resuspenderla en 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
6. Centrifugar a 4000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Resuspender el sedimento celular en 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM y extender 100  $\mu\text{l}$  de diferentes diluciones (Ej.  $10^0$  a  $10^{-4}$ ) en placas de selección. La mezcla de conjugación puede conservarse durante varias semanas a 4°C y durante varios meses a -80°C en glicerol al 15% v/v.
8. Incubar las placas durante 12-16 horas a la temperatura adecuada.
9. Purificar las colonias de los transconjugantes en medio de selección.

En este trabajo el mayor número de transconjugantes se obtuvo siguiendo la proporción 2 donadora/ 1 receptora.

---

#### 4.1.6. OBTENCIÓN DE MUTANTES

##### 4.1.6.1. Selección de mutantes espontáneos

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

En este trabajo se obtuvieron mutantes espontáneos de EcN y ECOR63 resistentes a rifampicina. Estos fueron utilizados después para la construcción de mutantes *knockout* por disrupción génica mediante el Método 4.1.6.2.

##### Procedimiento:

1. Crecer la cepa bacteriana en 2 ml de medio LB durante 12 - 16 horas.
2. Centrifugar el cultivo a 4000 xg durante 2 minutos.
3. Resuspender el sedimento bacteriano en 100 µl de medio LB.
4. Sembrar en placas de LB con rifampicina.
5. Seleccionar las colonias que presenten resistencia a rifampicina.

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

Esta metodología se basa en las propiedades suicidas del vector pUTmini-Tn5-Tc y en la recombinación homóloga entre un gen presente en el genoma de la cepa, en este caso el gen *tcpC*, y un *cassette* que consiste en el mismo gen interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina (*tcpC::kan*), previamente clonado en el vector suicida.

Aunque pUTmini-Tn5-Tc es un plásmido utilizado normalmente para obtener mutantes al azar por inserción de un transposón (Herrero *et al.*, 1990), presenta características que le permiten ser utilizado también para mutagénesis dirigida (FIGURA 4.1). Entre dichas características están que en el esqueleto del vector se localiza el gen de resistencia a ampicilina (*bla*), contiene un origen de replicación obtenido a partir del vector R6K (*oriR6K9*) y un origen de transferencia derivado de RP4 (*mobRP4*).

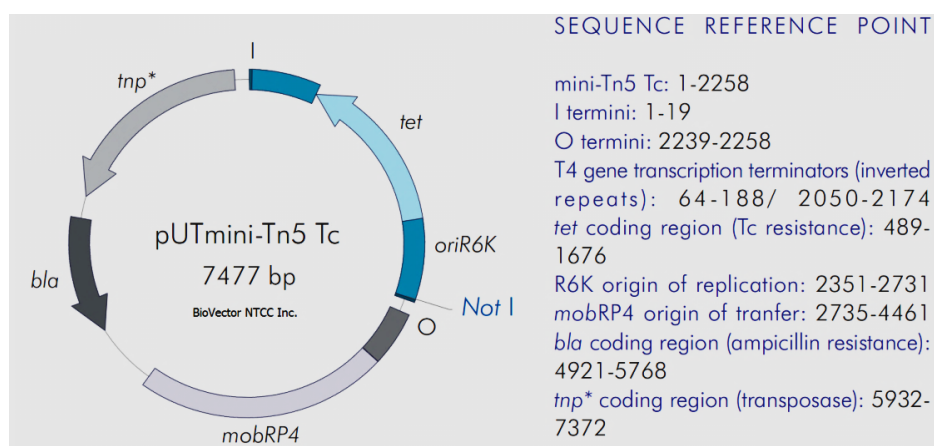


FIGURA 4.1. Vector pUTmini Tn5 Tc. Imagen obtenida de Biomedal, S.L., 2006.

El origen de replicación de este vector deriva del vector suicida R6K, cuya replicación depende de la presencia del factor  $\pi$  codificado por el gen *pir*. Para mantener estos vectores se ha de utilizar una cepa que contenga el gen *pir*, como EB6193. Se recomienda mantener este plásmido en la cepa EB6193 y hacer uso de *E. coli* S17-1 $\lambda$  *pir* en el momento de la conjugación. La recombinación homóloga entre el gen salvaje y el *cassette* se produce tras la conjugación de una cepa donadora y una cepa receptora. Ya que la cepa receptora no produce el factor  $\pi$  y por ello, no puede mantener el pUTmini-Tn5-Tc de manera estable, los transcojugantes son seleccionados por resistencia al antibiótico aportado por el *cassette*.

En el momento que se identifican colonias con el fenotipo deseado, la correcta inserción en el genoma se puede comprobar mediante PCR (ver Método 4.5.5) usando un oligonucleótido interno del casete KAN (Datsenko y Wanner, 2000) y un oligonucleótido correspondiente a la región del genoma adyacente a los fragmentos utilizados para construir el *cassette* KAN.

#### 4.1.6.2.1. Mutantes knockout mediante pUTmini-Tn5-Tc y conjugación

Para la construcción de un mutante *knockout* de *tcpC* se utilizó la metodología de disrupción génica mediante la introducción de un *cassette* de resistencia a kanamicina (KAN), siguiendo el protocolo descrito en la figura 4.2. La región del gen *tcpC* (802 pb) fue amplificada por PCR. El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pUC18Not utilizando las dianas *BamHI* y *EcoRI*. Por otra parte, el gen *kan* que confiere resistencia a kanamicina fue obtenido a partir del plásmido pKD4 mediante amplificación con *primers* que incorporan la diana *SmaI* en los extremos. Este fragmento fue purificado y clonado en la diana *StuI* interna al gen *tcpC* clonado en pUC18Not, produciendo así la disrupción del marco de lectura del gen *tcpC*. El gen

*tcpC* mutado por inserción (*tcpC::kan*) fue obtenido partir de este plásmido recombinante mediante digestión con NotI. El fragmento resultante se subclonó en el plásmido suicida pUT-miniTn5 Tc y se transfirió a la cepa *E. coli* S17  $\lambda$  *pir*.

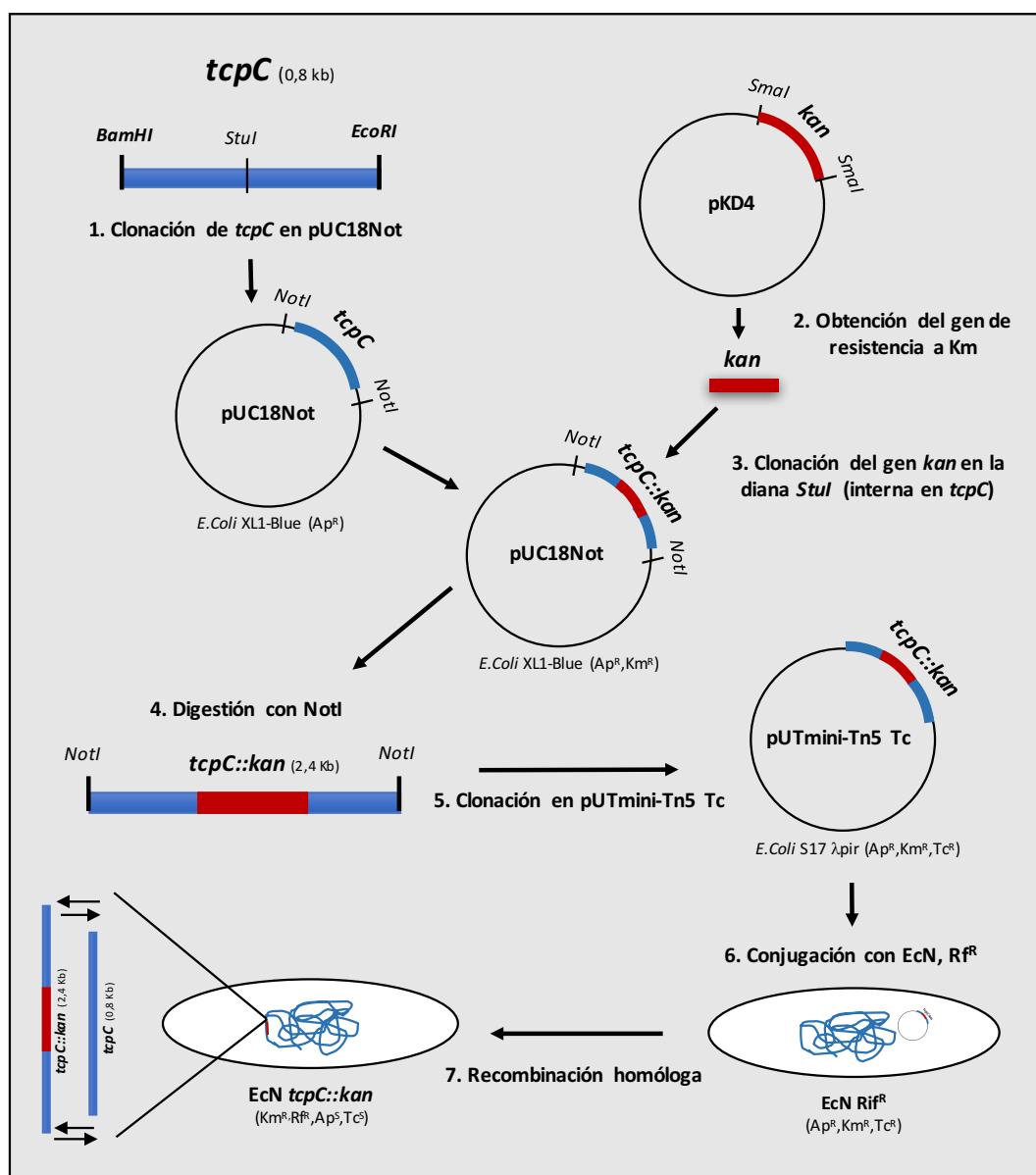
El inserto *tcpC::kan* fue transferido a la cepa EcN rifampicina resistente mediante conjugación, donde por recombinación homóloga se generó el mutante *knockout* EcN *tcpC::kan*. Después de la purificación de los transconjugantes, la correcta construcción del mutante *knockout* fue confirmada mediante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

#### Procedimiento:

1. Clonar el gen que se desea mutar en el plásmido pUC18Not.
2. Amplificar por PCR el gen *kan* a partir del plásmido pKD4 utilizando oligonucleótidos con dianas de restricción compatibles con el vector recombinante construido anteriormente. Estas dianas han de localizarse una sola vez dentro del gen clonado, de tal manera que al interrumpir dicho gen queden al menos 500 pb a ambos lados del gen *kan*.
3. Purificar el producto de PCR (ver Método 4.5.6.3).
4. Clonar el gen *kan* en el plásmido recombinante que contiene el gen a mutar utilizando la enzima de restricción del punto 2.
5. Una vez construido el *cassette*, clonar en el vector pUTminiTn5Tc utilizando la diana *NotI*.
6. Transformar la cepa EB6193 con el producto de la ligación y sembrar la transformación en placas de LB suplementadas con Km 50  $\mu$ g/ml.
7. Identificar mediante PCR un clon que haya insertado el *cassette* de KAN y obtener su DNA plasmídico. Comprobar por digestiones enzimáticas y secuenciación la correcta inserción y orientación del *cassette* de KAN.
8. Transformar la cepa *E. coli* S17  $\lambda$  *pir* con el plásmido circular pUTminiTn5Tc KAN y sembrar en placas de LB suplementadas con Km 50  $\mu$ g/ml y Tc 12,5  $\mu$ g/ml.
9. Purificar una colonia de *E. coli* S17  $\lambda$  *pir* pUTminiTn5Tc Km en placas de LB suplementadas con Km 50  $\mu$ g/ml y Tc 12,5  $\mu$ g/ml.
10. Realizar un proceso de conjugación entre *E. coli* S17  $\lambda$  *pir* pUTminiTn5Tc KAN y EcN rifampicina resistente (Rif<sup>R</sup>). La mezcla de conjugación se siembra en placas de medio LB suplementadas con Km 50  $\mu$ g/ml y Rif 25  $\mu$ g/ml. Incubar durante 48 horas a 30°C.
11. Purificar las colonias transconjugantes en las mismas placas de selección.

Incubar durante 48 horas a 30°C.

12. Sembrar colonias aisladas en LB suplementado con Km 50 µg/ml y Rif 25 µg/ml. Incubar durante 12-16 horas a 30°C. Repetir este proceso dos veces más.
13. Comprobar la correcta recombinación del *cassette* mediante fenotipo (Km<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>, Ap<sup>S</sup>, Tc<sup>S</sup>) y por PCR.



**FIGURA 4.2. Esquema de la construcción de *EcN tcpC::kan*.** El mutante *knockout* de *tcpC* se obtuvo por disrupción génica mediante inserción de un cassette de resistencia a kanamicina. El inserto *tcpC::kan* fue transferido a la cepa *EcN* rifampicina resistente mediante conjugación, donde por recombinación homóloga se generó el mutante *knockout* *EcN tcpC::kan*.

#### 4.1.6.2.2. Mutantes knockout mediante pUTmini-Tn5-Tc y la recombinasa $\lambda$ Red

En el caso de la cepa ECOR63 no fue posible obtener el mutante *tcpC* por la estrategia de recombinación homóloga. Por este motivo, el mutante *knockout* de *tcpC* por disrupción génica se construyó mediante la expresión de la recombinasa *Red* del fago  $\lambda$ , a partir del plásmido pKD46 de bajo número de copias (FIGURA 4.3). El procedimiento realizado fue una modificación del descrito por Datsenko y Wanner (2000).

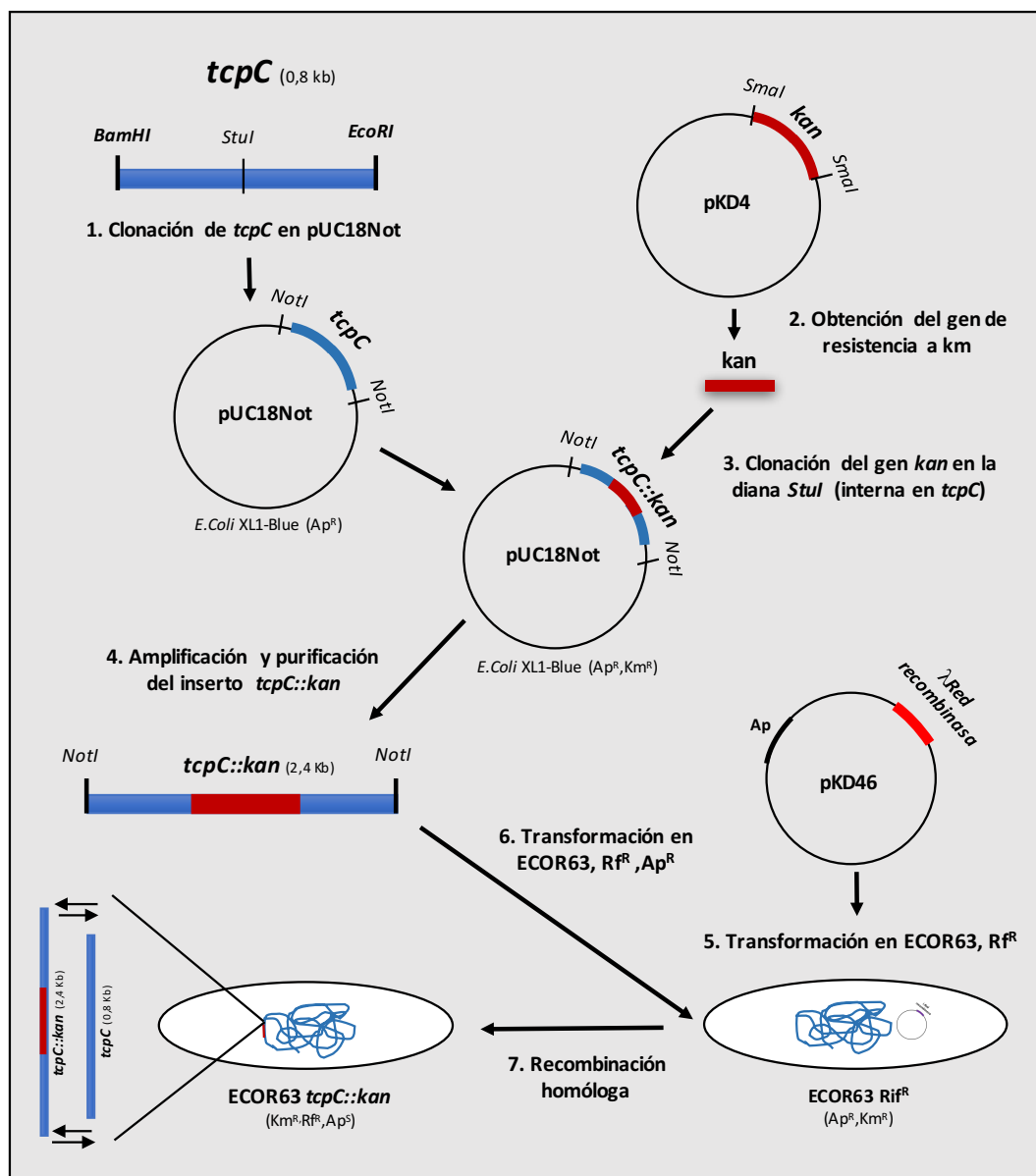
El gen *tcpC* mutado por inserción de un *cassette* de KAN (*tcpC::kan*) clonado en pUC18Not, se obtuvo mediante amplificación por PCR. Este fragmento fue purificado y electroporado en la cepa ECOR63 rifampicina resistente, la cual, previamente se transformó con el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa *Red* de fago *lamda* bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Los transformantes resistentes a kanamicina se incubaron a 37°C para inducir la pérdida del plásmido pKD46 lábil al calor. La pérdida de plásmido pKD46 se confirmó por la pérdida de resistencia a ampicilina. Después de la purificación de los mutantes *knockout* aislados finales, se comprobó su correcta construcción mediante PCR con *primers* que flanquean el gen *tcpC* y *primers* específicos del *cassette* de KAN. Una segunda confirmación se realizó mediante secuenciación de los sitios de inserción *upstream* y *downstream*.

##### Procedimiento:

1. Seguir el procedimiento descrito en Métodos 4.1.6.2.1., hasta el punto número 5. Una vez construido el *cassette* y clonado en el plásmido pUC18Not, amplificar el *cassete* por PCR y purificar.
2. Electroporar el fragmento (*tcpC::kan*) en la cepa ECOR63 rifampicina resistente (Rif<sup>R</sup>), la cual, previamente se transformó con el plásmido de expresión *Red recombinasa* pKD46. Para facilitar la recombinación del fragmento electroporado, inducir la expresión de la recombinasa  $\lambda$ Red en medio LB suplementado con 100 mM L-arabinosa a 27°C, durante una hora.
3. Sembrar las células en placas de LB suplementadas con Km 50 µg/ml e incubar de 12-16 horas a 27°C.
4. Resembrar los transformantes resistentes a kanamicina a 27°C.
5. Purificar las colonias transconjugantes en las mismas placas de selección. Incubar durante 24 horas a 37°C.
6. Confirmar la pérdida de resistencia a ampicilina, sembrando las colonias en placas de selección suplementadas con Ap 100 µg/ml. Incubar durante 24 horas a 37°C.



7. De nuevo sembrar colonias (sensibles a ampicilina) en LB suplementado con Km 50 µg/ml. Incubar durante 12-16 horas a 37°C. Repetir este proceso una vez más.
8. Comprobar la correcta recombinación del *cassette* KAN mediante PCR y secuenciación.



**FIGURA 4.3. Esquema de la construcción de ECOR63 *tcpC::kan*.** El mutante *knockout* de *tcpC* se obtuvo por disrupción génica mediante inserción de un *cassette* de resistencia a kanamicina, promoviendo la recombinación homóloga mediante la expresión de la recombinasa *Red* del fago  $\lambda$ .

---

#### **4.1.7. OBTENCIÓN DE FRACCIONES BACTERIANAS SECRETADAS (CF-SN, COF-SN y OMVs)**

##### **4.1.7.1. OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES TOTALES LIBRES DE CÉLULAS (*Cell Free Supernatants*): CF-SN**

En primer lugar, se obtuvieron sobrenadantes concentrados que contienen proteínas y otros factores secretados al medio extracelular a partir de cultivos bacterianos tal como se describe a continuación.

##### Procedimiento:

1. Inocular la cepa de estudio en 2 ml de LB e incubar durante 8 horas a 37 °C en constante agitación.
2. Reinocular 1 ml del cultivo en 10 ml de medio LB o en medio DMEM (adicionado con 1% de aminoácidos no esenciales y 15 mM hepes. Incubar a 37 °C durante 12-16 horas en agitación.
3. Reinocular 8 ml del cultivo en 1L de LB o en medio DMEM (adicionado con 1% de aminoácidos no esenciales y 15 mM de Hepes). Incubar a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 1.
4. Centrifugar el cultivo a 18500 xg durante 30 minutos, a 4°C, y separar el sobrenadante.
5. Esterilizar el sobrenadante por filtración con 0,22 µm de poro.
6. Concentrar el sobrenadante hasta un volumen de 4 ml, mediante un filtro concentrador (Centricon-plus70, Millipore) con un límite de exclusión de 10000 Daltons, siguiendo las indicaciones del fabricante.
7. Determinar la concentración de proteína mediante el método de Lowry (Método 4.3.2)
8. Distribuir el sobrenadante en alícuotas de 500 µl y conservar a -20°C hasta su uso.

##### **4.1.7.2. OBTENCIÓN DE OMVs Y SOBRENADANTES LIBRES DE OMVs (COF-SN: *Cell-OMVs Free Supernatants*)**

Estas fracciones secretadas se prepararon a partir de los CF-SN (Método 4.1.7.1).

##### Procedimiento:

1. Seguir el Método 4.1.7.1 hasta el paso 6.

2. Ultracentrifugar los sobrenadantes concentrados a 150000 xg durante 1 hora 30 minutos, a 4°C.
3. Separar el sobrenadante que corresponde a las proteínas y factores solubles secretados al medio (COF-SN).
4. Distribuir el sobrenadante en alícuotas de 500 µl y conservar a -20°C hasta su uso.
5. Por otro lado, añadir 8 ml de PBS 1X estéril al sedimento que contiene las OMVs y ultracentrifugar a 150000 xg durante 1 hora 30 minutos, a 4°C (fase de lavado).
6. Decantar y resuspender el sedimento que contiene las OMVs en 300 µl de PBS 1X estéril.
7. Distribuir las OMVs en alícuotas de 50 µl y conservar a -20°C hasta su uso.
8. Determinar, en ambos casos, la concentración de proteína mediante el método Lowry (Método 4.3.2).

## 4.2. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

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

Para el mantenimiento de los cultivos se utilizaron placas de 100 mm de diámetro para la línea celular Caco-2 y frascos de 75 cm<sup>2</sup> para las células T-84. Cuando los cultivos alcanzaban un 80-90% de confluencia se procedía a su expansión por tripsinización.

En los estudios de integridad de la barrera celular, se utilizaron placas *Transwell* de 12 pocillos con un soporte permeable o filtro de poliéster con poro de 0,4 µm y una superficie de 1,12 cm<sup>2</sup>.

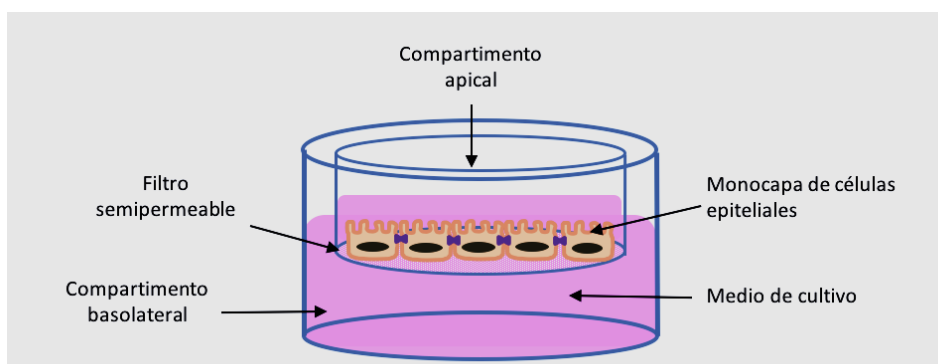
En el sistema *Transwell*, las células crecen sobre un filtro que permite la separación de dos compartimientos, el apical y el basolateral (FIGURA 4.4). En la zona apical, se sembraron 0,5 ml de la suspensión celular a una densidad aproximada de 0,5x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> de células Caco-2, y a una densidad de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> de células T-84, para garantizar la formación de una monocapa. En la zona basolateral se adicionaron 1,5 ml de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron durante 9-15 días, mediante renovación del medio cada dos días.

Para los ensayos de análisis de expresión génica, se utilizaron placas de 12 pocillos de 3,8 cm<sup>2</sup>. En los ensayos en que las células debían ser analizadas por microscopía confocal de fluorescencia, estas se sembraron sobre *µ-slides* (ibidi) de 8 pocillos con 1

cm<sup>2</sup> de área por pocillo.

El material fue suministrado por la casa comercial Corning, excepto en el caso que se indique otra casa comercial.

En todos los cultivos en que se requería la diferenciación celular, se renovó el medio de cultivo cada dos días, durante 9 -15 días.



**FIGURA 4.4. Esquema representativo de un *Transwell*.** Se pueden observar dos compartimientos, el apical (superior) y el basolateral (inferior), separados por un filtro semipermeable.

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

Los medios de cultivo utilizados para el mantenimiento y diferenciación de las células fueron el medio DMEM (Gibco) y el medio DMEM/F12 (1:1) GlutaMAX (Gibco) convenientemente suplementados, tal como se describe en las tablas siguientes. La función principal del suero que se adiciona al medio es suministrar hormonas y factores de crecimiento necesarios para el crecimiento de las líneas celulares. Puesto que en el suero se encuentra presente el sistema del complemento, constituido por 20 glicoproteínas con alta actividad proteolítica, era necesaria la inactivación por calor a 56°C, durante 1 hora, con la finalidad de no alterar la viabilidad celular. El suero inactivado se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

| <b><u>Medio DMEM</u></b>                |         |
|-----------------------------------------|---------|
| DMEM (Gibco)                            | 500 ml  |
| Suero Fetal Bovino FBS (Gibco)          | 10 %    |
| Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco)  | 5 ml    |
| Penicilina-Estreptomicina 1000X (Gibco) | 5 ml    |
| Hepes 1M (Gibco)                        | 12,5 ml |

**Medio DMEM/F12 (1:1) GlutaMAX**

|                                         |        |
|-----------------------------------------|--------|
| DMEM (Gibco)                            | 500 ml |
| Suero Fetal Bovino FBS (Gibco)          | 5 %    |
| Penicilina-Estreptomicina 1000X (Gibco) | 5 ml   |
| Hepes 1M (Gibco)                        | 7,5 ml |

Para los ensayos de infección bacteriana, así como para los ensayos de estimulación con fracciones bacterianas, se utilizó un medio de infección que no contenía FBS, ni antibióticos. Y en el caso de las infecciones con EPEC, se adicionó manosa al 0,5% (Guignot et al., 2007).

**Medio de infección**

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| DMEM (Gibco)                           | 500 ml  |
| Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco) | 5 ml    |
| Hepes 1M (Gibco)                       | 12,5 ml |
| Manosa 40% (Sigma)                     | 6,25 ml |

**4.2.2. EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES TRAS TRIPSINIZACIÓN**

La tripsinización permite separar las células que crecen adheridas a una placa o frasco de cultivo mediante el uso de la enzima tripsina, que rompe tanto las uniones intercelulares como las uniones al sustrato, y permite la obtención de una suspensión celular. La presencia de un quelante de calcio, en este caso el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en la solución de tripsina, optimiza el proceso de disgregación celular porque actúa como agente quelante de metales que podrían inhibir la actividad de la enzima.

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

**Procedimiento para células Caco-2:**

1. Atemperar la solución de tripsina/EDTA a 37°C durante 15 minutos.
2. Aspirar el medio de cultivo de la placa y lavar con 5 ml de PBS.
3. Agregar 2 ml de la solución de tripsina e incubar a 37°C durante 5-10 minutos hasta lograr que las células se desprendan de la superficie de la

placa.

4. Adicionar a la placa 4 ml de medio de cultivo, y mediante aspiración con una pipeta, facilitar que las células se separen y se visualicen al microscopio como entidades aisladas.
5. Depositar, en una placa nueva, 8 ml de medio de cultivo y adicionar el volumen necesario de la suspensión celular (aproximadamente  $4 \times 10^6$  células) para obtener un volumen final de 10 ml totales en la placa.
6. Agitar cuidadosamente las placas para que las células se distribuyan homogéneamente en la superficie.
7. Incubar las placas hasta que se alcance nuevamente la confluencia del 80-90%.

#### Procedimiento para células T-84:

1. Atemperar la solución de tripsina/EDTA a 37°C durante 15 minutos.
2. Aspirar el medio de cultivo del frasco de cultivo y lavar con 5 ml de PBS, 2 veces.
3. Agregar 3 ml de la solución de tripsina e incubar a 37°C durante 5-10 minutos hasta lograr que las células se desprendan de la superficie del frasco.
4. Adicionar al frasco 9 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. Transferir la suspensión celular a un tubo Falcon de 15 ml y centrifugar a 1.200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, para que se sedimenten las células.
6. Aspirar el sobrenadante que contiene la solución de tripsina/EDTA, evitando arrastrar el sedimento celular.
7. Resuspender el sedimento celular con 6 ml de medio de cultivo nuevo.
8. Depositar en un frasco nuevo 23 ml de medio de cultivo y adicionar 2 ml de la suspensión celular para obtener un volumen final de 25 ml.
9. Agitar cuidadosamente el frasco para que las células se distribuyan homogéneamente en la superficie.
10. Incubar el frasco hasta que se alcance nuevamente una confluencia de 80-90%.

#### 4.2.3. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS LINEAS CELULARES

El número de veces que se puede subcultivar una línea celular es limitado, por lo tanto, es importante disponer de un *stock* de células con un bajo número de subcultivos. Con este fin se procedió a la criopreservación de cultivos confluentes en crioviales con medio de congelación con DMSO (*Dimethyl sulfoxide*; Sigma), criopreservante que evita la formación de cristales a la temperatura de  $-195^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido) y por tanto reduce la mortalidad celular. Los pases de células para los ensayos fueron: Caco-2 (pases 60-70), T-84 (pases 58 y 68).

##### Procedimiento para células Caco-2:

1. Tripsinizar una placa al 80-90% de confluencia (Método 4.2.2).
2. Diluir con medio de cultivo la resuspensión celular hasta un volumen final de 12 ml y traspasar a un tubo Falcon.
3. Centrifugar a 300 xg durante 5 minutos para que sedimenten las células.
4. Aspirar el sobrenadante evitando arrastrar el sedimento celular.
5. Resuspender el sedimento celular con 1,5 ml de medio de cultivo y adicionar DMSO al 10% (150  $\mu\text{l}$ ), homogenizando la mezcla con una pipeta.
6. Traspasar la mezcla a un tubo de criocongelación (criovial).
7. Congelar inmediatamente las células mediante gradiente de frío en un *cryobox*, que al contener isopropanol permite un descenso de temperatura de  $-1^{\circ}\text{C}$  por minuto.
8. Mantener a  $-80^{\circ}\text{C}$  un mínimo de 2 horas y transferir a un tanque de nitrógeno líquido ( $-195^{\circ}\text{C}$ ) para su conservación.

##### Procedimiento para células T-84:

1. Tripsinizar una placa al 80-90% de confluencia (Método 4.2.2).
2. Diluir con medio de cultivo la suspensión celular hasta un volumen final de 12 ml y traspasar a un tubo Falcon.
3. Centrifugar a 300 xg durante 5 minutos para que sedimenten las células.
4. Aspirar el sobrenadante evitando arrastrar el sedimento celular, resuspender en 4 ml de medio nuevo y proceder al conteo de células (Método 2.4.5).
5. Traspasar 1 ml de suspensión celular con  $2 \cdot 10^6$  células en un criovial.
6. Adicionar DMSO al 5% (50  $\mu\text{l}$ ), homogenizando la mezcla con una pipeta.
7. Añadir 10% de FBS (100  $\mu\text{l}$ ) al medio, homogenizando la mezcla.
8. Congelar inmediatamente las células mediante gradiente de frío en un

*cryobox*, que al contener isopropanol permite un descenso de temperatura de  $-1^{\circ}\text{C}$  por minuto.

9. Mantener a  $-80^{\circ}\text{C}$  un mínimo de 2 horas y transferir a un tanque de nitrógeno líquido ( $-195^{\circ}\text{C}$ ) para su conservación.

#### 4.2.4. DESCONGELACIÓN DE LAS LINEAS CELULARES

Para iniciar los cultivos se descongelaron las alícuotas de cada línea celular que estaban criopreservadas en nitrógeno líquido. Este proceso se realiza con la máxima rapidez ya que el DMSO a temperatura ambiente es altamente tóxico para las células. El procedimiento utilizado fue el siguiente.

##### Procedimiento para células Caco-2:

1. Descongelar las células en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y diluir con medio de cultivo el contenido del criotubo hasta un volumen de 10 ml.
2. Centrifugar inmediatamente a 3000 xg durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y eliminar el sobrenadante que contiene DMSO.
3. Diluir el sedimento celular en 5 ml de medio de cultivo.
4. Depositar en una placa de 100 mm de diámetro, 5 ml de medio y adicionar los 5 ml de la resuspensión celular;
5. Agitar cuidadosamente las placas para que las células se depositen homogéneamente en su superficie.
6. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas.
7. Aspirar el medio para retirar las células no viables y adicionar nuevamente medio de cultivo convenientemente atemperado.
8. Incubar la placa a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que alcance una confluencia del 80-90%.

##### Procedimiento para células T-84:

1. Descongelar las células en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y diluir con medio de cultivo el contenido del criotubo hasta un volumen de 10 ml.
2. Centrifugar inmediatamente a 3000 xg durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y eliminar el sobrenadante que contiene DMSO.
3. Diluir el sedimento celular en 5 ml de medio de cultivo, segregándolas.
4. Depositar 20 ml de medio en una placa de  $75\text{ cm}^2$  y adicionar los 5 ml de la suspensión celular.
5. Agitar cuidadosamente los frascos para que las células se depositen



homogéneamente en su superficie.

6. Incubar a 37°C durante 24 horas.
7. Aspirar el medio para retirar las células no viables y adicionar nuevamente 25 ml de medio de cultivo convenientemente atemperado.
8. Incubar la placa a 37°C hasta que alcance una confluencia del 80-90%.

#### 4.2.5. RECuento Y SIEMBRA DE CÉLULAS

El recuento celular se llevó a cabo en presencia de *Tripán blue* (Countess®) que permite estimar simultáneamente la viabilidad de las células.

Para el recuento de células se utilizó un contador automático (*Automated cell counter*, Countess®). El principio de este equipo es similar al de un hemocitómetro y realiza recuentos de células viables al mezclarlas con una solución de *Tripán blue* (Countess®), que permite diferenciar células vivas de células muertas, debido a que en las células viables con membrana intacta no se incorpora el colorante y no se tiñen.

##### Procedimiento:

1. Tripsinizar una placa al 80-90% de confluencia (Método 4.2.2).
2. Diluir con medio de cultivo la resuspensión celular hasta un volumen final de 4 ml y traspasar a un tubo Falcon.
3. Mezclar en un tubo tipo eppendorf 10 µl de diferentes diluciones de esta suspensión celular con 10 µl del reactivo *Tripán blue*.
4. Depositar 10 µl de la mezcla en el soporte de recuento del contador automático (*Cell counting chamber slides*, Counterss®) y determinar la concentración de células vivas por mililitro, siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular siempre ha de ser superior al 90%.
5. Una vez conocido el recuento celular, las células se siembran a la concentración adecuada para cada experimento.

#### 4.2.6. INCUBACIÓN DE MONOCAPAS DE CÉLULAS EPITELIALES CON CULTIVOS Y FACTORES SECRETADOS

En este estudio se utilizó como modelo *in vitro* de epitelio intestinal, cultivos en monocapa de células T-84 o Caco-2 crecidas durante 9 y 12 días respectivamente. Estas monocapas se incubaron con cultivos bacterianos o con las distintas fracciones bacterianas obtenidas a partir del sobrenadante de los cultivos (CF-SN, COF-SN y

OMVs) de diferentes cepas (la cepa probiótica EcN y cepas comensales).

#### **4.2.6.1. Incubación con cultivos bacterianos**

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

|        |                          |
|--------|--------------------------|
| EcN    | = $1 \times 10^8$ UFC/ml |
| EcoR12 | = $2 \times 10^8$ UFC/ml |
| EcoR63 | = $2 \times 10^8$ UFC/ml |
| EPEC   | = $3 \times 10^8$ UFC/ml |

#### Crecimiento de los cultivos bacterianos:

1. Crecer las bacterias en 10 ml de medio LB o DMEM, suplementado con el antibiótico de selección, hasta que alcancen una DO a 600 nm de 0,5.
2. Sedimentar las células por centrifugación a 4000 xg durante 10 minutos a 4°C.
3. Resuspender cuidadosamente el sedimento bacteriano en 5 ml de medio de infección y calcular la dilución necesaria para que al adicionar las bacterias sobre las células en cultivo se obtenga una MOI de 100.

#### Infección de las células epiteliales:

1. Cultivar las células epiteliales hasta alcanzar una monocapa. Aspirar el medio de cultivo y lavar 3 veces con PBS para eliminar el medio residual.
2. Adicionar medio de infección fresco (ver Método 4.2.1).
3. Infectar las monocapas de células eucariotas con el volumen adecuado de la suspensión bacteriana para obtener una MOI de 100.
4. Incubar durante el tiempo indicado en cada ensayo, a 37°C en estufa con atmosfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.6.2. Incubación con fracciones secretadas (CF-SN, COF-SN y OMVs)

##### Procedimiento:

1. Cultivar las células epiteliales hasta alcanzar una monocapa. Aspirar el medio de cultivo y lavar 3 veces con PBS para eliminar el medio residual.
2. Adicionar medio de infección fresco (ver Método 4.2.1) suplementado con 100 µg/ml de gentamicina.
3. Añadir sobre las monocapas de células las diferentes fracciones secretadas (ver Método 4.1.7) a la concentración de proteína indicada según la fracción a evaluar, y según el medio de cultivo a partir del cual se obtuvo dicha fracción como se detalla en la tabla siguiente:

|               | <u>Fracción celular</u>                                                          | <u>Concentración de proteína</u> |                   |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|
|               |                                                                                  | <u>Medio LB</u>                  | <u>Medio DMEM</u> |
| <b>CF-SN</b>  | Sobrenadantes totales libres de células ( <i>Cell Free Supernatants</i> )        | 2 mg/ml                          | 0,5 mg/ml         |
| <b>COF-SN</b> | Sobrenadantes libres de células y de OMVs ( <i>Cell-OMVs free supernatants</i> ) | 2 mg/ml                          | 0,5 mg/ml         |
| <b>OMVs</b>   | Vesículas de Membrana Externa                                                    | 0,1 mg/ml                        | 0,1 mg/ml         |

4. Incubar durante el tiempo indicado según el ensayo a realizar, a 37°C en estufa con atmosfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.7. MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL EN MONOCAPAS DE CÉLULAS T-84 Y Caco-2

La permeabilidad paracelular de monocapas de células T-84 y Caco-2 se analizó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial en placas *Transwell* (ver FIGURA 4.5).

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

La TER se determinó a partir de la resistencia medida mediante un voltímetro *Millicell*-

ERS-2 (Millipore) y se expresó como  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  de área de la superficie de la monocapa. A este valor se le substrajo la resistencia determinada en ausencia de la monocapa celular (filtro vacío), tal como se indica en la siguiente fórmula:

$$TER (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \text{resistencia}(\Omega) - \text{resistencia filtro} \times \text{área membrana} (\text{cm}^2)$$

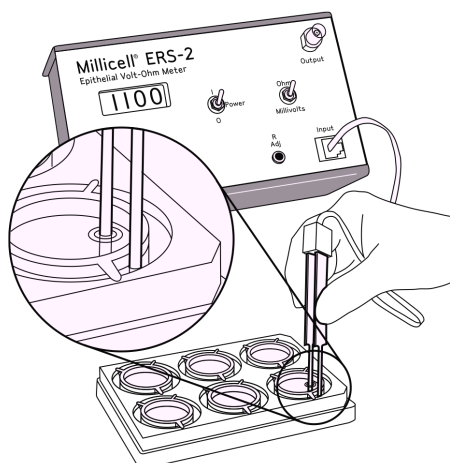
El cambio de TER se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cambio de TER (\%)} = \frac{TER (\Omega \cdot \text{cm}^2)}{TER \text{ inicial } (\Omega \cdot \text{cm}^2)} - 100 (\%)$$

Todos los experimentos fueron realizados partiendo de monocapas de células epiteliales con una  $TER \geq 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

#### Procedimiento:

1. Añadir medio fresco a los cultivos de células diferenciadas en placas *Transwell*, tal como se ha descrito en Método 4.2, e incubar 1 hora a 37°C en estufa con atmosfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Sumergir las puntas del electrodo en metanol al 70% durante 15 minutos para su desinfección.
3. Enjuagar el electrodo en PBS estéril, y equilibrar el electrodo en medio de cultivo DMEM a 37°C durante 15 minutos.
4. Medir la TER inicial sumergiendo la punta más corta del electrodo en el inserto apical procurando que no toque la monocapa de células que crecen sobre la membrana, y sumergir la punta larga en el pocillo exterior tocando apenas el fondo de la placa. Mantener el electrodo estable y en un ángulo de 90° respecto a la placa, para que los datos de la medición sean reproducibles. Se seleccionó Ohms como unidad de medida del equipo.
5. Adicionar el cultivo bacteriano o la fracción bacteriana secretada a evaluar en la zona apical, acorde a la descripción del Método 4.2.6.
6. Incubar a 37°C en estufa con atmosfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>, durante el tiempo indicado según el ensayo a realizar.
7. Lavar 3 veces con PBS 1X y rellenar nuevamente la zona apical y basolateral con 1,5 y 0,5 ml de medio respectivamente.
8. Medir nuevamente TER.
9. Obtener el valor de % de cambio de TER, en cada tratamiento.



**FIGURA 4.5.** Esquema representativo de la medición de TER de una monocapa de células epiteliales sembradas en *Transwell*. El electrodo no entra en contacto directo con las células y debe mantenerse estable y en un ángulo de 90 ° respecto a la placa. (Imagen extraída de Millicell® I ERS-2 User Guide, Millipore).

### 4.3. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 4.3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES (EC)

##### 4.3.1.1. Obtención de extractos celulares bacterianos

Los extractos celulares se obtuvieron mediante disrupción por ultrasonidos.

##### Procedimiento:

1. Cultivar la cepa de estudio en las condiciones que requiera el ensayo.
2. Sedimentar las bacterias por centrifugación a 4000 xg a 4°C durante 10 minutos.
1. Resuspender el sedimento bacteriano en un volumen equivalente a 4 veces su peso húmedo, de PBS complementado con *Complete Protease Inhibidor Cocktail Tables®* (Roche).
3. Someter 1 ml de la suspensión celular a una descarga ultrasónica, a una amplitud de onda de 12-14 micrones, durante 20 segundos (sonicador MSE, de 150 W). Repetir 4 veces a intervalos de 10 segundos.
4. Durante el proceso mantener la muestra sumergida en una mezcla refrigerante compuesta de agua, hielo y NaCl.
5. Centrifugar el homogenizado a 12000 xg a 4°C durante 30 minutos.
6. Separar la fracción sobrenadante, que constituye el extracto celular o extracto crudo, y que corresponde a los compartimentos periplasmático y citosólico.

| <b><u>PBS</u></b>                  |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| NaCl                               | 140 mM          |
| KCl                                | 2,7 mM          |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 10 mM           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 1,8 mM          |
| <i>Protease Inhibidor Cocktail</i> | 1 tableta/50 ml |
| <i>Tables®</i> (Roche)             |                 |
| Ajustar a pH 7,3                   |                 |

#### **4.3.1.2. Obtención de extractos celulares eucariotas**

En este trabajo se obtuvieron extractos celulares a partir de células T-84, incubadas en presencia de distintas fracciones bacterianas (0,5 mg/ml de COF-SN y 0,1 mg/ml de OMVs).

##### **Procedimiento:**

1. Lavar las monocapas celulares con PBS atemperado a 4°C.
2. Añadir a cada pocillo de 3,4 cm<sup>2</sup>, 50 µl de buffer de lisis que contiene detergentes que lisan la membrana celular y facilita la separación de las células. Incubar 1 hora en hielo.
3. Raspar las células con raspadores de plástico (SPL Lifes Sciences), y traspasar la suspensión celular a un tubo eppendorf.
4. Homogenizar las células con un homogeneizador eléctrico durante 40 segundos.
5. Centrifugar el homogenizado a 15000 xg durante 15 minutos a 4°C.
6. Preparar alícuotas del sobrenadante. Determinar la concentración de proteína (Método 4.3.2). Mantener a -80°C hasta su utilización.

| <b><u>Tampón de Lisis para cultivos celulares eucariotas</u></b> |        |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| HEPES pH 7,4                                                     | 50 mM  |
| Tritón X-100                                                     | 1 %    |
| Deoxicolato sódico                                               | 0,2 %  |
| SDS                                                              | 0,1 %  |
| NaCl                                                             | 150 mM |
| MgCl <sub>2</sub>                                                | 1,5 mM |
| EGTA                                                             | 1 mM   |

*Complete Protease Inhibitor Cocktail* 1 tableta/50 ml  
*Tables®* (Roche)

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

La cuantificación de proteínas en los extractos celulares y en los sobrenadantes de cultivos se determinó siguiendo una modificación del método descrito por (Lowry et al., 1951) que permite determinar la concentración de proteína de una muestra en el rango de 20-200 µg/ml. Las determinaciones se hicieron por duplicado y a partir de diferentes diluciones de la muestra problema. El valor de concentración fue la media de los valores obtenidos, siempre que éstos no se diferenciases de la media en más de un 10%.

##### Procedimiento:

1. Preparar diferentes diluciones de albúmina (BSA) en el rango 20-200 µg/ml con NaCl 0,9%. Estas muestras servirán para elaborar la recta patrón.
2. Realizar diferentes diluciones de la muestra problema con NaCl 0,9%.
3. Preparar alícuotas de 200 µl de cada dilución patrón y muestra problema.
4. Añadir 200 µl de reactivo alcalino. Agitar y dejar en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 800 µl de reactivo de Folin Ciocalteu 0,1 N y agitar vigorosamente.
6. Incubar durante 5 minutos a 55°C, e inmediatamente después mantener durante 10 minutos en hielo.
7. Determinar la absorbancia a una longitud de onda de 680 nm.
8. La concentración de proteína se expresa en mg/ml.

##### Reactivo alcalino

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Tartrato sódico potásico        | 10 % p/v   |
| CuSO <sub>4</sub>               | 0,05 % p/v |
| NaOH                            | 0,5 M      |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 10 % p/v   |

\*Preparar añadiendo los reactivos en el orden establecido en su composición para evitar la formación de un precipitado.

**Folin Ciocalteu**

1/2 del volumen final de Folin-Ciocalteu 2N

1/2 del volumen final de H<sub>2</sub>O destilada y desionizada

**4.3.3. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)**

Cuando los niveles de proteína de los sobrenadantes de los cultivos no fueron lo suficientemente elevados para realizar ensayos de *Western blot*, éstos se concentraron por precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

**Procedimiento:**

1. Precipitar las proteínas de la muestra de interés mediante la adición de TCA al 10 %.
2. Incubar a 4°C durante 1 hora como mínimo.
3. Centrifugar las proteínas precipitadas a 15000 xg a 4°C durante 30 minutos.
4. Descartar el sobrenadante, lavar las proteínas con acetona fría al 90% y centrifugar a 15000 xg durante 30 minutos. Repetir el proceso.
5. Descartar el sobrenadante y eliminar la acetona residual por evaporación a 37 °C.
6. Resuspender las proteínas precipitadas con el tampón de carga de electroforesis (Método 4.3.4).

**4.3.4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)**

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

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



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

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

La composición de las soluciones utilizadas se muestra a continuación:

| <u>Gel apilador</u>                |               |
|------------------------------------|---------------|
| Tris-HCl pH 6,8                    | 0,13 M        |
| SDS                                | 0,1 %         |
| Acrilamida: Bisacrilamida (37.5:1) | 4 %           |
| Persulfato amónico                 | 0,16 %        |
| TEMED                              | 0,075 % (v/v) |

| <u>Gel separador</u>               |               |
|------------------------------------|---------------|
| Tris-HCl pH 6,8                    | 0,13 M        |
| SDS                                | 0,1 %         |
| Acrilamida: Bisacrilamida (37.5:1) | 8 -15 %       |
| Persulfato amónico                 | 0,08 %        |
| TEMED                              | 0,075 % (v/v) |

| <u>Tampón de carga 4X</u> |              |
|---------------------------|--------------|
| Tris-HCl pH 6,8           | 0,25 M       |
| SDS                       | 8 %          |
| Glicerol                  | 40 %         |
| β-mecaptoetanol           | 20 %         |
| Azul de bromofenol        | 0,08 % (p/v) |

| <u>Tampón de electroforesis</u> |        |
|---------------------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,3                 | 25 mM  |
| Glicina                         | 192 mM |
| SDS                             | 0,1 %  |

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

Procedimiento de tinción con azul de *Coomassie*:

1. Separar el gel de los vidrios utilizados para la electroforesis.
2. Sumergir el gel en la solución de tinción. Mantener en agitación durante 15 minutos.
3. Desteñir el gel sumergiéndolo secuencialmente en la solución I y II, mediante agitación, durante 20 minutos.
4. Depositar el gel sobre papel de filtro y secar.

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

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

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

Esta técnica permite detectar proteínas presentes en muestras biológicas mediante el empleo de anticuerpos específicos.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo y las diluciones empleadas, se especifican en la siguiente tabla:

| <u>Anticuerpos primarios</u>                                                     | <u>Especie de procedencia</u> | <u>Dilución</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Anti- $\beta$ -actina (Sigma)                                                    | Conejo                        | 1/10000         |
| Anti- ZO-1 (Invitrogen)                                                          | Conejo                        | 1/100           |
| Anti-Ocludina (Invitrogen)                                                       | Conejo                        | 1/1000          |
| Anti-Claudina 2 (Abcam)                                                          | Conejo                        | 1/1000          |
| <u>Anticuerpos Secundarios</u>                                                   | <u>Especie de procedencia</u> | <u>Dilución</u> |
| Donkey anti-rabbit IgG, HRP linked F (ab') <sub>2</sub> Fragment (GE Healthcare) | Mono                          | 1/10000         |

#### Procedimiento:

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

| <u>Tampón de transferencia</u> |       |
|--------------------------------|-------|
| Tris-HCl                       | 25 mM |
| Glicina                        | 0,2 M |

#### 4.3.6. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST

En este trabajo, se utilizó el sistema de expresión y purificación de proteínas fusionadas a *glutathión-S-transferasa* (GST) para la proteína TcpC.

##### 4.3.6.1. Expresión

El gen *tcpC* fue clonado en el vector pGEX-3X que permite fusionar la proteína a un *tag* de GST en su extremo N-terminal. En este sistema la expresión de la proteína de fusión está bajo el control del promotor *tac* y el operador *lac*. En ausencia de inducción, el operador *lac* se encuentra ocupado por el represor LacI, codificado por el propio vector, impidiéndose la expresión de la proteína de fusión, que solo tiene lugar cuando se adiciona IPTG al medio de cultivo. Además, este vector presenta resistencia a ampicilina.

En este trabajo se ha obtenido el clon recombinante para la expresión de la proteína GST-TcpC. Para ello el gen *tcpC* fue amplificado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa EcN. Los cebadores utilizados fueron diseñados para clonar el gen en las dianas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (ANEXO 1), manteniendo el marco de lectura en fase. El fragmento resultante fue clonado en el vector pGEX-3x, y después de transformar la cepa XL1-Blue para la propagación de los plásmidos, se seleccionó un plásmido recombinante (pGEX-*tcpC*). Para aumentar la eficiencia de expresión de la proteína recombinante se introdujo, mediante transformación, el plásmido pGEX-*tcpC* en la cepa BL21.

##### Procedimiento:

1. Clonar el gen *tcpC* en el vector pGEX-3X (Método 4.5.9).
2. Inocular 1 colonia que contiene el plásmido recombinante en 2 ml de LB suplementado con ampicilina e incubar a 37°C en constante agitación durante 12-16 horas.
3. Reinocular en 100 ml de LB (dilución 1:100) suplementado con ampicilina e incubar hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,5.

4. Añadir el inductor IPTG a una concentración adecuada para la expresión de la proteína de interés. Incubar por un determinado período de tiempo (entre 3-16 horas) y temperatura (30°C o 37°C) adecuados para la expresión de la proteína. Mantener en constante agitación.
5. Recoger las células por centrifugación a 4000 xg durante 10 min. Descartar el sobrenadante. El sedimento celular se puede conservar para su uso posterior a -20°C.
6. Resuspender el sedimento celular en PBS con inhibidor de proteasas y obtener el extracto celular (Método 4.3.1.1). Comprobar el nivel de expresión de la proteína recombinante mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (Método 4.3.4).
7. Proceder a la purificación como se describe en Método 4.3.6.2.

#### **Condiciones de expresión de TcpC fusionada a GST**

|             |        |        |
|-------------|--------|--------|
| IPTG        | 0,1 mM | 0,3 mM |
| Tiempo      | 3h     | 16h    |
| Temperatura | 30 °C  | 37 °C  |

#### **4.3.6.2. Purificación**

La purificación de la proteína *TcpC* se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina *Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B* (GE Healthcare). En este sistema las proteínas fusionadas a GST son inmovilizadas a la matriz debido a su afinidad por el glutatión (sustrato de la GST). Seguidamente, estas proteínas pueden ser fácilmente eluidas de la resina mediante la adición de una solución tampón conteniendo una concentración de 10 mM de glutatión.

#### **Procedimiento:**

2. Diluir el extracto celular 5 veces con PBS complementado con *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tables®* (Roche).
3. Preparar la columna con el volumen apropiado de la resina *Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B* (GE Healthcare). La cantidad de resina dependerá de la cantidad de proteína de fusión a purificar (10 mg/ml de resina).
4. Lavar la resina con 5 volúmenes de PBS conteniendo inhibidores de proteasas.
5. Añadir el extracto celular diluido y mantener en contacto con la resina en un agitador orbital durante 1 hora 30 minutos a 4°C.

6. Abrir la columna y recoger la fracción de la muestra que no queda retenida a la resina (*Flow-through*).
7. Lavar la resina con 12 volúmenes de PBS conteniendo inhibidores de proteasas. Recoger el ultimo lavado.
8. Eluir la proteína de fusión con el tampón GEB (*Glutation Elution Buffer*) proveído por *GST Bulk<sup>TM</sup> Kit* (GE Healthcare). Utilizar el mismo volumen de tampón de elución que de resina. Repetir el proceso de elución dos veces más.
9. Conservar todas las muestras recogidas para su posterior análisis.
10. Analizar las fracciones en un gel de poliacrilamida-SDS (Método 4.3.4).

#### 4.4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ANALISIS DE IMÁGENES

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

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

##### Procedimiento:

1. Recoger las bacterias crecidas en fase exponencial en diferentes medios de cultivo (LB y DMEM), o aislar las bacterias de heces o raspado de mucus de ratones infectados.
2. Centrifugar las bacterias a 12000 xg durante 2 minutos.
3. Depositar el *pellet* bacteriano entre un portaobjetos y un cubreobjetos.
4. Visualizar las muestras directamente en el microscopio de fluorescencia.

##### 4.4.2. MARCAJE MEDIANTE INMUNOLocalIZACIÓN.

La inmunolocalización es una técnica que permite detectar y localizar proteínas específicas dentro de una célula o tejido, gracias a la especificidad de la unión antígeno- anticuerpo. El procedimiento de detección se inicia haciendo una fijación de la muestra para que retenga la distribución del antígeno y la morfología celular y / o tisular. Posteriormente, se incuba la muestra con un anticuerpo primario específico para la proteína que se quiere determinar y, a continuación, se añade un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo que reconoce el anticuerpo primario inicial. La fluorescencia emitida por este fluorocromo puede ser detectada y captada con un

microscopio de fluorescencia con cámara, y cuantificada.

La inmunolocalización de proteínas de TJ se realizó sobre monocapas de células Caco-2 después de la incubación con las cepas bacterianas o con las distintas fracciones secretadas (COF-SN, 0,5 mg/ml u OMVs, 0,1 mg/ml) a ensayar.

Procedimiento:

1. Lavar las células a analizar que se encuentran sembradas en micro-placas de fondo de vidrio ( *$\mu$ -Slide 8 well Glass bottom*, Ibidi) con PBS estéril, 3 veces.
2. Fijar la muestra celular con paraformaldehído al 3% e incubar a temperatura ambiente durante 40 minutos.
3. Lavar 3 veces con solución de lavado (PBS-glicina 20 mM).
4. Permeabilizar las células con una solución de saponina al 0,05% en PBS- glicina 20 mM e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Lavar 3 veces con solución de lavado.
6. Bloquear las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo compuesta por BSA al 1% en PBS- glicina 20 mM e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar una vez con solución de lavado.
8. Incubar la muestra con el anticuerpo primario anti- *tight junction* específico (ver tabla siguiente) suspendido en una solución de BSA al 1% y saponina al 0,025% en PBS- glicina 20 mM durante 1 hora 30 minutos a 37°C.
9. Lavar 5 veces con solución de lavado.
10. Incubar con el anticuerpo secundario adecuado (ver tabla siguiente) suspendido en una solución de BSA al 1% y saponina al 0,025% en PBS- glicina 20 mM, durante 2 horas a 37°C.
11. Lavar 5 veces con solución de lavado.
12. Marcar el núcleo celular con una solución 0,125  $\mu$ g/ml de DAPI (Sigma Aldrich) por 20 minutos a temperatura ambiente.
13. Lavar 3 veces con PBS estéril.
14. Añadir suficiente PBS estéril para mantener las células hidratadas y almacenar a 4°C hasta su análisis.

Los anticuerpos utilizados en el marcaje por inmunolocalización de proteínas de TJ y sus respectivas concentraciones, se especifican en la siguiente tabla:

| <u>Anticuerpos primarios</u>                                              | <u>Especie de procedencia</u> | <u>Concentración</u> | <u>Casa comercial</u> |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Anti-Ocludina                                                             | Ratón                         | 0,5 µg/ml            | Invitrogen            |
| Anti-ZO1                                                                  | Conejo                        | 5 µg/ml              | Invitrogen            |
| Anti-ZO2                                                                  | Conejo                        | 5 µg/ml              | Invitrogen            |
| Anti-Claudina2                                                            | Conejo                        | 5 µg/ml              | Abcam                 |
| <u>Anticuerpos Secundarios</u>                                            | <u>Especie de procedencia</u> | <u>Concentración</u> | <u>Casa comercial</u> |
| Alexa Fluor 488-conjugated F (ab') <sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (H+L) | Cabra                         | 0,5 µg/ml            | Invitrogen            |
| Alexa Fluor 488-conjugated F (ab') <sub>2</sub> goat anti-rabbit IgG      | Cabra                         | 0,5 µg/ml            | Invitrogen            |

#### 4.4.3. MICROSCOPIA CONFOCAL Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

La microscopía confocal posibilita un estudio tridimensional de las muestras, incluyendo su interior. La característica principal de la microscopía confocal es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Algunas moléculas poseen una fluorescencia natural o intrínseca ("fluorescencia primaria"). Sin embargo, la mayoría de las estructuras biológicas carecen de ella, por lo que para poder visualizarlas es necesario modificarlas específicamente. Esto se consigue utilizando fluorocromos o fluoróforos extrínsecos ("fluorescencia secundaria"), que permite que se puedan observar simultáneamente distintas estructuras dentro de una misma muestra, si cada una de ellas está marcada con un fluorocromo diferente. Además, en este tipo de muestras se puede estudiar la colocación (coincidencia) de los diferentes marcadores, en una región concreta de la célula o del tejido (García, 2012).

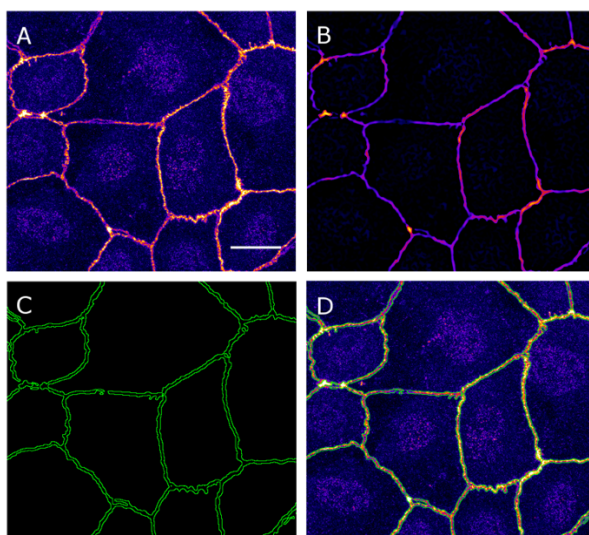
La obtención de imágenes de proteínas de *Tight junctions* (TJ) marcadas por inmunolocalización se realizó mediante microscopía confocal y se analizaron utilizando *Fiji* (distribuido por el programa de procesamiento y análisis de imágenes biológicas de acceso abierto *Image J*) (Schindelin et al., 2012).

El trabajo de microscopía confocal se realizó en la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada, que forma parte de los Centros Científicos y Tecnológicos (CCiT) de la Universidad de Barcelona.



Procedimiento:

1. Visualizar en la muestra las proteínas TJ marcadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2, equipado con los láseres Ar, Ar-UV y HeNe; utilizando un objetivo en aceite de inmersión 63x 1.32NA.
2. Obtener imágenes del marcaje en 12-bits, con una resolución de imagen de  $0.232 \times 0.232 \times 0.488 \mu\text{m}/\text{voxel}$  (x,y,z respectivamente).
3. Procesar las imágenes utilizando el *software Fiji*
4. Para el análisis cuantitativo de las proteínas ZO-1 y ocludina, trazar las *Tight junctions* utilizando el *plugin Tubeness* y la imagen que proyecta la máxima intensidad.
5. Segmentar la imagen proyectada mediante el método de Li y Tam (1998).
6. Utilizar la región segmentada resultante, para medir la intensidad media en la imagen original de máxima intensidad del punto 4 (ver FIGURA 4.6).



**FIGURA 4.6. Análisis de imagen de la proteína de *Tight junctions* ZO-1.** (A) Recuadro de una imagen original que proyecta la máxima intensidad. (B) El mismo recuadro después de procesarlo por un filtro mediano, donde se elimina el ruido de fondo y se traza usando el *Tubeness plugin*. (C) Regiones de interés (ROI, verde) obtenidas después de binarizar la imagen presentada en el panel (B) aplicando la Entropía Umbral Mínima de Li. (D) Solapamiento de ROI (C) sobre la imagen original panel (A). Las imágenes están codificadas por los colores arbitrarios del estilo *Fire*. Escala de la barra, 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

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

#### 4.5.1 OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO

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

#### 4.5.2 OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para obtener DNA plasmídico a pequeña y media escala (a partir de 10 y 100 ml de cultivo, respectivamente), se utilizaron los kits *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) y *GenElute™ HP Plasmid Midiprep* (Sigma), tal como se describe en los protocolos de las casas comerciales.

#### 4.5.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA

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

Los productos de la reacción se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa, tal y como se describe en Método 4.5.6.1.

#### 4.5.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

La reacción de ligación consiste en la unión de dos fragmentos de DNA mediante una reacción enzimática. Para ello se utiliza la DNA ligasa del bacteriófago T4, una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los grupos 5'-fosfato y los grupos 3'-hidroxilo terminales de fragmentos de DNA, en presencia de ATP y  $Mg^{2+}$ .

##### Procedimiento:

1. Determinar la concentración tanto del vector como del inserto para la ligación.

2. Preparar la reacción de ligación según las siguientes proporciones:

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

(1) Normalmente 100 ng.

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

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

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

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

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

La técnica de PCR desarrollada en 1983 por Kary Mullis y posteriormente publicada (Saiki *et al.*, 1988), se utiliza para amplificar fragmentos de DNA a partir de un DNA molde. La región de DNA a amplificar queda limitada por la secuencia de los dos oligonucleótidos utilizados que son complementarios a cada una de las cadenas de DNA. Estos oligonucleótidos funcionan como cebadores para la síntesis del DNA por la DNA polimerasa.

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

Se utilizan polimerasas termoestables. En este trabajo se ha utilizado de forma general la *taq Biotoools DNA Polymerase* (Biotoools), excepto cuando se requería una alta fidelidad o que los fragmentos de DNA amplificados tuviesen los extremos romos; en estos casos se utilizó la *Pfu TurboTM DNA Polymerase* (Stratagene). Las reacciones de PCR son muy susceptibles al tipo de DNA molde utilizado, así como a la concentración de  $Mg^{2+}$ , cebadores y dNTPs. Por este motivo, no existe un protocolo generalizado,

sino que cada reacción necesita ser puesta a punto. Básicamente se siguió el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001).

#### Procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción en tubos de 0,5 ml, como se indica a continuación:

| <b><u>Mezcla de reacción</u></b> |                         |
|----------------------------------|-------------------------|
| DNA molde                        | Variable <sup>(1)</sup> |
| <i>Primer forward</i>            | 0,025 mM                |
| <i>Primer reverse</i>            | 0,025 mM                |
| dNTPs                            | 0,2 mM                  |
| DNA polimerasa                   | 2,5 U                   |
| Tampón de amplificación          | 1X                      |
| Mg <sup>2+</sup> <sup>(2)</sup>  | 1,5 – 4 mM              |
| H <sub>2</sub> O desionizada     | csp <sup>(3)</sup>      |

- (1) 2ng de DNA genómico, 50 ng de DNA plasmídico o una colonia bacteriana.
- (2) Siempre y cuando no estuviese incluido en el tampón de reacción.
- (3) Volumen final de 100 µl para la obtención de fragmentos de DNA y 20 µl para el análisis de clones recombinantes.

2. Colocar los tubos en el termociclador y programar los siguientes pasos.
  - I. Desnaturalizar el DNA molde a 94°C (1 minuto para DNA plasmídico y 5 minutos para DNA genómico libre o si se utiliza directamente colonia bacteriana).
  - II. Aplicar un número variable de ciclos (20-30) con los siguientes pasos:
    - a) Desnaturalización del DNA: 94°C, durante 45 segundos.
    - b) Unión de los cebadores: 45 segundos a T<sub>m</sub> óptima (específica para cada pareja de cebadores).
    - c) Extensión: 72°C durante el tiempo necesario (1 minuto por cada 1 Kb excepto cuando se utiliza la enzima Pfu (enzima altamente termoestable) que amplifica 1 Kb cada 2 minutos aproximadamente).
  - III. Aplicar un último ciclo de extensión durante 10 minutos y a 72°C.
  - IV. Purificar el DNA obtenido.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran listados en el

## ANEXO 1.

Las reacciones se realizaron en el termociclador *G-STORM* (Bionova Científica s.l.)

**4.5.6. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA**

La técnica de PCR se utilizó para la obtención de fragmentos de DNA que posteriormente fueron clonados en diferentes plásmidos. Para comprobar que durante el proceso de amplificación la DNA polimerasa no hubiese introducido mutaciones, todos los fragmentos obtenidos mediante esta técnica fueron secuenciados (Método 4.5.8).

**4.5.6.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa mediante electroforesis**

La electroforesis en geles de agarosa permite la separación de fragmentos de DNA en función de su tamaño, comprendido entre 0,1 y 25 Kb. El DNA es una molécula cargada negativamente y se desplaza hacia el ánodo en la matriz de agarosa al aplicar una corriente eléctrica. La movilidad del DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño. La concentración de agarosa del gel determina la resolución de los fragmentos de DNA a separar, de forma que es posible discriminar entre bandas de DNA de tamaño muy parecido mediante la variación de la concentración. En este trabajo se han utilizado geles de agarosa preparados al 1% (p/v).

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

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

**Tampón de electroforesis (TAE 50x)**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris base             | 5 M   |
| Ácido acético glacial | 1 M   |
| EDTA                  | 50 mM |

Ajustar pH a 8,0

| <u>Tampón de carga</u> |    |
|------------------------|----|
| Glicerol               | 5% |
| Azul de bromofenol     | 5% |

#### 4.5.6.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

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

#### 4.5.6.3. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR

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

#### 4.5.7. SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES

La técnica de PCR (Método 4.5.5) también permite la selección de clones recombinantes que provienen de la ligación entre un fragmento de DNA y un vector de clonación. Para ello se puede utilizar una pareja de cebadores pertenecientes al vector de clonación, o bien, un cebador del vector y otro del fragmento clonado.

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

#### 4.5.8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA

Para la secuenciación automática de fragmentos de DNA se utilizó el servicio de secuenciación EZ-Seq V2.0 (Macrogen, Europe). En la preparación de las muestras se siguió el protocolo descrito por la casa comercial, tal como se indica a continuación:

| <u>Mezcla de reacción</u>                            |      |
|------------------------------------------------------|------|
| DNA a secuenciar (50 ng/μl) <sup>(1)</sup>           | 5 μl |
| Primer <i>Reverse</i> o <i>Forward</i> (5 pmoles/μl) | 5 μl |

- <sup>(1)</sup> Fragmento de DNA obtenido de la purificación de producto de PCR o plásmido recombinante (Método 4.5.6.3).

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

El proceso de obtención de moléculas híbridas de DNA consta de diferentes etapas, todas ellas descritas en apartados anteriores. El primer paso consiste en la obtención del vector de clonación y del inserto que se desea clonar. El inserto puede obtenerse mediante la técnica de PCR (Método 4.5.5) o por digestión a partir de otro plásmido recombinante y posterior purificación. A continuación, inserto y vector, deben ser digeridos con las enzimas de restricción adecuadas (Método 4.5.3) para la obtención de moléculas con extremos compatibles. Posteriormente se procede a la ligación de ambos DNAs (Método 4.5.4) por acción de la T4 DNA ligasa (*Fast-Link<sup>TM</sup> Ligase*) y finalmente, el producto de ligación es introducido en células de *E. coli* competentes (Método 4.1.4) a utilizar según el estudio. Entre las colonias crecidas en placas de selección, se identifican los clones recombinantes (que contienen la molécula híbrida de interés) mediante PCR y se aísla el DNA plasmídico (Método 4.5.2) para su posterior análisis.

##### **4.5.9.1. Fusión de promotores al gen *gfpmut3.1***

Para estudiar la expresión de *tcpC*, se clonó el promotor de dicho gen en un plásmido de la serie PFU. Esta serie de plásmidos contienen un *polilinker* con múltiples dianas de restricción y se diferencian en el gen reportero. En este caso se utilizó el plásmido PFU34, que lleva como marcador el gen de resistencia a ampicilina y como gen reportero el gen *gfpmut.3.1*. Este gen expresa una versión mutada de la proteína *Green fluorescent protein* (GFP) que emite más fluorescencia que la proteína *wild type*, adecuada para el análisis en células bacterianas (Uliczka et al., 2011).

El promotor amplificado correspondió a un fragmento de 692 pb por delante del codón ATG, conteniendo en sus extremos las dianas de restricción para las enzimas *BamHI* y *Sall* respectivamente.

##### Procedimiento:

1. Amplificar la región promotora de *tcpC* por PCR (Método 4.5.5)

2. Purificar el fragmento amplificado con el *kit Quiagen*.
3. Digerir el inserto y el vector con las dos enzimas de restricción seleccionadas (Método 4.5.3).
4. Inactivar las enzimas por incubación a 65°C durante 15 minutos.
5. Purificar los productos de digestión y proceder a su ligación utilizando el *kit Fastlink*
6. Transformar la cepa *E. coli* XL1-Blue con el producto de la ligación e incubar en placas de LB-ampicilina (Método 4.1.4).
7. Seleccionar las colonias que contienen el plásmido recombinante mediante PCR.

## 4.6. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

El RNA es una molécula muy sensible a la acción de RNasas, de manera que siempre se trabajó con guantes y material estéril libre de RNasas para evitar su degradación.

### 4.6.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para la obtención de RNA total de células eucariotas, se utilizó el kit comercial *illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit* (GE Healthcare), siempre siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

La utilización del kit para la extracción de RNA asegura una eliminación eficiente del DNA contaminante en la muestra. Sin embargo, para evitar amplificaciones de DNA contaminante, se realizó un tratamiento con DNasa I libre de RNasas (suministradas por cada kit) al RNA que queda adherido a la columna de sílice durante la extracción.

La enzima DNasa es una endonucleasa inespecífica que degrada DNA de cadena simple y doble, asegurando una muestra de RNA libre de DNA contaminante.

El RNA se conservó congelado a -80°C. Antes de su uso se mantuvo a 4°C.

### 4.6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA

El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. La absorbancia a 260 nm ( $DO_{260}$ ) permite calcular la concentración de RNA de la muestra. Una  $DO_{260}$  de 1 equivale a aproximadamente 40 µg/ml de RNA. La relación entre la



absorbancia a 260 y 280 nm ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) permite estimar la pureza del RNA, considerando óptimo un valor de 2.

Para confirmar la calidad del RNA se visualizaron las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S por electroforesis (Método 4.5.6.1) en condiciones desnaturalizantes, en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2%.

#### 4.6.3. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL RNA

La transcripción inversa del RNA es un tipo de PCR que utiliza como molde RNAs que se expresan en las células. El mRNA es copiado a DNA complementario (cDNA) por la transcriptasa reversa empleando una mezcla de *random primers* (oligonucleótidos al azar) que aseguran que la síntesis de cDNA ocurre eficientemente. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de cDNA generado por retrotranscripción es proporcional al número de moléculas de RNA presente en una muestra dada.

El cDNA fue obtenido utilizando el kit Transcriptor *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (AB biosystems) a partir de 1000 ng de RNA, siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

##### Procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción 2x (reactivos proporcionados por el kit de Applied Biosystems™) y colocar 10 µl de la misma en tubos de 0,5 ml de capacidad.
2. Añadir 1 µg de RNA diluidos en 10 µl de H<sub>2</sub>O.
3. Realizar la Transcripción reversa aplicando el programa de ciclos de temperatura en el termociclador G-STORM (Bionova Científica s.l.) con los siguientes pasos:

| <b><u>Pasos</u></b> | <b><u>1</u></b> | <b><u>2</u></b> | <b><u>3</u></b> | <b><u>4</u></b> |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Temperatura (°C)    | 25              | 37              | 85              | 4               |
| Tiempo (minutos)    | 10              | 120             | 5               | ∞               |

4. Conservar el cDNA a 4°C hasta su utilización.

#### 4.6.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA ACOPLADA A TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la PCR que permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de un ácido nucleico. Esta técnica fue descrita por Higuchi y colaboradores (1993), quienes inicialmente la denominaron Kinetic PCR. La reacción de qPCR es básicamente igual a una PCR convencional, sin embargo, a la mezcla de reacción se le añade un reactivo que emite fluorescencia al unirse a la secuencia amplificada (TAQMAN PROBES®) o bien cuando se intercala a DNA de doble cadena (SYBR GREEN®); y se utiliza un termociclador especial capaz de detectar la fluorescencia emitida. Esto permite medir la tasa de generación del producto de DNA después de cada ciclo de amplificación, motivo por el que recibe el nombre de PCR en tiempo real.

La tecnología de la PCR cuantitativa está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del DNA diana. Esta metodología permite estimar la formación de producto de amplificación de manera continua y establecer el punto en el tiempo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un producto de PCR. Este se determina identificando el número del ciclo en el cual la intensidad de la emisión del reportero marcado se incrementa sobre el ruido de fondo. Este número del ciclo está referido como el ciclo umbral o “threshold cycle” (Ct). El Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias del blanco. Por lo tanto cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos los valores de Ct.

Los ensayos de RT-qPCR son altamente reproducibles y pueden discriminar fácilmente entre cantidades diferentes de molde. Esta técnica se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de mRNA (Bustin, 2000), en donde el cDNA (obtenido a partir de RNA por transcripción reversa) es el molde para una reacción de PCR en tiempo real para determinar cambios en la expresión de genes.

##### 4.6.4.1. RT-qPCR por SYBR Green

Para seguir la amplificación de cDNA durante la RT-qPCR se utiliza el fluoróforo *SYBR Green*, un agente reportero de unión a DNA de doble cadena. Cuando la molécula se intercala con el DNA, su fluorescencia incrementa (Morrison *et al.*, 1998). Durante el transcurso de la PCR la intensidad de la fluorescencia incrementará proporcionalmente a la cantidad DNA de doble cadena formado.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, con pocillos ópticos adaptados para no interferir en esta detección. El equipo utilizado fue un StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

La reacción consta de los mismos componentes que una PCR convencional además del fluoróforo SYBR Green. La mezcla de reacción que incluye la *Taq* polimerasa, el fluorocromo y el tampón de reacción se obtuvo de Life Technologies (SYBR® Green PCR Master Mix,).

Los oligonucleótidos cebadores debían tener una longitud de entre 19 y 22 nucleótidos, con un mínimo de 50% de residuos G/C, y formar un fragmento de amplificación de entre 50 y 330 pb.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran listados en el ANEXO 1. Como control endógeno se utilizó el gen de la  $\beta$ -actina.

#### Procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción para cada muestra y gen a analizar en un volumen final de 40  $\mu$ l, que se reparte en dos pocillos diferentes de 20  $\mu$ l para obtener cada ensayo por duplicado, tal como se indica a continuación:

| <b><u>Mezcla de reacción</u></b>       |                             |
|----------------------------------------|-----------------------------|
| <i>SYBR Green PCR Master Mix</i> (2X)  | 20 $\mu$ l (1X)             |
| <i>Primer forward</i>                  | 1 $\mu$ l (3mM)             |
| <i>Primer reverse</i>                  | 1 $\mu$ l (3mM)             |
| cDNA molde diluido 1/25 <sup>(1)</sup> | 18 $\mu$ l (2 ng / $\mu$ l) |

<sup>(1)</sup> cDNA obtenido a partir de 1  $\mu$ g de RNA en la RT-PCR (Método 4.6.4).

2. Colocar los tubos en el termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System), y programar los siguientes pasos de la qRT-PCR:

| <b><u>Pasos</u></b>       | <b><u>Nº ciclos</u></b> | <b><u>Temperatura</u></b> | <b><u>Tiempo</u></b> |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|
| Desnaturalización inicial | 1 X                     | 50° C                     | 2 min                |
|                           |                         | 95° C                     | 10 seg               |
| Amplificación             | 40 X                    | 95° C                     | 15 seg               |
|                           |                         | 62° C                     | 1 min                |

#### 4.6.4.2. RT-qPCR por sondas TaqMan

Esta técnica se basa en la utilización de tres oligonucleótidos en la reacción de PCR, dos de los cuales (*forward* y *reverse*) permiten la amplificación del producto al que se hibridará el tercer oligonucleótido, la sonda fluorogénica TaqMan®. Esta sonda cuenta con un marcador fluorescente en el extremo 5' y con un *quencher* en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, la distancia que separa el *quencher* del fluorógeno es suficiente para disminuir la fluorescencia emitida por éste. Cuando se amplifica el gen diana, mediante la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq Polimerasa, se degrada el extremo 3' de la sonda fluorescente (que contiene el *quencher*) permitiendo así la emisión de la fluorescencia en tiempo real. De esta manera la cantidad de fluorescencia producida es directamente proporcional a la concentración de la secuencia diana.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), en placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción que incluye la Taq polimerasa y el tampón de reacción se obtuvo de Life technologies™ (TaqMan® Gene Expression Master Mix Reagent,).

Las sondas Taqman® utilizadas en este trabajo se encuentran listadas en el ANEXO 2. Como control endógeno se utilizó el gen de la  $\beta$ -actina (*ACTB Oligo Mix*, Life technologies™).

#### Procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción para cada muestra y gen a analizar en un volumen final de 40  $\mu$ l, que se reparte en dos pocillos diferentes de 20  $\mu$ l para obtener cada ensayo por duplicado, tal como se indica a continuación:

| <b>Mezcla de reacción</b>              |                             |
|----------------------------------------|-----------------------------|
| SYBR Green PCR Master Mix (2X)         | 20 $\mu$ l (1X)             |
| Sonda TaqMan®                          | 2 $\mu$ l                   |
| cDNA molde diluido 1/12 <sup>(1)</sup> | 10 $\mu$ l (4 ng / $\mu$ l) |
| H <sub>2</sub> O milliQ c.s.p          | 40 $\mu$ l                  |

<sup>(1)</sup> cDNA obtenido a partir de 1  $\mu$ g de RNA en la RT-PCR (Método 4.6.4).

2. Colocar los tubos en el termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System), y programar los siguientes pasos de la qRT-PCR:

| <u>Pasos</u>              | <u>Nº ciclos</u> | <u>Temperatura</u> | <u>Tiempo</u> |
|---------------------------|------------------|--------------------|---------------|
| Desnaturalización inicial | 1 X              | 50 °C              | 2 min         |
|                           |                  | 95° C              | 10 min        |
| Amplificación             | 40 X             | 95° C              | 15 seg        |
|                           |                  | 60° C              | 1 min         |

#### 4.6.4.3. CALCULO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN NIVELES RELATIVOS DE mRNA

La cuantificación de la expresión génica utilizando RT-qPCR puede hacerse mediante dos métodos, en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la cuantificación se expresa en valor absoluto y se basa en la utilización de una recta estándar a partir de cDNAs de concentraciones conocidas, y en extrapolar la concentración del gen en la muestra experimental a partir del ciclo umbral (Ct) obtenido. Durante esta Tesis se han realizado los cálculos de los niveles relativos de mRNA mediante el segundo tipo de análisis, cuantificación relativa o método del  $\Delta\Delta Ct$ , en el que se comparan directamente los Cts del gen testado y gen de referencia ( $\Delta Ct$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta Ct$  de las muestras experimentales con respecto a los  $\Delta Ct$  de la muestra control. Para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares.

Para cada muestra, las reacciones de RT-qPCR se realizaron por duplicado y se estableció el Ct en la parte lineal de la curva de amplificación. El gen de referencia elegido en todos los experimentos fue el gen de la  $\beta$ -actina que mantiene una expresión constante en nuestro modelo de estudio, y se fijó el valor de expresión de las muestras control en 1. Los valores de niveles relativos de mRNA se determinaron como un aumento de veces en comparación con las muestras de control y se calcularon como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

$$\Delta Ct = Ct(gen\ testado) - Ct(gen\ \beta - actina)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(muestra\ experimental) - \Delta Ct(muestra\ control)$$

$$Nivel\ relativo\ de\ mRNA = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

#### 4.7. COLONIZACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATONES CON CEPAS BACTERIANAS

Para analizar la expresión del gen *tcpC* *in vivo* en el intestino de ratones mediante la expresión de la fusión del promotor de *tcpC* de EcN al gen reportero *gfp*, se administraron por vía orogástrica suspensiones bacterianas de la cepa EcN (PFU34) y EcN (PFU34- $\phi$ tcpC) a ratones machos CD-1, de 5-8 semanas de edad. Estas cepas eran resistentes a ampicilina. Después del tratamiento se determinó el número de bacterias de cada cepa, en las heces y en el mucus de colon e íleon de los ratones.

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

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

##### Procedimiento de inoculación a ratones:

1. Adicionar 5 g/L de ampicilina en el agua de bebida de los ratones 24 horas antes de la infección.
2. Retirar el alimento de las jaulas 3 horas previo a la infección.
3. Administrar a los ratones, mediante sonda orogástrica, 200  $\mu$ l de las cepas bacterianas a analizar, resuspendidas en PBS a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.
4. Distribuir los ratones en sus jaulas reponiendo el alimento y manteniendo el antibiótico en el agua de bebida durante todo el proceso.

##### Procedimiento de obtención y tratamiento de heces:

1. Agrupar y mantener los ratones durante 3 días después de la infección en sus correspondientes jaulas.
2. Separar los ratones en jaulas individuales durante 3 horas, privados de agua y alimento.
3. Recolectar las heces de manera individual para cada ratón en tubos de

ensayo previamente tarados y determinar su peso.

4. Homogenizar las heces en medio mínimo (SM) en una proporción de 1g/10 ml de SM, mediante agitación y la ayuda de una varilla de cristal.
5. Realizar diluciones seriadas y sembrar alícuotas de 100 µl en placas de LB con ampicilina (antibiótico de selección).

| <b>Medio SM</b>                                 |          |
|-------------------------------------------------|----------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | 34 mM    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 64 mM    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 20 mM    |
| FeSO <sub>4</sub>                               | 0,001 mM |

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

1. Sacrificar los ratones, transcurridos 4 días de la infección mediante asfixia por CO<sub>2</sub>. Diseccionar los animales para extraer el tejido intestinal.
2. Lavar 3 veces la luz del tracto intestinal con 10 ml de PBS, mediante una jeringa.
3. Cortar una porción de 3 cm del íleon distal y otra porción del colon, de las zonas más próximas al ciego.
4. Depositar los tejidos sobre un cristal y con un portaobjetos raspar su superficie para extraer el mucus.
5. Visualizar por microscopia de fluorescencia las muestras de mucus (Método 4.4.1).
6. Transferir el mucus a tubos Eppendorf estériles previamente tarados y determinar su peso. Mantener los tubos en hielo.
7. Resuspender el mucus en 1 ml de medio SM y proceder al recuento.

## 4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa *SPSS Statistic 20.0*. La diferencia entre dos grupos se analizó mediante el test de la *t* de *Student*. Los análisis de las diferencias entre más de dos grupos, se llevaron a cabo mediante el análisis de la varianza “*one-way ANOVA*” seguido del test de Tukey. Un valor de *P* <0.05 ha sido considerado estadísticamente significativo. Los resultados se expresan como la media ± del error estándar (SE).

---

A lo largo de este trabajo, todos los ensayos se han realizado como mínimo a partir de 3 experimentos biológicos independientes.





## 5. RESULTADOS

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. SELECCIÓN DE CEPAS COMENSALES DE LA COLECCIÓN ECOR CON EFECTOS POSITIVOS SOBRE LA FUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL

#### 5.1.1. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS ECOR QUE CONTIENEN EL GEN *tcpC*

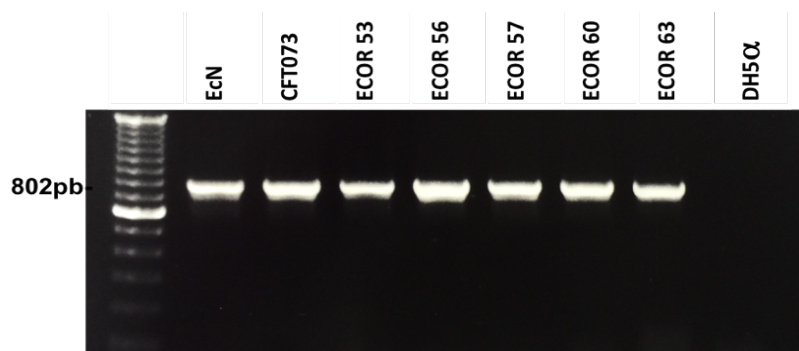
Debido a que el efecto positivo del probiótico EcN sobre la función de barrera intestinal fue atribuido a la proteína TcpC (Hering et al., 2014), se realizó una búsqueda de otras cepas de *E. coli* de origen intestinal que contuvieran el gen *tcpC*, para evaluar posteriormente su capacidad de reforzar la función de barrera.

Para ello, se partió de la Colección de Referencia de *Escherichia coli* (ECOR) que representa ampliamente la variación genotípica en *E. coli*, estando formada por 72 cepas aisladas de muestras fecales o urinarias de mamíferos (Ochman y Selander, 1984). Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica así como de la información genómica disponible en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sobre la presencia de la secuencia del gen *tcpC* en las 72 cepas de esta colección. Esta búsqueda reveló que el gen *tcpC* está presente en 5 cepas, en concreto en las cepas ECOR53, 56, 57, 60 y 63 (Schubert et al., 2010), lo que representa el 7% de la colección (5/72).

Las cepas ECOR53 y ECOR63 corresponden a aislados de heces de humanos sanos, mientras que ECOR56 y ECOR60 fueron aisladas de pacientes con infección del tracto urinario. La cepa ECOR57 se aisló de un gorila sano.

En este trabajo, se seleccionaron las 5 cepas *tcpC* positivas y se confirmó la presencia de la secuencia *tcpC* mediante amplificación por PCR (FIGURA 5.1.) utilizando *primers* específicos de la región codificante del gen que permitieron amplificar un fragmento de 802 pb. Además, se utilizaron las cepas EcN y *E. coli* CFT073 (uropatógena) como controles positivos, y la cepa de laboratorio *E. coli* DH5 $\alpha$  como control negativo.

Los linajes de la colección ECOR se dividen en cinco grupos: A, B1, B2, D y E (Herzer et al., 1990). Estudios filogenéticos demuestran la existencia de genes determinantes de patogenicidad *hly*, *kps*, *pap* y *sfa* en cepas uropatógenas y entéricas de la colección ECOR. La distribución de los cuatro determinantes de la virulencia en las cepas ECOR se limita predominantemente a dos linajes, los grupos B2 y D. Todas las cepas *tcpC* positivas, al igual que EcN, pertenecen al grupo filogenético B2, asociado mayoritariamente con cepas virulentas que causan infecciones extra-intestinales (STEC Center, <http://www.shigatox.net/new/reference-strains/ecor.html>).



**FIGURA 5.1. Análisis de la presencia de *tcpC* en 5 cepas ECOR.** Amplificación por PCR de la secuencia de *tcpC* con los *primers* FW-*tcpC* (TCGCATGGAAACAGCACCT) y RV-*tcpC* (CTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC) de las cepas indicadas. Se indica el tamaño del fragmento amplificado (802 pb). Las cepas EcN y *E. coli* CFT073 fueron procesadas como controles positivos, y la cepa *E. coli* DH5α como control negativo.

Por ello, se realizó una prospección bibliográfica para identificar la presencia de estos potenciales marcadores de virulencia en las cinco cepas ECOR *tcpC* positivas. Los datos publicados indican que todas ellas presentan en su genoma estas regiones asociadas a virulencia (TABLA 5.1.) (Boyd y Hartl, 1998), aunque no se ha demostrado que estas regiones sean funcionales en todas ellas.

**TABLA 5.1. Origen de las cepas de la Colección ECOR y las regiones asociadas a virulencia.** Se resalta en negrita las cepas *tcpC* positivas. Información obtenida de (Boyd y Hartl, 1998).

| Huésped        | Cepas con regiones asociadas a virulencia |                                                                                                               |                                                                                                                       |                                                |
|----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                | <i>hlyII</i>                              | <i>kps</i>                                                                                                    | <i>pap</i>                                                                                                            | <i>sfa</i>                                     |
| Humano         | 24, 43, 48, 51, 54, <b>56, 60, 63</b>     | 8, 11, 14, 24, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 47, 48, 49, 50, 51, <b>53</b> , 55, <b>56</b> , 61, 62, <b>63</b> , 64 | 2, 11, 24, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 48, 49, 50, 51, <b>53</b> , 54, 55, <b>56</b> , 59, <b>60</b> , 62, <b>63</b> , 64 | 51, <b>53</b> , 54, <b>60</b> , <b>63</b> , 64 |
| Otros primates | 52, <b>57</b>                             | 46, 52, <b>57</b> , 66                                                                                        | 37, 46, 52, <b>57</b>                                                                                                 | 52, <b>57</b> , 65, 66                         |
| No primates    |                                           | 44, 47                                                                                                        | 31, 44                                                                                                                | 58                                             |

Respecto a la funcionalidad de estos genes, sólo existe una referencia bibliográfica sobre el gen de la hemolisina (*hlyA*) (Lai et al., 1999). Los datos aportados en este estudio muestran como las diferentes cepas ECOR expresan niveles cuantitativamente diferentes de hemolisina y la gran mayoría causan una fuerte citotoxicidad en la línea celular de macrófagos murinos J774. Sin embargo, aunque las cepas ECOR57 y ECOR63 tienen el genotipo *hlyA*, no presentan el fenotipo asociado a este marcador de

virulencia ya que no expresan una hemolisina funcional y no ejercen efectos citotóxicos en la célula huésped. La viabilidad celular de macrófagos J774 incubados en presencia de estas cepas se mantiene cercana al 100% con valores comparables a las células control (Lai et al., 1999). La ausencia de una hemolisina funcional en estas cepas se ha atribuido a posibles alteraciones o deleciones en la estructura del operón *hlyCABD* o a la existencia de mutaciones responsables de cambios en la secuencia aminoacídica de HlyA que conducen a la pérdida de su actividad hemolítica (Boyd y Hartl, 1998; Lai et al., 1999).

En base a esta información, se decidió excluir las cepas citotóxicas para el desarrollo de esta tesis doctoral. Así pues, se seleccionaron las cepas ECOR57 y ECOR63 para realizar una evaluación directa sobre la capacidad de las mismas en reforzar la función de barrera en monocapas de células epiteliales.

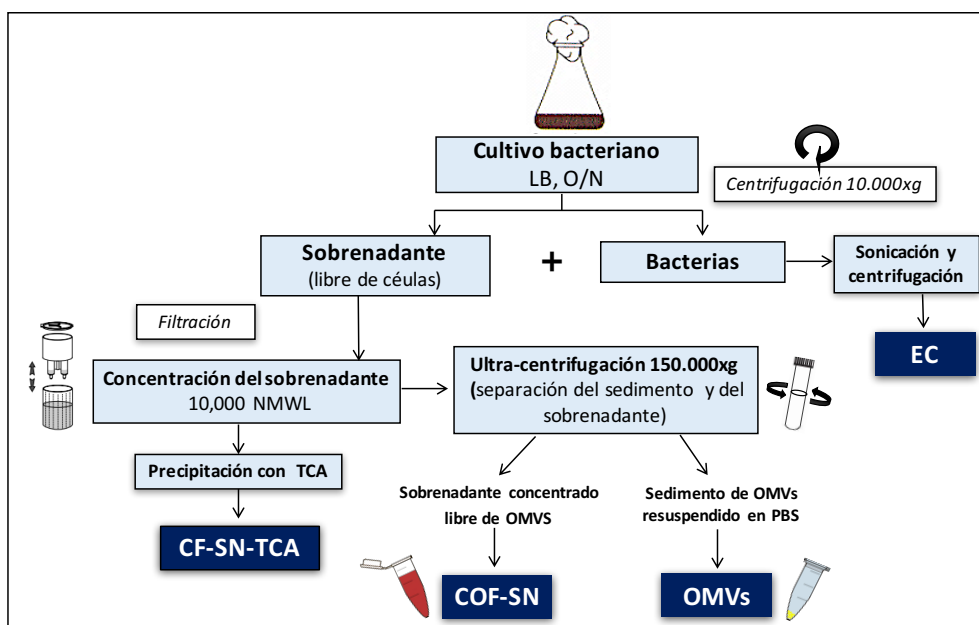
#### **5.1.2. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE TcpC EN CULTIVOS DE LAS CEPAS ECOR *tcpC* POSITIVAS**

Para confirmar la expresión del gen *tcpC* en las cepas ECOR57 y ECOR63, así como evaluar si la proteína TcpC es secretada al medio de cultivo en forma soluble se procedió al fraccionamiento del sobrenadante de cultivos de estas cepas en medio LB siguiendo el esquema detallado en la figura 5.2. En este estudio se incluyó la cepa probiótica EcN (*tcpC* positiva). Las cepas *tcpC* negativas ECOR12 y HB101 se procesaron en paralelo como control negativo.

Los cultivos de estas cepas en medio LB durante 16 horas se centrifugaron para separar las bacterias de los sobrenadantes libres de células (CF-SN) que contienen tanto las proteínas secretadas de manera soluble como las vesículas de membrana externa (OMVs). A partir del sedimento bacteriano se obtuvieron los extractos celulares (CE) que contienen las proteínas intracelulares y de membrana plasmática. Los CF-SN fueron filtrados a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar posibles bacterias residuales y posteriormente sometidos a precipitación con TCA (CF-SN-TCA) (ver Método 4.3.3). El esquema del proceso se presenta en la figura 5.2.

Se analizó la presencia de la proteína TcpC en las fracciones obtenidas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo policlonal de conejo (anticuerpo anti-TcpC). Este anticuerpo comercial fue preparado por GenScrip® a través de un protocolo de inmunización de conejos con un péptido inmunogénico de la proteína TcpC. El péptido utilizado fue QTLEVGDSLRRNID (FIGURA 5.3). En paralelo se clonó el gen *tcpC* de la cepa EcN en el plásmido de expresión pBAD-TOPO que contiene: (i) el promotor del sistema *araBAD* inducible por L-arabinosa, y (ii) una secuencia nucleotídica que

codifica la etiqueta correspondiente al epítipo V5 seguida de la etiqueta (6xHis) fusionadas al extremo C-terminal de la proteína recombinante. Estas etiquetas permiten su purificación por cromatografía de afinidad y la detección de la proteína recombinante con anticuerpos anti-His y anti-V5, respectivamente. La expresión de la proteína se llevó a cabo en células Top-10 transformadas con el plásmido recombinante pBAD-TOPO-TcpC-V5-His.



**FIGURA 5.2. Fraccionamiento de cultivos bacterianos.** **CF-SN-TCA:** Sobrenadante del cultivo libre de células y precipitado con TCA (contiene todos los componentes secretados por la bacteria); **COF-SN:** sobrenadante libre de células y OMVs; **OMVs:** vesículas sedimentadas por ultracentrifugación del sobrenadante del cultivo a 150000 xg; **EC:** Extractos celulares obtenidos por sonicación de las bacterias recogidas del cultivo por centrifugación.

MIAYENIEFFICLVNVLDDNNMYNILLFFILSLAIPFLFLAWKQHLKTKEIRSYLLKE  
 GYNIIFNGEGNSYLA FNISNATFRAGNLTSDYFQASISYIH DYRWEWKEVEAKKINN  
 IFIYISNIDFPSQKLFYRNNKSLAEIDWAKLQAIFHQPYEIQNDVMQDNNNTHYDFF  
ISHAKEDKDTFVRPLVDELNRLGVIIWYDEQTLEVGDSLRRNIDLGLRKANYGIVILSH  
NFLNKKWTQYELDSLINRAVYDDNKIILPIWHNINAQEVSKYSHYLADKMALQTSLY  
 SVKEIARELAEIAYRRR

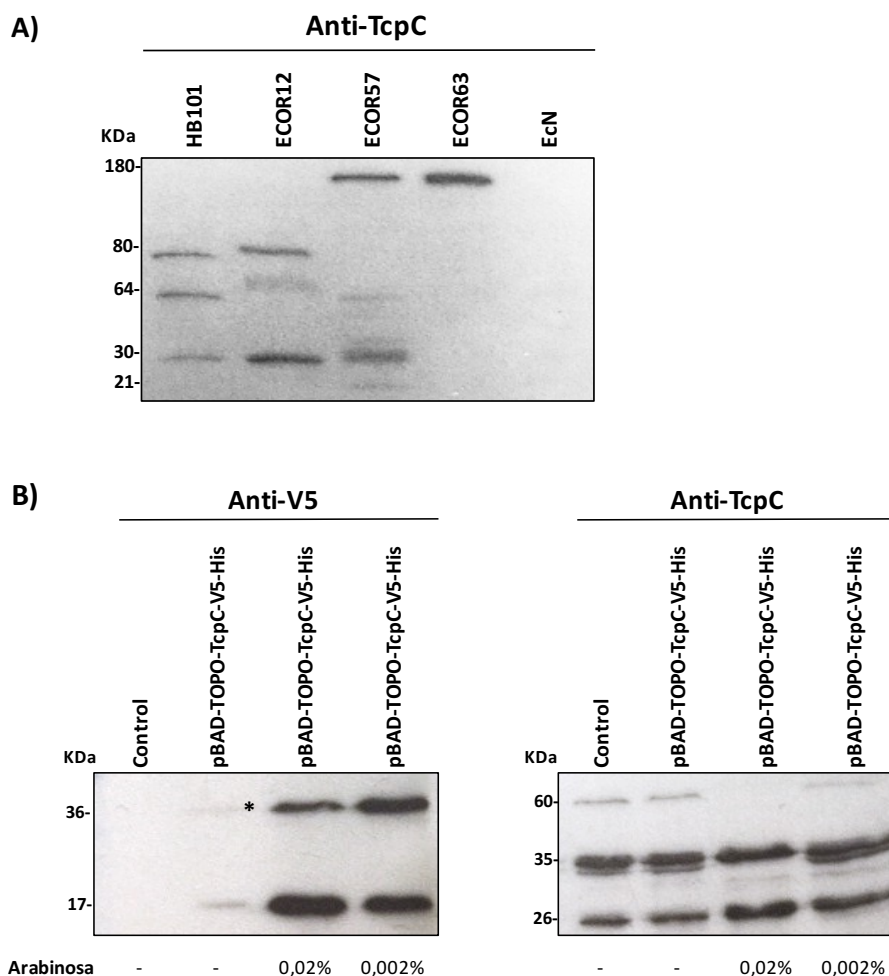
**FIGURA 5.3. Secuencia aminoacídica de la proteína TcpC.** La secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de unión a TIR del receptor Toll/IL-1 se resalta en color gris. Los péptidos seleccionados para la obtención de anticuerpos anti-TcpC se muestran subrayados.

Los resultados del análisis por *Western blot* para la detección de TcpC en las fracciones bacterianas se presentan en la figura 5.4. Dicho análisis reveló que el anticuerpo anti-TcpC reconoció de manera inespecífica señales en proteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos analizados (CF-SN-TCA) puesto que se observaron múltiples bandas de detección en las cepas *tcpC* negativas HB101 y ECOR12. En los sobrenadantes de las cepas ECOR57 y ECOR63 se observó una banda de alto peso molecular, no compatible con el tamaño esperado para TcpC (34 kDa), que podría deberse a un reconocimiento cruzado probablemente del dominio de unión a TIR presente en otra proteína secretada. En cuanto a EcN no se observó detección alguna. La ausencia de detección específica de TcpC en los CF-SN-TCA podría indicar que esta proteína presenta una muy baja expresión o estabilidad. Otra opción sería que el anticuerpo obtenido frente a un epítipo concreto no fuera eficaz para la inmunodetección de la proteína TcpC completa.

Para confirmar la validez del anticuerpo anti-TcpC, este fue utilizado para inmunodetectar la proteína recombinante TcpC-V5-His6 expresada a partir del plásmido pBAD-TOPO-TcpC-V5-His. La inducción de la proteína se llevó a cabo por adición de L-arabinosa al medio de cultivo a dos concentraciones finales, 0,02% y 0,002%. Después del fraccionamiento de los cultivos bacterianos se obtuvieron los EC y la expresión de TcpC fue analizada mediante *Western blot* con anticuerpos dirigidos contra el epítipo V5 fusionado al extremo C-terminal de TcpC o con el anticuerpo anti-TcpC utilizado anteriormente (FIGURA 5.4.B). La proteína de 36 KDa detectada con el anticuerpo anti-V5 correspondía a la proteína TcpC recombinante (TcpC-V5-His<sub>6</sub>). Sin embargo, se observa también la presencia de una segunda banda que indica que esta proteína se proteoliza y dicha ruptura incrementa a medida que aumenta la concentración del inductor L-arabinosa.

En cuanto a la inmunodetección con el anticuerpo anti-TcpC se observó nuevamente reacción inespecífica, ya que las bandas observadas estaban presentes incluso en las células TOP-10 control. Estos resultados evidenciaban que el anticuerpo anti-TcpC obtenido no era adecuado y por esta razón se diseñaron otros 3 anticuerpos comerciales de GenScript® contra péptidos inmunogénicos seleccionados de zonas internas y externas a la secuencia correspondiente al dominio de unión a TIR de la proteína TcpC para descartar posibles reacciones cruzadas. Los nuevos péptidos utilizados fueron YRWEWKEVEAKKIN, HAKEDKDTFVRPLV y DSLINRAVYDDNKI (FIGURA 5.3). Los 3 anticuerpos anti-TcpC fueron ensayados en los sobrenadantes (COF-SN-TCA) y en los extractos celulares (EC), tanto de la cepa TOP-10 transformada con el plásmido recombinante pBAD-TOPO-TcpC-V5-His como de las cepas *tcpC* positivas (EcN, ECOR63, ECOR57). No fue posible identificar mediante *Western blot* la proteína TcpC de manera específica ni en los extractos celulares ni como proteína secretada (datos no mostrados).



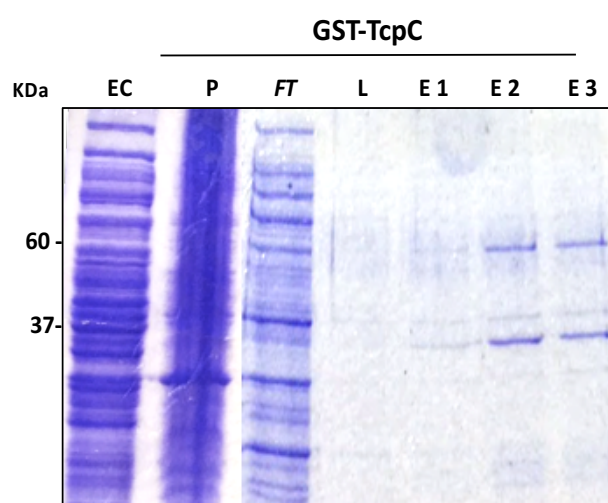


**FIGURA 5.4.** Análisis mediante *Western blot* para la detección de TcpC en las distintas fracciones bacterianas obtenidas a partir de cultivos en medio LB de las cepas indicadas. **(A)** Análisis de la secreción de TcpC mediante el anticuerpo anti-TcpC. Las muestras analizadas corresponden a los sobrenadantes (CF-SN-TCA) de las cepas indicadas. **(B)** Detección de la proteína recombinante TcpC-V5-His<sub>6</sub> en ECs (15 µg) de células TOP-10 transformadas con el plásmido recombinante pBAD-TOPO-TcpC-V5-His tras inducción con 0,02 y 0,002% de L-arabinosa. Como control se analizaron los ECs de células TOP-10 control y de células TOP-10 transformadas con el plásmido recombinante en ausencia de inducción por L-arabinosa. La banda esperada de 36 KDa correspondiente a la proteína TcpC recombinante se muestra con un asterisco. La inmunodetección se llevó a cabo usando anticuerpos anti-V5 o anti-TcpC.

Finalmente, nos planteamos purificar la proteína TcpC utilizando la tecnología del DNA recombinante con la finalidad de utilizar la proteína nativa como antígeno en procesos de inmunización para la obtención de anticuerpos específicos. Para ello se clonó el gen *tcpC* en el vector de expresión inducible pGEX-3x que fusiona la proteína de estudio a la etiqueta GST (*glutathion S-transferasa*). El proceso de purificación de la proteína se realizó a partir de los ECs obtenidos de cultivos de células XL1-Blue transformadas con el plásmido recombinante pGEX-TcpC que expresa GST-TcpC tras la inducción con IPTG. La proteína GST-TcpC se purificó mediante cromatografía de afinidad a través de una columna de *glutathione sepharosa 4B* (Métodos 4.3.6.2) Después de un

exhaustivo lavado con PBS, la proteína GST-TcpC fue eluida con tapón de elución conteniendo 10 mM glutatión. Las fracciones obtenidas durante la purificación como son el *Flow-through* (fracción de la muestra que no queda retenida en la resina), el lavado y las eluciones de la proteína de fusión se analizaron por SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie*. Los resultados se muestran en la figura 5.5, donde se observa que no fue posible purificar la proteína dada su baja expresión y rendimiento. Cabe destacar que modificaciones de las condiciones de inducción tales como la concentración de IPTG (0,1 mM ó 0,3 mM), temperatura (37°C ó 30°C) y tiempo de incubación (3 ó 18 horas) no mejoraron el resultado. Por ello se descartó la estrategia de inmunizar conejos con la proteína completa dirigida a la obtención de anticuerpos para su posterior uso en *Western blot*.

Ya se había reportado en cepas uropatógenas que los niveles de TcpC secretada eran muy bajos (Cirl et al., 2008). Es de destacar que los estudios publicados sobre la función de TcpC en la cepa probiótica EcN están basados en el uso de mutantes *tcpC knockout*, sin que se presenten resultados de la inmunodetección de la proteína secretada (Hering et al., 2014).



**FIGURA 5.5.** Análisis por SDS-PAGE de la proteína de fusión GST-TcpC purificada mediante cromatografía de afinidad a través de una columna de *glutathione sepharosa 4B*. Las condiciones de inducción fueron: 0,3 mM de IPTG a 37°C durante 3 horas. La elución de GST-TcpC se llevó a cabo con glutatión 10 mM. Las fracciones del proceso de purificación analizadas son FT, *flow-through*; L, lavado; E1, E2 y E3, primera, segunda y tercera elución. Se añadieron las fracciones EC, y P, *pellet* (contiene el material insoluble después de sonicar las bacterias) para su comparación con las fracciones purificadas.

### 5.1.3. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE *tcpC* MEDIANTE FUSIONES DE PROMOTOR AL GEN REPORTERO *gfp*

A la vista de que no fue posible detectar la expresión de *tcpC* a nivel de proteína intracelular, ni en la fracción secretada, nos planteamos confirmar su expresión tanto en cultivos *in vitro* como en el tracto intestinal mediante estudios *in vivo* en modelos murinos. Las proteínas reporteras fluorescentes son muy útiles para el estudio de la expresión de genes en comunidades bacterianas o durante la infección y colonización de modelos animales (Uliczka et al., 2011). Con esta finalidad se obtuvieron fusiones del promotor de *tcpC* al gen reportero *gfp*.

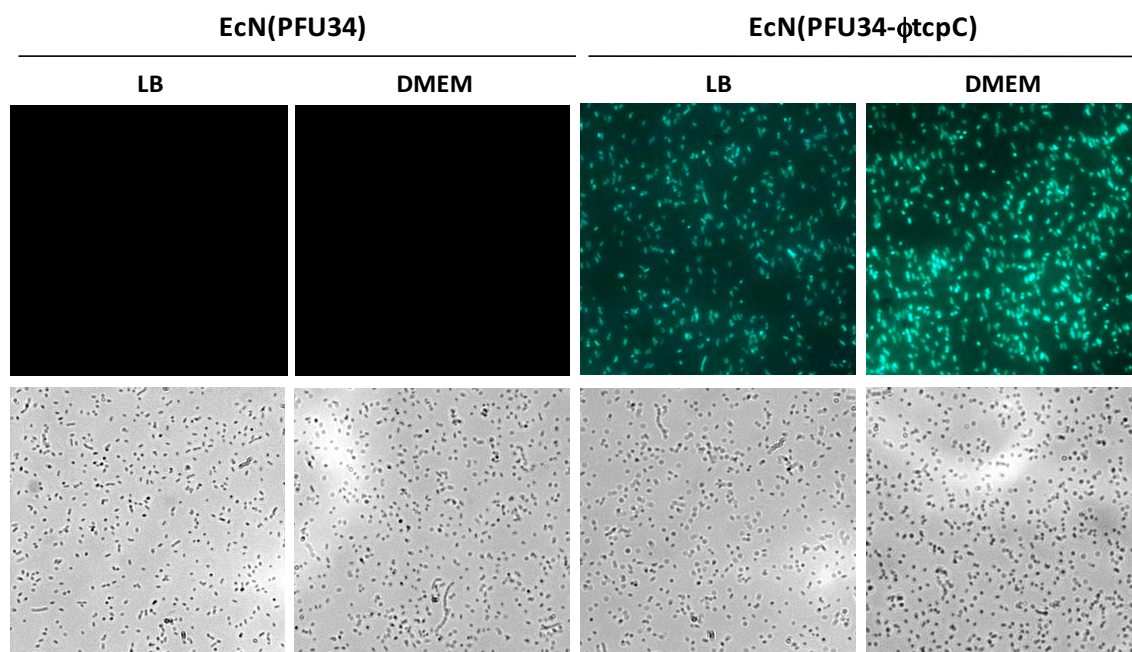
El fragmento utilizado para la construcción de la fusión del promotor de *tcpC* al gen *gfp* se obtuvo mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa EcN. Este fragmento de 692 pb se extendía 692 pb corriente arriba del codón de inicio ATG. Los *primers* utilizados en la reacción de PCR contenían en su extremo 5' la diana de restricción para las enzimas BamHI (*primer forward*) y Sall (*primer reverse*). El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido PFU34 que lleva como marcador el gen de resistencia a la ampicilina y que contiene como gen reportero el gen *gfpmut3.1* que expresa una versión mutada de la proteína *Green fluorescent protein* (GFP). Esta proteína es capaz de emitir mayor intensidad de fluorescencia que la proteína GFP *wild type*. El plásmido recombinante se seleccionó después de transformar células competentes de la cepa XL1-Blue con la mezcla de ligación, obtener el DNA plasmídico de los transformantes ampicilina resistentes y comprobar por PCR la presencia del fragmento clonado, así como la ausencia de mutaciones por secuenciación del mismo. El plásmido recombinante obtenido (PFU34- $\phi$ tcpC) se utilizó para transformar la cepa EcN mediante electroporación. Como control negativo se transformó la cepa EcN con el vector (PFU34) en el que el gen *gfpmut3.1* carece de promotor (Método 4.5.9). Los clones recombinantes fueron seleccionados en placas de LB-ampicilina.

#### 5.1.3.1. Análisis *in vitro*

Como primera aproximación nos planteamos el análisis de la expresión de la construcción  $\phi$ (*tcpC-gfpmut3.1*) en cultivos de la cepa EcN transformada con el plásmido PFU34- $\phi$ tcpC o con el plásmido PFU34 como control. Los medios de cultivo utilizados fueron LB y DMEM.

Los resultados obtenidos muestran la expresión de la proteína GFP a partir del promotor de *tcpC* (bacterias verdes) en los dos medios de cultivo ensayados (FIGURA 5.6). Se observa una mayor intensidad de fluorescencia en medio DMEM con respecto

a LB, lo que sugiere una mayor expresión de *tcpC* en medio DMEM. Los resultados obtenidos con la cepa EcN transformada con el plásmido PFU34 (control negativo) no mostraron emisión de fluorescencia. La presencia de bacterias en los campos analizados fue evidenciada por microscopía de contraste de fases. Estos resultados confirman la funcionalidad del promotor del gen *tcpC* y validan la construcción PFU34- $\phi$ tcpC para estudios de expresión *in vivo*.



**FIGURA 5.6. Análisis de la expresión de *tcpC* en las cepas recombinantes EcN (PFU34) y EcN (PFU34- $\phi$ tcpC).** Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo LB o DMEM. La cepa EcN PFU34 se utilizó como control negativo. Las bacterias fueron procesadas para observación mediante microscopía de fluorescencia (paneles superiores) y microscopía de contraste de fases (paneles inferiores).

### 5.1.3.2. Análisis *in vivo*

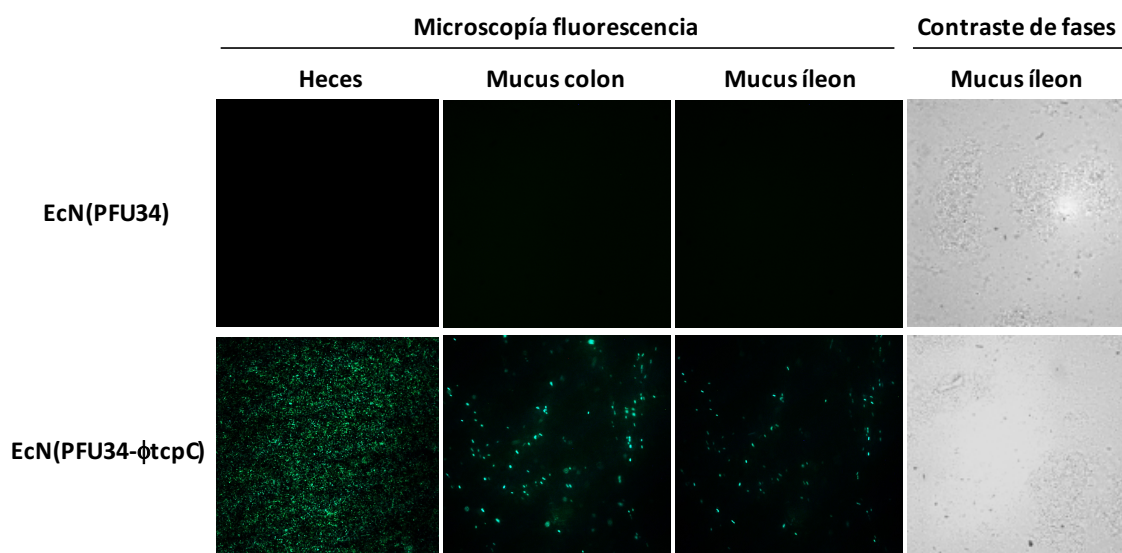
Para analizar la expresión del gen *tcpC* en el intestino, se administró por sonda orogástrica 0.2 ml de una solución que contenía  $10^6$  UFC/ml de la cepa EcN (PFU34- $\phi$ tcpC) a 2 ratones CD-1 (ratones 3 y 4). Otros 2 ratones fueron inoculados con 0.2 ml de una solución que contenía  $10^6$  UFC/ml de la cepa EcN (PFU34) como control negativo (ratones 1 y 2). Un día antes a la inoculación de los ratones, se les administró ampicilina en el agua de bebida (5 g/L) con la finalidad de eliminar las cepas resistentes a dicho antibiótico y facilitar la colonización de las cepas en estudio. La ampicilina fue mantenida en el agua de bebida durante todo el experimento. Al tercer día de la

inoculación se recogieron las heces de los ratones y se trataron como se describe en el apartado Método 4.7 para realizar el recuento bacteriano y observación por microscopía de fluorescencia. La expresión de *tcpC* en el intestino daría como resultado la expresión de GFP a partir de la construcción (PFU34- $\phi$ tcpC), lo que permitiría visualizar las bacterias por la fluorescencia emitida (Método 4.4.1). Al día siguiente de la obtención de heces se procedió al sacrificio de los ratones para obtener por raspado el mucus de las regiones correspondientes al íleon y colon, para realizar los recuentos bacterianos en placas de LB-ampicilina y proceder a la observación por microscopía de fluorescencia. Los recuentos bacterianos obtenidos tanto en heces como en mucus (íleon y colon) se muestran en la tabla 5.2.

**TABLA 5.2. Recuento bacteriano en heces y mucus de colon e íleon de ratones CD-1 colonizados con las cepas indicadas.** Cada muestra se procesó por triplicado. Los valores son la media  $\pm$  SE.

| Ratón | Cepa utilizada           | Heces<br>UFC/g heces                  | Mucus colon<br>UFC/g mucus            | Mucus íleon<br>UFC/g mucus            |
|-------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1     | EcN (PFU34)              | $4,2 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^9$ | $4,5 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^9$ | $2,8 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^9$ |
| 2     | EcN (PFU34)              | $4,0 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ | $4,3 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^9$ | $2,1 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^9$ |
| 3     | EcN (PFU34- $\phi$ tcpC) | $3,9 \times 10^9 \pm 0,9 \times 10^9$ | $3,6 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^9$ | $1,7 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^9$ |
| 4     | EcN (PFU34- $\phi$ tcpC) | $4,3 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^9$ | $3,8 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^9$ | $2,9 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^9$ |

Los recuentos de bacterias expresados como UFC/g en heces y en el mucus aislado de las fracciones correspondientes a íleon y colon mostraron un nivel de colonización equivalente en todos los ratones (TABLA 5.2). Sin embargo, la observación mediante microscopía de fluorescencia de las suspensiones bacterianas obtenidas de heces y de las muestras de mucus mostró emisión de fluorescencia sólo en las cepas que portaban la cepa que expresa la fusión de promotor (PFU34- $\phi$ tcpC) (ratones 3 y 4). Las suspensiones bacterianas obtenidas de los ratones control, inoculados con la cepa probiótica transformada con el vector (PFU34), no mostraron emisión de fluorescencia (ratones 1 y 2) (FIGURA 5.7).

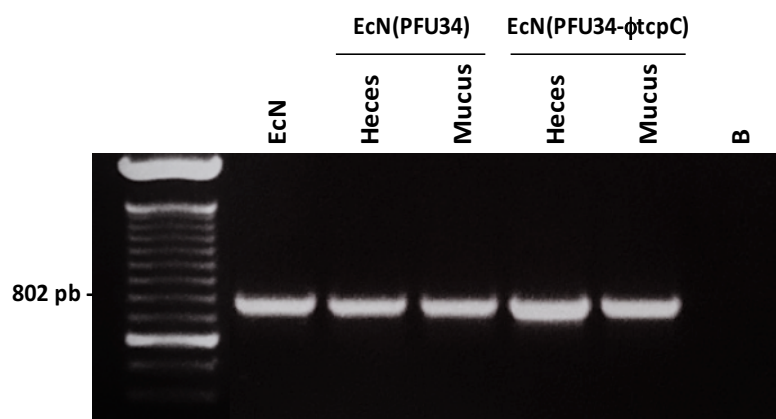


**FIGURA 5.7. Expresión de *tcpC* *in vivo* analizada en muestras de heces y raspado de mucus de colon e íleon de ratones CD-1 colonizados con las cepas indicadas.** Se presentan las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia y de contraste de fase. Se muestran imágenes representativas que corresponden a muestras procedentes de un ratón inoculado con EcN (PFU34) (control) y de un ratón inoculado con EcN (PFU34- $\phi$ tcpC).

De las colonias seleccionadas en placas de LB-ampicilina utilizadas para los recuentos bacterianos en heces y mucus, se aisló una colonia al azar de cada condición. Para confirmar que estas colonias correspondían a la cepa EcN inoculada a los ratones, se llevó a cabo una reacción de PCR con *primers* que permitían amplificar un fragmento de aproximadamente 802 pb, correspondiente a la región codificante del gen *tcpC* presente en el cromosoma de la cepa EcN portadora de los plásmidos PFU34 o PFU34- $\phi$ tcpC (FIGURA 5.8). La amplificación mediante PCR demostró que todas las colonias seleccionadas tanto de heces como de mucus correspondían a EcN. Estos resultados corroboran que las tasas de colonización estimadas se deben a las cepas inoculadas a los ratones y no a componentes de la microbiota intestinal resistentes a ampicilina.

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





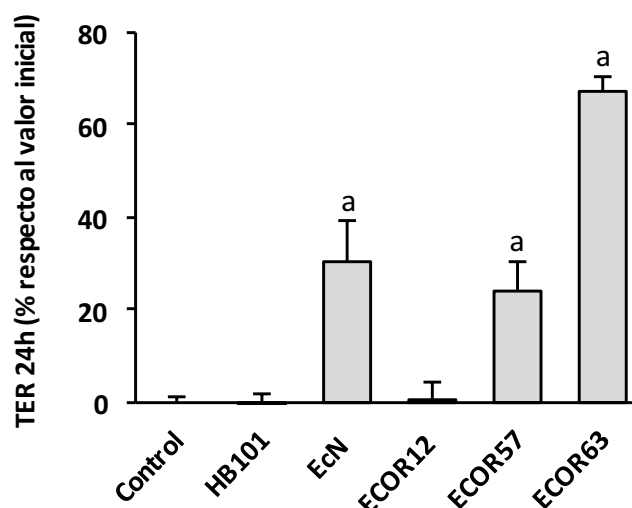
**FIGURA 5.8. Confirmación mediante PCR de las colonias aisladas de heces y mucus de ratones inoculados con las cepas indicadas.** Amplificación por PCR de la secuencia interna del gen *tcpC* con los *primers* FW-*tcpC* (TCGCATGGAAACAGCACCT) y RV-*tcpC* (CTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC) de las colonias aisladas en placas LB-ampicilina a partir de heces y mucus de ratones inoculados con la cepa EcN (PFU34) o EcN (PFU34- $\phi$ tcpC). Se indica el tamaño del fragmento amplificado (802 pb). La cepa EcN se utilizó como control positivo. B: blanco de la reacción de PCR en ausencia de DNA.

#### 5.1.4. LAS CEPAS ECOR QUE CONTIENEN EL GEN *tcpC* INCREMENTAN LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL EN MONOCAPAS DE CÉLULAS T-84

Estudios previos realizados en el grupo de investigación habían demostrado que sobrenadantes concentrados de cultivos de la cepa probiótica EcN en LB tienen un impacto positivo sobre la TER de monocapas de células epiteliales y previenen la disrupción de la barrera epitelial causada por patógenos (Tolosa et al., 2015). Para evaluar la capacidad de los sobrenadantes de las cepas *tcpC*-positivas ECOR63 y ECOR57 para reforzar la barrera epitelial, se incubaron durante 24 horas monocapas de células T-84 con sobrenadantes libres de células (CF-SN) (2 mg de proteína/ ml) recogidos de cultivos en medio LB (Método 4.1.7.1) y la TER se midió antes y después del tratamiento. En paralelo se analizaron los CF-SN obtenidos a partir de cultivos de EcN (control positivo), *E. coli* HB101 (control negativo) y de la cepa de origen intestinal ECOR12 (*tcpC*-negativo) para su comparación.

Sólo los CF-SN de las cepas EcN, ECOR63 y ECOR57 (*tcpC* positivas) provocaron un aumento de la TER, mientras que las muestras procedentes de la cepa de laboratorio HB101 y de la cepa comensal ECOR12 no promovieron ningún cambio respecto a las células control (FIGURA 5.9). El incremento en la TER observado en monocapas de células T-84 incubadas con CF-SN de EcN concuerda con el incremento promovido por los sobrenadantes concentrados de EcN sobre monocapas de células HT-29/B6 reportado por Hering et al., (2014). Estos autores atribuyeron este incremento a la proteína TcpC. El incremento en la TER promovido por el sobrenadante de la cepa

ECOR57 fue del mismo orden que el observado para la cepa EcN, mientras que el proveniente de la cepa ECOR63 mostró una mayor capacidad de refuerzo de la barrera epitelial.



**FIGURA 5.9.** Los sobrenadantes libres de células (CF-SN) de cepas de la Colección de Referencia de *Escherichia coli* (ECOR) que llevan el gen *tcpC* aumentan la TER de monocapas de células T-84. El efecto sobre la TER promovido por los CF-SN de las cepas ECOR indicadas se analizó en monocapas de células T-84 (9 días post-confluencia y valores de TER de alrededor de  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) en comparación con el probiótico EcN y la cepa de laboratorio HB101. Los valores de TER se midieron antes y después de 24 horas de incubación con los CF-SN (2 mg/ ml) recogidos de cultivos en medio LB (n=3, ensayos biológicos independientes). Los datos se presentan como porcentaje de incremento en la TER desde el valor inicial. <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células control no tratadas ( $P \leq 0,001$ ).

Puesto que la cepa ECOR57 no es de origen humano, se seleccionó la cepa ECOR63 para la realización de los posteriores estudios mostrados en esta tesis.

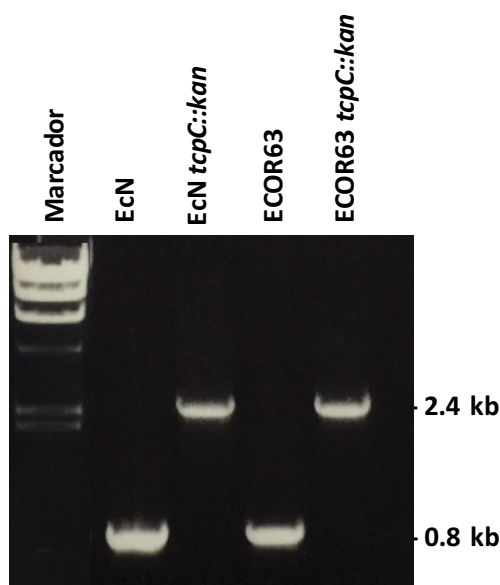
## 5.2. MODULACIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL POR OMVs Y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR LAS CEPAS EcN Y ECOR63

### 5.2.1. EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA ELECTRICA TRANSEPITELIAL DE MONOCAPAS DE CÉLULAS T-84

Puesto que no hay información disponible sobre el mecanismo de secreción de TcpC (en forma libre o asociada a vesículas), ni tampoco se logró detectar la presencia de la proteína con anticuerpos anti-TcpC en las distintas fracciones secretadas, nos planteamos la construcción de mutantes *tcpC knockout* de las cepas EcN y ECOR63



para analizar a que fracción extracelular (OMVs o factores solubles) está asociado el efecto de esta proteína. Dichos mutantes se construyeron por disrupción génica mediante la introducción de un *cassette* que confiere resistencia a kanamicina (*tcpC::kan*) (Método 4.1.6.2). Se comprobó la correcta inserción del *cassette* *tcpC::kan* en el genoma de los mutantes obtenidos mediante amplificación por PCR utilizando *primers* específicos de regiones que flanquean el punto de inserción del *cassette* (FIGURA 5.10). La amplificación a partir de las cepas EcN y ECOR63 generó un fragmento de 0,8 Kb, mientras que en los mutantes obtenidos se obtuvo un único producto de mayor tamaño, en concreto de 2,4 Kb, que confirma la correcta disrupción del gen *tcpC* en su genoma.



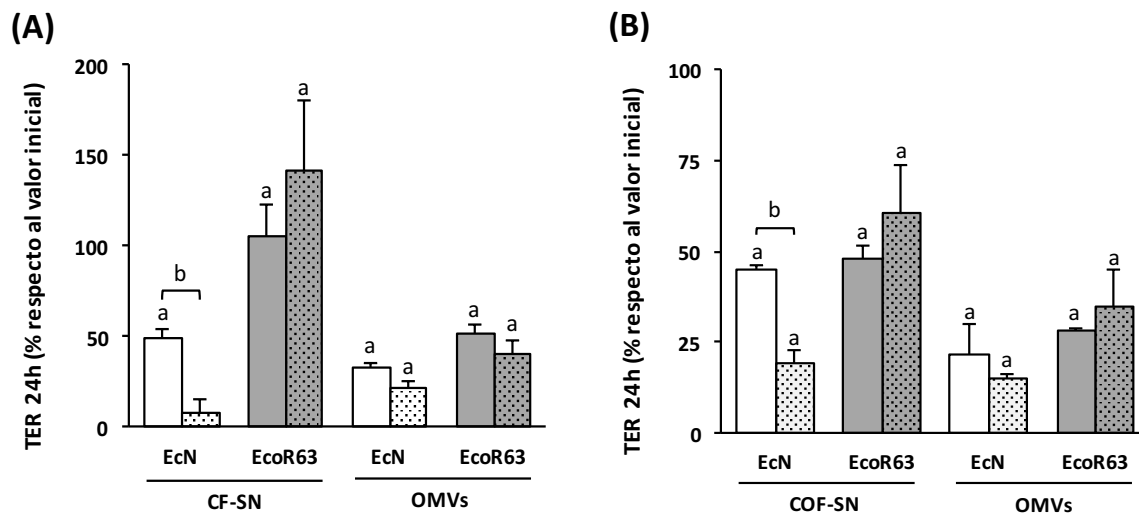
**FIGURA 5.10. Confirmación por PCR de la interrupción del gen *tcpC* en los mutantes EcN *tcpC::kan* y ECOR63 *tcpC::kan*.** Amplificación por PCR de las secuencias *tcpC* con los *primers* FW-*tcpC* (TCGCATGGAAACAGCACCT) y RV-*tcpC* (CTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC) en las cepas indicadas. Se indica el tamaño de los productos amplificados. El aumento de 1,6 Kb en el producto de PCR de los mutantes *knockout* corresponde al *cassette* de kanamicina insertado dentro del gen *tcpC*. El marcador utilizado es DNA del bacteriófago *lambda* digerido con HindIII.

Estos mutantes, así como las cepas parentales de tipo salvaje, se cultivaron en medio LB. Los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante se filtró para eliminar bacterias residuales y obtener los correspondientes sobrenadantes libres de células (CF-SN). Esta fracción CF-SN se centrifugó a 150000 xg durante 1 hora 30 minutos para aislar las OMVs (ver FIGURA 5.2 y Método 4.1.7.3).

El potencial de estas fracciones para estimular la TER se analizó sobre monocapas de células T-84 después de 24 horas de incubación (FIGURA 5.11.A). Con respecto a la cepa probiótica EcN, la mutación *tcpC* disminuyó significativamente la capacidad del CF-SN (2mg/ml) de aumentar los valores de TER. En contraste, el CF-SN (2 mg/ml) de la

cepa mutante ECOR63 *tcpC* aumentó la TER a niveles comparables a la cepa parental ECOR63.

El análisis de TER en monocapas incubadas con las OMVs aisladas (0,1 mg/ ml) reveló la capacidad de las OMVs de EcN y ECOR63 de incrementar la TER, y por tanto de reforzar la barrera epitelial. Para las OMVs de ambas cepas, este efecto fue independiente de *TcpC*.



**FIGURA 5.11. El impacto de EcN y ECOR63 sobre la TER está mediado por factores secretados y OMVs.** (A) Análisis de la TER de monocapas de células T-84 (9 días post-confluencia) después de 24 horas de incubación con CF-SN (2 mg/ ml) (esta fracción contiene tanto OMVs como mediadores secretados de manera soluble) o con OMVs aisladas (0,1 mg/ ml) de cultivos en medio LB de las cepas tipo salvaje EcN (barras blancas) y ECOR63 (barras grises) y de sus correspondientes mutantes *tcpC* (barras punteadas). (B) análisis de la TER de monocapas de células T-84 después de 24 horas de incubación con COF-SN (0,5 mg/ ml) (esta fracción contiene sólo mediadores solubles liberados) u OMVs aisladas (0,1 mg/ ml) de cultivos exponenciales en medio DMEM, de las mismas cepas tipo salvaje (barras simples) y mutantes *tcpC* (barras punteadas). En ambos gráficos, los datos se presentan como porcentaje del incremento en la TER desde el valor inicial (n=3, ensayos biológicos independientes). <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células control no tratadas ( $P \leq 0,05$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos entre las cepas mutantes *tcpC* con respecto a las cepas parentales tipo salvaje ( $P \leq 0,002$ ).

Para evitar la interferencia de las proteínas y péptidos presentes en el medio LB en la cuantificación de las muestras CF-SN obtenidas, y con la finalidad de analizar mejor el efecto sobre la TER de los mediadores solubles secretados por las cepas en estudio, se llevaron a cabo cultivos de las cepas EcN y ECOR63 tipo salvaje y de sus respectivos mutantes *tcpC* en medio DMEM. Después de 8 horas de crecimiento (fase exponencial), las bacterias fueron eliminadas por centrifugación y posterior filtración. El sobrenadante libre de células (CF-SN) resultante fue concentrado y sometido a

ultracentrifugación para aislar las OMVs y obtener los sobrenadantes libres de células y OMVs (COF-SN) (ver FIGURA 5.2. y Método 4.1.7.2).

Posteriormente, se evaluó el potencial de estas fracciones para estimular la TER en monocapas de células T-84 después de 24 horas de incubación (FIGURA 5.11.B). Los resultados obtenidos de la estimulación con OMVs (0,1 mg/ ml) o con COF-SN (0,5 mg/ ml) recogidos de los cultivos en medio DMEM fueron comparables a los obtenidos con muestras aisladas de cultivos LB. Solo la mutación de *tcpC* en EcN disminuyó significativamente la capacidad de los COF-SN de reforzar la barrera. En general, estos resultados indican que tanto factores solubles como factores asociados a vesículas median los efectos positivos de EcN y ECOR63 sobre la barrera epitelial, lo que conduce a un incremento en la TER de la monocapa. También sugieren que la secreción de TpcC no está asociada a las OMVs, y que además de TpcC, la cepa comensal ECOR63 libera otros factores que pueden modular positivamente la integridad de la barrera epitelial.

El efecto de las fracciones COF-SN y OMVs sobre la TER de monocapas de células T-84 se analizó también después de 3 horas de incubación. Los resultados mostrados en la tabla 3 indican que con sólo 3 horas de estimulación las fracciones evaluadas son capaces de promover un aumento significativo en la TER de la monocapa, con respecto a las células control no tratadas.

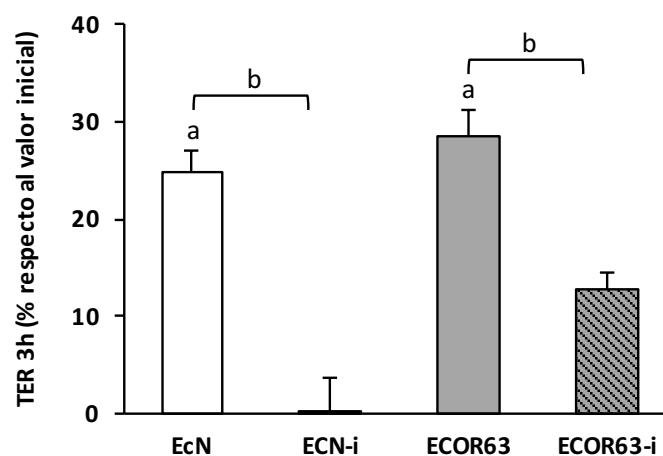
**TABLA 5.3. Incremento de la TER de monocapas de células T-84 a las 3 horas de incubación con COF-SN u OMVs de las cepas EcN y ECOR63.** Los valores son la media  $\pm$  SE. <sup>a</sup> Resultados estadísticamente significativos con respecto a las células control sin tratamiento ( $P \leq 0,05$ ).

| Cepa utilizada | Fracción evaluada | TER 3h (% respecto al valor inicial) |
|----------------|-------------------|--------------------------------------|
| EcN            | COF-SN            | 24,86 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>         |
| ECOR63         | COF-SN            | 28,55 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>         |
| EcN            | OMVs              | 17,43 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>         |
| ECOR63         | OMVs              | 17,80 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>         |

Una vez demostrado que las cepas EcN y ECOR63 secretan factores activos al medio de cultivo capaces de reforzar la barrera epitelial, nos planteamos analizar la naturaleza de estos factores secretados de manera soluble. Para ello, como primera aproximación se evaluó si la aplicación de un tratamiento térmico intensivo (calentamiento a 95°C durante 15 minutos) podría anular el efecto de las fracciones COF-SN de ambas cepas, EcN y ECOR63.

Los COF-SN inactivados por calor (EcN-i y ECOR63-i) se aplicaron sobre monocapas de células T-84 y después de 3 horas de incubación se evaluó el cambio en la TER (FIGURA 5.12). En el caso de la cepa EcN, el tratamiento por calor anuló por completo la capacidad del COF-SN de incrementar la TER de la monocapa, mientras que en el caso de la fracción COF-SN de la cepa ECOR63, este tratamiento solo causó una disminución del 50% en su capacidad de refuerzo de la barrera epitelial. Estos resultados sugieren que el/los factor/es activos secretados por EcN con efectos positivos sobre la integridad de barrera podrían ser de naturaleza proteica y, probablemente, se trate de la proteína TcpC. En cuanto a la cepa ECOR63, esta podría liberar otros factores activos además de factores proteicos, lo que podría explicar su capacidad de refuerzo de la barrera epitelial observada en los ensayos de TER con los COF-SN del mutante ECOR63 *tcpC* (FIGURA 5.11.B).

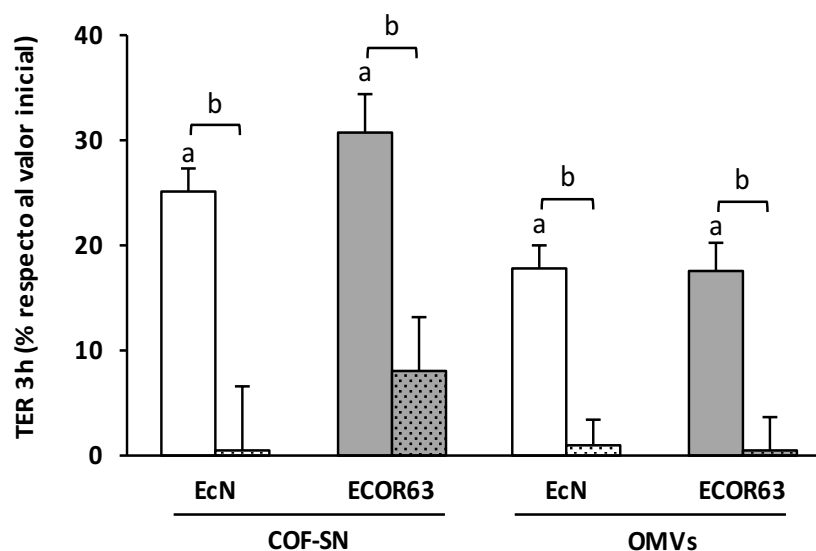
Paralelamente se realizaron ensayos de estimulación de TER a las 3 horas con los COF-SN de ambas cepas tratadas con proteinasa K (2 mg/ml) durante 2 horas a 37°C, para asegurar la degradación de las proteínas presentes. Los resultados de incremento de TER con los COF-SN (0,5 mg/ ml) tratados con proteinasa K fueron comparables a los inactivados por calor (resultados no mostrados).



**FIGURA 5.12. La inactivación por calor de la fracción COF-SN de las cepas EcN y ECOR63 reduce su actividad de refuerzo de la barrera epitelial.** Análisis de la TER de monocapas de células T-84 (9 días post-confluencia) después de 3 horas de incubación con COF-SN (0,5 mg/ ml) de cultivos en medio DMEM de las cepas EcN (barras blancas) y ECOR63 (barras grises) y de sus correspondientes COF-SN inactivados por calor a 95°C por 15 minutos (EcN-i y ECOR63-i) (barras rayadas). Los datos se presentan como porcentaje del incremento en la TER desde el valor inicial (n=3, ensayos biológicos independientes). <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células control no tratadas ( $P = 0,000$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos entre los COF-SN inactivados por calor con respecto a los COF-SN nativos ( $P \leq 0,05$ ).

Por último, se analizó si el efecto de las fracciones bacterianas COF-SN y OMVs sobre el reforzamiento de la barrera epitelial dependía de la señalización mediada por la ERK 1/2 (*extracellular signal regulated kinase*). Previamente, Hering et al., (2014) describieron que los sobrenadantes de cultivos de EcN, y particularmente la proteína TcpC, son capaces de promover la fosforilación de ERK 1/2, siendo esta señal, al menos en parte, responsable del incremento de la TER en monocapas de células HT-29/B6.

Para ello, los ensayos de TER se llevaron a cabo en monocapas de T-84 pre-incubadas con el inhibidor U0126 (25  $\mu$ M durante 15 minutos), un inhibidor específico de la fosforilación de ERK 1/2. Después del pretratamiento se estimularon las monocapas celulares con COF-SN (0,5 mg/ ml) y OMVs (0,1 mg/ ml) de EcN y ECOR63, durante 3 horas (FIGURA 5.13). Como control se estimularon en paralelo monocapas de células T-84 en ausencia de inhibidor.



**FIGURA 5.13. El inhibidor de ERK 1/2 (U0126) anula el efecto positivo que ejercen los factores secretados de EcN y ECOR63 sobre la TER.** El efecto sobre la TER de los COF-SN y las OMVs de EcN (barras blancas) y ECOR63 (barras grises) se analizó en monocapas de células T-84 (9 días post-confluencia) previamente tratadas con el inhibidor U0126 (25  $\mu$ M, 15 minutos) (barras punteadas). Células sin inhibidor estimuladas con las fracciones secretadas, se procesaron en paralelo como control positivo (barras lisas). Los valores de TER se midieron antes y después de las 3 horas de tratamiento con COF-SN (0,5 mg/ml) u OMVs (0,1 mg/ml) obtenidos a partir de cultivos de las cepas indicadas en medio DMEM (n=3, ensayos biológicos independientes). Los datos se presentan como porcentaje de cambio en la TER desde el valor inicial. <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células control no tratadas ( $P \leq 0,01$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos entre células tratadas con el inhibidor en comparación con células estimuladas en ausencia de inhibidor ( $P \leq 0,05$ ).

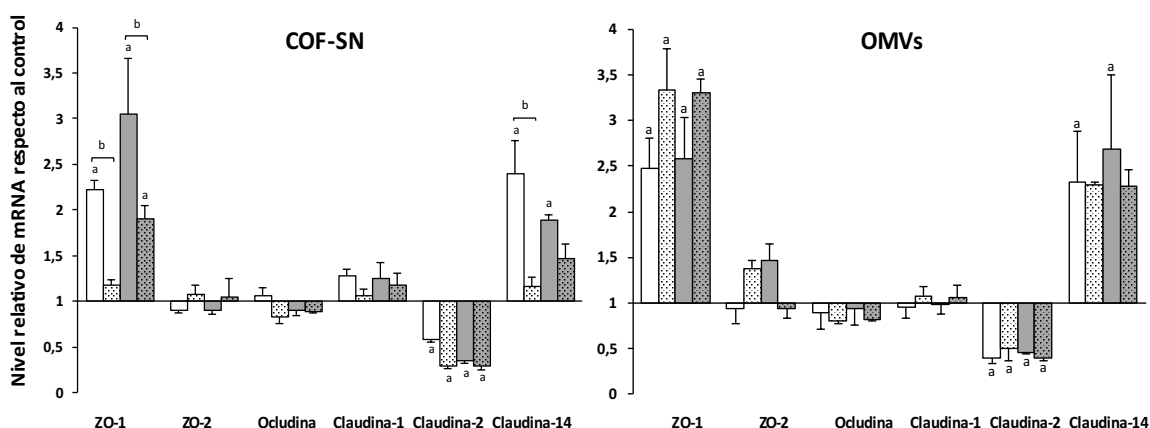
Para ambas cepas, el incremento en la TER promovido por las OMVs se vio completamente anulado en presencia del inhibidor de ERK 1/2, lo que indica que el efecto de las OMVs sobre el refuerzo de la barrera epitelial depende de esta vía de señalización. Respecto a la fracción secretada COF-SN, la inhibición de la actividad de ERK 1/2 también comportó una drástica reducción en la actividad de estas fracciones, siendo los niveles de TER similares a los de las células control. Sin embargo, en este caso se aprecian ligeras diferencias entre cepas. En presencia del inhibidor U0126, el COF-SN de ECOR63 retiene todavía una cierta capacidad de incrementar la TER, aunque los datos no son estadísticamente significativos. Estos resultados sugieren que los COF-SN y las OMVs de EcN y ECOR63 tienen la capacidad de reforzar la barrera epitelial mediante la vía de señalización de ERK 1/2.

### 5.2.2. ANÁLISIS POR RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE TJ EN CÉLULAS T-84 Y Caco-2

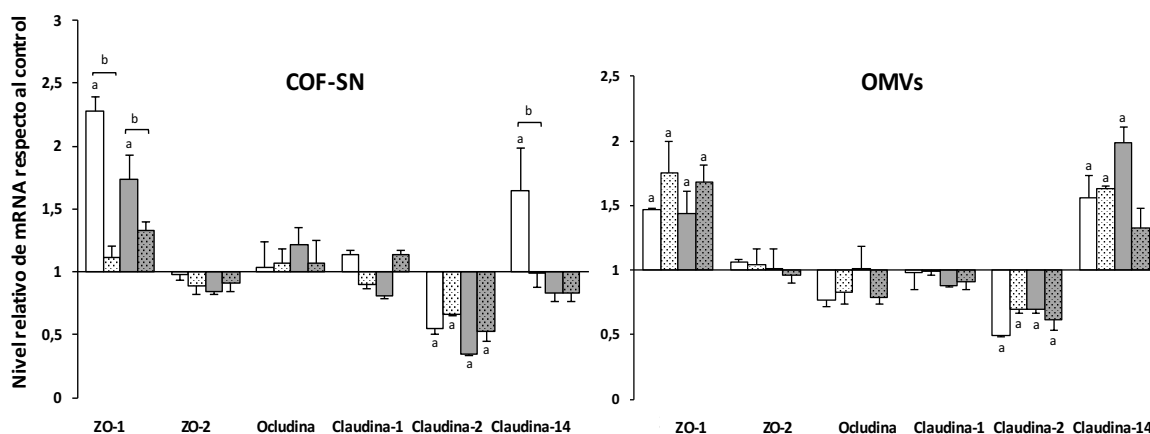
El incremento de la TER promovido por estas fracciones extracelulares procedentes de las cepas en estudio sugería cambios en las proteínas que constituyen las TJ. Como primera aproximación se analizó la expresión de genes que codifican varias proteínas de TJ relevantes para la función de barrera. En este estudio se incluyeron proteínas TJ conocidas por ser reguladas por el probiótico EcN, tales como ZO-1, ZO-2 y claudina-14 (Ukena et al., 2007; Zyrek et al., 2007; Hering et al., 2014), así como otras proteínas reguladas por otras cepas bacterianas (patógenas o probióticas) como la ocludina, claudina-1 y claudina-2.

Las monocapas T-84 con 9 días de cultivo después de llegar a confluencia, se estimularon apicalmente durante 4 horas con OMVs (0,1 mg/ ml) o con COF-SN (0,5 mg/ ml) obtenidos a partir de cultivos exponenciales en medio DMEM de las dos cepas tipo salvaje EcN y ECOR63 y de sus respectivos mutantes *tcpC*. Monocapas de células T-84 no tratadas se utilizaron como control. Los niveles relativos de mRNA de las proteínas TJ evaluadas se cuantificaron mediante RT-qPCR (FIGURA 5.14.A). Los resultados obtenidos muestran la regulación transcripcional de ZO-1, claudina-2 y claudina-14 por los dos tipos de fracciones bacterianas (OMVs y COF-SN) tanto de EcN como de ECOR63. Específicamente, dichas fracciones promovieron la regulación positiva de ZO-1 y claudina-14, y por el contrario, causaron una reducción significativa del mRNA de claudina-2 (FIGURA 5.14.A, barras en color blanco y gris). Respecto a ZO-2, ocludina y claudina-1, no se observaron cambios significativos bajo ninguna condición. Los niveles relativos de mRNA en monocapas incubadas con OMVs o COF-SN se mantuvieron similares a los de las células control.

## (A) Células T-84



## (B) Células Caco-2



**FIGURA 5.14. Efecto de las fracciones secretadas (COF-SN y OMVs) sobre la expresión de proteínas de *Tight junctions* en las líneas celulares de epitelio intestinal (A) T-84 y (B) Caco-2.** Las monocapas de células se incubaron durante 4 horas con COF-SN (0,5 mg/ ml) u OMVs (0,1 mg / ml) de *EcN* (barras blancas), *EcN tcpC::kan* (barras blancas punteadas), ECOR63 (barras grises) o ECOR63 *tcpC::kan* (barras grises punteadas). Los niveles relativos de mRNA de las proteínas indicadas se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Los datos se presentan como cambios en el nivel de mRNA en comparación con células control no tratadas ( $n=3$ , ensayos biológicos independientes). <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos frente a las células control no tratadas ( $P \leq 0,04$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos entre el mutante *tcpC* y su cepa parental tipo salvaje ( $P \leq 0,02$ ).

En cuanto al efecto de los COF-SN, la regulación positiva de ZO-1 y claudina-14 fue casi suprimida por la deficiencia de *TcpC* en *EcN*, y disminuyó significativamente en el caso del mutante ECOR63 *tcpC* (FIGURA 5.14.A, barras punteadas). Estos resultados muestran que *TcpC* contribuye a la regulación transcripcional de ZO-1 y claudina-14, y además sugieren que otros factores secretados por ECOR63 pueden también contribuir a esta regulación. Por otra parte, la deficiencia de *TcpC* no comportó cambios significativos en los niveles de mRNA de claudina-2 en comparación con las

células T-84 incubadas con los sobrenadantes de las cepas ECN y ECOR63 tipo salvaje, descartando así la contribución de *TcpC* en el control transcripcional de claudina-2. Con respecto a las OMVs de los mutantes *tcpC*, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de ZO-1, claudina-2 y claudina-14 entre las células estimuladas con las OMVs aisladas de las cepas de tipo salvaje o de los mutantes *tcpC* (FIGURA 5.14.A).

Con la finalidad de confirmar el perfil de regulación mediado por las fracciones COF-SN y OMVs de EcN y ECOR63 en otra línea celular de epitelio intestinal, se analizó la expresión de las mismas proteínas TJ en monocapas de células Caco-2. En general, los resultados muestran un patrón de expresión similar, es decir, una regulación positiva de ZO-1 y claudina-14, y regulación negativa de claudina-2 (FIGURA 5.14.B). Al igual que en las células T-84, la regulación transcripcional de estas proteínas mediada por las OMVs no se vio afectada por la mutación *tcpC*, pero se observó que los niveles de mRNA de ZO-1 y claudina-14 fueron inferiores en las células Caco-2.

En cuanto a los estímulos con los COF-SN, la expresión de ZO-1 y claudina-2 siguió el mismo patrón que en las células T-84. Sin embargo, el incremento promovido por los COF-SN de ECOR63 y ECOR63 *tcpC* en la expresión de ZO-1 era claramente inferior en las células Caco-2 que en la línea celular T-84, con niveles relativos de mRNA que eran alrededor del 50% de los alcanzados en T-84. Precisamente esta menor respuesta de las células Caco-2 a los COF-SN de ECOR63 podría explicar la falta de inducción de claudina-14 en esta línea celular. Si consideramos una reducción del 50% en los niveles relativos de mRNA de claudina-14 observados en las células T-84 estimuladas con los COF-SN de ECOR63 (FIGURA 5.13.A) se puede deducir que en las células Caco-2 los niveles de mRNA de claudina-14 estén cercanos a los de las células no tratadas (FIGURA 5.14.B).

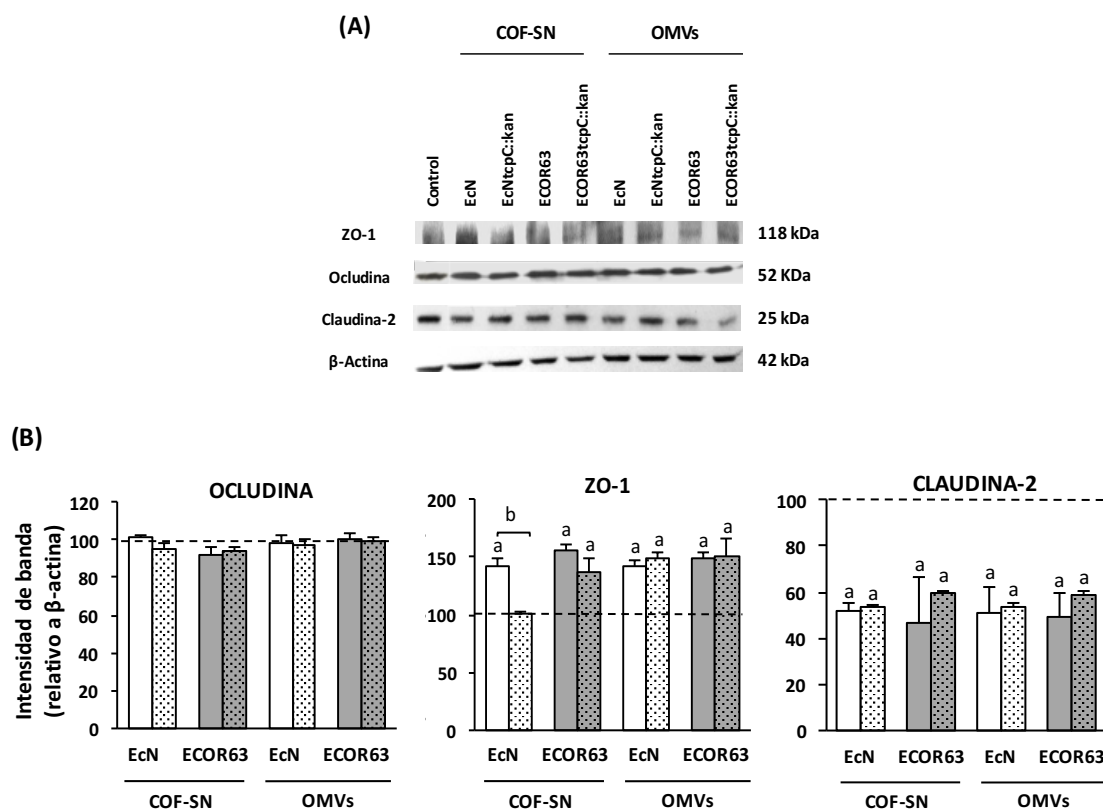
### 5.2.3. ANÁLISIS POR *WESTERN BLOT* DE PROTEÍNAS DE TJ EN CÉLULAS T-84

A modo de confirmar los resultados obtenidos en la modulación de la expresión de proteínas de TJ por los COF-SN y las OMVs de EcN, ECOR63 y sus respectivos mutantes *tcpC*, se realizaron ensayos de *Western blot* (Método 4.3.5) para evaluar a nivel de proteína la regulación de ZO-1 y claudina-2. La expresión de ocludina se analizó en paralelo como control de una proteína no regulada.

La inmunodetección por *Western blot* se realizó a partir de extractos obtenidos de monocapas de células T-84 incubadas durante 24 horas con las fracciones extracelulares de las cepas tipo salvaje y mutantes *tcpC* derivados, así como de células



T-84 control no tratadas (FIGURA 5.15.A).



**FIGURA 5.15. Análisis por *Western blot* de proteínas TJ en monocapas de células T-84 tratadas con COF-SN u OMVs de las cepas bacterianas indicadas.** Las monocapas de células se incubaron durante 24 horas con COF-SN (0,5 mg/ml) u OMVs (0,1 mg/ml) de EcN (barras blancas), EcN *tcpC::kan* (barras blancas punteadas), ECOR63 (barras grises) o ECOR63 *tcpC::kan* (barras grises punteadas). Las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-2 fueron inmunodetectadas con anticuerpos específicos. **(A)** Se muestran imágenes de *Western blot* representativos de tres experimentos independientes. **(B)** Cuantificación por densitometría de las bandas inmunodetectadas ( $n=3$ , ensayos biológicos independientes). Los valores se normalizaron con respecto a  $\beta$ -actina. Los valores normalizados de las células control no tratadas se establecieron como el 100% y se indican con una línea discontinua. <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos frente a las células control no tratadas ( $P \leq 0,04$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos entre el mutante *tcpC* y su cepa parental tipo salvaje ( $P = 0,001$ ).

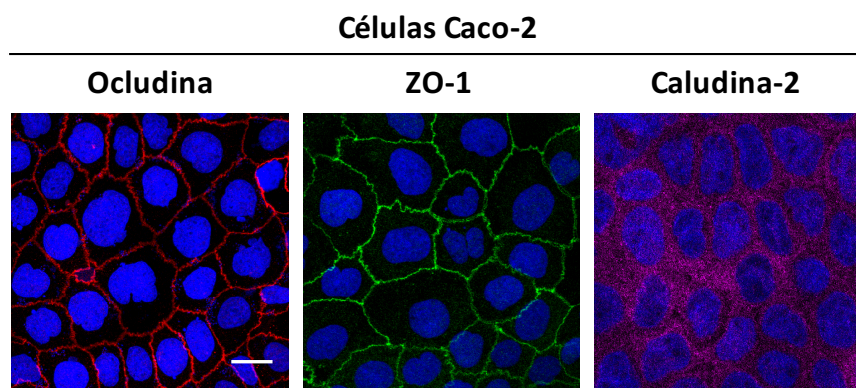
La cuantificación de la intensidad de las bandas por densitometría y su normalización con respecto a la expresión de la proteína  $\beta$ -actina confirmó los resultados de RT-qPCR. Así, se confirmó la regulación negativa de claudina-2 en todas las muestras evaluadas, con una reducción en los niveles de proteína entre el 30 y 40 % con respecto al nivel de expresión de las células control no tratadas (FIGURA 5.15.B). Referente a la regulación de ZO-1, se confirmó que la activación mediada por OMVs es independiente de *TcpC*, mientras que la mediada por COF-SN se ve reducida cuando estos sobrenadantes se obtienen de cultivos de los mutantes deficientes en *TcpC*. En

las células incubadas con el COF-SN del mutante EcN *tcpC*, los niveles de proteína ZO-1 no difirieron significativamente de los de las células control no tratadas. Y aunque los niveles de ZO-1 alcanzados tras la estimulación con sobrenadantes del mutante ECOR63 *tcpC* eran ligeramente inferiores a los de las células incubadas con los sobrenadantes de la cepa ECOR63 tipo salvaje, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Por último, la cuantificación de los niveles de ocludina confirmó la ausencia de regulación de esta proteína, cuya expresión permaneció similar a la de las monocapas no tratadas, independientemente del tratamiento con cualquiera de las fracciones extracelulares de las cepas analizadas.

#### **5.2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS DE TJ POR MICROSCOPIA CONFOCAL**

El impacto de *TcpC*, las OMVs y otros factores solubles secretados por la cepa probiótica EcN y la cepa comensal ECOR63 sobre las TJ fue también evaluado mediante marcaje de las proteínas por inmunofluorescencia y visualización por microscopía confocal (Método 4.4.3). Esta metodología permite analizar tanto la expresión como la localización subcelular de las proteínas. En este trabajo, este análisis se llevó a cabo para las proteínas ZO-1 y claudina-2. La ocludina se analizó en paralelo como control de una proteína no regulada. El marcaje por inmunofluorescencia se realizó en células Caco-2 a los 5 y 7 días después de su siembra. Después de fijar las células epiteliales las proteínas se marcaron con anticuerpos específicos tal como se detalla en el apartado Método 4.4.2. Como se muestra en la Figura 5.16 la detección de ocludina y ZO-1 se localizó en la membrana celular mientras que la claudina-2 se localizó principalmente en el citoplasma. Dado que este análisis se realizó en células cultivadas durante 7 días, esta observación es consistente con los resultados presentados por Fischer et al., (2014) referentes al análisis por inmunofluorescencia de claudina-2 a lo largo del período de diferenciación de células Caco-2. A los tres 3 días de diferenciación la señal de claudina-2 parecía estar distribuida difusamente en el citoplasma, mientras que la localización progresiva de claudina-2 hacia la zona de las TJ (asociada a la membrana celular) se producía a medida que avanzaba el estado de diferenciación de la monocapa, siendo el tiempo óptimo cercano a los 21 días (Fischer et al., 2014).



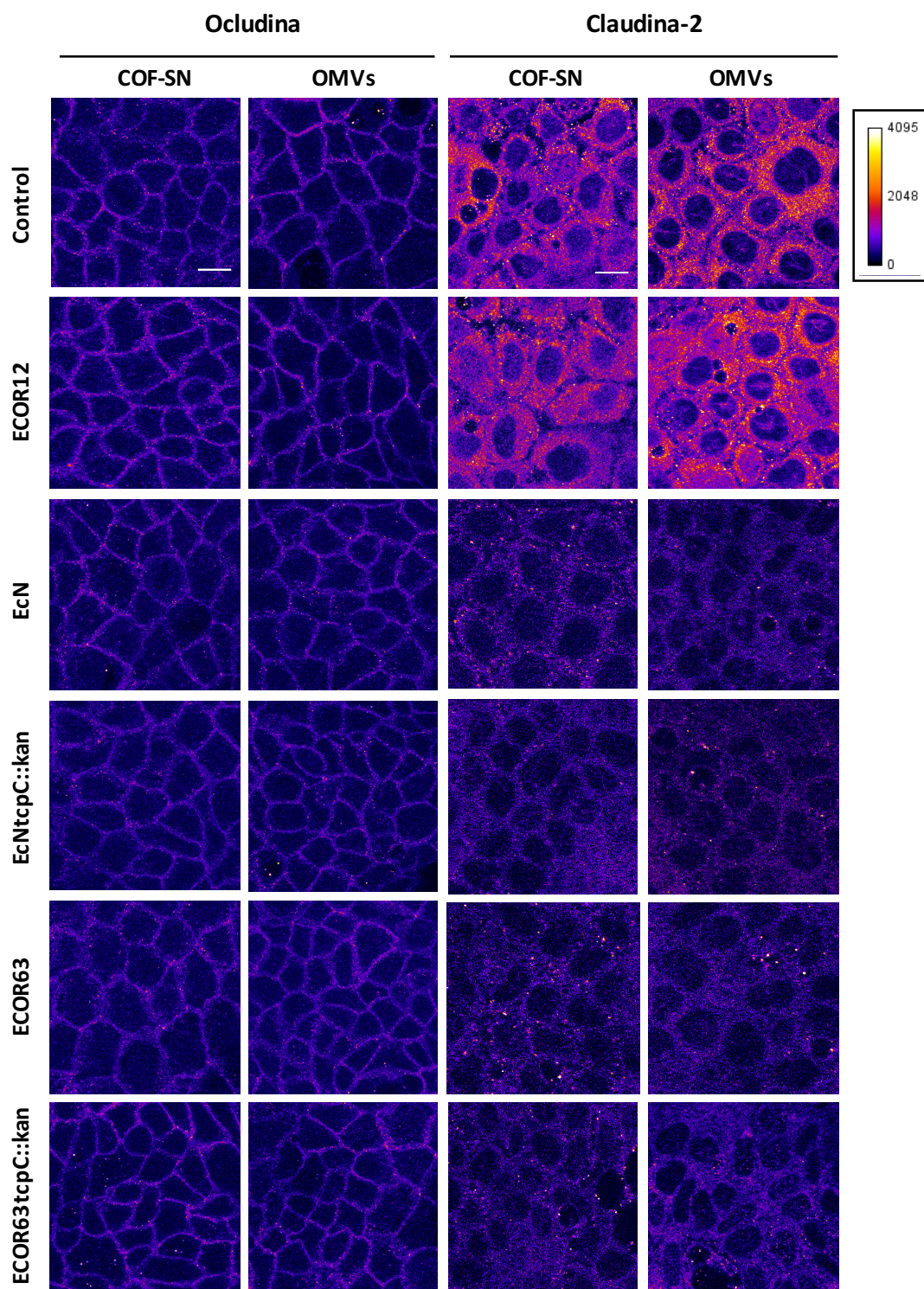
**FIGURA 5.16. Marcaje por inmunofluorescencia de las proteínas de *Tight Junction* ocludina, ZO-1 y claudina-2 en células Caco-2.** La inmunodetección de las proteínas TJ en células Caco-2 a los 5 y 7 días después de su siembra, ubicó a la ocludina (izquierda, color rojo) y a la ZO-1 (centro, color verde) en la membrana celular, mientras que la claudina-2 (derecha, color violeta) se localizó en el citoplasma. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en color azul. Escala de la barra de calibración, 20  $\mu$ m.

Para analizar el efecto de las fracciones bacterianas secretadas, se incubaron monocapas de células Caco-2 con COF-SN u OMVs aisladas de las cepas EcN y ECOR63 tipo salvaje y de los mutantes *tcpC* derivados. En paralelo se llevaron a cabo incubaciones con las fracciones obtenidas de cultivos de la cepa ECOR12, como control de una cepa comensal que no presenta la capacidad de reforzar la barrera epitelial (apartado 5.1.4). Después de 24 horas de incubación las células se fijaron y procesaron para la inmunodetección de las proteínas ZO-1, claudina-2 y ocludina mediante microscopia confocal de fluorescencia.

En la Figura 5.17 se muestran imágenes representativas del marcaje de ocludina y claudina-2, y en la figura 5.18 se muestran las imágenes representativas del marcaje de ZO-1. Todas las imágenes se codificaron con los colores arbitrarios del estilo *Fire* (*software* Fiji), para percibir la intensidad de fluorescencia emitida según la tabla de calibración de fluorescencia mostrada a la derecha de las imágenes.

Como se esperaba, no se observaron diferencias en la señal de fluorescencia emitida en ninguna de las tres proteínas analizadas en células tratadas con las muestras de ECOR12, con respecto a las células control no tratadas. En cuanto a los resultados obtenidos en las células incubadas con las muestras de las fracciones extracelulares de EcN y ECOR63, éstos se correlacionan con los resultados de expresión a nivel de mRNA (RT-qPCR) y de proteína (*Western blot*). Consistentemente, no se observaron cambios significativos en la expresión de ocludina, mientras que la señal de claudina-2 se redujo significativamente en las células tratadas con COF-SN u OMVs aisladas de EcN y ECOR63, independientemente de si eran cepas positivas o negativas para *TcpC* (FIGURA 5.17).





**FIGURA 5.17.** Marcaje por inmunofluorescencia de ocludina y claudina-2 en células Caco-2 tratadas durante 24 horas con COF-SN o con OMVs de las cepas bacterianas indicadas. La inmunotinción de ocludina (izquierda) y claudina-2 (derecha) se llevó a cabo en células Caco-2 a los 5 y 7 días respectivamente, después de su siembra (n=3, ensayos biológicos independientes). Las imágenes están codificadas por los colores arbitrarios del estilo *Fire* y la barra de calibración de fluorescencia se muestra a la derecha. Escala de la barra de calibración, 20 μm.

Con respecto a la proteína ZO-1, ésta fue regulada positivamente. Las imágenes de microscopía mostraron un aumento de la señal fluorescente en los límites celulares de las monocapas de Caco-2 tratadas con COF-SN de las cepas EcN o ECOR63 tipo salvaje, mientras que este aumento no fue evidente en células incubadas con los COF-SN de los mutantes *tcpC* derivados. En este caso, las señales de ZO-1 eran similares a las de las células control no tratadas o a las de células tratadas con los COF-SN de ECOR12. (FIGURA 5.18.A).

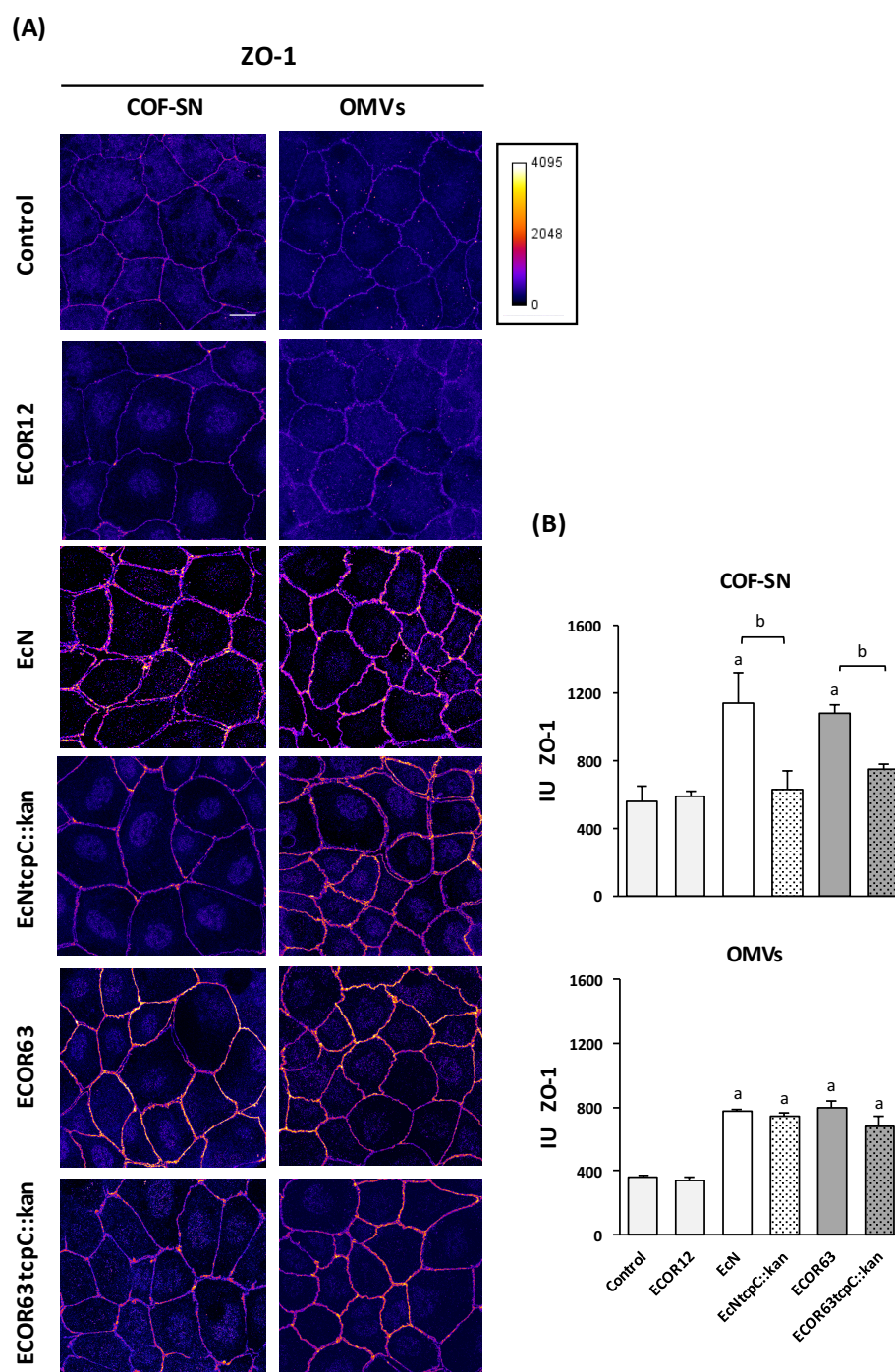
Las OMVs aisladas de EcN y ECOR63 también promovieron un aumento significativo en la señal fluorescente periférica correspondiente a ZO-1, y este efecto no fue anulado por la mutación de *tcpC* (FIGURA 5.18.A).

Además, la señal de ZO-1 se cuantificó en la zona de TJ, tal como se describe en el apartado de Método 4.4.3 y se ilustra en la figura 4.6. Los resultados (FIGURA 5.18.B) revelan un aumento estadísticamente significativo de la intensidad media de la fluorescencia de ZO-1 asociada a la membrana celular después del tratamiento con COF-SN de EcN y de ECOR63, pero no después de la incubación con COF-SN de las cepas mutantes *tcpC* (datos obtenidos de cinco ensayos biológicos independientes, el total de células analizadas en cada experimento fue de  $94 \pm 6,16$ ).

El análisis de cuantificación también confirmó que el aumento de ZO-1 inducido por las OMVs de EcN y de ECOR63 fue independiente de *TcpC* (datos obtenidos de tres ensayos biológicos independientes, la media de las células totales analizadas en cada experimento fue de  $104 \pm 15,30$ ).

La cuantificación de la señal de fluorescencia de la proteína ocludina no registró cambios significativos entre las células tratadas y las no tratadas. Los datos obtenidos de tres experimentos independientes con una media de  $127,26 \pm 28,43$  células analizadas por experimento, mostró una intensidad media de la fluorescencia de alrededor de 500-600 unidades de intensidad relativa (IU) en todas las condiciones ensayadas (datos no mostrados).





**FIGURA 5.18. Tinción por inmunofluorescencia de ZO-1 en células Caco-2 tratadas durante 24 horas con COF-SN o OMVs de las cepas bacterianas indicadas. (A)** La inmunotinción de ZO-1 se llevó a cabo en células Caco-2 a los 5 días después de su siembra. Las imágenes están codificadas por los colores arbitrarios del estilo *Fire* y la barra de calibración de fluorescencia se muestra a la derecha. Escala de la barra de calibración, 20  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad media de la fluorescencia emitida del marcaje de ZO-1 acotada en la zona de las *Tight Junctions* (ver Método 4.4.3 para detalles del trazado y procesamiento de las imágenes). Los datos se presentan como la media  $\pm$  SE de unidades de intensidad relativa (IU) ( $n=5$  ensayos biológicos independientes para células tratadas con COF-SN y  $n=3$  ensayos biológicos independientes para células tratadas con OMVs). <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos frente a las células control no tratadas ( $P < 0,015$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos entre el mutante *tcpC* y su cepa parental tipo salvaje ( $P \leq 0.05$ ).

### **5.3. PROTECCIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL FRENTE AL DAÑO CAUSADO POR ENTEROPATÓGENOS MEDIANTE OMVs y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS DE EcN Y ECOR63**

Ya que los resultados presentados demuestran que tanto la cepa probiótica EcN como la comensal ECOR63 secretan factores, ya sea liberados en forma soluble o asociados a OMVs, con capacidad de reforzar la función de barrera de monocapas de células epiteliales, nos planteamos evaluar la capacidad de dichas fracciones de proteger la barrera epitelial en un modelo de barrera dañada por infección con la cepa *E. coli* enteropatógena (EPEC).

EPEC es un patógeno entérico no invasivo de gran importancia médica ya que causa diarrea aguda infantil, siendo una de las principales causas de millones de muertes cada año en los países en desarrollo. Este patógeno altera la barrera a través de su unión a las células epiteliales del intestino, donde inyecta proteínas (factores de virulencia, también llamados efectores) directamente del citoplasma bacteriano al citoplasma de la célula huésped a través del sistema de secreción T3SS. Los efectores desempeñan un papel relevante en la manipulación de las funciones de la célula diana modificando o bloqueando las vías de señalización celular. Estos efectores también alteran ciertas estructuras celulares como son el citoesqueleto de actina, la red de microtúbulos para el tráfico vesicular y las conexiones entre proteínas de TJ. De esta manera compromete la integridad de la barrera epitelial e induce varios fenotipos, entre los que se encuentra la alteración de la permeabilidad paracelular del epitelio intestinal, que finalmente conduce a la diarrea (Suzuki, 2013; Weflen et al., 2009; Ugalde-Silva et al., 2016).

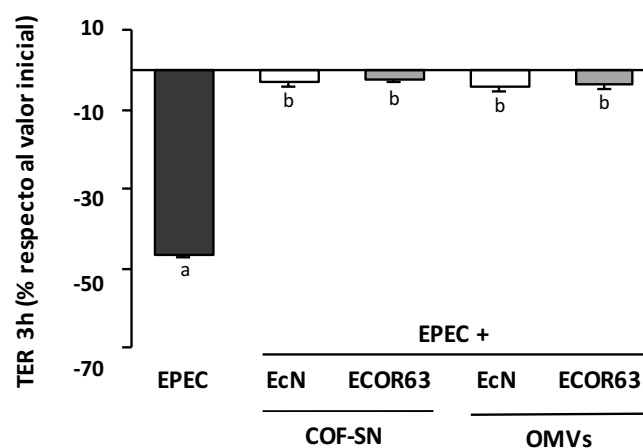
Esta nueva aproximación se realizó en monocapas de células T-84 infectadas con EPEC a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 en ausencia y presencia de OMVs o COF-SN de EcN y ECOR63. La respuesta se evaluó mediante ensayos de TER, análisis de la expresión de proteínas de TJ por RT-qPCR y análisis de la redistribución de proteínas de TJ mediante microscopía confocal.

#### **5.3.1. EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA ELECTRICA TRANSEPITELIAL EN UN MODELO DE BARRERA EPITELIAL DAÑADA POR EPEC**

Estudios previamente realizados en nuestro grupo (Tolosa et al., 2015) demostraron que los sobrenadantes obtenidos del cultivo de la cepa probiótica EcN son capaces de prevenir la disrupción de la barrera de monocapas de células Caco-2 sometidas a la infección con EPEC, indicando que el efecto protector podría atribuirse a un factor

secretado.

Por lo tanto, una vez que en este trabajo se comprobó el potencial de los COF-SN y las OMVs de EcN y de ECOR63 para estimular un aumento de la TER, se analizó si dichas fracciones mantenían la capacidad de evitar la disminución de TER provocada por la infección de EPEC. Para ello, se infectaron apicalmente monocapas T-84 crecidas en placas *transwell* (9 días de cultivo después de llegar a confluencia) con EPEC a una MOI de 100 durante 3 horas. En paralelo se infectaron monocapas T-84 con EPEC (MOI 100) en presencia de OMVs (0,1 mg/ ml) o de COF-SN (0,5 mg/ ml) obtenidos a partir de las cepas EcN y ECOR63. Las monocapas de células no tratadas se utilizaron como control (FIGURA 5.19).



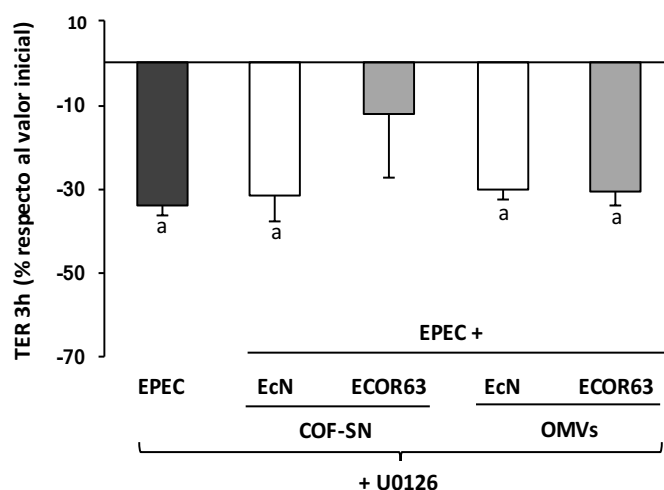
**FIGURA 5.19. Los COF-SN y OMVs de EcN y ECOR63 evitan la disminución de la TER en monocapas de células T-84 infectadas con EPEC.** El efecto sobre la TER de los COF-SN y las OMVs de las cepas indicadas se analizó en monocapas T-84 infectadas con EPEC a una multiplicidad de infección (MOI) de 100. Los valores de TER se midieron antes y después de las 3 horas de infección en presencia de COF-SN (0,5 mg/ ml) u OMVs (0,1 mg/ ml) obtenidos a partir de cultivos de las cepas EcN y ECOR63 en medio DMEM (n=3, ensayos biológicos independientes). Los datos se presentan como porcentaje de cambio en la TER desde el valor inicial. <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células control no tratadas ( $P \leq 0,001$ ). <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células infectadas solo con EPEC ( $P \leq 0.005$ ).

La infección con EPEC provocó una disminución de cerca del 50% en los valores de TER de la monocapa con respecto a las células control no tratadas. Sin embargo, cuando la infección de EPEC se realizó en presencia de los COF-SN o de las OMVs tanto de EcN como de ECOR63, la reducción en la TER causada por EPEC fue neutralizada, permaneciendo los niveles de TER sin cambios significativos respecto a las células control no infectadas. En general, estos resultados indican que EPEC altera la permeabilidad paracelular de las monocapas de células T-84, sin embargo, las fracciones secretadas (COF-SN y OMVs) de EcN y de ECOR63 son capaces de evitar o



compensar la alteración en la barrera epitelial.

Finalmente, se analizó la implicación de la vía de ERK en la modulación de la TER mediada por las fracciones secretadas en este modelo de barrera epitelial dañada por EPEC. De manera análoga a la aproximación llevada a cabo en condiciones de barrera intacta (apartado 5.2.1), ERK 1/2 fue inhibida mediante preincubación de las monocapas de células T-84 con el inhibidor U0126 (25  $\mu$ M durante 15 minutos). Después del pretratamiento se infectaron las monocapas con EPEC (MOI 100) en ausencia o presencia de los COF-SN (0,5 mg/m) y OMVS (0,1 mg/ml) de EcN y ECOR63, durante 3 horas (FIGURA 5.20).



**FIGURA 5.20. El inhibidor de ERK 1/2 (U0126) anula el efecto protector de los COF-SN y OMVs de EcN y ECOR63 sobre la disminución de la TER en monocapas de células T-84 infectadas con EPEC.** El efecto sobre la TER por la infección con EPEC a una MOI de 100 (barra gris oscuro) en ausencia o presencia de los COF-SN y las OMVs de las cepas EcN (barras blancas) y ECOR63 (barras gris claro) se analizó en monocapas T-84 previamente tratadas con el inhibidor de la fosforilación de ERK 1/2 U0126 (25  $\mu$ M, 15 minutos). Los valores de TER se midieron antes y después de las 3 horas de infección en ausencia o presencia de COF-SN (0,5 mg/ ml) u OMVs (0,1 mg/ ml) obtenidos a partir de cultivos de las cepas indicadas en medio DMEM (n=3, ensayos biológicos independientes). Los datos se presentan como porcentaje de cambio en la TER desde el valor inicial. <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos en comparación con las células control no tratadas ( $P \leq 0,05$ ). En las monocapas tratadas con el inhibidor U0126 no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos entre las células infectadas con EPEC en presencia o ausencia de las fracciones bacterianas secretadas.

La inhibición de la actividad de ERK 1/2 no evitó la disminución de la TER (de más del 30%) promovida por EPEC. Sin embargo, esta disminución fue menos pronunciada en comparación con los ensayos de infección sin inhibidor donde EPEC provocó una reducción de TER de cerca de 50% (FIGURA 5.19). Por otra parte, en presencia del inhibidor U0126, los factores secretados (COF-SN y OMVs) tanto de EcN como de

ECOR63 no pudieron compensar o neutralizar la disminución de la TER causada por EPEC. Estos resultados refuerzan los obtenidos en condiciones de barrera intacta (ver FIGURA 5.13) e indican que el refuerzo de la barrera epitelial promovido por factores secretados por EcN y ECOR63, ya sea de forma soluble (COF-SN) o asociados a vesículas (OMVs) depende de la señalización de ERK 1/2.

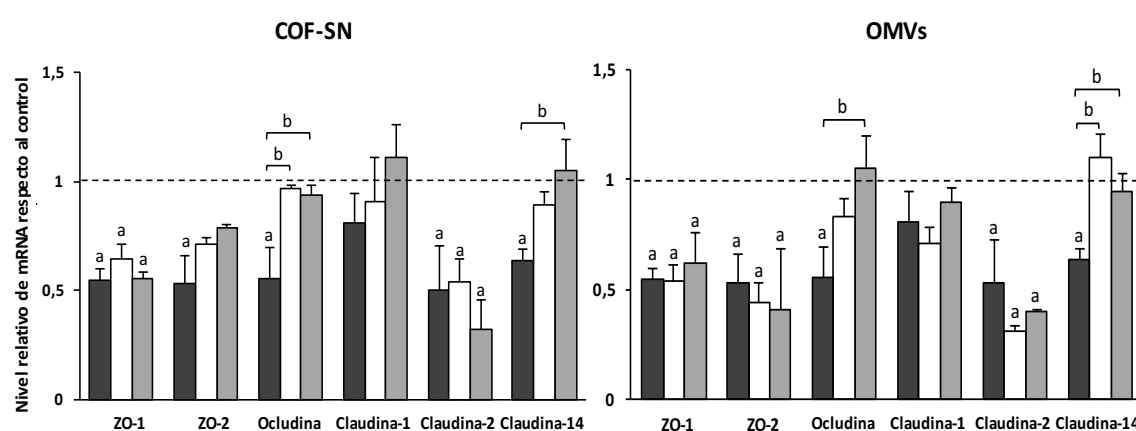
### **5.3.2. ANÁLISIS POR RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE TJ EN UN MODELO DE BARRERA EPITELIAL DAÑADA CON EPEC**

En cuanto a la expresión de las proteínas de TJ relevantes para la función de barrera en monocapas de células T-84, habíamos comprobado que en condiciones de una barrera intacta, tanto los COF-SN como las OMVs de EcN y de ECOR63 promovían un incremento de la expresión de ZO-1 y claudina-14, al mismo tiempo que causaban una disminución de claudina-2. Sin embargo, en un modelo de epitelio dañado por la infección con EPEC el perfil de regulación de la TJ podría verse modificado, sobre todo, teniendo en cuenta que la infección con EPEC causa una disminución significativa en la TER. Además, hay que considerar que EPEC puede alterar otras proteínas no reguladas por EcN o ECOR63. Por esta razón se analizaron los cambios en la expresión de las cinco proteínas de TJ previamente evaluadas, ZO-1, ZO-2, ocludina, claudina-1, claudina-2 y claudina-14 en monocapas de células T-84 tras la infección con EPEC. Asimismo, se evaluaron los cambios en la expresión de estas proteínas en monocapas sometidas a infección con EPEC en presencia de COF-SN u OMVs de ambas cepas, para confirmar si la protección mediada por dichas fracciones, observada indirectamente a través de la TER, correlacionaba con cambios en los niveles de expresión génica de las proteínas TJ alteradas.

Las monocapas T-84 (con 9 días de cultivo después de llegar a confluencia) se infectaron con EPEC a una MOI de 100 durante 3 horas. Por otra parte, se estimularon monocapas T-84 infectadas con EPEC (MOI 100) en presencia de OMVs (0,1 mg/ ml) o COF-SN (0,5 mg/ ml). Las monocapas T-84 no tratadas se utilizaron como control. Los niveles relativos de mRNA de las proteínas TJ se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando el gen de  $\beta$ -actina como referencia (FIGURA 5.21).

Los resultados obtenidos muestran que la infección con EPEC provocó una disminución de alrededor un 50% en los niveles de RNAm de ZO-1, ZO-2, ocludina, claudina-2 y claudina-14 (FIGURA 5.20, barras gris oscuro). Respecto a claudina-1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a células T-84 control, no sometidas a infección.

Sin embargo, la infección de EPEC en presencia de ambas fracciones bacterianas (OMVs y COF-SN) tanto de EcN (barras blancas) como de ECOR63 (barras gris claro), contrarrestó la reducción en la expresión de ocludina y claudina-14, manteniendo los niveles de expresión cercanos a los de las células control (no infectadas). No se observaron diferencias significativas entre las muestras procedentes de la cepa probiótica y de la cepa comensal respecto a su efecto de protección de ocludina y claudina-14. Por el contrario, ninguna de las fracciones bacterianas estudiadas consiguió revertir o evitar la regulación negativa de ZO-1, ZO-2 y claudina-2 causada por la infección de EPEC.



**FIGURA 5.21. Efecto de las fracciones secretadas (COF-SN y OMVs) de EcN y ECOR63 sobre la expresión de proteínas de *Tight junctions* en monocapas T-84 infectadas con EPEC.** Las monocapas de células T-84 se incubaron durante 3 horas con EPEC a una MOI de 100 (barras gris oscuro). Infecciones paralelas se llevaron a cabo en presencia de COF-SN (0,5 mg/ ml) u OMVs (0,1 mg / ml) de EcN (barras blancas) o ECOR63 (barras gris claro). Los niveles relativos de mRNA de las proteínas indicadas se determinaron mediante RT-qPCR utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Los datos se presentan como cambios en el nivel de mRNA en comparación con células control no tratadas (línea punteada) (n=3, ensayos biológicos independientes). <sup>a</sup> resultados estadísticamente significativos frente a las células control no tratadas ( $P \leq 0,05$ ); <sup>b</sup> resultados estadísticamente significativos con respecto a células incubadas únicamente con EPEC ( $P \leq 0,04$ ).

De manera general, estos resultados indican que tanto las OMVs como los COF-SN de EcN y ECOR63 compensan la regulación negativa de ocludina y claudina-14 causadas por EPEC. Este efecto podría, al menos en parte, explicar la protección observada en los ensayos de TER (FIGURA 5.19).

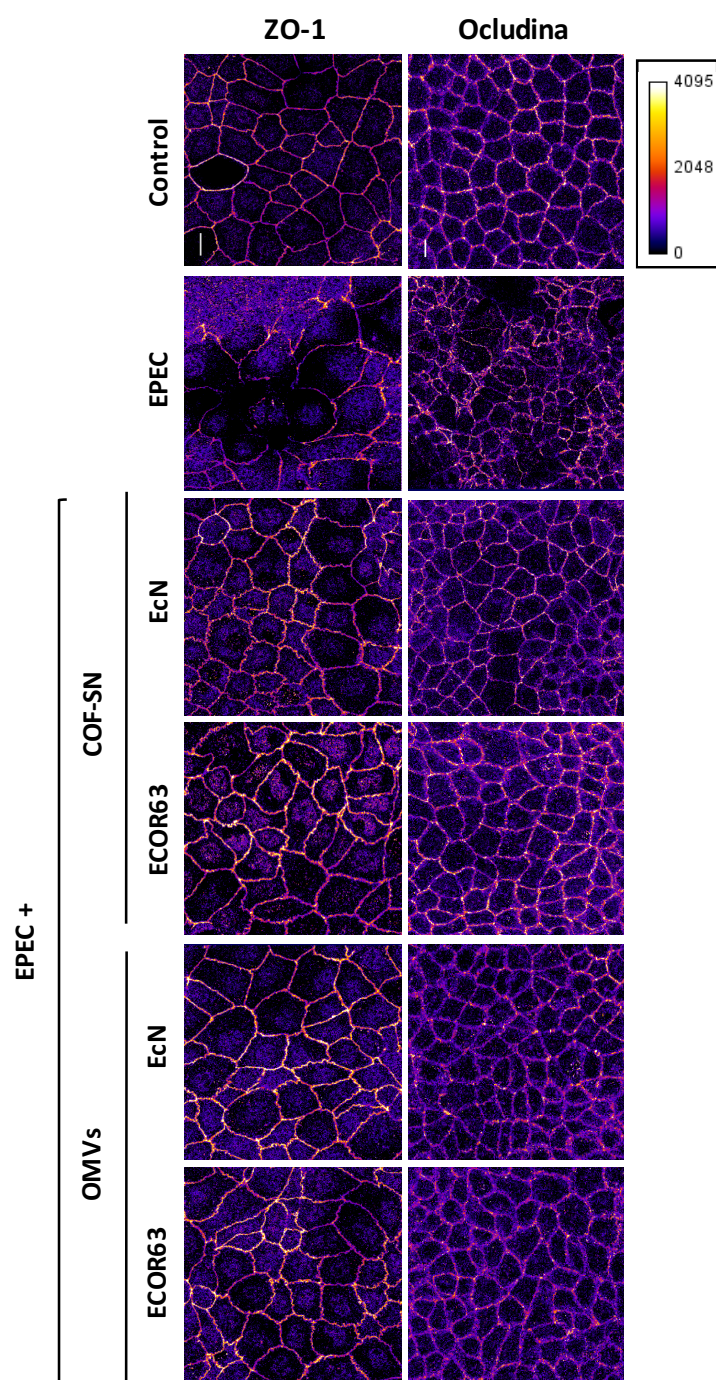
### 5.3.3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA REDISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS DE TJ EN UN MODELO DE BARRERA EPITELIAL DAÑADA CON EPEC

Aunque a nivel de mRNA los COF-SN y las OMVs de EcN y de ECOR63 no evitaron la reducción de la expresión de ZO-1 y ZO-2 causada por EPEC, se realizó un estudio de estas proteínas de TJ mediante marcaje por inmunofluorescencia y microscopía confocal, con la finalidad de investigar si dichas fracciones presentaban un efecto protector a nivel de su distribución subcelular. Asimismo, se analizó la localización subcelular de ocludina en células infectadas con EPEC en ausencia o en presencia de las fracciones evaluadas (COF-SN y OMVs de ambas cepas), con el objetivo de confirmar que la protección observada a nivel de expresión del mRNA correlacionaba con una mayor expresión de esta proteína en las células incubadas con COF-SN y OMVs.

Para el estudio de la localización y reorganización subcelular de las TJ, se incubaron monocapas de células Caco-2 (a los 5 y 7 días después de su siembra) con EPEC a una MOI de 100 durante 2 horas como control de los efectos causados por este patógeno. Al mismo tiempo se incubaron monocapas de células Caco-2 infectadas con EPEC en presencia de COF-SN (0,5 mg/ml) o de OMVs (0,1 mg/ml) de EcN y de ECOR63 para el análisis del efecto de estas fracciones. En paralelo se procesaron como control células Caco-2 no tratadas. Para el marcaje por inmunofluorescencia, las muestras celulares se fijaron y marcaron con anticuerpos específicos contra las proteínas ZO-1, ZO-2 y ocludina tal como se describe en el apartado Método 4.4.2. No fue posible realizar el marcaje de la proteína claudina-14, probablemente a que el anticuerpo utilizado no detectó la isoforma de esta proteína presente en nuestras muestras. Según la información consultada en UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), claudina-14 es una proteína que cuenta con más de 7 isoformas derivadas por *splicing* alternativos.

En todas las muestras de células T-84 infectadas con EPEC, se observaron reordenamientos y distribuciones alteradas de las proteínas ZO-1, ZO-2 y ocludina, con respecto a las células control. En la figura 5.22 se muestran las imágenes representativas de ZO-1 y ocludina, obtenidas en este estudio. La señal de ZO-1 se encontraba principalmente localizada en las membranas celulares de las monocapas control. En células infectadas con EPEC, el patógeno provocó que ZO-1 se redistribuyera hacia el citoplasma celular. Sin embargo, de manera contraria a los resultados obtenidos en el análisis mediante RT-qPCR, las fracciones evaluadas (COF-SN y OMVs de EcN y ECOR63) si mostraron un claro potencial de suprimir este efecto de EPEC, manteniendo la localización normal de ZO-1 anclada a las membranas celulares. Consistentemente con los datos obtenidos en el análisis de expresión, no se observaron cambios significativos sobre la localización de ZO-2 entre las monocapas

infectadas con EPEC y las que presentaban además tratamiento con las fracciones COF-SN y OMVs de ambas cepas (resultados no mostrados).



**FIGURA 5.22.** Tinción por inmunofluorescencia de ZO-1 y ocludina en monocapas de células Caco-2 incubadas durante 2 horas con EPEC en ausencia o presencia de COF-SN u OMVs de las cepas bacterianas indicadas. La inmunotinción de ZO-1 (izquierda) y ocludina (derecha) se llevó a cabo en células Caco-2 a los 5 y 7 días después de su siembra, respectivamente (n=3, ensayos biológicos independientes). Las imágenes están codificadas por los colores arbitrarios del estilo *Fire* y la barra de calibración de fluorescencia se muestra en la parte superior, a la derecha. Escala de la barra de calibración, 20 µm.

---

Respecto a la ocludina, su localización también se encontró asociada a las membranas celulares de las monocapas control. Durante la infección con EPEC se observó pérdida de la localización normal de la proteína anclada a las membranas, mostrando un marcaje discontinuo alrededor de las mismas. No obstante, cuando se incubaron las monocapas infectadas con el patógeno en presencia de las fracciones celulares de EcN y ECOR63, se mantuvo la señal de ocludina en la membrana celular a pesar de estar presente EPEC. En este caso, los resultados se correlacionan con los obtenidos mediante el análisis de expresión a nivel de mRNA, que indican que las fracciones COF-SN y OMVs de ambas cepas son capaces de contrarrestar la regulación negativa sobre ocludina, incrementando por tanto los niveles de esta proteína de la membrana plasmática.

En conjunto estos resultados indican que los factores secretados COF-SN y OMVs de EcN y ECOR63 tienen el potencial de proteger del daño causado por EPEC tanto a nivel de compensar la expresión génica, como en su redistribución subcelular, manteniendo la localización normal de las proteínas de TJ ZO-1 y ocludina.



## 6. DISCUSIÓN

---





## 6. DISCUSIÓN

Es bien conocido que la microbiota intestinal libera metabolitos y efectores bioactivos que pueden mediar la comunicación con el epitelio intestinal del huésped. Estos factores extracelulares son capaces de atravesar las barreras físico-químicas, que protegen el epitelio, como la capa de mucina, y se ha demostrado que son capaces de provocar respuestas específicas en el sistema intestinal. En este contexto, el tracto intestinal requiere de mecanismos de regulación y de función de barrera que proporcionen alta resistencia a la translocación de microorganismos y antígenos, para preservar la homeostasis intestinal. Para mantener una función de barrera selectiva, los complejos de proteínas de uniones celulares o *tight junctions* (TJ) sellan el espacio intercelular entre células epiteliales adyacentes y regulan el transporte paracelular. Actualmente, es bien conocido que existe una asociación entre el aumento de la permeabilidad intestinal con varios trastornos y enfermedades intestinales tales como el síndrome del colon irritable, la colitis y la enfermedad de Crohn. Sin embargo, está corroborado que ciertas bacterias comensales pueden modular la integridad de la barrera epitelial a través de la regulación positiva de las proteínas de TJ. Por este motivo, se está explorando la administración de bacterias como una aplicación clínica potencial para reducir la permeabilidad intestinal incrementada y mejorar el estado clínico de tales enfermedades gastrointestinales.

### 6.1. REFUERZO DE LA BARRERA INTESTINAL POR BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS

Muchos de los estudios sobre los efectos beneficiosos de las bacterias, en concreto en su capacidad de mejorar la integridad de las TJ tanto *in vitro* como *in vivo*, se han centrado en el uso de cepas probióticas y comensales. Así pues, se ha demostrado que el tratamiento de monocapas de células T-84 con metabolitos secretados por *Bifidobacterium infantis* conduce a un aumento en la TER y en la expresión de las proteínas ZO-1 y ocludina mientras que reduce la expresión de claudina-2 (Ewaschuk et al., 2008). Además, el tratamiento de células Caco-2 con el probiótico *Lactobacillus plantarum* MB452 (aislado del producto probiótico VSL#3) mejora la función de barrera intestinal mediante el incremento de la expresión génica de ocludina y cingulina (Anderson et al., 2010). La administración de *L. plantarum* MB452 al duodeno de pacientes sanos, así como el tratamiento sobre células Caco-2, aumentó significativamente las proteínas ZO-1 y ocludina en la región asociada a las estructuras de TJ que sellan el espacio paracelular entre las células del epitelio intestinal.

Algunos probióticos y cepas comensales también han demostrado prevenir e incluso revertir los efectos adversos causados por patógenos sobre la función de la barrera intestinal. La combinación de las cepas *L. acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* atenúa la disrupción de barrera inducida por la cepa *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) en células HT29 (Resta-Lenert y Barrett, 2003). *L. Plantarum* ejerce un efecto protector contra el daño en la integridad de la estructura y distribución de las proteínas TJ de monocapas de células Caco-2 causada por la infección con EIEC, manteniendo la TER y evitando la pérdida de expresión y el reordenamiento de claudina-1, ocludina, JAM-1 y ZO-1 (Qin et al., 2009). La cepa *L. casei* DN-114 001 inhibe la disminución de la TER y la redistribución de ZO-1 de monocapas de células T-84, inducida por *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Parassol et al., 2005). El pretratamiento con *L. Rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* R0011 o *L. acidophilus* R0052 previene la disminución de TER y contrarresta la redistribución de las proteínas de TJ inducido por la infección con *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o con EPEC, en células T-84 (Johnson-Henry et al., 2008; Sherman et al., 2005).

## 6.2. EFECTO POSITIVO DE ECN SOBRE LA BARRERA INTESTINAL: IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA TcpC

El probiótico EcN es un buen colonizador del intestino, afecta positivamente la homeostasis intestinal y ha sido autorizado su uso en la práctica clínica para el tratamiento de varios trastornos del sistema gastrointestinal. Se ha demostrado mediante ensayos clínicos su eficacia terapéutica en la remisión de la colitis ulcerosa (Kruis et al., 2004, revisado por Scaldaferri et al., 2016). Además, está bien documentada su eficiencia en la mejora de la colitis experimental inducida en ratones (Grabig et al., 2006; Ukena et al. 2007; Garrido-Mesa et al. 2011; Olier et al., 2012; Souza et al., 2016). La eficacia de EcN en disminuir la permeabilidad intestinal y curar el intestino permeable puede atribuirse, al menos en parte, a su capacidad para promover la regulación positiva y la redistribución de las proteínas de TJ. En ensayos *in vivo*, se observó que la administración oral del probiótico EcN induce una regulación positiva de la proteína ZO-1 tanto en ratones sanos como en ratones colíticos tratados con sulfato de dextrano sódico (Ukena et al., 2007). En estudios *in vitro* llevados a cabo en células de epitelio intestinal incubadas con suspensiones de EcN se observó una regulación positiva de ZO-2 (Zyrek et al., 2007) o de claudina-14 (Hering et al., 2014), dependiendo de la línea celular utilizada. Concretamente, la regulación positiva de claudina-14 y el incremento de la TER en monocapas de células HT-29/B6, fue atribuido a TcpC, una proteína secretada por EcN al medio de cultivo (Hering et al., 2014).

Debido a que el refuerzo de la función de barrera mediado por EcN se asoció a la presencia de TcpC, en este trabajo nos planteamos realizar la búsqueda de otras cepas de *E. coli* comensales portadoras del gen *tcpC* en la Colección de Referencia de *E. coli* (ECOR) que representa ampliamente la variación genotípica de esta especie. El grupo *E. coli* incluye una gran variedad de cepas patógenas capaces de causar infecciones intestinales y de las vías urinarias, así como cepas no patógenas capaces de colonizar diferentes hábitats, entre los cuales destaca el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Tanto las cepas comensales como las patógenas son capaces de colonizar el intestino, sin embargo, difieren en la presencia de determinantes genéticos que contribuyen a rasgos específicos de virulencia o a la supervivencia y capacidad de adaptación de las bacterias dentro del huésped. Al igual que EcN, las cepas *tcpC*-positivas de la colección ECOR se clasifican en el grupo filogenético B2, que se asocia mayoritariamente con cepas virulentas que causan infecciones extra-intestinales. De hecho, TcpC es muy prevalente en los patógenos gram-negativos. Esta proteína contiene un dominio de unión al receptor Toll/IL-1 (TIR), que media su interacción con Myd88 e inhibe las vías de señalización de los receptores de tipo *Toll*. Mediante este mecanismo, TcpC altera la inmunidad innata causando inflamación y daño tisular (Cirl et al., 2008; Yadav et al., 2010). Sin embargo, a pesar de su naturaleza virulenta, TcpC tiene un impacto positivo en la barrera epitelial (Hering et al., 2014). En relación con este efecto, es de destacar que todas las cepas ECOR portadoras del gen *tcpC* analizadas en este trabajo promovieron un incremento en la TER de monocapas de células T-84 tras 24 horas de incubación, mientras que la cepa ECOR12 (grupo filogenético A), carente del gen *tcpC*, no mostró dicha capacidad.

TcpC, al igual que la inmunomodulina colibactina, está entre los factores de virulencia codificados en el genoma de EcN que contribuyen a su actividad probiótica. La colibactina es un péptido-poliquétido no ribosómico sintetizado por enzimas codificadas en la isla *pks*, que muestra efectos tanto genotóxicos como antiinflamatorios. Las mutaciones que eliminan la síntesis de colibactina reducen en gran medida la actividad beneficiosa de EcN en la modulación de la expresión de citoquinas y en la mejora de la colitis experimental en ratones (Olier et al., 2012). La prevalencia de los determinantes de virulencia extra-intestinal en cepas comensales de *E. coli* del grupo B2 se ha explicado sobre la base de que estos determinantes son de hecho factores de supervivencia (factores *fitness*), y por tanto pueden contribuir a la supervivencia y adaptación de las cepas dentro del tracto intestinal (Le Gall et al., 2007).

Otros datos obtenidos por nuestro grupo de investigación indican que la expresión de proteínas consideradas factores de virulencia por cepas de la microbiota comensal no

debe ser considerada un factor negativo. Por ejemplo la serin proteasa Sat actúa como un factor de virulencia que contribuye, junto con la expresión de otros factores y proteínas por parte de la bacteria productora, a mecanismos de patógenesis. Así, en patógenos la expresión de Sat tiene lugar conjuntamente con otros factores de virulencia, cuya combinación puede determinar la acción tóxica de Sat (por ejemplo facilitar su entrada al interior de la célula infectada para que Sat pueda interactuar con algún factor o diana). Sin embargo, la expresión de Sat en la cepa probiótica EcN no actúa como un factor de virulencia. EcN expresa y secreta otras proteínas que contrarrestan o impiden la posible acción citotóxica de Sat, lo que indica que esta proteína es de hecho un factor *fitness* que puede contribuir a la colonización intestinal (Tolosa et al., 2015). Por lo tanto, en algunos casos el efecto de toxicidad depende de la expresión de otros factores por parte de la bacteria (como por ejemplo en el caso de la proteína Sat), y en otros, de la expresión de ciertas proteínas consideradas factores de virulencia que es necesaria para obtener un efecto probiótico (como por ejemplo las proteínas colibactina y TcpC).

Las cepas de la colección ECOR portadoras del gen tcpC (ECOR53, ECOR56, ECOR57, ECOR60 y ECOR63) pertenecen al igual que EcN al grupo filogenético B2. La gran mayoría de estas cepas expresan varios determinantes de virulencia y son altamente citotóxicas (Boyd y Hartl, 1998), a excepción de la cepa ECOR63, aislada de las heces de un individuo sano. Esta cepa carece de genes de virulencia funcionales como la hemolisina (hlyA), y no ejerce efectos citotóxicos en la línea celular de macrófagos murinos J774 (Lai et al., 1999). En base a esta información, descartamos las cepas citotóxicas y seleccionamos las cepas EcN y ECOR63 para llevar a cabo el estudio sobre su capacidad para regular la expresión y distribución de las proteínas de TJ.

### **6.3. LAS OMVs DE EcN Y CEPAS COMENSALES DE *E. coli* MODULAN LA BARRERA INTESTINAL DE MANERA INDEPENDIENTE DE TcpC**

Dado que las interacciones entre el huésped y los microorganismos se producen a través de moléculas moduladoras o efectoras, es necesaria la caracterización de las mismas, así como establecer una relación entre estos efectores bacterianos y las respuestas moleculares que inducen en el huésped. Los productos de secreción de las bacterias tales como los metabolitos, los factores proteicos y las vesículas de membrana externa (OMVs) se posicionan como una estrategia eficaz utilizada por bacterias intestinales para modular y ejercer efectos protectores sobre la función de barrera intestinal.

Dentro de los metabolitos bacterianos con capacidad de inducir cambios en la composición de las proteínas de TJ y mejorar la integridad de la barrera epitelial se encuentran el butirato y el indol. Ambos son capaces de incrementar la TER de monocapas de células Caco-2. El butirato se emplea clínicamente para el tratamiento de la colitis ulcerosa (Scheppach et al., 1992) y puede revertir el aumento de la permeabilidad y la ulceración intestinal observada en ratones tratados con SDS (sulfato sódico de dextrano) (Venkatraman et al., 2000). En pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, el butirato reestablece las TJ mediante la regulación negativa de claudina-2 y la regulación positiva de ocludina, cingulina, ZO-1 y ZO-2 (Plöger et al., 2012). En estudios *in vitro*, el tratamiento de monocapas de células Caco-2 con butirato mostró una disminución en la expresión a nivel post-transcripcional del 90% de claudina-2 y un aumento del 376% de claudina-7. El indol genera un incremento del 62% en la expresión de claudina-5 (Valenzano et al., 2015).

Por otra parte, nuestro grupo se ha centrado en los últimos tres años en estudiar factores secretados por el probiótico EcN y por varias cepas comensales de *E. coli* como mediadores en la comunicación intercelular con el huésped a nivel intestinal. Hemos demostrado que los sobrenadantes obtenidos del cultivo de EcN son capaces de incrementar la TER en monocapas de células Caco-2, aportando evidencias que este efecto podría atribuirse a un factor secretado (Tolosa et al., 2015).

En cuanto a las vesículas de microbiota no existe información previa. Por esta razón, una parte importante de nuestra investigación está orientada a establecer el papel de las vesículas secretadas por la microbiota, en concreto de cepas *E. coli* gram-negativas, como moduladores de la homeostasis intestinal. En este contexto, hemos demostrado que las OMVs de EcN, así como las OMVs secretadas por otras cepas de *E. coli* comensales, se internalizan en células de epitelio intestinal a través de endocitosis mediada por clatrina (Cañas et al., 2016). Hemos descrito también que las OMVs de estas cepas ejercen efectos inmunomoduladores en diferentes modelos celulares *in vitro* y *ex vivo*, activando vías de señalización a través de la barrera epitelial intestinal (Fábrega et al., 2016). Por tanto, el objetivo de esta tesis se centró en analizar el efecto de factores secretados (OMVs y factores solubles) obtenidos a partir de cultivos del probiótico EcN y de la cepa comensal ECOR63 sobre la integridad de la barrera intestinal, evaluando su capacidad de regular la expresión y localización subcelular de proteínas de TJ. Un aspecto relevante ha sido establecer si el efecto de refuerzo de la función de barrera intestinal es dependiente exclusivamente de la expresión de la proteína Tcpc.

Antes de la realización de esta tesis doctoral se había reportado que en las cepas

uropatógenas el nivel de secreción de TcpC era muy bajo (Cirl et al., 2008). Además, se desconocía cual era la vía de secreción de esta proteína. Por ello nos planteamos en primer lugar analizar si TcpC es secretada en forma soluble o asociada a las OMVs. La estrategia diseñada estaba basada en utilizar técnicas de inmunodetección para establecer la localización de TcpC asociada a vesículas o vinculada a la fracción secretada de manera soluble. Sin embargo, todos los intentos fueron infructuosos. Aunque se diseñaron varios anticuerpos contra péptidos inmunogénicos de TcpC, ninguno de ellos resultó eficaz para la inmunodetección de la proteína ni en el sobrenadante de los cultivos ni a nivel intracelular. La estrategia de purificar la proteína recombinante a partir del gen *tcpC* clonado en vectores de expresión para su uso como antígeno en los procesos de inmunización de conejos tampoco resultó exitosa por el bajo rendimiento en la expresión de la proteína. Por ello, se desestimó también la estrategia de obtener anticuerpos contra la proteína completa.

El hecho de no disponer de una buena preparación de anticuerpos contra TcpC limitaba el estudio de la vía de secreción de TcpC, así como también el evaluar si el gen *tcpC* es funcional y se expresa en las condiciones de ensayo. Por este motivo, la expresión de *tcpC* fue evaluada a través del análisis de la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *gfp* en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos mostraron que TcpC se expresa en condiciones *in vitro* en los medios de cultivo LB y DMEM, y además se expresa en condiciones *in vivo* en el tracto intestinal de ratones. Así pues, una vez establecida la expresión del gen *tcpC* en la cepa EcN nos planteamos abordar estudios funcionales de TcpC mediante la construcción de mutantes *tcpC Knockout* derivados de EcN y ECOR63. De hecho, otros estudios publicados sobre la función de TcpC en la cepa probiótica EcN están basados en el uso de mutantes *Knockout* y no en la inmunodetección de la proteína (Hering et al., 2014). Los mutantes TcpC negativos obtenidos en este proyecto de tesis nos permitieron además evaluar de manera indirecta si el efecto de TcpC se asociaba a las fracciones solubles o a las OMVs.

En primer lugar se analizó la implicación de mediadores secretados por EcN y ECOR63 en la modulación de la barrera epitelial en condiciones de barrera intacta. Para ello se prepararon diferentes fracciones a partir de cultivos bacterianos. Así, los sobrenadantes de los cultivos de EcN, ECOR63 y sus respectivos mutantes *tcpC* obtenidos, tras la eliminación de las bacterias, contenían tanto los factores secretados de manera soluble como las OMVs. Estos sobrenadantes se fraccionaron mediante ultracentrifugación para separar por un lado las OMVs (sedimento) de los factores solubles que permanecen en el sobrenadante después de la ultracentrifugación (COF-SN). De esta manera fue posible realizar la evaluación de cada fracción de manera

independiente. El análisis del efecto de cada fracción sobre la barrera intestinal se realizó a través de la determinación de la TER, la expresión del mRNA y de proteínas de TJ, así como el análisis de la distribución subcelular de estas proteínas.

Este estudio demuestra que EcN y ECOR63 tienen un efecto positivo sobre el fortalecimiento de la barrera epitelial en dos líneas celulares de epitelio intestinal (Caco-2 y T-84), y este efecto no depende exclusivamente de TcpC. Los resultados apuntan a la contribución de otros efectores bacterianos en la regulación de la función de barrera intestinal. En primer lugar, la separación de las fracciones secretadas en COF-SN (factores solubles) y OMVs reveló que tanto las OMVs como los COF-SN obtenidos de ambas cepas son capaces de provocar un aumento en la TER de monocapas de células T-84 a las 24 horas de incubación. Este efecto de refuerzo se observa también a las 3 horas de incubación. En segundo lugar, la deficiencia de TcpC no alteró la actividad estimuladora de las OMVs aisladas de ambas cepas, ni tampoco la de los COF-SN obtenidos de ECOR63, pero sí redujo significativamente el efecto de los COF-SN obtenidos de EcN. En general, estos resultados muestran por primera vez que las OMVs secretadas por componentes de la microbiota, como EcN y ECOR63, tienen la capacidad de modular la integridad de la barrera epitelial. También indican que TcpC no se encuentra asociada a las OMVs, y por tanto, el efecto modulador de estas vesículas es independiente de TcpC. Además, revelan que la cepa ECOR63 secreta otros factores activos solubles, distintos de TcpC, que tienen un gran impacto sobre la barrera epitelial. Estos factores son de naturaleza no proteica ya que su efecto no es inactivado por digestión con proteinasa K ni por tratamiento a alta temperatura.

Diferentes vías de señalización están implicadas en la regulación de proteínas de TJ. Entre ellas, la vía de ERK 1/2 (*extracellular signal regulated kinase*) controla la transcripción de varias proteínas de TJ (González-Mariscal et al., 2008; Khan y Asif, 2015). Según Hering et al., (2014), la activación de esta vía de señalización por sobrenadantes de cultivos de EcN, y en particular por la proteína TcpC, contribuye al incremento de la TER en monocapas de células HT-29/B6 promovido por este probiótico. En este contexto, nuestros resultados profundizan un poco más en esta regulación y demuestran que, no sólo TcpC, sino también el efecto de las OMVs de EcN y ECOR63 sobre la TER depende de la vía de señalización de ERK 1/2. El refuerzo de la barrera epitelial promovido por las OMVs de ambas cepas fue completamente anulado en presencia del inhibidor de ERK 1/2, U0126. Este inhibidor anuló también el efecto del COF-SN de EcN, muy probablemente mediado por TcpC. Sin embargo, el COF-SN de ECOR63 mantuvo una cierta actividad de incremento de la TER en presencia de U0126, lo que sugiere que lo(s) factor(es) con actividad positiva sobre la barrera intestinal secretados de manera soluble por esta cepa no activarían ERK 1/2.



La activación de ERK 1/2 por OMVs y COF-SN sugería la regulación transcripcional de ciertas proteínas de TJ. El análisis de los niveles de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa mostró que estas fracciones secretadas no desencadenaron cambios significativos en los niveles de mRNA de las proteínas ZO-2, ocludina o claudina-1. Por lo tanto, no se vincula la expresión de estas proteínas con el incremento de la TER y el reforzamiento de la barrera epitelial promovido por las OMVs y factores solubles secretados por estas cepas de la microbiota intestinal. En cuanto a la proteína ZO-2, otros estudios realizados con los mismos modelos celulares utilizados en este trabajo (células T-84 y Caco-2) revelaron una regulación positiva de la expresión de esta proteína tras la incubación con suspensiones del probiótico EcN (Zyrek et al., 2007). Por tanto, en base a nuestros resultados obtenidos al estimular las monocapas de células epiteliales con las fracciones de EcN secretadas (COF-SN y OMVS), podemos especular que la regulación positiva mediada por EcN de ZO-2 depende de factores asociados a la bacteria y no de factores secretados.

En cuanto a la regulación de las otras proteínas de TJ analizadas en este estudio, nuestros resultados mostraron una regulación positiva (*upregulation*) de ZO-1 y claudina-14, y de manera contraria, se observó una regulación negativa (*downregulation*) de claudina-2. Es de destacar que todos estos efectos fueron mediados tanto por las OMVs como los COF-SN de las dos cepas.

El incremento en los niveles de mRNA de claudina-14 observado en monocapas incubadas con COF-SN concuerda con los resultados reportados por Hering et al., (2014) que demuestran que los sobrenadantes de EcN incrementan la expresión de claudina-14 y relacionan este efecto con la proteína secretada TpcC (Hering et al., 2014). Sin embargo, en los ensayos realizados con los COF-SN de ECOR63, la deficiencia de TpcC no resultó en una reducción significativa de los niveles de mRNA de claudina-14, al menos en el modelo celular T-84. Esto confirma la presencia de otros factores solubles activos en las muestras COF-SN de ECOR63. Por otra parte, las OMVs aisladas de las cepas EcN y ECOR63 y de sus respectivos mutantes *tcpC* también provocaron un incremento en los niveles de mRNA de claudina-14, confirmando que el efecto de las OMVs es independiente de TpcC. Este es un resultado relevante puesto que la regulación de claudina-14 por OMVs de microbiota no había sido descrita anteriormente.

Respecto a la expresión de ZO-1, se había reportado que EcN promovía una regulación positiva de esta proteína en modelos murinos *in vivo* (Ukena et al., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la regulación positiva de esta proteína podría ser mediada por TpcC y las OMVs secretadas por EcN. La expresión de

ZO-1 se analizó a nivel de mRNA, a nivel de proteína y a nivel de localización subcelular la zona de las TJ. En todos los ensayos realizados, los niveles de proteína ZO-1 cuantificada por *Western blot* correlacionaron con los niveles de mRNA, lo que apunta a la regulación transcripcional del gen. Esta observación es compatible con la implicación de ERK 1/2 en la señalización inducida por OMVs y COF-SN. En diferentes modelos celulares, la sobre-expresión de ZO-1 inducida por diferentes mediadores va asociada a la fosforilación de ERK 1/2 (Yang et al., 2005; Ko et al., 2009).

Como era previsible, la regulación positiva de ZO-1 inducida por las OMVs de ambas cepas, no depende de *TcpC*. Hay que destacar sin embargo que la actividad de los COF-SN sobre la regulación de ZO-1 difiere según la cepa utilizada. En el caso de los COF-SN de EcN, la regulación positiva de ZO-1 depende exclusivamente de *TcpC*, pero en los COF-SN de ECOR63 podrían existir otros factores secretados solubles que contribuyan a la modulación de la expresión de ZO-1, al igual que se ha observado para claudina-14. Un hecho importante a resaltar es que la expresión incrementada de ZO-1 va acompañada de su localización en la zona de las TJ. La cuantificación de la proteína ZO-1, basada en la tinción por inmunofluorescencia seguida de la visualización mediante microscopía confocal, confirma la estrecha correlación existente entre los niveles de expresión de ZO-1 y su asociación a las TJ en la periferia de las células que conforman la monocapa. Este efecto observado en las células epiteliales tratadas con las OMVs o los COF-SN de EcN y ECOR63 no es promovido por las fracciones equivalentes aisladas de la cepa comensal *tcpC* negativa, ECOR12. La fosforilación de componentes clave de las TJ como claudina, ocludina o ZO-1/2 tiene un gran impacto en la función de barrera (González-Mariscal et al., 2008). Es probable que estos efectores bacterianos (OMVs, *TcpC* u otros factores solubles) activen también mecanismos de regulación post-traducciona, tales como la fosforilación de ZO-1, que contribuyen a la asociación de esta proteína con los complejos proteicos que conforman las TJ.

Así pues, este trabajo proporciona información novedosa respecto a las proteínas TJ claudina-14 y ZO-1, cuya regulación por el probiótico EcN era ya conocida. En concreto, los resultados contribuyen a caracterizar los efectores bacterianos implicados en esta regulación. Además, de la proteína *TcpC* ya descrita (Hering et al., 2014), otro(s) mediadores secretados a través de las OMVs contribuyen a su regulación. Además, la cepa ECOR63 secreta algún factor de naturaleza no proteica con capacidad de activar la expresión de claudina-14 y ZO-1, no generado por el probiótico EcN.

Además de proteínas TJ relacionadas con el refuerzo de la barrera epitelial, en este estudio se incluyó la evaluación de la proteína claudina-2 que juega un papel opuesto. Esta proteína forma poros paracelulares (Lu et al., 2013) que facilitan la secreción de

caciones y actúa como un canal de agua en las TJ de las células epiteliales (Luettig et al., 2015). Los estímulos que aumentan los niveles de expresión de claudina-2 dan como resultado un aumento en la permeabilidad paracelular (Luettig et al., 2015) que contribuye al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales. Se ha descrito una mayor expresión de claudina-2 en el epitelio intestinal de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Landy et al., 2016). Algunos patógenos como *Salmonella* aumentan la expresión de claudina-2 y facilitan la invasión bacteriana, a través de la activación de la quinasa Jun (JNK) (Zhang et al., 2013). Ciertas toxinas microbianas, tales como la toxina del cólera o la enterotoxina B de *Estafilococos*, también promueven la regulación positiva de claudina-2, y por tanto comprometen la barrera epitelial intestinal (Liu et al., 2013). Por el contrario, la regulación negativa de claudina-2 es parte del mecanismo utilizado por algunas cepas probióticas para mejorar la función de la barrera intestinal (Ewaschuk et al., 2008). Este estudio muestra por primera vez la capacidad de EcN y de ECOR63 para disminuir la expresión de claudina-2. En esta regulación están implicados tanto las OMVs como factores solubles secretados (COF-SN). En este caso, la regulación negativa de claudina-2 no depende de TcpC.

Se desconoce el mecanismo a través del cual las OMVs y los factores solubles presentes en la fracción COF-SN promueven la disminución de los niveles de claudina-2 (tanto a nivel de proteína como de mRNA). Se sabe que la transcripción de claudina-2 es activada por varias vías de señalización, entre ellas la vía de ERK (Khan y Asif, 2015). Ya que esta vía es esencial para que las fracciones secretadas (OMVs y factores solubles) de EcN y ECOR63 ejerzan un efecto positivo sobre la TER de la barrera epitelial, se esperaría que estos efectores microbianos promovieran un incremento, no una disminución, en la expresión de claudina-2. Por ello, otros mecanismos han de ser activados para regular a la contra los niveles de claudina-2, como puede ser la regulación de microRNAs (miRNAs). Recientemente se ha descrito que la elevada expresión de claudina-2 en el síndrome de colon irritable que cursa con diarrea es debida a una alteración en la expresión del miR-16. En el colon de estos pacientes se observa expresión reducida de este miRNA, que tiene como uno de sus mRNAs diana el mRNA de claudina-2. Ello se traduce en una mayor estabilidad del mRNA de claudina-2 y en consecuencia en un incremento en la síntesis de esta proteína que contribuye a la elevada permeabilidad intestinal asociada a esta patología (Martínez et al., 2017).

Dada la complejidad de la microbiota intestinal y de los tipos celulares del huésped que intervienen en su reconocimiento, es evidente que se requieren elaborados mecanismos reguladores que aseguren la homeostasis intestinal. Estudios recientes indican que los microRNAs (miRNAs) son actores relevantes en el establecimiento de una óptima interacción microbiota–hospedador. Los miRNAs son RNAs no codificantes

de pequeño tamaño (20-25 nucleótidos) que después de un proceso de maduración se asocian al complejo RISC y regulan la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) diana por unión a su región 3'-UTR promoviendo la degradación del mRNA o bloqueando su traducción. Ejercen pues una regulación negativa a nivel post-transcripcional que permite controlar de forma ajustada la expresión de vías de señalización. Los miRNAs están implicados en el control de múltiples procesos celulares. Existen varios estudios y revisiones sobre el tema que describen el papel regulador de miRNAs en la homeostasis intestinal y el impacto de la microbiota en su expresión (Masotti, 2012; Runtsch et al., 2014). Asimismo, hay estudios que relacionan la expresión de determinados miRNAs con la respuesta a la infección por patógenos, así como también la capacidad de los patógenos en modular la expresión de miRNA en beneficio propio (Maudet et al., 2014a; Maudet et al., 2014b). En este contexto, se ha descrito que EcN regula de manera inversa algunos miRNAs modulados por EPEC, que tienen como diana mRNAs de proteínas relacionadas con la barrera epitelial (Veltman et al., 2012). En base a esta información, se puede especular que las OMVs y factores secretados por EcN y ECOR63 podrían activar la expresión del miR -16, y en consecuencia regular a la baja la expresión de claudina-2. Estos estudios están siendo iniciados en nuestro laboratorio.

A parte de los efectos de EcN sobre la expresión de las proteínas TJ ZO-1 y claudina-14, la regulación negativa de la claudina-2 puede contribuir a la eficacia de este probiótico en el tratamiento de infecciones intestinales y enfermedades inflamatorias. Aunque la cepa ECOR63 no había sido caracterizada hasta el presente, en este trabajo se muestra por primera vez que las OMVs y factores microbianos secretados por esta cepa regulan la expresión de ZO-1, claudina-14 y claudina-2 del mismo modo que la cepa probiótica EcN. Ya se ha comentado que ambas cepas pertenecen al mismo grupo filogenético B2. En cambio, la cepa comensal ECOR12 (grupo filogenético A, no asociado a cepas virulentas), no incrementa la TER de la barrera epitelial y tampoco modula la expresión de claudina-2. Estos resultados refuerzan la idea de que “los factores determinantes de virulencia” pueden ser percibidos como factores de supervivencia que aumentan la aptitud de las cepas que los portan, y no meramente como agentes de virulencia extra-intestinal (Le Gall et al., 2007).

#### **6.4. LAS OMVs Y FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR EcN Y ECOR63 PROTEGEN LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA EPITELIAL INTESTINAL DAÑADA POR CEPAS ENTEROPATÓGENAS**

Una vez comprobada la capacidad de las OMVs y factores solubles secretados por las cepas EcN y ECOR63 de reforzar la barrera epitelial intacta, se realizaron aproximaciones experimentales encaminadas a evaluar la capacidad de estas fracciones de proteger la integridad de la barrera en un modelo de barrera dañada por

la infección con *E. coli* enteropatógena (EPEC). La infección con EPEC daña la estructura y función de las TJ de las células epiteliales (Ugalde-silva et al., 2016) e induce la alteración de la permeabilidad del epitelio intestinal causando diarrea en el huésped (Groschwitz y Hogan, 2009; Weflen et al., 2009). Se ha demostrado en varios modelos de células epiteliales que EPEC promueve la reducción de la TER (Canil et al., 1993; Spitz et al., 1995). Estudios previos del grupo encaminados a elucidar el papel de la proteasa Sat (*serin autotransporter toxin*, considerada un factor de virulencia) en EcN habían evidenciado, mediante mediciones de la TER, que los sobrenadantes de cultivos de EcN en LB son capaces de prevenir la disrupción de la barrera de monocapas de células Caco-2 infectadas con EPEC, indicando que el efecto de protección podría atribuirse a un factor secretado (Tolosa et al., 2015). Los resultados de esta tesis indican que ambas fracciones secretadas (COF-SN y OMVs) de EcN, así como las de ECOR63 evitan la disminución de la TER provocada por la infección con EPEC en monocapas de células T-84.

La inhibición de la fosforilación de ERK 1/2 no evitó la disminución de la TER promovida por EPEC, lo que indica que el daño causado por EPEC no es mediado por esta vía de señalización. En presencia del inhibidor U0126, los factores secretados (COF-SN y OMVs) de EcN y ECOR63 no fueron capaces de neutralizar la disminución de la TER causada por este patógeno. Este efecto está en la línea del observado en condiciones de barrera intacta. En conjunto, los ensayos realizados en presencia de este inhibidor indican que estos efectores microbianos modulan la integridad de la barrera epitelial a través de la señalización de ERK 1/2, promoviendo el refuerzo de la barrera intacta y protegiendo o compensando el daño causado por EPEC.

Los análisis por RT-PCR cuantitativa mostraron que la infección con EPEC provoca la regulación negativa de las proteínas ZO-1, ZO-2, ocludina, claudina-14 y curiosamente también de claudina-2. En base a esta observación se descarta que EPEC, a diferencia de otros patógenos como *Salmonella* (Zhang et al., 2013), induzca el estado de permeabilidad aumentada mediante la expresión de claudina-2. No se observaron cambios significativos en la expresión de claudina-1 en monocapas de células T-84 infectadas con EPEC. La incubación en presencia de OMVs y COF-SN de ambas cepas compensó la disminución de los niveles de mRNA de ocludina y claudina-14 causada por EPEC, alcanzando niveles similares a los de las células control no infectadas. Sin embargo, estas fracciones no fueron capaces de contrarrestar la disminución de la expresión de ZO-1 y ZO-2 promovida por el patógeno.

Las TJ son estructuras altamente dinámicas cuya fuerza de interacción es regulada por múltiples estímulos. A parte de la regulación transcripcional, las proteínas de TJ

---

pueden ser reguladas por mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional, así como a nivel post-traducciona, controlando en este caso su asociación a otras proteínas que componen la estructura de TJ. Es conocido que la fosforilación reversible de ocludina y otras proteínas TJ como ZO-1 y ZO-2 es un mecanismo vital en la regulación de la barrera intestinal, habiéndose descrito varias quinasas con esta actividad (González-Mariscal et al., 2008; Cummins, 2012). En el caso de las proteínas ZO, estas modificaciones alteran su localización subcelular, pudiendo estar deslocalizadas a nivel de citosol y núcleo (en forma defosforilada), o fuertemente asociadas a proteínas TJ integrales de la membrana plasmática como ocludina y claudinas (en su forma fosforilada). En este contexto, se conocía que EPEC promueve una distribución alterada de las proteínas ZO-1 (Philpott et al., 1996), ZO-2 (Zyrek et al., 2007) y ocludina (Simonovic et al., 2000; Weflen et al., 2009). Estos efectos sobre la deslocalización de proteínas TJ junto con las alteraciones promovidas a nivel de transcripción de genes TJ explicarían el efecto patogénico de esa cepa. En este trabajo se comprobó mediante marcaje por inmunofluorescencia seguido por microscopía confocal la alteración en la localización celular de las proteínas ZO-1, ZO-2 y ocludina después de la infección con EPEC. Respecto a ZO-2, estudios realizados por otros autores indican que en células T-84 infectadas con EPEC, la co-incubación con el probiótico EcN (suspensión de bacterias viables) evita la disociación de ZO-2 de los sitios de contacto celular promovida por el patógeno, manteniendo su localización normal en la zona de TJs (Zyrek et al., 2007). Sin embargo, las fracciones secretadas por ambas cepas (OMVs y COF-SN) no evitan la deslocalización de ZO-2 hacia el citoplasma promovida por EPEC. Por tanto, se confirma que la regulación positiva de ZO-2 mediada por EcN podría depender de factores asociados a la bacteria y no de factores secretados. Con respecto a las proteínas ZO-1 y ocludina, los ensayos de infección con EPEC en presencia de los COF-SN y de las OMVs de EcN y ECOR63 revelaron que dichas fracciones son capaces de evitar la deslocalización de estas proteínas hacia el citosol, especialmente de ZO-1, manteniendo su asociación a las estructuras de las TJ. Estos resultados sugieren que los factores secretados por estas cepas de la microbiota intestinal contrarrestan los cambios en el estado de fosforilación de ZO-1 promovidos por EPEC.

Respecto a posibles mecanismos de regulación post-transcripcional activados por EPEC y contrarrestados por EcN o ECOR63 podemos considerar la regulación por miRNAs. Se han descrito tres miRNAs (miR-203, miR-595, miR-483-3p) que son regulados de manera contraria por el patógeno EPEC y el probiótico EcN. Todos ellos controlan la expresión de proteínas reguladoras y estructurales de las TJ, así como de otros componentes celulares implicados en la integridad de la barrera como mucinas y péptidos antimicrobianos (Veltman et al., 2012). Entre ellos miR-203 controla la

expresión de ZO-2. En esta tesis no se ha observado regulación de ZO-2 por las fracciones secretadas (COF-SN y OMVs) de EcN, por lo que podemos especular que la regulación de este miRNA por EcN es mediada por algún componente asociado a la bacteria, pero no secretado. Entre los mRNAs diana de miR-595 y miR-483-3p están diversas isoformas de PKC (implicadas en la fosforilación de proteínas TJ) y proteínas reguladoras de las TJ como PAR-3 y PAR-6. Por tanto, estos miRNAs controlan la distribución subcelular de proteínas ZO y la integridad de las uniones TJ. La regulación de estos dos miRNAs por las OMVs o factores secretados de manera soluble obtenidos de EcN, así como de ECOR63, podría explicar el efecto protector de estos efectores bacterianos frente a las alteraciones promovidas por EPEC.

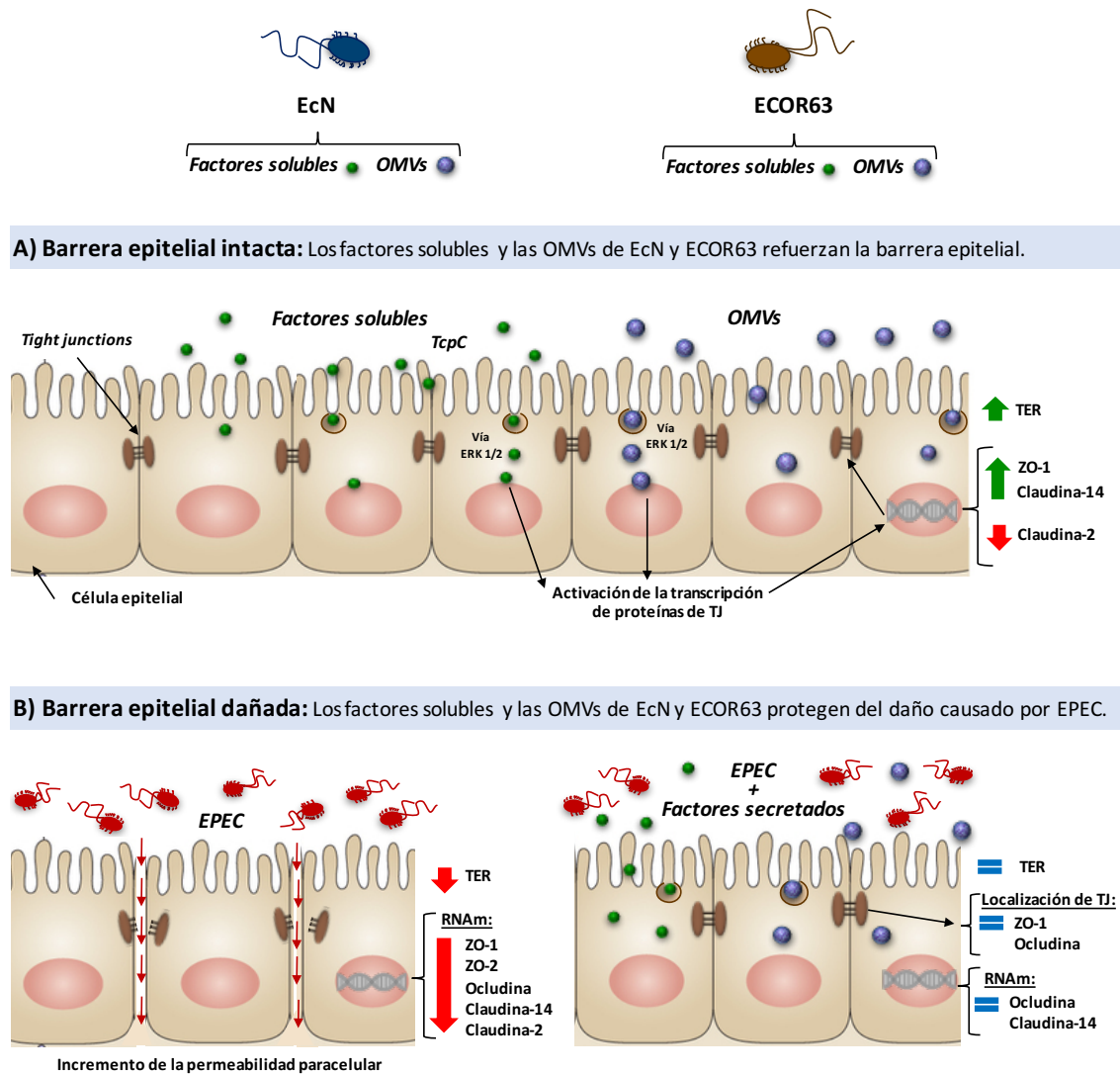
Este estudio demuestra que la protección ejercida por las fracciones secretadas (OMVs y COF-SN) de EcN y ECOR63 frente a la disrupción de la barrera epitelial causada por EPEC (observada en los ensayos de TER) implica la regulación compensatoria a nivel de mRNA de la expresión de las proteínas de TJ ocludina y claudina-14 y de redistribución de la proteína ZO-1 hacia las TJ.

La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de TJ inducida por los factores extracelulares secretados de bacterias probióticas o comensales podría sentar las bases para el desarrollo de tratamientos terapéuticos y preventivos contra enfermedades asociadas con defectos de barrera intestinal.

En la figura 6.1. se esquematiza a manera de resumen, los mecanismos moleculares caracterizados en esta tesis, a través de los cuales las OMVs y de los factores secretados por la cepa probiótica EcN y la cepa comensal ECOR63 refuerzan la barrera epitelial.

Este trabajo representa el primer estudio que proporciona evidencia sobre la función de las OMVs de cepas probióticas y comensales de *E. coli*, en la modulación de proteínas de TJ.





**FIGURA 6.1. Modulación de la barrera epitelial intestinal por las OMVs y los factores solubles secretados de EcN y ECOR63.** A) Modelo de barrera epitelial intacta: Los factores secretados por ambas cepas refuerzan la barrera epitelial a través del incremento de la TER y la regulación positiva de las proteínas ZO-1 y claudina-14, así como la regulación negativa de claudina-2. B) Modelo de barrera epitelial dañada: Los factores secretados de ambas cepas protegen la integridad de la barrera epitelial frente al daño causado por la infección con *E. coli* enteropatógena (EPEC), evitando la reducción de TER, contrarrestando la expresión disminuida de ocludina y claudina-14 y manteniendo la localización subcelular de ZO-1 y ocludina asociada a las estructuras de TJ.





## **7. CONCLUSIONES**

---



---

## 7. CONCLUSIONES

1. La cepa probiótica EcN y las cepas de *E. coli* comensales portadoras del gen *tcpC* (cepa seleccionada ECOR63) incrementan la TER de monocapas de células T-84, y por tanto, son capaces de reforzar la función de barrera en un modelo *in vitro* de epitelio intestinal.
2. El gen *tcpC* se expresa *in vitro* por crecimiento en medios de cultivo LB y DMEM, e *in vivo* en el tracto intestinal de ratones.
3. Las OMVs y factores solubles secretados por EcN y ECOR63 incrementan la TER de monocapas de células T-84 a través de la vía de señalización de ERK 1/2 (*extracellular signal regulated kinase*).
4. Las OMVs y factores solubles secretados por ambas cepas promueven la regulación positiva de las proteínas ZO-1 y claudina-14, y la regulación negativa de claudina-2, proteína de TJ vinculada al aumento de la permeabilidad paracelular.
5. Los efectos reguladores de las OMVs sobre el refuerzo de la barrera epitelial son independientes de *TcpC*, lo que indica que esta proteína no es secretada a través de vesículas.
6. La proteína *TcpC* contribuye a la regulación positiva de ZO-1 y claudina-14. En contraste, esta proteína no tiene ningún efecto sobre la regulación de la proteína claudina-2.
7. El refuerzo de la barrera epitelial promovido por la fracción extracelular de EcN que contiene los factores secretados de forma soluble es debido a *TcpC*; mientras que en la cepa ECOR63, además de *TcpC*, otros factores de naturaleza no proteica contribuyen a este efecto.
8. Las OMVs y factores solubles secretados por EcN y ECOR63 tienen la capacidad de proteger la integridad de la barrera epitelial frente al daño causado por la infección con *E. coli* enteropatógena (EPEC).
9. EPEC promueve una regulación negativa a nivel de mRNA de las proteínas ZO-1, ZO-2, ocludina y claudina-14, y altera la localización subcelular de la proteína ZO-1 promoviendo su deslocalización hacia el citosol y núcleo.
10. Las OMVs y factores solubles secretados por EcN y ECOR63 contrarrestan la expresión disminuida de ocludina y claudina-14, y mantienen la localización subcelular de la proteína ZO-1 asociada a las estructuras de TJ. En este caso, la redistribución de ZO-1 no va acompañada de cambios a nivel de mRNA.



## **8. REFERENCIAS**

---



---

## 8. REFERENCIAS

### A

---

**Agace**, W.W. and McCoy, K.D., (2017). Review regionalized development and maintenance of the Intestinal Adaptive Immune Landscape. *Immunity* 46(4): 532–548.

**Aguilera**, L., Toloza, L., Giménez, R., Odena, A., Oliveira, E., Aguilar, J., Badia, J., and Baldomà, L. (2014). Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics* 14(2–3): 222–229.

**Alok**, A., Singh, I.D., Singh, S., Kishore, M., Jha, P.C., and Iqbal, M.A. (2017). Probiotics: A new era of biotherapy. *Advanced biomedical research* 6(31):1-5.

**Anderson**, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W. C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W. J., and Roy, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology* 10(1): 316-327.

**Antoni**, L., Nuding, S., Wehkamp, J., Stange, E.F., Antoni, L., Nuding, S., and Wehkamp, J. (2014). Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 20(5): 1165–1179.

**Ausubel**, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology.

### B

---

**Baumler**, J.A., and Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *HHS Public Access* 535(7610): 85–93.

**Becker**, C., Neurath M.F., and Wirtz, S. (2015). The intestinal microbiota in inflammatory bowel disease. *ILAR Journal* 56(2): 192–204.

**Bergström**, J.H., Birchenough, G.M.H., Katona, G., Schroeder, B.O., Schütte, A., Ermund, A., Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(48): 13833–13838.

**Bertani**, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of bacteriology* 186(3): 595–600.

---



- Bevins, C.L.** (2006). Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochemical Society Transactions* 34(2): 263-266.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H.** (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9(5): 356–368.
- Bomberger, J.M., Maceachran D.P., Coutermarsh, B.A., Ye, S., O'Toole, G.A., and Stanton, B.A.** (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas Aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathogens* 5(4): e1000382.
- Boyd, E.F., and Hartl, D.L.** (1998). Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *Journal of Bacteriology* 180(5): 1159–1165.
- Bonnington, K.E., and Kuehn, M.J.** (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843(8): 1612–1619.
- Bron, P.A., Baarlen, P.V., and Kleerebezem, M.** (2011). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology* 10(1): 66–78.
- Bustin, S.A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2): 169–193.

## C

- Cañas, M.A., Giménez, R., Fábrega, M.J., Toloza, L., Baldomà, L., and Badia, J.** (2016). Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage. *PLoS ONE* 11(8): 1–22.
- Caballero, S., and Pamer, E.G.** (2015). Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. *Annual Review of Immunology* 33(2): 227–256.
- Canil, C., Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B.** (1993) Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect. Immun.* 61(7): 2755–2762.
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., and Sawada, N.** (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 588–600.
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fisher, H., Stappert, D., Wantia, N.,**

Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., and Miethke, T. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature medicine* 14(4): 399–406.

**Coombes**, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology* 8(6): 435–446.

**Corcoran**, B.M, Stanton, C., Fitzgerald, G., and Ross, R.P. (2008). Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design* 14(14): 1382–1399.

**Cress**, B.F., Linhardt, R.J., and Koffas, M.A.G. (2013). Draft genome sequence of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (Serovar O6:K5:H1). *Genome Announcements* 1(2): e0004713.

**Cummins**, P.M. (2012). Occludin: One protein, many forms. *Molecular and Cellular Biology* 32(2): 242–250.

## D

**Datsenko**, K.A. and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97(12): 6640–6645.

**Dejana**, E. (2004). Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (4): 261–70.

**Donoghue**, E.J.O, and Krachler, A.M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol* 18(11): 1508–1517.

**Dower**, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16(13): 6127–45.

## E

**Ebnet**, K., Suzuki, A., Ohno, S., and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAM): more molecules with dual functions?. *Journal of Cell Science* 1(117): 19-29.

**Elhenawy**, W., Debelyy, M., and Feldman M.F. (2014). Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into bacteroides outer membrane vesicles. *American Society for Microbiology* 5(2): e00909- e00914.

**Ellis**, T.N., and Kuehn, M.J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(1): 81–94.

**Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., and Hansson, G.C. (2013).** Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. i. gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 305(5): G341-G347.

**Ewaschuk, J.B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van, M.L., and Madsen, K.L. (2008).** Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 295(5): G1025–G1034.

## F

**Fábrega, M.J., Aguilera, L., Giménez, R., and Varela, E. (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(mayo): 1–14.

**Fischer, A., Gluth, M., Weege, F., Pape, U.F., Wiedenmann, B., Baumgart, D.C., and Theuring, F. (2014).** Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 306(3): G218-G228.

## G

**García, D.M. (2012).** Uso de la fluorescencia y la microscopía confocal en la investigación científica. *SEBB DIVULGACION LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO*.

**Garrett, W.S., Gordon, J.I., and Glimcher, L.H. (2010).** Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140(6): 859–870.

**Garrido-Mesa, N., Utrilla, P., Comalada, M., Zorrilla, P., Garrido-Mesa, J., Zarzuelo, A., Rodríguez-Cabezas, M.E., and Gálvez, J. (2011)** The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 82(12): 1891–900.

**González-Mariscal, L., Tapia, R., and Chamorro, D. (2008).** Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1778(3): 729–756.

**Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., Dankof, A., Baumgart, D.C., Erckenbrecht, J., Raupach, B., Sonnenborn, U., Eckert, J., Schumann, R.R., Wiedenmann, B., Dignass, A.U., and Sturm, A. (2006).** *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways.

---

*Infection and Immunity* 74(7): 4075–82.

**Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P.** (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124 (1): 3–20.

**Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U.** (2004). Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Jurnal of Bacteriology* 186(16): 5432–41.

**Guarner, F.** (2011). Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterologia Y Hepatologia* 34(3): 147–154.

**Guignot, J., Chaplais, C., and Servin, A.L.** (2007). The secreted autotransporter toxin Sat functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cellular Microbiology* 9(1): 204–221.

**Guzman, J.R., Conlin V.S., and Jobin, C.** (2013). Diet, microbiome, and the intestinal epithelium: an essential triumvirate?. *BioMed Research International* 213: 425146-425158.

## H

---

**Hafez, M., Hayes, K., Goldrick, M., Warhurst, G., Grecis, R., and Roberts, I.S.** (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): 2995–3003.

**Hanahan, D.,** editado por G., and B, H. (1995). Techniques for transformation of *Escherichia coli*.

**Hansson, G.C., and Johansson, M.E.V.** (2010). The Inner of the Two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 1(1): 51–54.

**Haurat, M.F., Elhenawy, W., and Feldman, M.F.** (2015). Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *Biological Chemistry* 396 (2): 95–109.

**Hering, N., Richter, J.F., Fromm, A., Wieser, A., Hartmann, S., Günzel, D., Bücker, R., Fromm, M., Schulzke, J.D., and Troeger, H.** (2014). TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC $\zeta$  and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunology* 7 (2): 369–378.

---

- Herrero**, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 172(11): 6557–6567.
- Herzer**, P.J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T.S. (1990). Phylogenetic Distribution of Branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 172(11): 6175–6181.
- Higuchi**, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11(9): 1026–30.

---

## J

---

- Jacobi**, C.A., and Malfertheiner, P. (2011). *Escherichia Coli* Nissle 1917 (Mutaflor): New insights into an old probiotic bacterium. *Digestive Diseases* 29 (6): 600–607.
- Jacobs**, J.P., and Braun, J. (2014). Immune and genetic gardening of the intestinal microbiome. *FEBS Letters* 588(22): 4102–4111.
- Jain**, S., Suzuki, T., Seth, A., Samak, G., and Rao, R. (2011). Protein kinase C  $\zeta$  phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem. J.* 437: 289–99.
- Johansson**, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J.I., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The Inner of the Two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(39): 15064–15069.
- Johnson-Henry**, K.C., Donato, K.A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., and Sherman, P.M. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection and Immunity* 76(4): 1340–1348.

---

## K

---

- Kamada**, N., Inoue, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Matsuoka, K., Sato, T., Chinen, H., Hong, K.S., Yamada, T., Suzuki, Y., Suzuki, T., Watanabe, N., Tsuchimoto, K., and Hibi, T. (2005). Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 prevents murine acute and chronic colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 11(5): 455–463.
- Kesty**, N.C., and Kuehn, M.J. (2004). Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (3): 2069–2076.

- Khan, N.** and Asif, A.R. (2015). Transcriptional regulators of claudins in epithelial tight junctions. *Mediators of Inflammation* 2015: 1–6.
- Kim, Y.S.,** and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports* 12 (5): 319–330.
- Ko, J.-A.,** Murata, S., and Nishida, T. (2009). Up-regulation of the tight-junction protein ZO-1 by substance P and IGF-1 in A431 cells. *Cell Biochemistry and Function* 27(6): 388–394.
- Kruis, W.,** Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli*. *Gut* 53(11): 1617-1623.
- Kuehn, M.J,** and Kesty, N.C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes and Development* 1999: 2645–2655.
- Kulp, A.,** and Kuehn, M.J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *NIH Public Access* 64: 163–184.

---

## L

---

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–5.
- Lai, X.,** Wang, S., and Uhlin, B.E. (1999). Expression of cytotoxicity by potential pathogens in the standard *Escherichia coli* collection of reference (ECOR) strains. *Microbiology* 432: 3295–3303.
- Landy, J.,** Ronde, E., English, N., Clark, S.K., Hart, A.L., Knight, S.C., Ciclitira, P.J., and Al-Hassi, H.O. (2016). Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 22(11): 3117.
- Lasaro, M.A.,** Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M., and Zhu, J. (2009). F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1): 246–251.
- Lavelle, E.C.,** Murphy, C., O’Neill, L.A.J., and Creagh, E.M. (2010). The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunology* 3(1): 17–28.
- Le Gall, T.,** Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., and Tenaillon, O. (2007) Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in

B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology and Evolution* 24(11): 2373–2384.

**Leatham**, M.P., Banerjee, S., Autieri, S.M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., and Cohen, P.S. (2009). Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infection and Immunity* 77(7): 2876–2886.

**Lee**, J., Youn, O.K., and Song, Y.G. (2016). Proteomic profiling of gram-negative bacterial outer membrane vesicles: current perspectives. *Proteomics*: 897–909.

**Li**, C.H., and Tam, P.K.S. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters* 19(8): 771–776.

**Liu**, X., Yang, G., Geng, X.-R., Cao, Y., Li, N., Ma, L., Chen, S., Yang, P.C., and Liu, Z. (2013). Microbial products induce claudin-2 to compromise gut epithelial barrier function. *PLoS One* 8(8): e68547.

**Lu**, Z., Ding, L., Lu, Q., and Chen, Y. (2013). Distribution and functional significance in health and diseases claudins in intestines. *Tissue Barriers* 1(3): e24978.

**Luettig**, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., and Schulzke, J.D. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue barriers* 3: e977176.

**Lowry**, O.H., Rosebrough, N., Lewis, A., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193(1): 265–75.

## M

**MacDonald**, I., and Kuehn, M.J. (2012). Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Research in Microbiology* 163(2012): 607–618.

**Martínez**, C., Rodiño-J, B.K., Lobo, B., Stanifer, M.L., Klaus, B., Granzow, M., González-C, A.M., Salvo-R, E., Alonso-C, C., Pigrau, M., Roeth, R., Rappold, G., Huber, W., González-S, R., Lorenzo, J., de Torres, I., Azpiroz, F., Boulant, S., Vicario, M., Niesler, B., and Santos, J. (2017). miR-16 and miR-125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin-2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea. *Gut* gutjnl-2016-311477.

**Mashburn**, L.M., and Whiteley, M. (2005). Membrane Vesicles Traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437 (7057): 422–425.

**Masotti**, A. (2012). Interplays between gut microbiota and gene expression regulation by miRNAs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2(november): 1–4.

**Maudet**, C., Mano, M., and Eulalio, A. (2014a). MicroRNAs in the interaction between



host and bacterial pathogens. *FEBS Letters* 588(22): 4140–4147.

**Maudet, C.,** Mano, M., Sunkavalli, U., Sharan, M., Giacca, M., Förstner, K.U., and Eulalio, A. (2014b). Functional high-throughput screening identifies the miR-15 microRNA family as cellular restriction factors for Salmonella infection. *Nat. Commun.* 5: 4718.

**Mcdermott, A.J.,** and Huffnagle, G.B. (2014). The Microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* 142: 24–31.

**Morrison, T.B.,** Weis, J.J. and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24(6): 954–958.

**Mowat, A.M.,** and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14(10): 667–685.

**Muniz, L.R.,** Knosp, C., and Yeretssian, G. (2012). Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis , infection , and disease. *Frontiers in Immunology* 3(310): 1–13.

## O

**Ochman, H.,** and Selander, R.K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology* 157(2): 690–693.

**O'Hara, A.M,** and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* 7(7): 688–693.

**Olier, M.,** Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Penary, M., Gaultier, E., Nougayrède, J.P., Fioramonti, J., and Oswald, E. (2012) Genotoxicity of escherichia coli nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3(6): 501–509.

**Otte, J.,** and Podolsky, D.K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286(4): G613–G626.

## P

**Parassol, N.,** Freitas, M., Thoreux, K., Dalmasso, G., Bourdet-Sicard, R., and Rampal, P. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Research in Microbiology* 156(2): 256–262.

**Pearson, J.P.,** and Brownlee, I. (2010). The interaction of large bowel microflora with the colonic mucus barrier. *International Journal of Inflammation* 2010: 321426.



- Pelaseyed**, T., Birchenough, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., Van Der Post, S., Svensson, F., Rodríguez- Piñeiro, A.M., Nyström, E.E.L., Wising, C., Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cell and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*. 260(1): 8–20.
- Pelkmans**, L. (2005). Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746 (3): 295–304.
- Pérez-Cruz**, C., Cañas M., Giménez, R., Badia, J., Mercade, E., Baldomà L., and Aguilera, L. (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(12): e0169186.
- Peterson**, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14(3): 141–53.
- Philpott**, D.J., McKay, D.M., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (1996). Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am. J. Physiol.* 270(4 Pt 1): G634-G645.
- Plöger**, S., Stumpff, F., Penner, G.B., Schulzke, J.-D., Gäbel, G., Martens, H., Shen, Z., Günzel, D., Aschenbach, J.R. (2012). Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258(1): 52–59.

## Q

- Qin**, H., Zhang, Z., Hang, X., and Jiang, Y. (2009). *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology* 9(1): 63-72.

## R

- Rakoff-Nahoum**, S., Coyne, M.J., and Comstock, L.E. (2014). An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Current Biology* 24(1): 40–49.
- Reister**, M., Hoffmeier, K., Krezdorn, N., Rotter, B., Liang, C., Rund, S., Dandekar, T., Sonnenborn, U., and Oelschlaeger, T.A. (2014). Complete genome sequence of the gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of Biotechnology* 187: 106-107.
- Resta-Lenert**, S., and Barrett, K.E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52(7):

988–97.

**Rewatkar, P.V., Parton, R.G., Parekh, H.S., and Parat, M. (2015).** Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems?. *Advanced Drug Delivery Reviews* 91(August): 92–108.

**Robles-Alonso, V., and Guarner, F. (2013a).** Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutricion Hospitalaria* 28(3): 553–557.

**Robles Alonso, V., and Guarner, F. (2013b).** Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition* 109(S2): S21–26.

**Rodríguez-Piñeiro, A.M., Bergstrom J.H., Ermund, A., Gustafsson, J.K., Schutte, A., Johansson, M.E., and Hansson, G.C. (2013).** Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. iii. gastrointestinal Muc5ac and Muc2 Mucin O-Glycan patterns reveal a regiospecific distribution. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 30 (5): G357-G363.

**Roier, S., Zingl, F.G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T.O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R., Lass, A., Daum, G., Reidl, J., Feldman, M.F. and Schild, S. (2016).** A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in gram-negative bacteria. *Nature Communications* 25(7): 10515.

**Runtsch, M.C., Round, J.L., and O’Connell, R.M. (2014).** MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. *Frontiers in Genetics* 5(October): 1–10.

## S

**Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239(4839): 487–941.

**Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning : a laboratory manual 3rd. ed., Cold Spring Harbor (N.Y.) : Cold Spring Harbor Laboratory.

**Scaldaferri, F., Gerardi, V., Mangiola, F., Lopetuso, L.R., Pizzoferrato, M., Petito, V., Papa, A., Stojanovic, J., Poscia, A., Cammarota, G., and Gasbarrini, A. (2016).** Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update. *World Journal of Gastroenterology* 22(24): 5505–5511.

**Scheppach, W., Sommer, H., Kirchner, T., Paganelli, G.M., Bartram, P., Christl, S., Richter, F., Dusel, G., and Kasper, H. (1992).** Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103(1): 51–56.

**Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T.,**

- Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9(7): 676–82.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2007).** Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and Immunity* 75(5): 2399–2407.
- Schubert, S., Nörenberga, D., Clermontb, O., Magistroa, G., Wiesera, A., Romanna, E., Hoffmanna, C., Weinerta, K., and Denamur, E. (2010).** Prevalence and phylogenetic history of the TpcC virulence determinant in *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 300(7): 429–434.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., and Tompkins, T.A. (2005).** Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity* 73(8): 5183–5188.
- Simonovic, I., Rosenberg, J., Koutsouris, A., and Hecht, G. (2000).** Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cellular Microbiology* 2(4): 305–315.
- Sonnenburg, J.L., and Bäckhed, F. (2016).** Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535(7610): 56–64.
- Souza, É.L., Elian, S.D., Paula, L.M., Garcia, C.C., Vieira, A.T., Teixeira, M.M., Arantes, R.M., Nicoli, J.R., and Martins, F.S. (2016).** *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. *Journal of medical microbiology* 65(3): 201–10.
- Spitz, J., Yuhan, R., Koutsouris, A., Blatt, C., Alverdy, J., and Hecht, G. (1995)** Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *The American Journal of Physiology* 268(2 Pt 1): G374–G379.
- Sun, J., Gunzer, F., Westendorf, A.M., Buer, J., Scharfe, M., Jarek, M., Gößling, F., Blöcker, H., and Ping, A.Z. (2005).** Genomic Peculiarity of Coding Sequences and Metabolic Potential of Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *Journal of Biotechnology* 117(2): 147–161.
- Suzuki, T. (2013).** Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *cellular and molecular life sciences* 70(4): 631–659.

---

## T

---

- Tiihonen**, K., Ouwehand, A.C., and Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews* 9(2): 107–116.
- Tolosa**, L., Giménez, R., Fábrega, M.J., Alvarez, C.S., Aguilera, L., Cañas, M.A., Martín-Venegas, R., Badia, J., and Baldomà, L. (2015). The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *BMC Microbiology* 15(1): 250.
- Trebichavsky**, I., Splichal, I., Rada, V., and Splichalova, A. 2010. Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nutrition Reviews* 68(8): 459–464.
- Turksen**, K., and Troy, T. (2004). Barriers built on claudins. *Journal of Cell Science* 117(Pt 12): 2435–2447.

## U

---

- Ugalde-Silva**, P., Gonzalez-lugo, O., and Navarro-Garcia, F. (2016). Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion system effectors injected by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection Microbiology* 6(August): 1–12.
- Ukena**, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., and Westendorf, A.M. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE* 2(12): e1308.
- Uliczka**, F., Pisano, F., Kochut, A., Opitz, W., Herbst, K., Stolz, T., and Dersch, P. (2011). Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. *PLoS ONE* 6(6): 1–12.
- Ulluwishewa**, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., and Roy, N.C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of Nutrition* 141(5): 769–776.
- Unal**, C.M., Schaar, V., and Riesbeck, K. (2011). Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Seminars in Immunopathology* 33(5): 395–408.

## V

---

- Valenzano**, M.C., Diguilio, K., Mercado, J., Teter, M., To, J., Wertheimer, J., and Mullin,

- J.M. (2015) Remodeling of tight junctions and enhancement of barrier integrity of the CACO-2 intestinal epithelial cell layer by micronutrients. *PLoS One* 10(7): e0133926.
- Van der Flier**, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology* 71(1): 241–60.
- Van Spaendonk**, H., Ceuleers, H., Witters, L., Patteet, E., Joossens, J., Augustyns, K., Lambeir, A., Meester, I.D., G De Man, J., and Y De Winter, B. (2017). Regulation of intestinal permeability: the role of proteases. *World Journal of Gastroenterology* 23(12): 2106–2123.
- Veltman**, K., Hummel, S., Cichon, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2012). Identification of specific miRNAs targeting proteins of the apical junctional complex that simulate the probiotic effect of *E. coli* Nissle 1917 on T84 epithelial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(2): 341–349.
- Venkatraman**, A., Ramakrishna, B.S., Pulimood, A.B., Patra, S., and Murthy, S. (2000). Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand. J. Gastroenterol* 35(10): 1053–1059.
- Vercauteren**, D., Vandenbroucke, R.E., Jones, A.T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S.C., Sanders, N.N., and Braeckmans, K. (2010). The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18(3): 561–569.
- Von Bernuth**, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.-L., Chrabieh, M., Mustapha, I.B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Sirvent, N., Guedes, M., Vitor, A.B., Herrero-mata, M.J., Aróstequi, J.I., Rodrigo, C., Alsina, L., Ruiz-Ortiz, E., Juan, M., Fortuny, C., Yagüe, J., Antón, J., Pascal, M., Chang, H.M., Janniere, L., Rose, Y., Garty, B.Z. Chapel, H., Issekutz, A., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Banchereau, J., Abel, L., Li, X., Chaussabel, D., Puel, A., and Casanova, J.L. (2008). Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321(5889): 691–96.

## W

- Wang**, H., Bastian, S.E.P., Cheah, K.Y., Lawrence, A., and Howarth, G.S. (2014). *Escherichia coli* Nissle 1917-derived factors reduce cell death and late apoptosis and increase transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell damage. *Cancer Biology and Therapy* 15(5): 560–569.
- Weflen**, A., Alto, N., and Hecht, G. (2009). Tight junctions and enteropathogenic *E. coli*. *NIH Public Access* 1165: 169–174.

---

**Wells, J.M., Rossi, O., Meijerink, M., and van Baarlen, P. (2011).** Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl: 4607–4614.

## Y

---

**Yadav, M., Zhang, J., Fischer, H., Huang, W., Lutay, N., Cirl, C., Lum, J., Miethke, T., and Svanborg, C. (2010)** Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathog* 6(9): e1001120.

**Yang, R., Harada, T., Li, J., Uchiyama, T., Han, Y., Englert, J.A., and Fink, M.P. (2005).** Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism. *Intensive Care Medicine* 31(5): 709–717.

**Yu, Q., Yuan, L., Deng, J., and Yang, Q. (2015).** *Lactobacillus* protects the integrity of intestinal epithelial barrier damaged by pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5(March): 1–7.

## Z

---

**Zhang, K., Hornef, M.W., and Dupont, A. (2015).** Microreview The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cellular Microbiology* 17(11): 1561–1569.

**Zhang, Y.G., Wu, S., Xia, Y., and Sun, J. (2013).** *Salmonella* infection upregulates the leaky protein claudin-2 in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE* 8(3): 1–11.

**Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., and Doyle, R.J. (1998).** On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 163(2): 223–228.

**Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2007).** Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC  $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular Microbiology* (November): 804–816.



## 9. ANEXOS

---





## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO 1: OLIGONUCLEÓTIDOS

En los casos en los que los oligonucleótidos contenían alguna diana de restricción, estas se muestran subrayadas.

| Oligonucleótidos empleados para amplificar <i>tcpC</i> |                         |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|
| Nombre                                                 | Secuencia               |
| FW- <i>tcpC</i> :                                      | TCGCATGGAAACAGCACCT     |
| RV- <i>tcpC</i> :                                      | CTTCTCCTGTATGCTATTTCAGC |

| Oligonucleótidos empleados para la clonación de <i>tcpC</i> en PBAD-TOPO |                                     |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Nombre                                                                   | Secuencia                           |
| FW V5- <i>tcpC</i> :                                                     | GCCCATGGGTTTTGGGCAACAATATGTATAATATC |
| RV V5- <i>tcpC</i> :                                                     | TCTTCTCCTGTATGCTATTTCAGC            |

| Oligonucleótidos empleados para la clonación de <i>tcpC</i> en pGEX-3x |                                  |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Nombre                                                                 | Secuencia                        |
| FW GST- <i>tcpC</i> :                                                  | TAAGGATCCTTATGTATAATATCCTTTTCATC |
| RV GST- <i>tcpC</i> :                                                  | CTGAATTCTTATCTTCTCCTGTATGCTATTTC |

| Oligonucleótidos empleados para la clonación del promotor <i>tcpC</i> en PFU34 |                                |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Nombre                                                                         | Secuencia                      |
| FW $\phi$ ( <i>tcpC-gfpmut3.1</i> ):                                           | GGCGGATCCGAAGACCAGCAGCAAAATCT  |
| RV $\phi$ ( <i>tcpC-gfpmut3.1</i> ):                                           | CCGGTCGACATACATATTGTTGCCCAAAAC |
| RV PFU34:                                                                      | CGCATGCTTAATTTCTCCTCG          |

| Oligonucleótidos empleados para la construcción del knockout de <i>tcpC</i> |                               |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Nombre                                                                      | Secuencia                     |
| FW KO- <i>tcpC</i> :                                                        | CGCGGATCCGATGTCAGAAGCTTTACGAT |
| RV KO- <i>tcpC</i> :                                                        | CCGGAATTCCTTGCCCATGAAATAGATCT |
| FW kan:                                                                     | TCCCCGGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC  |
| RV kan:                                                                     | TCCCCGGGCATATGAATATCCTCCTTAG  |

**Oligonucleótidos empleados en los ensayos de RT-qPCR por SYBR Green.**

| Nombre              | Secuencia                                               |
|---------------------|---------------------------------------------------------|
| FW $\beta$ -Actina: | GCTCTGGCTCCTAGCACCAT                                    |
| RV $\beta$ -Actina: | GCCACCGATCCACACGAGT                                     |
| FW Claudina-1:      | GCCCCAGTGGAGGATTTACT                                    |
| RV Claudina-1:      | GTTTTGGATAGGGCCTTGGT                                    |
| FW Claudina-2:      | ACCTGCTACCGCCACTCTGT                                    |
| RV Claudina-2:      | CTCCCTGGCCTGCATTATCTC                                   |
| Mix Claudina-14:    | <i>PrimerPCR Assay CLDN14, qHsaCED0023020 (BioRad).</i> |

**9.2. ANEXO 2: SONDAS TAQMAN**
**Sondas TaqMan empleadas en los ensayos de RT-qPCR**

| Gen         | Especie | Sonda (Referencia) de Applied Biosystem |
|-------------|---------|-----------------------------------------|
| TJP1 (ZO-1) | Humano  | Hs01551861_m1                           |
| TJP2 (ZO-2) | Humano  | Hs00910543_m1                           |
| OCLN        | Humano  | Hs00170162_m1                           |

## **10. PUBLICACIONES**

---





# 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

## OPEN ACCESS

### Edited by:

M. Pilar Francino,  
FISABIO-Public Health, Spain

### Reviewed by:

Fernando Navarro-Garcia,  
Center for Research and Advanced  
Studies of the National Polytechnic  
Institute (CINVESTAV), Mexico

Dimitar Dimitrov,  
Diavita Ltd., Bulgaria

### \*Correspondence:

Laura Baldomà  
lbaldoma@ub.edu  
Rosa Giménez  
rgimenez@ub.edu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Symbioses,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 07 October 2016

**Accepted:** 25 November 2016

**Published:** 15 December 2016

### Citation:

Alvarez C-S, Badia J, Bosch M,  
Giménez R and Baldomà L (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.  
Front. Microbiol. 7:1981.  
doi: 10.3389/fmicb.2016.01981

Carina-Shianya Alvarez<sup>1,2</sup>, Josefa Badia<sup>1,2</sup>, Manel Bosch<sup>3</sup>, Rosa Giménez<sup>1,2\*</sup> and Laura Baldomà<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Institut de Recerca Sant Joan De Déu, Barcelona, Spain, <sup>3</sup> Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

The gastrointestinal epithelial layer forms a physical and biochemical barrier that maintains the segregation between host and intestinal microbiota. The integrity of this barrier is critical in maintaining homeostasis in the body and its dysfunction is linked to a variety of illnesses, especially inflammatory bowel disease. Gut microbes, and particularly probiotic bacteria, modulate the barrier integrity by reducing gut permeability and reinforcing tight junctions. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is a good colonizer of the human gut with proven therapeutic efficacy in the remission of ulcerative colitis in humans. EcN positively modulates the intestinal epithelial barrier through upregulation and redistribution of the tight junction proteins ZO-1, ZO-2 and claudin-14. Upregulation of claudin-14 has been attributed to the secreted protein TcpC. Whether regulation of ZO-1 and ZO-2 is mediated by EcN secreted factors remains unknown. The aim of this study was to explore whether outer membrane vesicles (OMVs) released by EcN strengthen the epithelial barrier. This study includes other *E. coli* strains of human intestinal origin that contain the *tcpC* gene, such as ECOR63. Cell-free supernatants collected from the wild-type strains and from the derived *tcpC* mutants were fractionated into isolated OMVs and soluble secreted factors. The impact of these extracellular fractions on the epithelial barrier was evaluated by measuring transepithelial resistance and expression of several tight junction proteins in T-84 and Caco-2 polarized monolayers. Our results show that the strengthening activity of EcN and ECOR63 does not exclusively depend on TcpC. Both OMVs and soluble factors secreted by these strains promote upregulation of ZO-1 and claudin-14, and down-regulation of claudin-2. The OMVs-mediated effects are TcpC-independent.

Soluble secreted TcpC contributes to the upregulation of ZO-1 and claudin-14, but this protein has no effect on the transcriptional regulation of claudin-2. Thus, in addition to OMVs and TcpC, other active factors released by these microbiota strains contribute to the reinforcement of the epithelial barrier.

**Keywords:** probiotics, gut microbes, *Escherichia coli*, phylogenetic group B2, membrane vesicles, tight junctions, intestinal barrier, TcpC

## INTRODUCTION

The gastrointestinal epithelial layer is the first line of defense against pathogens and the surface where the host interacts with microbiota. This specialized epithelium forms a physical and biochemical barrier that maintains the segregation between host and intestinal microbiota. Several factors contribute to the epithelial barrier function, including the production of a mucin layer that covers the epithelial surface and prevents direct contact with intestinal microbes, the secretion of antimicrobial peptides, and the establishment of TJ between intestinal epithelial cells that seal the host tissue against the luminal environment. In addition, intestinal epithelial cells play a key role in sensing and integrating microbial signals that regulate the intestinal immune cell responses (reviewed by Turner, 2009; Wells et al., 2011; Peterson and Artis, 2014).

The TJ that connect adjacent intestinal epithelial cells are composed of different types of integral membrane proteins such as occludin, several claudins, tricellulin, and junctional adhesion molecules (Turner, 2009). Organization of the TJ structure depends on peripheral membrane proteins of the ZO family, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, which bind to claudins and act as scaffolds anchoring the TJ transmembrane proteins to the actin cytoskeleton (Umeda et al., 2006; Shen et al., 2011). Claudins are a large family of TJ proteins that regulate paracellular permeability. To date, 27 claudin isoforms have been identified in humans. Some of them have a sealing function (like claudin-1), whereas others act as selective channels or pores for small charged molecules. Claudin-2, for instance, controls the movement of ions and enhances transepithelial water flux (Rosenthal et al., 2010).

The integrity of the epithelial barrier is critical in maintaining homeostasis in the body and its dysfunction is linked to inflammatory, allergic or metabolic diseases (Hering et al., 2012; Oshima and Miwa, 2016). Interaction between gut microbiota and the intestinal epithelium is crucial for the integrity of this barrier. Alterations in microbiota composition or aberrant responses to luminal bacteria or dietary components can result in increased intestinal permeability, which may lead to the development of such pathologies. In this context, many studies have been conducted to investigate the therapeutic potential of certain commensal and probiotic strains to ameliorate

inflammatory bowel diseases in clinical trials (reviewed by Chibbar and Dieleman, 2015; Wasilewski et al., 2015) or in animal models of colitis (Ewaschuk et al., 2008; Arribas et al., 2009; Shen et al., 2012; Kang et al., 2013; Martin et al., 2014; Souza et al., 2016). In mice colitis models, beneficial bacteria reduce inflammatory cytokines, normalize gut permeability, and reinforce the epithelial barrier. Some studies indicate that these effects may be mediated, at least in part, by bacterial secreted factors (Ewaschuk et al., 2008; Martín et al., 2015) or by released membrane vesicles (Shen et al., 2012; Kang et al., 2013).

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is a Gram-negative probiotic used to treat intestinal disorders, and particularly in maintaining remission of ulcerative colitis (Kruis et al., 2004; Chibbar and Dieleman, 2015). The strain, which was originally isolated from a soldier who survived a severe outbreak of diarrhea during the First World War, is a good colonizer of the human gut and positively affects gastrointestinal homeostasis and microbiota balance. It is well-known that EcN promotes anti-inflammatory modulation of the immune response (Trebichavsky et al., 2010). These effects have been mainly established from *in vitro* and *in vivo* experiments performed with live probiotic suspensions. We have recently shown that OMVs released by this probiotic can modulate the cytokine/chemokine response of gut epithelial and immune cells in *in vitro* and *ex vivo* cellular models (Fábrega et al., 2016). The probiotic EcN also positively modulates the intestinal epithelial barrier through both increased expression of secreted antimicrobial factors such as  $\beta$ -defensin-2 (Schlee et al., 2007; Fábrega et al., 2016) and upregulation and redistribution of the TJ proteins ZO-1 (Ukena et al., 2007), ZO-2 (Zyrek et al., 2007), and claudin-14 (Hering et al., 2014). Upregulation of claudin-14 in HT-29/B6 cells has been attributed to TcpC (Hering et al., 2014), an immunomodulatory protein secreted by uropathogenic *E. coli* strains that interferes with the host immune defense by inhibiting MyD88/Toll-like receptor 4 signaling cascade (Yadav et al., 2010; Snyder et al., 2013). However, the bacterial factors that regulate ZO-1 and ZO-2 expression have not been described to date.

Several facts indicate that the TJ strengthening capacity of EcN is mediated by factors released to the extracellular medium: (i) the TcpC activity on epithelial barrier function is associated with EcN culture supernatants (Hering et al., 2014), and (ii) EcN supernatants prevent barrier disruption by EPEC in polarized Caco-2 cell monolayers and confer protection against deleterious effects on paracellular permeability caused by virulence factors such as the serin protease Sat (secreted autotransporter toxin) (Tolosa et al., 2015). The aim of this study was to define whether the TJ-barrier strengthening capacity of EcN is mediated by secreted factors or by OMVs using as a model T-84 and Caco-2 polarized monolayers. We extended the analysis to other *E. coli* strains of human intestinal origin from the reference collection

**Abbreviations:** CF-SN, cell-free supernatant; COF-SN, cell-OMV-free supernatant; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EcN, *Escherichia coli* Nissle 1917; FCS, fetal calf serum; LB, Luria-Bertani broth; OMVs, outer membrane vesicles; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffer saline; RT-qPCR, quantitative reverse transcription PCR; SDS, sodium dodecyl sulfate; TER, transepithelial electrical resistance; TJ, tight junctions. ZO, zonula occludens.

(ECOR), and to the derived *tcpC* mutants. The activity of the two extracellular fractions (OMVs and soluble secreted factors) on the epithelial barrier function was evaluated by analyzing the expression and subcellular location of several TJ proteins. We show that both OMVs and soluble secreted factors from EcN and ECOR63 promote upregulation of ZO-1 and claudin-14, and down-regulation of claudin-2. The OMVs mediated effects are *TcpC*-independent.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains and Growth Conditions

The probiotic strain EcN (serotype O6:K5:H1) was provided by Ardeypharm (GmbH, Herdecke, Germany). ECOR12 and ECOR63 are commensal *E. coli* strain isolated from healthy human stool samples (Ochman and Selander, 1984). ECOR57, from the same collection, was isolated from a healthy gorilla. EcN *tcpC::kan* and ECOR63 *tcpC::kan* were constructed in this work as described below. The laboratory *E. coli* strain HB101 ( $F^-$  *mcrB mrr hsdS20* ( $r_B^-$   $m_B^-$ ) *recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1*) was from the American Type Culture Collection (ATCC 33694). The *E. coli* strains S17 ( $\lambda$ pir) (Biomedal) and EB6193 (RP4-2 *tet* Mu-1 *kan::Tn7* integrant; *leu-63::IS10 recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA*(MuI)::*pir*<sup>+</sup>*thi* Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>) (de la Riva et al., 2008) were used for cloning and propagation of the suicide plasmid pUT-miniTn5 Tc and derived recombinant constructs. Bacterial cells were grown at 37°C in Luria-Bertani broth (LB) or in DMEM (GIBCO) supplemented with 1% non-essential amino acids and 25 mM HEPES, with constant rotation (150 rpm). When required the following antibiotics were used at the indicated concentrations: ampicillin (Ap), 100 µg/ml; kanamycin (Km), 50 µg/ml; rifampicin (Rf), 50 µg/ml; and tetracycline (Tc), 30 µg/ml. Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>).

### Site Directed Mutagenesis of *tcpC* Gene

To construct *tcpC* knockout mutants, a 2059 pb-fragment encompassing the *tcpC* gene was amplified by PCR from EcN genomic DNA using oligonucleotides FWKO-*tcpC* CGC GGATCCGATGTCAGAAAGCTTTACGAT and RVKO-*tcpC* CCGGAATTCTTGTCCCATGAAATAGATCT. Restriction sites for BamHI and EcoRI were incorporated at the 5'-ends of the primers (underlined) to facilitate directed cloning of the amplified fragment into plasmid pUC18Not (Biomedal). Disruption of the cloned *tcpC* gene was performed by insertion of the *kan* gene into the StuI site located 596 bp downstream of the ATG codon. The *kan* cassette was obtained by PCR amplification from plasmid pKD4 using primer Kn1 TCCCCCGGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC and Kn2 TCCCCCGGGCATATGAATATCCTCCTTAG (Datsenko and Wanner, 2000), with the SmaI restriction site incorporated at their 5'-end (underlined). This process resulted in the recombinant plasmid pUC18NotI-*tcpC::kan*.

The *tcpC* knockout mutant derived from EcN was generated by antibiotic marker exchange using the suicide plasmid pUT-miniTn5 Tc (Biomedal) as described previously (Toloz et al.,

2015). This vector contains the R6K origin of replication, which functions only in bacteria that contain the gene *pir*. The disrupted *tcpC::kan* gene was obtained by digestion of the recombinant pUC18NotI-*tcpC::kan* plasmid with NotI and further subcloned into the NotI restriction site of the suicide plasmid pUT-miniTn5 Tc. The resulting recombinant plasmid was propagated into strain EB6193 and introduced into *E. coli* S17 ( $\lambda$ pir) by electroporation, to be used as a donor strain in mating experiments aimed at introducing the *tcpC* mutation into the EcN chromosome. A Rf-resistant derivative of EcN (Toloz et al., 2015) was used as the recipient. Transconjugants were selected for their resistance to Km and Rf on LB plates and further purified in this medium. After several rounds of growth at 30°C in this medium, colonies were screened for sensitivity to Ap and Tc in order to identify which transconjugants had undergone allelic exchange. Gene disruption of the target gene was verified by PCR (Supplementary Figure S1).

Since homologous recombination had not been successful with ECOR63, the *tcpC* mutant derived from this strain was constructed by the one-step inactivation method described elsewhere (Datsenko and Wanner, 2000). In this case, recombination requires the phage lambda Red recombinase, which is synthesized under the control of an inducible promoter on easily curable plasmid. We transformed ECOR63 with pKD46 harboring a heat-labile origin and the gene encoding the  $\lambda$ Red recombinase under an arabinose-inducible promoter. To construct the ECOR63 *tcpC::kan* mutant, wild-type strain ECOR63 containing plasmid pKD46 was transformed with the *tcpC::kan* fragment obtained by PCR from the recombinant pUC18NotI-*tcpC::kan*, and grown in the presence of 100 mM arabinose at 30°C. Transformants were further grown at 37°C to loss the plasmid. The ECOR63 *tcpC::kan* mutant was selected by screening for Km resistance and Ap sensitivity. The correct insertion of the mutation in the selected strain was confirmed by PCR (Supplementary Figure S1).

### Preparation of OMVs and Cell-Free Supernatant Fractions

Cell free supernatants (CF-SN) were obtained from bacterial cultures in LB medium or DMEM supplemented with 1% non-essential amino acids and 25 mM HEPES as described previously (Toloz et al., 2015). Briefly, bacterial cells were pelleted by centrifugation at 10,000 × *g* for 20 min at 4°C; the supernatants were filtered through a 0.22 µm-pore-size filter (Merck Millipore) to remove residual bacteria and concentrated using a Centricon® Plus-70 filter device with a molecular weight cutoff of 10 KDa (Merck Millipore). OMVs were isolated from this CF-SN fraction by ultracentrifugation at 150,000 × *g* for 1 h at 4°C in an Optima™ L-90K ultracentrifuge (Beckman Coulter) as described before (Aguilera et al., 2014). The supernatant obtained in this step was concentrated twice and used as COF-SN fraction. Pelleted OMVs were washed twice, resuspended in an adequate volume of phosphate buffered saline (PBS) and stored at −20°C. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951).



## Cell Culture and Growth Conditions

The human colonic cells lines Caco-2 (ATCC HTB37) and T-84 (CCL-248) were obtained from the American Type Culture Collection. The culture medium for Caco-2 cells was DMEM High Glucose supplemented with 10% (v/v) FCS, whereas for T-84 cells the medium was DMEM/F12 Glutamax medium (Gibco-BRL) with 5% (v/v) FCS. In both cases, media contained 25 mM HEPES, 1% non-essential amino acids, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco-BRL). Cultures were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were routinely subcultured once a week with trypsin-EDTA (Gibco-BRL) and seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells in 55 cm<sup>2</sup> dishes (Caco-2) or in 75 cm<sup>2</sup> flasks (T-84) for propagation.

## Transepithelial Resistance Measurement

T-84 cells ( $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were seeded on the apical compartment of 12 mm polycarbonate Transwell cell culture inserts (0.4 µm, Transwell Millipore). The basolateral compartment contained 1.5 ml of the culture medium supplemented with 10% (v/v) FCS, penicillin and streptomycin. Cells were grown during 9 days. During growth and differentiation the medium was changed every 2 days in both compartments. Monolayer integrity was controlled by measurement of the transepithelial electrical resistance (TER) and by visual assessment of cell layer integrity under the microscope. Prior to apical stimulation with OMVs or culture supernatants (CF-SN or COF-SN), the medium was changed to DMEM/F12 Glutamax containing 25 mM HEPES, 1% non-essential amino acids, and gentamicin (100 µg/ml).

TER was measured with a Millicel-ERS-2 volt-ohmmeter (Millipore). Before measurement, electrodes were equilibrated and sterilized according to the manufacturer's recommendations. The ohmic resistance of a blank (culture insert without cells) was measured in parallel. To obtain the sample resistance, the blank value was subtracted from the total resistance of the sample. The final unit area resistance ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) was calculated by multiplying the sample resistance ( $\Omega$ ) by the effective area of the membrane (1.12 cm<sup>2</sup>).

Stimulations were performed at initial TER values greater than 1000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . CF-SN (2 mg/ml), COF-SN (0.5 mg/ml), or OMVs (0.1 mg/ml) were added to the apical compartment. After incubation for 24 h at 37°C, T-84 monolayers cells were washed with PBS. TER was measured after 1 h stabilization in the presence of fresh medium without FCS and antibiotics.

## RNA Isolation and Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

T-84 ( $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) and Caco-2 ( $0.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were seeded on 12-well plates and cultured for 9 days. After 4 h stimulation with COF-SN (0.5 mg/ml) or OMVs (0.1 mg/ml), total RNA was extracted from epithelial cells by using the Illustra RNAspin Mini kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA samples were assessed by the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm in a NanoDrop® spectrophotometer. RNA integrity

was verified by visualization of 28S and 18S rRNAs after 1% agarose/formaldehyde gel electrophoresis.

RNA (1 µg) was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) in a final volume of 20 µl following manufacturer's recommendations. RT-qPCR reactions were performed in a StepOne Plus PCR cycler (Applied Biosystems) by using the Taqman Gene Expression Master Mix, and the Taqman probes and primers for human ZO-1, ZO-2, and occludin (Applied Biosystems), or SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems) and specific oligonucleotides for claudin-1 (Satake et al., 2008), claudin-2 (Zhang et al., 2013), and claudin-14 (BIORAD).

The standard PCR program used was: one denaturation cycle for 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. A control reaction was performed in the absence of RNA. The housekeeping gene  $\beta$ -actin was used as a normalizing gene. Relative gene expression was calculated as fold-change compared with control and calculated by means of  $\Delta\Delta\text{Ct}$  formula.

## Immunoblotting of TJ Proteins

T-84 cells were grown for 9 days as indicated above for RNA isolation. After 24 h stimulation with COF-SN or OMVs, cells were rinsed in PBS and incubated with lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.2% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, containing 20 µg/ml protease inhibitor cocktail) at 4°C for 1 h. Then, cells were scraped off with a rubber policeman, transferred to a chilled Eppendorf tube and homogenized for 40 s whilst on ice using an electrical homogenizer. Samples were then centrifuged at  $20,800 \times g$  for 15 min at 4°C, and the supernatant was collected and kept at -80°C until use.

Proteins were separated on 10% SDS-PAGE, and transferred to a Hybond-P polyvinylidene difluoride membrane by using a Bio-Rad MiniTransblot apparatus. For ZO-1 analysis 7% SDS-PAGE gels were used. The membrane was blocked in PBS-0.05% Tween-20 and 5% skimmed milk (blocking solution) for 1 h at room temperature, and then incubated with specific antibodies against ZO-1 (1:100 dilution), claudin-2 (1:1,000 dilution), occludin (1:1000 dilution) or  $\beta$ -actin (Sigma 1:10,000 dilution) for 16 h at 4°C. The secondary antibody was donkey anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase, diluted 1:10,000 in blocking solution.  $\beta$ -Actin served as a loading control to normalize protein expression levels. The protein-antibody complex was visualized by using the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech). For protein quantification, densitometry analysis was done with the software package Image Studio™ Lite from LI-COR Biosciences.

## Immunofluorescence Labeling

Caco-2 cells were grown for 5–7 days in an 8-well chamber slide ( $\mu$ -Slide 8 well Glass bottom, Ibidi). Then, cells were stimulated with COF-SN (0.5 mg/ml) or OMVs (0.1 mg/ml) for 24 h at 37°C. After washing with PBS cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.05% saponin (Sigma-Aldrich) and blocked using PBS containing 1% bovine serum albumin. The TJ proteins ZO-1, claudin-2 and occludin were stained using, respectively, anti-ZO-1 (5 µg/ml, Invitrogen),

anti-claudin-2 (5 µg/ml, Abcam) rabbit IgG antibodies, and anti-occludin mouse IgG antibody (0.5 µg/ml, Invitrogen) for 16 h at 4°C, followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rabbit IgG (H+L) (5 µg/ml, Invitrogen) or Alexa Fluor 488 - conjugated F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (H+L) (5 µg/ml, Invitrogen) for 2 h at 37°C. Nuclei were labeled with DAPI (0,125 µg/ml, Sigma–Aldrich) for 20 min at room temperature.

## Confocal Microscopy and Image Analysis

Confocal microscopy was carried out using a Leica TCS SP2 confocal microscope equipped with an Ar, an Ar-UV and a HeNe lasers. 12-bit images were obtained using a 63× 1.32NA oil immersion objective and an image resolution of 0.232 × 0.232 × 0.488 µm/voxel (x, y, z, respectively). Images were analyzed using Fiji (Schindelin et al., 2012). For quantitative analysis of ZO-1 and occludin, TJ were traced using the Tubeness plugin and projected by maximum intensity projection. The projected image was segmented using Li's Minimum Cross Entropy thresholding method (Li and Tam, 1998) and the resulting segmented region of interest was used to measure mean intensity in the maximum intensity projected original image (Supplementary Figure S2).

## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (version 20.0, Chicago, IL, USA) software package with pooled data from at least three independent biological replicates. The values for all measurements are presented as the mean ± standard error. Differences between more than two groups were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significance was established when  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### ECOR Strains That Contain the *tcpC* Gene Increase TER in T-84 Monolayers

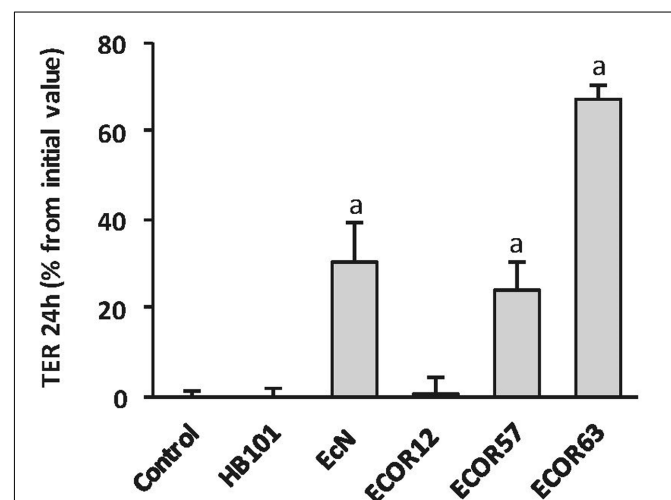
The positive effects of the probiotic EcN on intestinal barrier function have been attributed to TcpC, a protein that mediates upregulation of the TJ protein claudin-14 (Hering et al., 2014). To search for other intestinal *E. coli* strains with TJ-barrier-strengthening ability, we screened the ECOR collection (Ochman and Selander, 1984) for the presence of *tcpC* sequences. Using the information available at NCBI<sup>1</sup> we identified five *tcpC*-positive ECOR strains, namely ECOR53, 56, 57, 60, and 63 (Schubert et al., 2010). Like EcN, all of the strains belong to the phylogenetic group B2, associated with virulent strains that cause extra-intestinal infections. ECOR53 and ECOR63 were isolated from healthy human stools, whereas ECOR56 and ECOR60 were isolated from patients with urinary tract infection. ECOR57 was from a healthy gorilla (STEC Center)<sup>2</sup>. Studies to identify

potential virulence markers among the ECOR strains showed that all of these strains, except ECOR57 and ECOR63, expressed functional haemolysin and caused strong cytotoxicity in the murine macrophage cell line J774 (Lai et al., 1999). With this information, we excluded the cytotoxic strains from this study.

We previously showed that EcN CF-SN have a positive impact on the TER of epithelial cell monolayers and prevent barrier disruption caused by pathogens (Tolosa et al., 2015). To test the ability of *tcpC*-positive strains ECOR63 and ECOR57 to strengthen the epithelial barrier, T-84 monolayers were incubated for 24 h with CF-SN (2 mg/ml) collected from LB cultures, and TER was measured before and after the treatment period. CF-SN obtained from EcN cultures (positive control) or from HB101 (negative control) were processed in parallel. We also included the intestinal isolate ECOR12 (*tcpC*-negative) for comparison. Only the *tcpC*-positive strains increased TER, whereas the laboratory strain HB101 or the commensal ECOR12 had no effect on this parameter (Figure 1). These results are in accordance with those reported by Hering et al. (2014). As ECOR57 is not of human origin we selected ECOR63 for further studies.

### The Positive Effects of EcN and ECOR63 on TER Are Mediated by Soluble and Vesicle-Associated Factors

Since no information was available on the mechanism of TcpC secretion, we sought to analyze whether the TcpC effect was associated with OMVs. For this approach, we constructed *tcpC* mutants derived from both EcN and ECOR63 strains. These mutants, as well as the parental wild-type strains, were grown



**FIGURE 1 | *Escherichia coli* reference collection (ECOR) strains bearing *tcpC* gene increase TER in T-84 cell monolayers.** The effect on TER of the indicated *Escherichia coli* strains from the ECOR collection was analyzed in T-84 monolayers in comparison with the probiotic EcN and the laboratory strain HB101. TER values were measured before and after 24 h incubation with cell-free supernatants (CF-SN) (2 mg protein/ml) collected from LB cultures ( $n = 3$  independent biological replicates). Data are presented as percentage of increase in TER from the initial value. <sup>a</sup>significance against untreated control cells ( $p \leq 0.001$ ).

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

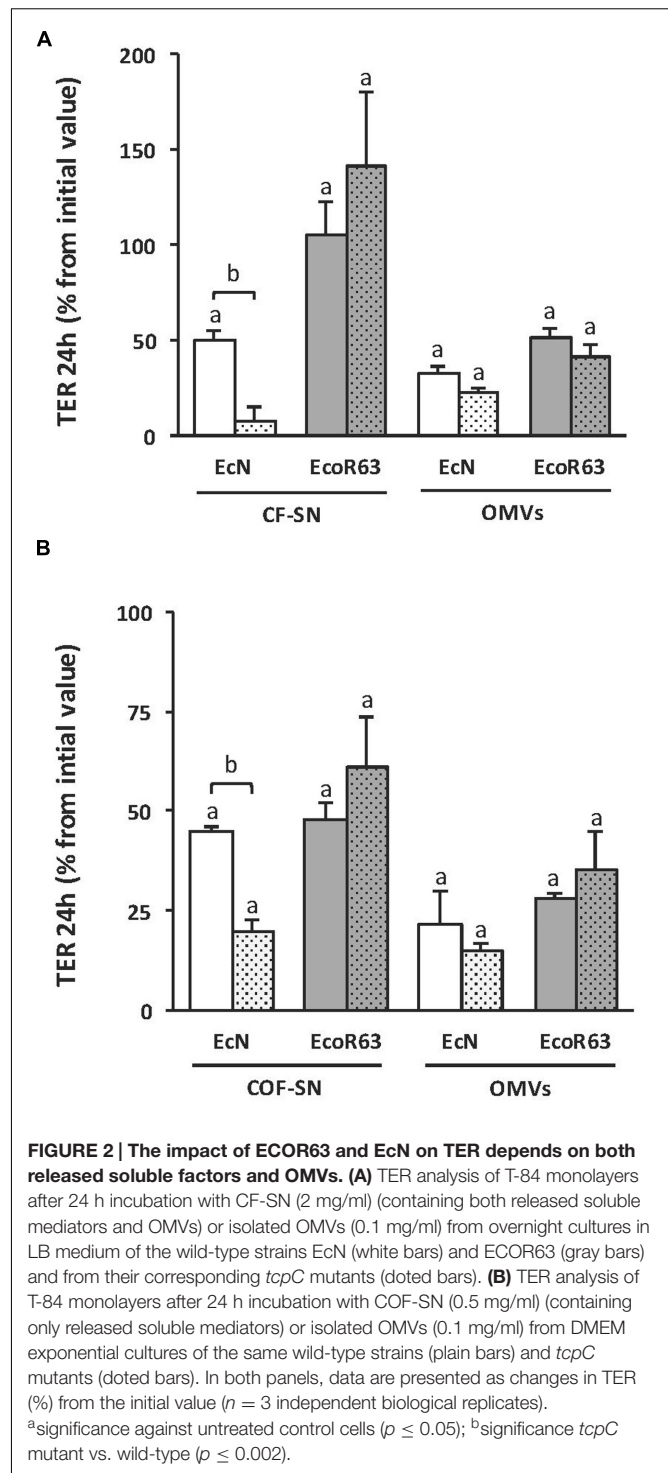
<sup>2</sup><http://www.shigatox.net/new/reference-strains/ecor.html>

overnight in LB. Cultures were centrifuged and the supernatant was filtered to eliminate bacteria and obtain the corresponding CF-SN samples. An aliquot of each CF-SN was centrifuged at  $150,000 \times g$  for 1 h to isolate OMVs. The potential of these fractions to stimulate TER was analyzed on T-84 cell monolayers after 24 h incubation (**Figure 2A**). Regarding the probiotic EcN, the *tcpC* mutation significantly diminished the capacity of CF-SN to increase TER values. In contrast, CF-SN collected from the ECOR63 *tcpC* mutant increased TER to levels comparable to the wild-type strain. Analysis of TER in monolayers challenged with bacterial OMVs (0.1 mg/ml) revealed the potential of EcN and ECOR63 vesicles to increase TER. For both strains, this effect was TcpC- independent.

Protein components of the rich LB medium interfere with the protein quantification of CF-SN samples. Therefore, to better analyze the effect of released soluble mediators on TER, wild-type EcN and ECOR63, and the derived *tcpC* mutants were grown in DMEM. After 8 h growth (exponential phase), cells were removed by centrifugation and the CF-SN were processed to isolate OMVs from the secreted soluble fraction (COF-SN). The potential of these fractions to stimulate TER was analyzed on T-84 cell monolayers after 24 h incubation (**Figure 2B**). The results obtained after stimulation with OMVs (0.1 mg/ml) or COF-SN (0.5 mg/ml) collected from DMEM cultures were comparable to those achieved with samples isolated from LB cultures. Introduction of the *tcpC* mutation only significantly diminished the barrier strengthening capacity of COF-SN from EcN. Overall, these results indicate that both soluble and vesicle-associated factors mediate the positive effects of EcN and ECOR63 on TER. Moreover, they suggest that TcpC secretion is not associated with OMVs, and that, in addition to TcpC, commensal ECOR63 releases other factors that can modulate the strength of the epithelial barrier.

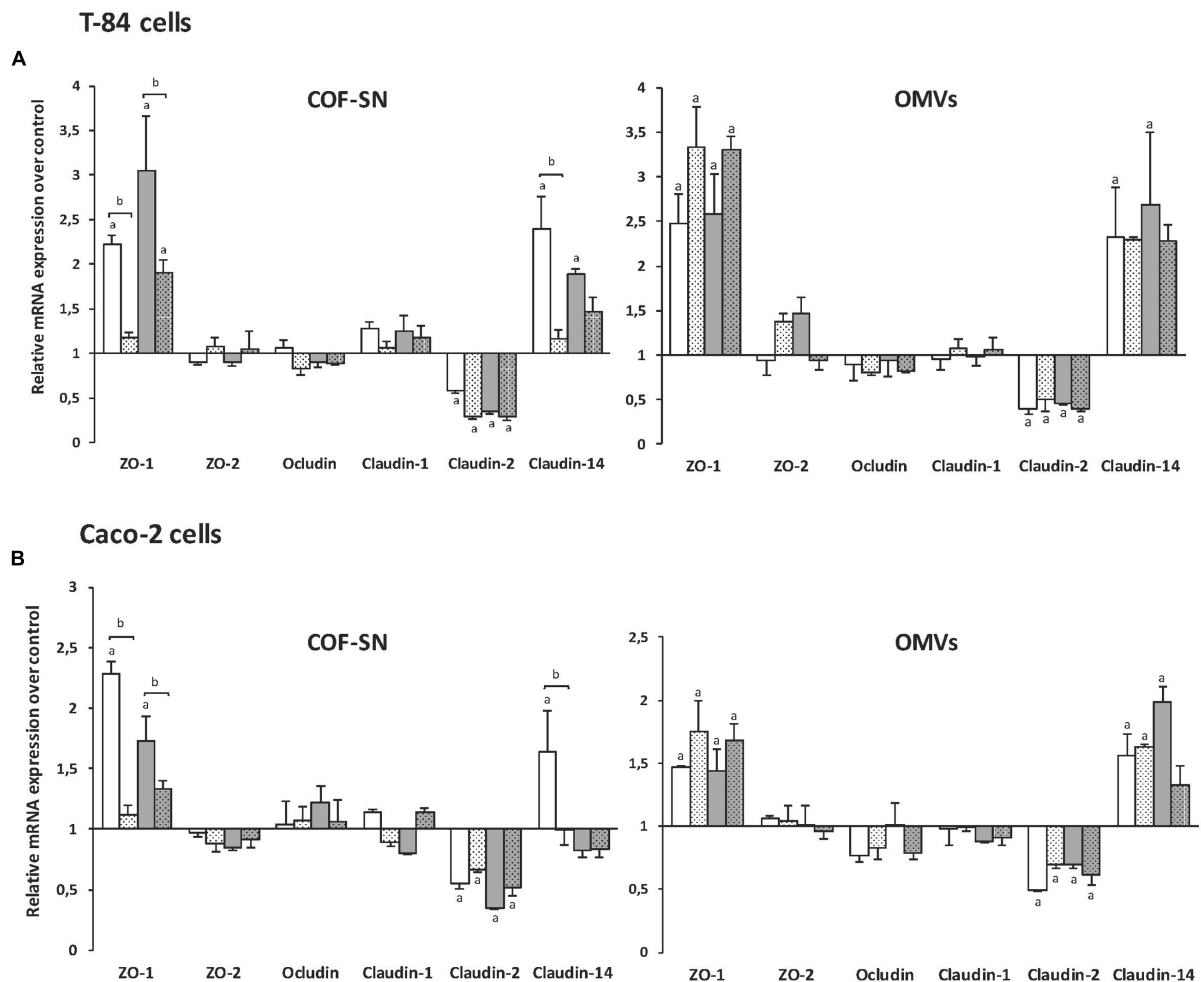
## Expression Analysis of TJ Proteins in Intestinal Epithelial Cells Challenged with OMVs or Soluble Factors Released by EcN and ECOR63

As the observed effects on TER pointed to changes in TJ proteins, expression of genes encoding several barrier-relevant TJ proteins was analyzed in T-84 cells. In this study, we included proteins known to be regulated by the probiotic EcN, such as ZO-1, ZO-2, and claudin-14 (Ukena et al., 2007; Zyrek et al., 2007; Hering et al., 2014), and others like occludin, claudin-1 and claudin-2. T-84 monolayers (9 days post-confluence) were apically stimulated for 4 h with OMVs (0.1 mg/ml) or COF-SN (0.5 mg/ml) collected from exponential DMEM cultures of the two wild-type strains EcN and ECOR63, and from the *tcpC* mutants. Untreated monolayers served as a control. The mRNA levels of the indicated TJ proteins were measured by RT-qPCR (**Figure 3A**). The results show transcriptional regulation of ZO-1, claudin-2, and claudin-14 by the two types of bacterial samples (OMVs and COF-SN) from either EcN or ECOR63. Specifically they promoted upregulation of ZO-1 and claudin-14, and downregulation of claudin-2 (**Figure 3A**, plain bars). In contrast, mRNA levels of ZO-2, occludin and claudin-1



were not significantly altered under any incubation condition, as their mRNA levels remained similar to those of control monolayers.

Regarding the effect of COF-SN, upregulation of ZO-1 and claudin-14 was almost abolished by TcpC deficiency in EcN, and significantly weakened in the case of ECOR63 *tcpC* (**Figure 3A**, dotted bars). These results show that TcpC contributes to the



**FIGURE 3 | Gene expression levels of tight junction proteins in the intestinal epithelial cell lines T-84 (A) or Caco-2 (B).** Cell monolayers were challenged for 4 h with COF-SN (0.5 mg/ml) or OMVs (0.1 mg/ml) from EcN (white bars), EcN *tcpC::kan* (dotted white bars), ECOR63 (gray bars) or ECOR63 *tcpC::kan* (dotted gray bars). Relative mRNA levels of the indicated proteins were measured by RT-qPCR, using  $\beta$ -actin as the reference gene. Data are presented as fold-change compared to untreated control cells ( $n = 3$  independent biological replicates). <sup>a</sup>Significance against untreated control cells ( $p \leq 0.04$ ); <sup>b</sup>significance *tcpC* mutant vs. wild-type ( $p \leq 0.02$ ).

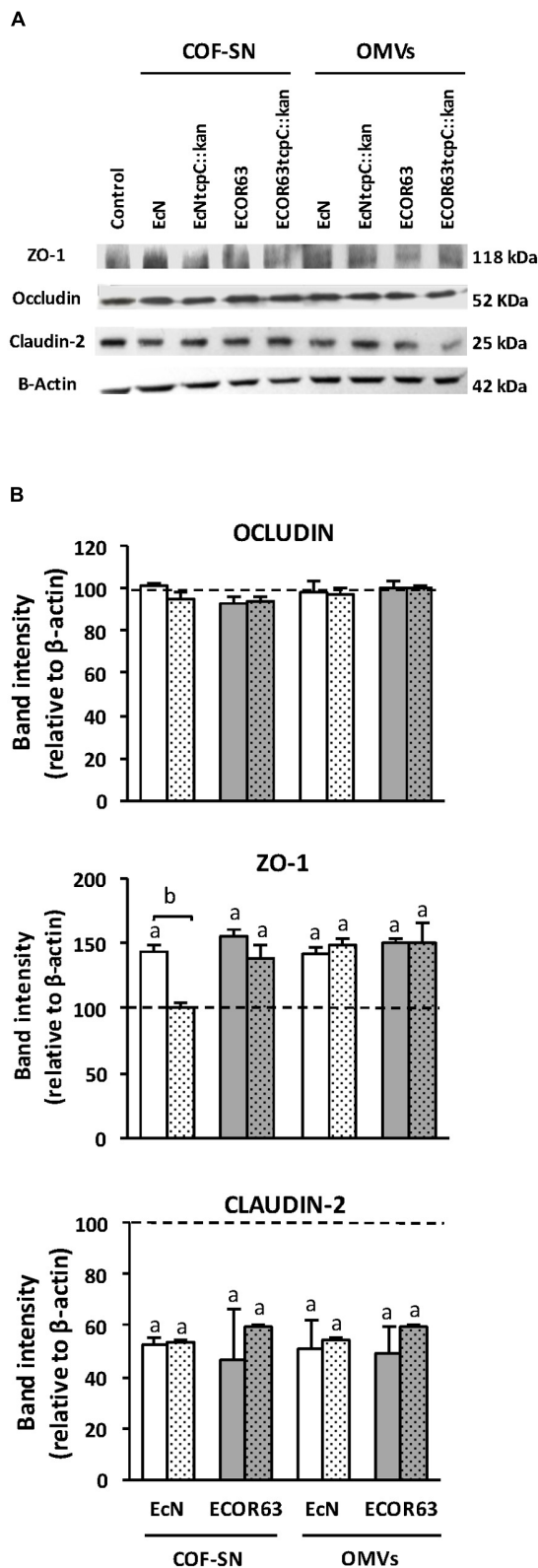
transcriptional regulation of ZO-1 and claudin-14, and suggest that other released factors may contribute to this regulation in ECOR63. In contrast, *TcpC* deficiency did not result in noticeable changes in claudin-2 mRNA levels compared to COF-SN collected from wild-type EcN and ECOR63, thus ruling out the contribution of *TcpC* to the transcriptional control of claudin-2. Considering the effect of OMVs, no significant differences in the mRNA levels of ZO-1, claudin-2 or claudin-14 were observed between cells stimulated with OMV samples isolated either from the wild-type or the *tcpC* mutants (Figure 3A).

The expression of TJ proteins was also analyzed in Caco-2 monolayers. In general, the results show a similar transcriptional pattern, that is, upregulation of ZO-1 and claudin-14, and down-regulation of claudin-2 (Figure 3B). As in T-84 cells, transcriptional regulation of these proteins by OMVs was not affected by the *tcpC* mutation, but the relative mRNA levels

of ZO-1 and claudin-14 were lower in Caco-2 cells (below 2-fold). Regarding stimulations with COF-SN, expression of ZO-1 and claudin-2 followed the same pattern as in T-84 cells. It was noticeable that the effect of COF-SN from ECOR63 and ECOR63 *tcpC* on ZO-1 expression was clearly lower than in the T-84 cell line, with relative mRNA levels that were around 50% of those achieved in T-84 monolayers (Figure 3). The lower response of Caco-2 cells to ECOR63 COF-SN could explain the lack of claudin-14 induction in this cell line. A 50% reduction in the relative claudin-14 mRNA levels observed in T-84 cells challenged with ECOR63 COF-SN (Figure 3A) may correlate in Caco-2 cells with mRNA levels close to those of untreated cells (Figure 3B).

We next undertook Western blot experiments to assess the regulation of ZO-1 and claudin-2 expression by soluble and vesicle-associated factors secreted by EcN and ECOR63. Occludin expression was analyzed as a control of a non-regulated





**FIGURE 4 |** Western blot analysis of TJ proteins in T-84 cell monolayers treated with COF-SN or OMVs from the indicated bacterial strains.

(Continued)

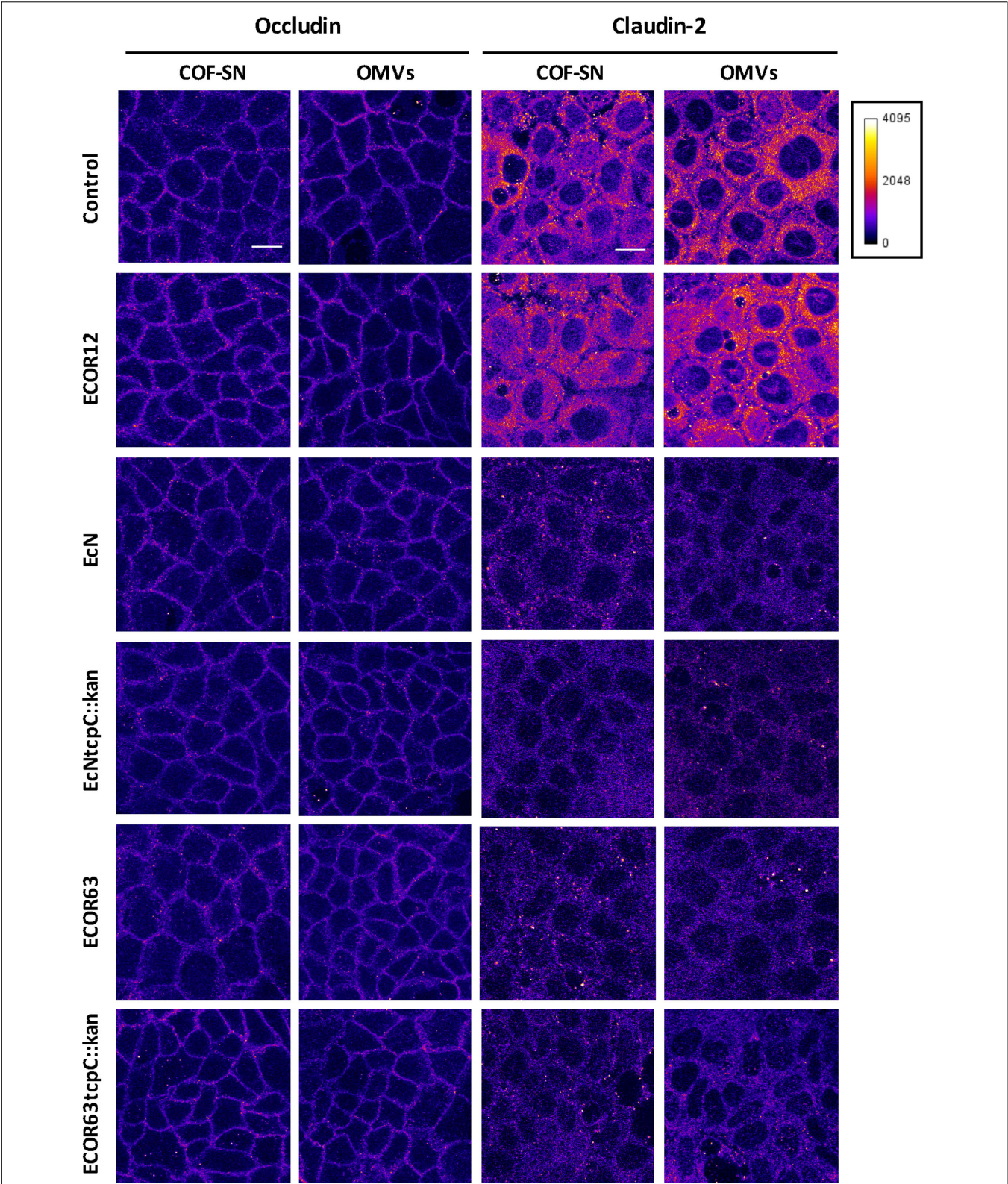
#### FIGURE 4 | Continued

Cell monolayers were challenged for 24 h with COF-SN (0.5 mg/ml) or OMVs (0.1 mg/ml) from EcN (white bars), EcN *tcpC::kan* (dotted white bars), ECOL63 (gray bars) or ECOL63 *tcpC::kan* (dotted gray bars). Occludin, ZO-1 and claudin-2 were immunodetected with specific antibodies. (A) Representative Western blots of three independent experiments are shown. (B) Densitometric quantification of the TJ proteins ( $n = 3$  independent biological replicates). Values were normalized to  $\beta$ -actin. Normalized values from untreated control cells were set as 100% and indicated by a dashed line. <sup>a</sup>Significance against untreated control cells ( $p \leq 0.04$ ); <sup>b</sup>significance *tcpC* mutant vs. wild-type ( $p = 0.001$ ).

protein. Immunoblotting analysis was performed in T-84 cell monolayers after 24 h incubation with extracellular samples from both wild-type and *tcpC* mutant strains (Figure 4). Densitometry quantification and normalization to  $\beta$ -actin confirmed downregulation of claudin-2 by all samples, with a 30–40% reduction in claudin-2 levels compared to the untreated control (Figure 4B). Regarding ZO-1, the results depend on whether T-84 cells were incubated with COF-SN or OMVs. Significant increases in ZO-1 were observed in cells treated with either wild-type EcN or ECOL63 COF-SNs. As expected, in cells incubated with COF-SN from the EcN *tcpC* mutant, ZO-1 protein levels did not significantly differ from those of untreated control cells. However, although ZO-1 levels achieved upon stimulation with supernatants from the ECOL63 *tcpC* mutant were slightly lower, they did not significantly differ from those of cells incubated with supernatants from the wild-type strain. Consistent with RT-qPCR data, OMVs triggered a significant increase in ZO-1 protein levels independently of the producer strain (Figure 4B). Quantification of occludin levels also confirmed that expression of this protein remained similar to those of untreated monolayers.

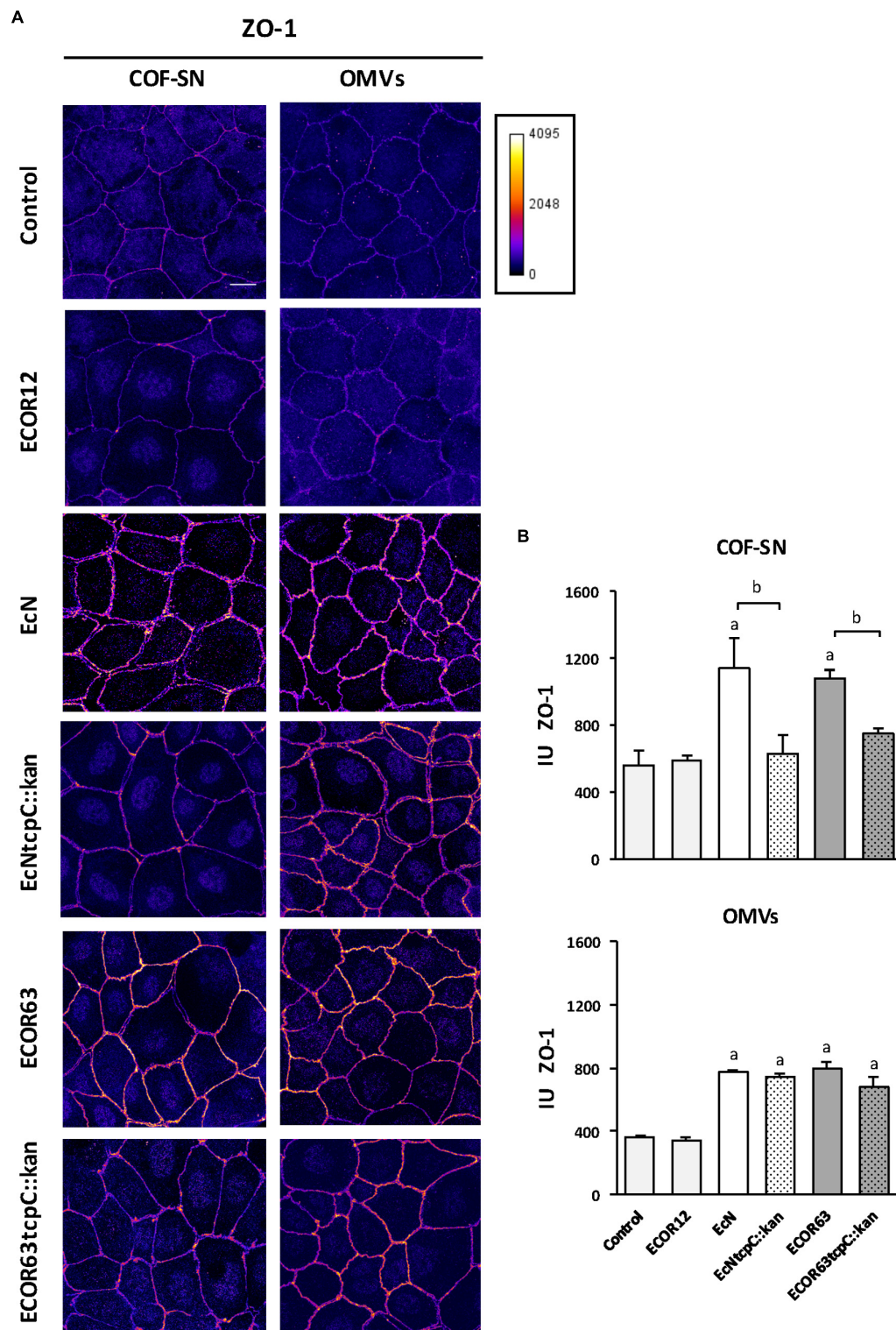
### Immunofluorescence Microscopy Analysis of TJ Confirm Regulation of ZO-1 and Claudin-2 by Factors Secreted by EcN and ECOL63

To confirm the impact of *TcpC* and other soluble and vesicle-secreted factors on TJ, we carried out immunofluorescence staining, followed by confocal laser scanning microscopy of ZO-1 and claudin-2. Occludin was analyzed in parallel as a control of a non-regulated protein. This analysis was performed in Caco-2 monolayers challenged for 24 h with COF-SN or OMVs isolated from wild-type EcN and ECOL63 and the derived *tcpC* mutants. Untreated Caco-2 cells and Caco-2 cells incubated with samples collected from ECOL12, which did not exhibit the ability to strengthen the epithelial barrier, were processed in parallel as a control. After 24 h incubation, cells were fixed and stained for the indicated proteins. Representative images are presented in Figure 5 (for occludin and claudin-2) and Figure 6 (for ZO-1). As expected, no differences in the fluorescence signal of any of the three proteins were observed in cells treated with ECOL12 samples with respect to the untreated control cells. The results for cells incubated with EcN and ECOL63 samples correlated with mRNA and protein expression



**FIGURE 5 | Immunofluorescence staining for occludin and claudin-2 in Caco-2 cells treated for 24 h with COF-SN or OMVs from the indicated bacterial strains.** Immunostaining of occludin (left) and claudin-2 (right) was carried out in Caco-2 cells at 5 days after seeding ( $n = 3$  independent biological replicates). Images are color coded with Fire look-up table and its calibration bar is shown on the right. Scale bar, 20  $\mu$ m.





**FIGURE 6 | Immunofluorescence staining for ZO-1 in Caco-2 cells treated for 24 h with COF-SN or OMVs from the indicated bacterial strains.**

**(A)** Immunostaining of ZO-1 was carried out in Caco-2 cells at 5 days after seeding. Images are color coded with Fire look-up table and its calibration bar is shown on the right. Scale bar, 20  $\mu$ m. **(B)** Quantification of the mean fluorescence intensity of ZO-1 labeling in tight junctions. See **Supplementary Figure S2** for details in the tracing and processing of the images. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of relative intensity units (IU) ( $n = 5$  independent biological replicates for COF-SN treated cells and  $n = 3$  independent biological replicates for OMVs treated cells). Statistical differences were assessed by the  $t$ -test. <sup>a</sup>Significance against untreated control cells ( $p < 0.015$ ); <sup>b</sup>significance *tcpC* mutant vs. wild-type ( $p \leq 0.05$ ).

data. Consistently, no significant treatment-associated changes were observed for occludin, whereas the claudin-2 signal was diminished in cells treated with either COF-SN or OMVs isolated from EcN and ECOR63, independently of whether they were positive or negative for *TcpC* (Figure 5). Notice that the claudin-2 signal was mainly localized in the cytoplasm. Since our analysis was performed in cells grown for 7 days, this observation is consistent with results from a time course analysis of claudin-2 immunofluorescence staining in Caco-2 cells, reported elsewhere (Fisher et al., 2014). After 3 days of cell seeding, the claudin-2 signal appeared to be diffusely distributed in the cytoplasm, whereas the progressive location of claudin-2 along TJ could be observed later during cell differentiation, such as at 21 days (Fisher et al., 2014). Concerning the upregulated ZO-1 protein, microscopy images showed an increased signal in the cell boundaries of Caco-2 monolayers treated with wild-type EcN or ECOR63 COF-SN, whereas this increase was not apparent in cells incubated with COF-SN collected from cultures of the *tcpC* mutants. In this case, ZO-1 signals were similar to those of control cells (Figure 6A). OMVs isolated from EcN and ECOR63 also promoted an increase in the peripheral ZO-1 signal, and this effect was not abolished by the *tcpC* mutation (Figure 6A).

The ZO-1 signal was quantified in TJ, as described in the section “Materials and Methods” and illustrated in Supplementary Figure S2. The results presented in Figure 6B reveal a statistically significant increase in TJ ZO-1 after treatment with COF-SN from EcN and ECOR63, but not after incubation with supernatants from the derived *tcpC* mutants (data collected from five independent biological experiments, mean of total cells analyzed for each experiment =  $94 \pm 6.16$ ). Quantification analysis also confirmed that the ZO-1 increase triggered by EcN or ECOR63 OMVs was *TcpC*-independent (data collected from three independent biological experiments, mean of total cells analyzed in each experiment =  $104 \pm 15.30$ ). Quantification of the occludin signal using the same software ruled out significant changes in the junctional localization of this protein between treated and untreated cells. The analysis of three independent replicates with a mean of  $127.26 \pm 28.43$  cells per experiment yielded arbitrary intensity units around 500–600 for all conditions (not shown).

## DISCUSSION

It is now well-known that gut microbiota is a source of regulatory signals that influence the maturation and function of the digestive and immune systems. In this context, the intestinal tract requires barrier and regulatory mechanisms to control reciprocal interactions between commensal bacteria, the epithelium and the mucosal immune system that prevent aberrant responses and preserve homeostasis. Conditions that compromise the integrity of the epithelial barrier are the basis of a wide range of illnesses, with special impact on inflammatory bowel diseases. As certain commensal bacteria modulate the integrity of the epithelial barrier, potential clinical applications of gut microbes are being explored to reduce increased intestinal permeability and improve the clinical status of such gastrointestinal diseases. Besides

anti-inflammatory effects, upregulation and redistribution of TJ proteins are among the multiple mechanisms used by these microbes to improve the epithelial barrier function. The probiotic EcN is a good intestinal colonizer that has been licensed for use in human medicine to treat several disorders of the gastrointestinal tract. Its therapeutic efficacy in the remission of ulcerative colitis has been proved through clinical trials (Kruis et al., 2004; reviewed by Scaldaferri et al., 2016). In addition, the effectiveness of this probiotic in the amelioration of induced experimental colitis in mice is well-documented (Grabig et al., 2006; Ukena et al., 2007; Garrido-Mesa et al., 2011; Olier et al., 2012; Souza et al., 2016). The ability of EcN to decrease intestinal permeability and cure leaky gut may be attributed, at least in part, to its ability to strength TJ. *In vivo* upregulation of ZO-1 by EcN suspensions was evidenced in both healthy and dextran sodium sulfate-treated mice (Ukena et al., 2007), whereas *in vitro* studies showed upregulation of ZO-2 (Zyrek et al., 2007) or claudin-14 (Hering et al., 2014), depending on the epithelial cell line used.

In the gut, communication between microbiota and the host mainly relies on secreted factors that can go through the mucus layer and reach the epithelium. Thus, membrane vesicles released by commensal strains are emerging as key players in signaling processes in the intestinal mucosa. We have recently shown that EcN OMVs, as well as vesicles produced by other commensal *E. coli* strains, are internalized by epithelial cells through clathrin-mediated endocytosis (Cañas et al., 2016) and mediate signaling events to the immune system through the intestinal epithelial barrier (Fábrega et al., 2016). Here we aim to analyze the impact of EcN OMVs on the integrity of the intestinal epithelial barrier.

In HT-29/B6 monolayers, the TER increase and upregulation of claudin-14 by EcN was attributed to *TcpC*, a secreted protein present in the culture supernatant. No other regulatory effects on TJ proteins were apparent in this cellular model (Hering et al., 2014). Upon removal of bacteria, culture supernatants contained both OMVs and soluble factors. Thus, we isolated the released vesicles from the putative active factors secreted in a soluble form (COF-SN), and tested both extracellular fractions independently. We extended our study to other *tcpC*-positive *E. coli* strains from the ECOR reference collection, and confirmed that their culture supernatants stimulated TER in T-84 cell monolayers. Like EcN, these *tcpC*-positive isolates fit into the phylogenetic group B2, which is associated with virulent strains that cause extra-intestinal infections. In fact, *TcpC* is highly prevalent in Gram-negative pathogens. This protein contains a Toll/IL-1 receptor (TIR)-binding domain, which mediates its interaction with Myd88 and inhibits toll-like receptor signaling pathways. By this mechanism, *TcpC* impairs innate immunity, causing inflammation and tissue damage (Cirl et al., 2008; Yadav et al., 2010). However, in spite of its virulent nature, *TcpC* have a positive impact on the epithelial barrier (Hering et al., 2014). *TcpC*, like the immunomodulin colibactin, are among the virulence factors encoded in the EcN genome that contribute to its probiotic activity. Colibactin is a non-ribosomal peptide-polyketide synthesized by enzymes encoded in the *pks* island, which displays both genotoxic and anti-inflammatory effects. Mutations that abolish colibactin synthesis greatly reduce the beneficial activity of EcN in the modulation of cytokine



expression and amelioration of experimental colitis in mice (Olier et al., 2012). The prevalence of extraintestinal virulence determinants in commensal *E. coli* B2 isolates has been explained on the basis that these determinants are in fact survival factors that can increase the fitness of the strains within the normal gut environment (Le Gall et al., 2007).

Our results showed that the strengthening activity of EcN and ECOR63 (the selected *tcpC*-positive strain lacking cytotoxic activity) does not exclusively depend on TcpC. Several facts point to the contribution of other bacterial effectors. First, partition of the culture supernatants revealed that both OMVs and soluble factors (COF-SN) collected from these strains increased the TER of T-84 cell monolayers upon 24 h incubation. Second, TcpC deficiency did not alter the OMV-stimulatory activity, and only diminished the effect of COF-SN collected from EcN. Overall, these results show for the first time the ability of secreted microbiota vesicles to modulate the integrity of the epithelial barrier, and also indicate that TcpC is not exported through OMVs. In addition, they reveal that these strains, especially ECOR63, secrete soluble active factors other than TcpC that have a great impact on the epithelial barrier.

Quantitative reverse transcription PCR analyses were undertaken to evaluate the capacity of these soluble and vesicular-secreted fractions to regulate the expression of selected TJ proteins. Neither OMVs nor COF-SN from the two strains triggered significant changes in the mRNA levels of ZO-2, occludin or claudin-1. Regarding ZO-2, studies performed in the same cellular models used here (T-84 and Caco-2 cells) revealed upregulation of this protein upon incubation with EcN suspensions (Zyrek et al., 2007). As we stimulated the epithelial cell monolayers with secreted EcN fractions, we may speculate that EcN-mediated upregulation of ZO-2 depends on bacteria-associated factors. Concerning the other genes analyzed in this study, our results showed upregulation of claudin-14 and ZO-1, and downregulation of claudin-2. Interestingly, all these effects were mediated either by OMVs or COF-SN collected from the two strains.

Regarding claudin-14, upregulation of this protein by COF-SN samples was in agreement with the literature on EcN supernatants, as this effect mainly relies on TcpC (Hering et al., 2014). Nevertheless, in ECOR63, TcpC deficiency did not result in a significant reduction of claudin-14 mRNA levels, at least in the T-84 cellular model. This confirms the presence of other active soluble factors in the COF-SN samples from ECOR63. Moreover, OMVs isolated from both EcN and ECOR63 strains also triggered upregulation of claudin-14 in a TcpC-independent manner.

In the case of ZO-1, our results indicate that the *in vivo* upregulation of this protein by EcN (Ukena et al., 2007) may be attributed to TcpC and released OMVs. Here, expression of this protein was analyzed at both mRNA and protein levels. In all conditions tested, ZO-1 protein quantified by Western blot correlated well with the corresponding mRNA levels, which points to transcriptional regulation of the gene. As expected, upregulation of ZO-1 by bacterial OMVs did not depend on TcpC. Regarding the activating activity of COF-SN samples, the results differed depending on the strain. In EcN, upregulation of

ZO-1 by COF-SN depends on TcpC exclusively, but in ECOR63 other soluble secreted factors existing in the corresponding sample could contribute to modulating ZO-1 expression. Notice that ZO-1 mRNA levels in T-84 cells treated with COF-SN from ECOR63 *tcpC::kan* were still significantly higher than those of untreated controls. Immunofluorescence staining followed by confocal laser scanning microscopy evidenced enhanced ZO-1 staining in the cell boundaries of monolayers treated with EcN or ECOR63 samples, but not in cells incubated with ECOR12 samples. In stimulated Caco-2 monolayers, enhanced expression of ZO-1 correlates with an increased TJ-associated ZO-1 signal, except for cells treated with COF-SN collected from the ECOR63 *tcp* mutant. In this case, the increase in TJ-associated ZO-1 signal was not statistically significant.

In addition to TJ proteins that are known to be regulated by EcN, in this study we included the leaky protein claudin-2, which plays an opposing role to other TJ proteins. This is a pore-forming protein that facilitates cation and water secretion by epithelial cells. Stimuli that raise claudin-2 levels result in increased barrier permeability (Luetting et al., 2015). Increased expression of claudin-2 has been reported in the gut epithelia of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease (Hering et al., 2012; Landy et al., 2016). Pathogens like *Salmonella* increase claudin-2 expression to facilitate bacterial invasion (Zhang et al., 2013). Microbial toxins, such as cholera toxin or Staphylococcal enterotoxin B, also promote upregulation of claudin-2, and thus compromise the intestinal epithelial barrier (Liu et al., 2013). In contrast, downregulation of claudin-2 is part of the mechanism used by some probiotic strains to enhance the intestinal barrier function (Ewaschuk et al., 2008). Our study shows for the first time the capacity of EcN to decrease claudin-2 expression. By means of gene and protein expression analyses, we provide evidence that downregulation of claudin-2 by EcN is mediated by released OMVs as well as by soluble factors, other than TcpC. In addition to the known effects of EcN on expression of the sealing TJ proteins ZO-1 and claudin-14, downregulation of claudin-2 can contribute to the efficacy of this probiotic in the treatment of intestinal infections and inflammatory diseases. Secreted OMVs and microbial factors from ECOR63, which belongs to the phylogenetic group B2 like EcN, also decrease claudin-2 expression. However, commensal ECOR12 (phylogenetic group A), which does not reinforce the TER of the epithelial barrier, does not modulate claudin-2 expression.

## CONCLUSION

This study addresses the impact of bacterial secreted factors on the expression of TJ proteins that are known to be regulated by EcN, as well as other proteins described here for the first time, like claudin-2. To the best of our knowledge, this is the first study providing evidence that OMVs from certain commensal *E. coli* strains, specifically EcN and ECOR63, increase epithelial barrier function through upregulation of ZO-1 and claudin-14, and downregulation of the leaky protein claudin-2. These regulatory effects are not mediated by TcpC. We have previously

reported that OMVs released by the probiotic EcN induce IL-22 expression in colonic explants (Fábrega et al., 2016). This cytokine, mainly expressed by immune cells, targets epithelial cells and reinforces the intestinal barrier, thus limiting the access of microbial compounds and allergens to the systemic circulation. Thus, our studies show that OMVs contribute to reinforcing the epithelial barrier integrity directly through transcriptional regulation of TJ proteins and indirectly through regulation of IL-22.

Besides OMVs, the soluble secreted TpcC protein also contributes to the upregulation effect of ZO-1 and claudin-14. In contrast, this protein has no effect on the transcriptional regulation of claudin-2. Thus, these microbiota strains release other bioactive factors that contribute to the reinforcement of the epithelial barrier.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LB, RG, and JB conceived of the study with the participation of MB and C-SA in experimental design. LB and JB wrote the manuscript. LB and RG supervised the work. RG, MB, and C-SA carried out data interpretation and statistical analysis. C-SA performed the experimental work. MB participated in confocal microscopy experiments and carried out image analysis. All authors revised, read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This study was supported by Grant AGL2012-34985 (co-financed with European Commission ERDF funds) from the Ministerio de

Economía y Competitividad, Spain, to LB. C-SA acknowledges the fellowships granted by PRODEP and by Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico. We acknowledge financial support from Universitat de Barcelona for publication in open access.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge laboratories Ardeypharm for providing strain EcN. We thank M. Lluïsa Miró for technical support. We acknowledge Lucille Banham for assistance in preparing the English manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01981/full#supplementary-material>

**FIGURE S1 | PCR confirmation of gene disruption in EcN *tcpC::kan* and ECOR63 *tcpC::kan* mutants.** PCR amplification of *tcpC* sequences with primers *FW-tcpC* (TCGCATGGAAACAGCACCT) and *RV-tcpC* (CTTCTCCTGTATGCTAT TTCAGC) in the indicated strains. The size of the amplified products is indicated. The 1.6 Kb-increase in the PCR product from knockout mutants corresponds to the kanamycin cassette inserted inside *tcpC* gene. The size marker was lambda HindIII.

**FIGURE S2 | Image analysis of tight junction stained with ZO-1. (A)** Inset of an original image. **(B)** Same inset after processing by median filter, subtract background and tracing using the Tubeness plugin. **(C)** Regions of interest (ROIs, green) obtained after binarizing **(B)** by applying Li's Minimum Cross Entropy thresholding method. **(D)** Overlap of ROIs in **(C)** on the original image **(A)**. Images are color coded with Fire look-up table. Scale bar, 20  $\mu$ m.

## REFERENCES

- Aguilera, L., Toloza, L., Giménez, R., Odena, A., Oliveira, E., Aguilar, J., et al. (2014). Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics* 14, 222–229. doi: 10.1002/pmic.201300328
- Arribas, B., Rodríguez-Cabezas, M. E., Camuesco, D., Comalada, M., Bailón, E., Utrilla, P., et al. (2009). A probiotic strain of *Escherichia coli*, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1024–1033. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00270.x
- Cañas, M. A., Giménez, R., Fábrega, M. J., Toloza, L., Baldomà, L., and Badia, J. (2016). Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage. *PLoS ONE* 11:e0160374. doi: 10.1371/journal.pone.0160374
- Chibbar, R., and Dieleman, L. A. (2015). Probiotics in the management of ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 49, S50–S55. doi: 10.1097/MCG.0000000000000368
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fisher, H., et al. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.* 14, 399–406. doi: 10.1038/nm1734
- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
- de la Riva, L., Badia, J., Aguilar, J., Bender, A. B., and Baldomà, L. (2008). The hpx genetic system for hypoxanthine assimilation as a nitrogen source in *Klebsiella pneumoniae*: gene organization and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 190, 7892–7903. doi: 10.1128/JB.01022-08
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., and Backer, J. (2008). Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G1025–G1034. doi: 10.1152/ajpgi.90227.2008
- Fábrega, M. J., Aguilera, L., Giménez, R., Varela, E., Cañas, M. A., Antolín, M., et al. (2016). Activation of immune and defense responses in the intestinal mucosa by outer membrane vesicles of commensal and probiotic *Escherichia coli* strains. *Front. Microbiol.* 7:705. doi: 10.3389/fmicb.2016.00705
- Fisher, A., Gluth, M., Weege, F., Ulrich-Frank, P., Wieddenmann, B., Baumgart, C. D., et al. (2014). Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, G218–G228. doi: 10.1152/ajpgi.00095.2013
- Garrido-Mesa, N., Utrilla, P., Comalada, M., Zorrilla, P., Garrido-Mesa, J., Zarzuelo, A., et al. (2011). The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1891–1900. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.004
- Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., Dankof, A., Baumgart, D. C., Erckenbrecht, J., et al. (2006). *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect. Immun.* 74, 4075–4082. doi: 10.1128/IAI.01449-05
- Hering, N. A., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* 590, 1035–1044. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224568
- Hering, N. A., Richter, J. F., Fromm, A., Wieser, A., Hartmann, S., Günzel, D., et al. (2014). TpcC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function

- involving PKC $\zeta$  and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunol.* 7, 369–378. doi: 10.1038/mi.2013.55
- Kang, C. S., Ban, M., Choi, E. J., Moon, H. G., Jeon, J. S., Kim, D. K., et al. (2013). Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. *PLoS ONE* 8:e76520. doi: 10.1371/journal.pone.0076520
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617–1623. doi: 10.1136/gut.2003.037747
- Lai, X. H., Wang, S. Y., and Uhlin, B. E. (1999). Expression of cytotoxicity by potential pathogens in the standard *Escherichia coli* collection of reference (ECOR) strains. *Microbiology* 145, 3295–3303. doi: 10.1099/00221287-145-11-3295
- Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S. K., Hart, A. L., Knight, S. C., et al. (2016). Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 3117–3126. doi: 10.3748/wjg.v22.i11.3117
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., et al. (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2373–2384. doi: 10.1093/molbev/msm172
- Li, C. H., and Tam, P. K. S. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognit. Lett.* 19, 771–776. doi: 10.1016/S0167-8655(98) 57-59
- Liu, X., Yang, G., Geng, X. R., Cao, Y., Li, N., Ma, L., et al. (2013). Microbial products induce claudin-2 to compromise gut epithelial barrier function. *PLoS ONE* 8:e68547. doi: 10.1371/journal.pone.0068547
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–273.
- Luetting, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., and Schulzke, J. D. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers* 3, e977176. doi: 10.4161/tb.1688370.2014.977176
- Martin, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J. J., Sokol, H., et al. (2014). The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 417–430. doi: 10.1097/01.MIB.0000440815.76627.64
- Martín, R., Miquel, S., Chain, F., Natividad, J. M., Jury, J., Lu, J., et al. (2015). *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol.* 15:67. doi: 10.1186/s12866-015-0400-1
- Ochman, H., and Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 157, 690–693.
- Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., et al. (2012). Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3, 501–509. doi: 10.4161/gmic.21737
- Oshima, T., and Miwa, H. (2016). Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases. *J. Gastroenterol.* 51, 768–778. doi: 10.1007/s00535-016-1207-z
- Peterson, L. W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153. doi: 10.1038/nri3608
- Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J.-D., Amasheh, S., et al. (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* 123, 1913–1921. doi: 10.1242/jcs.060665
- Satake, S., Semba, S., Matsuda, Y., Usami, Y., Chiba, H., Sawada, N., et al. (2008). Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma. *Pathol. Int.* 58, 156–163. doi: 10.1111/j.1440-1827.2007.02204.x
- Scalaferrì, F., Gerardi, V., Mangiola, F., Lopetuso, L. R., Pizzoferrato, M., Petito, V., et al. (2016). Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update. *World J. Gastroenterol.* 22, 5505–5511. doi: 10.3748/wjg.v22.i24.5505
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kayning, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F., and Fellermann, K. (2007). Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* 75, 2399–2407. doi: 10.1128/IAI.01563-06
- Schubert, S., Nörenberg, D., Clermont, O., Magistro, G., Wieser, A., Romann, E., et al. (2010). Prevalence and phylogenetic history of the TcpC virulence determinant in *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 429–434. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.02.006
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., and Turner, J. R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 283–309. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142150
- Shen, Y., Giardino Torchia, M. L., Lawson, G. W., Karp, C. L., Ashwell, J. D., and Mazmanian, S. K. (2012). Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* 12, 509–520. doi: 10.1016/j.chom.2012.08.004
- Snyder, G. A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., et al. (2013). Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 6985–6990. doi: 10.1073/pnas.121577011031
- Souza, E. L., Elian, S. D., Paula, L. M., Garcia, C. C., Vieira, A. T., Teixeira, M. M., et al. (2016). *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. *J. Med. Microbiol.* 65, 201–210. doi: 10.1099/jmm.0.000222
- Toloz, L., Giménez, R., Fábrega, M. J., Alvarez, C. S., Aguilera, L., Cañas, M. A., et al. (2015). The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *BMC Microbiol.* 15:250. doi: 10.1186/s12866-015-0591-5
- Trebichavsky, I., Splichal, I., Rada, V., and Splichalova, A. (2010). Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* Nissle 1917. *Nutr. Rev.* 68, 459–464. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00305.x
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809. doi: 10.1038/nri2653
- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., and Hansen, W. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE* 2:e1308. doi: 10.1371/journal.pone.0001308
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., et al. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126, 741–754. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.043
- Wasilewski, A., Zielinska, M., Storr, M., and Fichna, J. (2015). Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1674–1682. doi: 10.1097/MIB.0000000000000364
- Wells, J. M., Rossi, O., Meijerink, M., and van Baarlen, P. (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4607–4614. doi: 10.1073/pnas.100092107
- Yadav, M., Zhang, J., Fischer, H., Huang, W., Lutay, N., Cirl, C., et al. (2010). Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathog.* 6:e1001120. doi: 10.1371/journal.ppat.1001120
- Zhang, Y. G., Wu, S., Xia, Y., and Sun, J. (2013). *Salmonella* infection upregulates the leaky protein claudin-2 in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE* 8:e58606. doi: 10.1371/journal.pone.0058606
- Zyrek, A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M. A. (2007). Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol.* 9, 804–816. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Alvarez, Badia, Bosch, Giménez and Beldomà. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

---

## **10.1. PARTICIPACIÓN EN OTRA PUBLICACIÓN.**



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917

Lorena Toloza<sup>1</sup>, Rosa Giménez<sup>1</sup>, María Jose Fábrega<sup>1</sup>, Carina Shianya Alvarez<sup>1</sup>, Laura Aguilera<sup>1</sup>,  
María Alexandra Cañas<sup>1</sup>, Raquel Martín-Venegas<sup>2</sup>, Josefa Badia<sup>1</sup> and Laura Baldomà<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is a probiotic used in the treatment of intestinal diseases. Although it is considered safe, EcN is closely related to the uropathogenic *E. coli* strain CFT073 and contains many of its predicted virulence elements. Thus, it is relevant to assess whether virulence-associated genes are functional in EcN. One of these genes encodes the secreted autotransporter toxin (Sat), a member of the serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) that are secreted following the type V autotransporter pathway. Sat is highly prevalent in certain *E. coli* pathogenic groups responsible for urinary and intestinal infections. In these pathogens Sat promotes cytotoxic effects in several lines of undifferentiated epithelial cells, but not in differentiated Caco-2 cells.

**Results:** Here we provide evidence that *sat* is expressed by EcN during the colonization of mouse intestine. The EcN protein is secreted as an active serine protease, with its 107 kDa-passenger domain released into the medium as a soluble protein. Expression of recombinant EcN Sat protein in strain HB101 increases paracellular permeability to mannitol in polarized Caco-2 monolayers. This effect, also reported for the Sat protein of diffusely adherent *E. coli*, is not observed when this protein is expressed in the EcN background. In addition, we show that EcN supernatants confer protection against Sat-mediated effects on paracellular permeability, thus indicating that other secreted EcN factors are able to prevent barrier disruption caused by pathogen-related factors. Sat is not required for intestinal colonization, but the EcN*sat::cat* mutant outcompetes wild-type EcN in the streptomycin-treated mouse model. Analysis of the presence of *sat* in 29 strains of the ECOR collection isolated from stools of healthy humans shows 34.8 % positives, with high prevalence of strains of the phylogenetic groups D and B2, related with extra-intestinal infections.

**Conclusions:** Sat does not act as a virulence factor in EcN. The role of Sat in intestinal pathogenesis relies on other genetic determinants responsible for the bacterial pathotype.

**Keywords:** *Escherichia coli* Nissle 1917, Probiotic, Secreted autotransporter toxin (Sat), Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs)

\* Correspondence: lbaldoma@ub.edu

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Toloza et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Background

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) (serotype O6:K5:H1) is a Gram-negative probiotic used in the treatment of intestinal disorders, especially inflammatory bowel diseases [1–3]. This strain, originally isolated from a soldier who survived a severe outbreak of diarrhoea during the First World War, is a good colonizer of the human gut and positively affects gastrointestinal homeostasis and microbiota balance. EcN modulates the expression of antimicrobial peptides, increases secretion of IgA and mucin, and promotes anti-inflammatory modulation of the immune response [4]. In addition, this probiotic modulates the intestinal epithelial barrier through upregulation and redistribution of tight junction proteins [5–7].

The EcN genome has been sequenced (genome size 5,441,200 bp) and is predicted to contain 5,324 coding sequences, among which 190 genes are strain-specific [8, 9]. EcN is furnished with a large repertoire of fitness factors that promote its competitiveness, which probably explains its success as a probiotic. Among these fitness factors there are microcins, iron uptake systems, adhesins and proteases that contribute to the colonization of the human gut [10–12]. Genes encoding these factors are mainly clustered in genomic islands and some smaller groups. Comparative genomic hybridization studies and genome sequencing revealed that the probiotic strain EcN is closely related to the uropathogenic *E. coli* strain (UPEC) CFT073 [9, 12]. Even though the two strains use different communication strategies with the host, their gene profiles are very similar (differing only in a few hundred genes). EcN lacks genes encoding defined virulence factors such as haemolysin and P-fimbrial adhesin, but most of the predicted CFT073 virulence elements are also present in the EcN genome. A transcriptomic analysis revealed that many UPEC virulence-related genes are expressed in the probiotic EcN [13]. The borderline between virulence and fitness factor is in some cases diffuse, as virulence depends on factors that increase fitness during colonization of specific host niches. One of these factors is the secreted autotransporter toxin Sat, encoded in EcN by a gene located in the genomic island II. Sat belongs to the subfamily of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs). This family is composed of extracellular proteases with diverse functions, normally associated with virulence of Gram-negative pathogens, which are secreted by the type Va secretion pathway [14, 15]. These proteins display the typical features of autotransporters: an N-terminal signal sequence, a passenger domain secreted into the extracellular medium and a C-terminal  $\beta$ -barrel domain involved in protein translocation through the outer membrane. Proteins of the SPATE family have been classified into two main groups according to their

structure and activity as well as to phylogenetic criteria. Class I includes proteins with cytotoxic activity and class II comprises non-cytotoxic proteins with roles in colonization and immunomodulation [16, 17].

Sat is a class I protease synthesized as a precursor (142 kDa) and processed at the N-terminal end on its way to the periplasmic space via the Sec secretion system (residues 1–49). This protein is subsequently self-transported through the outer membrane and undergoes another proteolytic cleavage which releases the protease domain (residues 50–1018; 107 kDa) and keeps the C-terminal domain anchored to the outer membrane (residues 1019–1295; 31 kDa) [18]. Sat function has been studied in pathogens, specifically in the UPEC strain CFT073, and in Afa/Dr diffusely adherent *E. coli* (DAEC) responsible for urinary tract and intestinal infections. *In vitro* studies showed that Sat from UPEC strains displays proteolytic activity on casein, spectrin, fodrin and coagulation factor V. Mucin, pepsin or IgA were not degraded by Sat [18–20]. In several cellular models of kidney, bladder and undifferentiated epithelial cells Sat promotes cytotoxic effects including vacuolization, autophagy and cell detachment [18, 21, 22]. Studies using subconfluent HeLa cells exposed to Sat from Afa/Dr DAEC strains revealed that these cytotoxic effects are preceded by F-actin cytoskeleton disassembly [22]. Moreover, several reports provide evidence that Sat is internalized by host cells and localized both in the cytosol and in nucleus [20, 22]. In differentiated Caco-2 cells, this toxin induces rearrangements of the tight junction-associated proteins ZO-1 and ZO-2 and occludins, leading to an increase in both fluid dome formation and paracellular permeability to small molecules like mannitol, without altering the monolayer transepithelial electrical resistance (TER). In this model, Sat of DAEC does not modify the paracellular permeability to fluorescein-5-sulphonic acid (478 Da), nor does it trigger dissociation of the F-actin network [23]. No experimental evidence of Sat-mediated proteolysis of tight junction-proteins has been reported to date. *In vivo* experiments carried out with Sat from a DAEC strain isolated from a child with diarrhea showed that this toxin induces fluid accumulation and histological effects in rabbit ileon loops. However, the intensity of the observed effects displayed great variation between animals, suggesting that other host factors may influence the establishment of diarrheal diseases [24].

As EcN is considered a safe probiotic [4, 25] it is relevant to test whether virulence-associated genes are expressed and whether the encoded proteins are functional. We report here the expression of *sat* during the colonization of the mouse intestine by EcN, and provide evidence that EcN Sat is a functional protease. We report that the negative effects of Sat

on the paracellular permeability of Caco-2 monolayers *in vitro* are not seen in the probiotic strain. In addition, we have performed colonization experiments using the streptomycin-treated mouse model, as well as a PCR survey to evaluate prevalence of *sat* among the *E. coli* reference collection (ECOR) strains from human intestinal origin. Our results indicate that the putative pathogenic role of Sat in the intestinal tract depends on the expression of other strain virulence determinants.

## Methods

### Bacterial strains and growth conditions

*E. coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacterial cells were routinely grown at 37 °C in Luria-Bertani broth (LB). When indicated, cells were grown in minimal medium (MM) [26] supplemented with 0.2 % glucose and 0.02 % casamino acids [13] or DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>). Bacterial cells were counted by plating serial dilutions on LB-plates containing the appropriate antibiotic. When required, ampicillin (Ap) (100 µg/ml), chloramphenicol (Cm) (20 µg/ml), streptomycin (Sm) (100 µg/ml), rifampicin (Rf) (25 µg/ml) or tetracycline (Tc) (12.5 µg/ml) was added to the medium. Expression of β-galactosidase was achieved by addition of 5 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to the culture medium.

### Construction of mutant strains

Rf- or Sm-resistant mutants were obtained by spontaneous mutation. To construct an EcN isogenic *sat* mutant, the 3 Kb-fragment encoding the Sat passenger domain was amplified with primers Mut-sat-Fw ACAGGATCCGCAAA TATTGATATATATCAAATGTATGG) and Mut-sat-Rev (ACAGAATTTCGTTGACCTCAGCAAGGAAG) and cloned into the EcoRI/BamHI restriction sites of plasmid pUC18Not (Biomedal). The resulting recombinant plasmid was then digested with SmaI (with a single restriction site in the *sat* gene) and ligated with a *cat* cassette that confers resistance to Cm. This cassette was obtained by digestion of plasmid pCAT19 [27] with SmaI. The recombinant plasmid was then digested with NotI and the fragment *sat::cat* was cloned into the NotI restriction site of vector pUTmini-Tn5 Tc (Biomedal). After electroporation of *E. coli* S17 (λpir) with this final construct, the introduction of the *sat::cat* mutation into the EcN chromosome was performed by conjugation using as a recipient strain a Rf-resistant derivative of EcN. Transconjugants having the Rf<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup> Tc<sup>s</sup> Ap<sup>s</sup> phenotypes were selected. Chromosomal insertion was confirmed by PCR. This insertional inactivation did not cause polarity on downstream genes as *sat* is transcribed as a single unit. Growth rates of the *sat* mutant strain in LB or DMEM were indistinguishable from that of the parental EcN strain.

### DNA manipulation and site-directed mutagenesis

Bacterial genomic DNA was obtained using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega), and plasmid

**Table 1** Strains and plasmids used in this study

| Strain or plasmid       | Genotype or description                                                                                                                                                                                         | Source or reference |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>E. coli</i> strains  |                                                                                                                                                                                                                 |                     |
| XL1Blue                 | <i>recA1 lac endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> (F' <i>proAB lacZ<sup>f</sup> lacZ</i> ΔM15 Tn10)                                                                                                         | Stratagene          |
| DH5α                    | F <sup>−</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>−</sup> m <sub>k</sub> <sup>−</sup> ) <i>phoA supE44 λ<sup>−</sup> thi- gyrA96 relA1</i>        | Gibco BRL           |
| HB101                   | F <sup>−</sup> <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>−</sup> m <sub>B</sub> <sup>−</sup> ) <i>recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>glnV44 λ<sup>−</sup></i> | ATCC 33694          |
| S17(λpir)               | Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA thi pro hsdR hsdM<sup>+</sup></i> RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 λ                                                                                                               | Biomedal            |
| Nissle 1917 (EcN)       | Non-pathogenic probiotic isolate (O6:K5:H1)                                                                                                                                                                     | Ardeypharm          |
| EcN <i>sat::cat</i>     | Nissle 1917 <i>sat::cat</i> ; Cm <sup>r</sup>                                                                                                                                                                   | This study          |
| E2348/69                | Wild type EPEC O127:H6 Sm <sup>r</sup>                                                                                                                                                                          | B.B. Finlay         |
| ECOR collection strains | Human stool isolates                                                                                                                                                                                            | [43]                |
| Plasmids                |                                                                                                                                                                                                                 |                     |
| pBR322                  | Vector for cloning, Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>                                                                                                                                                             | Biolabs             |
| pSat                    | Gene <i>sat</i> from EcN cloned in pBR322, Ap <sup>r</sup>                                                                                                                                                      | This study          |
| pSat-S256I              | Gene <i>sat</i> from EcN encoding the mutated Sat-S256I cloned in pBR322, Ap <sup>r</sup>                                                                                                                       | This study          |
| pCAT19                  | Source of <i>cat</i> gene, Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>                                                                                                                                                      | [26]                |
| pUT mini-Tn5 Tc         | <i>tnp<sup>*</sup></i> gene of Tn5-IS50R inserted in Sall site of pGP704; mini-Tn5 Tc transposable element, Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>                                                                     | Biomedal            |
| pFU34                   | Plasmid for transcriptional fusions to the reporter gene <i>gfp<sub>mut3.1</sub></i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                          | [28]                |
| pFU34-sat               | Promoter fusion Φ( <i>sat-gfp<sub>mut3.1</sub></i> ) in pFU34, Ap <sup>r</sup>                                                                                                                                  | This study          |



DNA was prepared using the Wizard Plus SV Midipreps DNA purification system (Promega). DNA manipulations were performed essentially as described elsewhere [28]. DNA fragments were amplified by PCR using *E. coli* chromosomal DNA as a template. PCR reactions were performed with Taq DNA polymerase or *pfu* DNA polymerase in standard conditions. DNA sequencing was carried out with an automated ABI 377 DNA sequencer and fluorescent dye termination methods.

The *sat* gene from EcN was amplified by PCR using primers pBR-sat-Fw (TACGGATCCGGATCAGGGTTG GCAATATCG) and pBR-sat-Rev (GCTAATAATGAG AGCAAGAGCGAT) and cloned into pBR322 between BamHI and NruI restriction sites. This construct encompasses the complete *sat* coding sequence and the 435 bp-region upstream the ATG start codon. Site-directed mutagenesis of the Sat catalytic serine residue (S256) was performed using the Quick change site-directed mutagenesis kit (Stratagen) following the manufacturer's instructions. The set of primers used to replace this residue to isoleucine (S256I) were TCGGAGACA TCGGCTCTGG and CCAGAGCCGATGTCTCCGA.

#### Construction of *sat-gfp* promoter fusion and detection of the reporter protein

Plasmid pFU34-*sat* (*sat-gfp* promoter fusion) was constructed by amplification of the *sat* upstream region with primers Sat-gfp-Fw (GGCGGATCCCGGTCTGAATA ACGCAGCTAG) and Sat-gfp-Rev (GCACGTGTCTGA CATTATATATTTCTCTCAACTCATTATTTGAATGA ACA) from EcN genomic DNA and cloned into the BamHI/SalI sites of plasmid pFU34 [29]. GFP expressed from EcN cells harboring plasmid pFU34-*sat* was visualized with a fluorescence microscopy (Leica D1000). For the analysis of the reporter gene expression under *in vitro* conditions, EcN harboring pFU34-*sat* or pFU34 as a control was diluted 1:50 in fresh culture medium from overnight cultures and grown at 37 °C to exponential phase. Fluorescence emitted by bacterial cells was measured in a microtiter plate reader (Turner BioSystems Modulus™ II Microplate). The data obtained from three independent cultures were given as relative fluorescence units per OD<sub>600</sub> (RLU/OD).

#### Isolation of secreted proteins

Isolation of secreted proteins was performed as previously described [30]. Briefly, overnight cultures in LB were diluted 1:50 in the indicated culture media and incubated at 37 °C. After 8 h of growth (OD<sub>600</sub> of 1.0) bacteria were collected by centrifugation (5,000 × *g*, 10 min, 4 °C), and the supernatant was passed through a 0.22 µm-pore-size filter (Millipore). For protease activity assays, cell-free supernatants were concentrated 500-fold using Centricon-Plus-70 centrifugal filters (Millipore)

with a molecular weight cut-off of 100 kDa. Protein concentration was quantified by the method of Lowry [31]. For Western blot analysis, the proteins in the filtrate were precipitated by incubation on ice for at least 1 h with 10 % trichloroacetic acid (TCA). The protein pellet was washed in 90 % (v/v) ice-cold acetone, air-dried and suspended in loading buffer before being resolved by sodium dodecyl sulphate (SDS)- polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) [32]. Outer membrane vesicles (OMVs) were isolated from cell-free supernatants as described previously [33].

#### Serine protease and spectrin cleavage assays

Serine protease activity was measured using the p-nitroanilide substrate assay [20]. Concentrated supernatant (200 µg protein) was added to a reaction mixture in 0.1 M morpholinepropanesulfonic acid buffer pH 7.3, containing 200 mM NaCl, 0.01 mM ZnSO<sub>4</sub> and 1 mM methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide as the substrate (Sigma-Aldrich). Samples were incubated at 37 °C during 18 h and substrate hydrolysis was monitored at 505 nm. As a control, protease activity was also assayed after preincubation of samples for 30 min at 37 °C with 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). The spectrin cleavage assay was performed as described elsewhere [20]. Reaction mixtures (20 µl) containing spectrin (4 µg) (Sigma-Aldrich) and concentrated culture supernatants were incubated at 37 °C for 24 h. Reaction products were resolved by SDS-PAGE.

#### Western blot analysis

For Western blot analysis, protein samples were separated on 10 % SDS-PAGE and transferred to a HyBond-P polyvinylidene difluoride membrane by using a Bio-Rad MiniTransblot apparatus. The membrane was blocked in PBS-0.05 % Tween-20 and 5 % skimmed milk (blocking solution) for 1 h at room temperature, and then incubated with specific antibodies against Sat (1:5,000 dilution in blocking solution) or with antibodies against β-galactosidase (Abcam, 1:10,000 dilution) for 16 h at 4 °C. Anti-Sat polyclonal antibodies (rabbit) were raised against a conjugated peptide (CKSNNQQTSTFDQPDW) of the Sat passenger domain selected by its antigenicity and surface exposure features prediction (Genscript). The secondary antibody was donkey anti-rabbit immunoglobulin horse-radish peroxidase-linked, diluted 1:15,000 in blocking solution. The protein-antibody complex was visualized by using the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Cell culture and infection conditions

HeLa or Caco-2 human colonic adenocarcinoma cells (ATCC HTB-37) were routinely grown in DMEM containing 25 mM HEPES, non-essential amino acids,

100 U/ml of penicillin G and 100 µg/ml of streptomycin. The medium was supplemented with 10 % (v/v) of heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL, MD, USA). Cells were incubated at 37 °C in 95 % air / 5 % CO<sub>2</sub>.

For permeability assays, Caco-2 cells were seeded on polycarbonate filter supports (0.4 µm, Transwell Corning) and experiments were performed when confluent monolayers were fully polarized (15–18 days postconfluence). For infection studies, *E. coli* cells were grown in LB overnight at 37 °C; the culture was then diluted 1:50 with fresh medium and grown until the OD<sub>600</sub> reached 0.5–1.0. Bacterial cells were collected by centrifugation and resuspended in DMEM plus 1 % mannose. Two hours before infection, monolayers of Caco-2 cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) and shifted to serum and antibiotic-free medium. Caco-2 cells were treated with bacterial suspensions from the apical side for 3 h at a multiplicity of infection (MOI) of 100. When indicated, bacterial concentrated supernatants (200 µg protein) were added to the apical compartment and incubation was extended for 3 h.

#### Transepithelial resistance and permeability measurement

After apical treatment, transepithelial resistance (TER) was determined with a Millicel-ERS-2 volt-ohmmeter (Millipore, Bedford, MA). The background of the supporting membrane in filters was subtracted from all readings before calculations. Results were expressed as Ω · cm<sup>2</sup> monolayer surface area.

Permeability of Caco-2 cell monolayers was determined by measuring the paracellular passage of [<sup>3</sup>H]-D-mannitol from apical to basolateral compartments of the chamber culture (transwell culture plate inserts; 0.4 µm) as described elsewhere [34]. Monolayers were washed with modified Krebs buffer (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM D-glucose and 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4), and placed in culture wells containing 1.5 and 0.5 ml of modified Krebs buffer in the basolateral and apical compartments, respectively. Apical medium contained 0.2 mCi/mL D-[2-<sup>3</sup>H]mannitol. Cells were incubated for 15 min at 37 °C. After this time, the basolateral medium was withdrawn and radioactivity was counted in a scintillation counter (1500 Tri-Carb®, Packard, Downers Grove, IL). Results were expressed as the percentage of recovery relative to total radioactivity.

#### Cytotoxicity assays

EcN Sat cytotoxicity was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) assay in HeLa cells as described elsewhere [22]. HeLa cells were seeded into 96-well plates

at 1 × 10<sup>4</sup> cells/well and grown to 90 % confluency. Before use, cells were kept overnight with medium containing 0.05 % FCS. Cells were washed twice with PBS and exposed to cell-free culture supernatants in the presence of fresh media deprived of FCS. At the indicated times, cell viability was determined the addition of MTT (1 mg/ml final concentration) followed by 1 hour- incubation at 37 °C. After solubilization with DMSO the plates were read at 570 nm using a Modulus™ Microplate Photometer (Turner BiSystems). The results were expressed as percentage of cell survival relative to the control (untreated cells).

#### Mouse colonization experiments

The streptomycin-treated mouse model, which overcomes colonization resistance in conventional animals, was used here to study the competition in gut colonization between Sm-resistant EcN and the isogenic EcN*sat::cat* mutant. The model was adapted from previous reports [35, 36].

The strains used in this study were spontaneous Sm<sup>r</sup> mutants, displaying resistance to antibiotic concentrations greater than 2 mg/ml. Both strains EcN Sm<sup>r</sup> and EcN*sat::cat* Sm<sup>r</sup> display the same point mutation in *rpsL*, resulting in the replacement of the lysine residue at position 43 by an isoleucine (AAA has changed to ATA). Therefore differences in the colonization abilities between these strains could not be attributed to different antibiotic resistance degrees. In addition both strains were resistant to Rf, and EcN*sat::cat* was resistant to Cm. Four male CD-1 mice (eight- to ten-weeks old) were provided with drinking water *ad libitum* containing streptomycin sulfate (5 g/l) from 24 hours prior to inoculation and over the entire course of the experiment. Stool samples were proved to be free of Sm-resistant bacteria before inoculation. Bacterial strains, were grown overnight in LB, diluted 1:200 and incubated to exponential phase (OD<sub>600nm</sub> of 0.5). Then, bacterial cells were collected by centrifugation, washed and resuspended in PBS to a final concentration of 1 × 10<sup>6</sup> CFU/ml. A mixed suspension (1:1) of strain EcN Sm<sup>r</sup> and the isogenic *sat::cat* mutant was prepared to a final concentration of 1 × 10<sup>6</sup> CFU/ml, and 0.2 ml of this inoculum was administered orogastrically (total number of bacteria 2 × 10<sup>5</sup>). At the indicated times over 18 days post-infection, mice were transferred individually to clean cages and fresh fecal samples were collected. Feces were weighed, diluted and homogenized in sterile PBS. Serial dilutions were plated on LB-agar containing Sm (100 µg/ml) and Rf (25 µg/ml). Plates were incubated for 16 to 20 h at 37 °C before quantification of bacteria by plate counts. To distinguish the two strains, 100 colonies from these plates were screened onto LB-plates containing Sm (100 µg/ml) and Cm (20 µg/ml). Results were expressed

as CFU/g of feces. Three independent colonization experiments were performed, with identical results. Pooled data from the three independent biological replicates were presented. Colonization experiments with single bacterial strains were performed in parallel ( $n = 4$ , two independent biological assays).

To isolate and enumerate bacteria adhered to the mucus layer, on day 18 post-infection mice were sacrificed. Sections of 4 to 5 cm of the ileum (at 1 cm from the cecum) and the ascendant colon were removed from each mouse. Each section of the intestine was washed three times with PBS to expel the luminal content. Then, the mucus layer from each fragment of intestine was scraped, transferred to a sterile tube, weighed and suspended into 1 ml of PBS. Samples were homogenized by vortexing and plated on LB-agar in the presence of Sm and Rf. After colony counting, the proportion of each strain was evaluated by picking 100 colonies on LB-plates containing Cm as described above. Bacteria were quantified as CFU/g of mucus.

The colonization experiments for *in vivo* analysis of *sat* expression were performed using essentially the same mouse model, but adding Ap (2 g/l) instead of Sm to the drinking water. Briefly, two male CD-1 mice (eight- to ten-weeks old) were orogastrically inoculated with 0.2 ml of a suspension of EcN cells harboring plasmid PFU34-*sat* ( $2 \times 10^5$ CFU) or PFU34 ( $2 \times 10^5$ CFU) as a control. Five days post-infection, fresh fecal samples, as well as the mucus layer from the ileon and colon sections, were collected and processed for quantification of bacteria as described above, using in this case LB-plates containing Ap (100  $\mu$ g/ml). A drop of each fecal or mucosal suspension was deposited on a slide and visualized with a fluorescence microscopy (Leica D1000).

#### Flow cytometry

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh buffy coats of healthy human donors by using Histopaque<sup>R</sup>-1077 (Sigma-Aldrich) following the manufacturer instructions. Buffy coats were provided by the “Banc de Sang i Teixits” of Barcelona according to the signed agreement with the Institution. Cells were cultured in DMEM containing gentamicin. PBMCs were left untreated or incubated with bacterial concentrated culture supernatants (200  $\mu$ g total protein) for 3 h. For antibody staining we followed the manufacturer's recommended protocol. Briefly, PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml; 100  $\mu$ l) were blocked in PBS + 5 % bovine serum albumin + 0.1 % NaN<sub>3</sub> at 4 °C. After washing, cells were incubated with the primary antibody anti-LFA-1 (anti-CD11 + CD18, Abcam) (1:100 dilution in blocking solution) at 4 °C for 1 h, followed by 30 min-incubation with the secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies). Cell viability

was assessed by propidium iodide staining. Data were analysed using the M X P Cytometry software (Cytometer FC500) in the Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCiT-UB).

#### Statistical analysis

Results were presented as mean  $\pm$  standard error (SE). Data analysis was performed using SPSS Statistics 20 package software. The statistical significance between two groups was determined using Student's *t* test. Differences between more than two groups were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significance was established when  $P < 0.05$ .

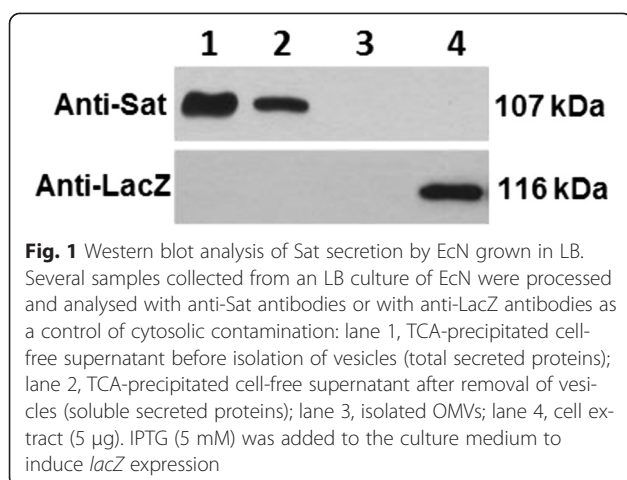
#### Ethics statement

Experiments with mice were approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Barcelona. PBMCs were isolated from buffy coats provided by the “Banc de Sang i Teixits” of Barcelona. This transfer fulfils the regulations approved by the Ethics Committee of this Institution.

## Results and discussion

### Sat is autotransported and its passenger domain is released into the medium in EcN cultures

Previous studies by our group identified Sat-specific peptides in the proteome of OMVs isolated from EcN cultures grown in LB [33]. To examine whether EcN Sat is secreted, supernatants of LB cultures were processed and analyzed by Western blot using antibodies anti-Sat obtained against a peptide of the passenger domain. Culture was centrifuged and the supernatant filtrated to eliminate bacteria. An aliquot of this cell-free supernatant was precipitated with TCA to obtain total secreted proteins. The remaining cell-free supernatant was centrifuged at 150,000  $\times g$  for 90 min to isolate OMVs from soluble secreted proteins. The presence of Sat in these fractions was analyzed by Western blot. A 107 kDa protein band was immunodetected in the total supernatant (Fig. 1, lane 1) and in the OMV free-supernatant (Fig. 1, lane 2), but not in the OMV fraction (Fig. 1, lane 3). To rule out cytosolic contamination due to cell lysis, immunoblots were probed with antibodies against the intracellular protein  $\beta$ -galactosidase. These results indicated that EcN Sat is secreted into the medium as a soluble 107-kDa protein. The C-terminal  $\beta$ -barrel domain of type V autotransporters remains inserted in the outer membrane. The absence of a cross-reactive band in the isolated OMVs is compatible with this secretion pathway, since the anti-Sat antibodies used do not recognize protein sequences of the  $\beta$ -barrel domain. The absence of a cross-reactive band in cellular extracts (Fig. 1, lane 4) is in accordance with the extracellular location of autotransporters of the SPATE family.



### The Sat protein encoded in the EcN genome displays serine protease activity

EcN Sat displays the functional motifs of the serine proteases of the SPATE family, including the catalytic triad formed by H, D and S residues, with the catalytic S256 residue comprised in the conserved GDSGSG motif (positions 254 to 259 in the protein sequence). To examine whether EcN Sat displays serine protease activity we cloned the EcN *sat* gene in pBR322 (pSat) and constructed the Sat mutant S256I by site-directed mutagenesis (pSat-S256I). These constructs were transformed into the *E. coli* strain HB101 lacking the *sat* gene, as well as into the mutant strain EcN*sat::cat* for comparison. Protease activity was assayed in concentrated culture supernatants obtained from LB cultures of these transformed cells by measuring hydrolysis of the colorimetric substrate methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide. We selected this substrate based on published results on the activity and specificity of several proteases of the SPATE family [19]. Supernatants of strains EcN, HB101 and EcN*sat::cat* were processed in parallel. In all samples the presence of Sat was assessed by Western blot using anti-Sat specific antibodies. Results are presented in Fig. 2a. Supernatants of EcN wild type displayed proteolytic activity, which was abolished by disruption of the *sat* gene (EcN*sat::cat*). The proteolytic activity in supernatants of Sat deficient cells transformed with pSat confirmed that the *sat* gene of the probiotic strain EcN encodes a functional serine protease. Consistently, all enzymatically active samples were completely inhibited by 30 min pre-incubation with the serine protease inhibitor PMSF. Expression from the recombinant plasmid pSat yielded activity levels, which were between 5–7 times higher than the expression from the chromosomal gene in EcN strain. In these supernatants, there was a correlation between proteolytic activity values and the amount of Sat protein

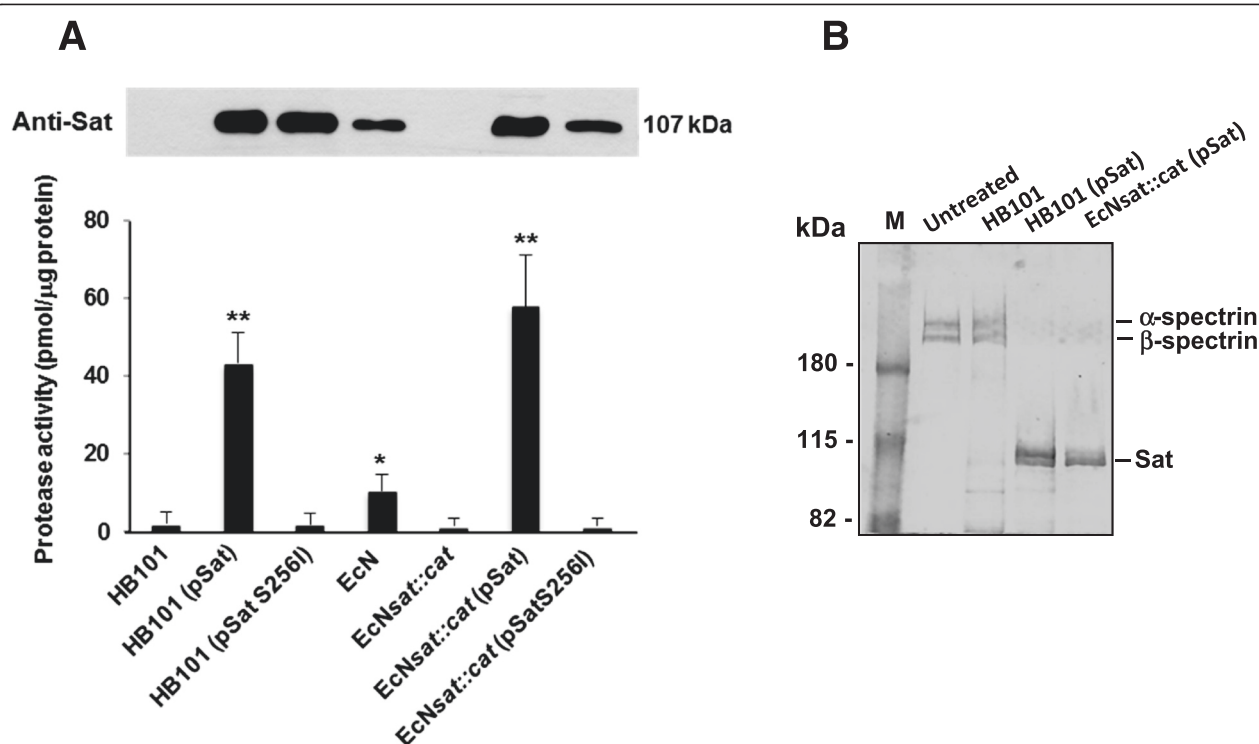
immunodetected with specific antibodies. The mutated Sat protein expressed from the recombinant plasmid pSat-S256I had negligible protease activity. These data confirmed Ser256 as the catalytic residue of EcN Sat.

To test whether the EcN toxin was active on known protein Sat substrates *in vitro*, concentrated culture supernatants of the recombinant HB101 or EcN*sat::cat* strains expressing the wild-type Sat protein were incubated with spectrin. Supernatants of HB101 were processed in parallel as a control. As shown in Fig. 2b, EcN Sat is able to degrade spectrin subunits. These results indicated that Sat from the probiotic strain is secreted as an active serine protease as the toxin from pathogenic *E. coli* strains.

### Analysis of EcN *sat* expression during colonization of the mouse intestine

Since the ecological niche of the commensal strain EcN is the intestinal tract we sought to analyze whether Sat is expressed *in vivo* during intestinal colonization of mice. To monitor *sat* expression, the *sat* promoter of strain EcN was cloned upstream the reporter gene *gfpmut3.1* of plasmid pFU34. This fragment extended 349 bp upstream from the ATG start codon. The recombinant plasmid pFU34-*sat* was transformed into EcN cells and expression of green fluorescent protein (GFP) was visualized by fluorescence microscopy. To check the functionality of this construct we first analyzed GFP expression in cells grown to exponential phase in LB as well as in DMEM or glucose minimal medium. To analyze whether expression of *sat* is temperature-regulated, cultures were incubated at either 37 °C or 25 °C. EcN cells harboring the vector pFU34 were processed in parallel for comparison. Results showed expression from the *sat* promoter in all growth conditions tested (see Additional file 1: Figure S1). Many virulence genes of bacterial pathogens that infect humans are controlled by temperature and their expression is induced at 37 °C [37–39]. Our results rule out temperature regulation of *sat* expression in EcN. To quantify the level of GFP expression in the culture media used, the emitted fluorescence was measured using the Turner BioSystems Modulus™ II Microplate reader. Control cultures of EcN harboring the vector pFU34 were performed in parallel. Expression values from the *sat* promoter were  $2.4 \times 10^4$  RFU/OD for cells grown in LB,  $2.6 \times 10^3$  RFU/OD in MM-glucose and  $2.9 \times 10^3$  RFU/OD in DMEM. Thus, maximal expression of *sat* was achieved in LB. Addition of compounds present in the gut such as sodium bicarbonate (3.7 g/l) or sodium deoxycolate (0.5 mg/ml) to cultures of EcN (pFU34-*sat*) in LB or MM-glucose did not increase the level of GFP expression from the *sat* promoter.





**Fig. 2** Serin protease activity of EcN Sat. **a** Concentrated culture supernatants (200 μg total protein) from the indicated *E. coli* strains were incubated with 1 mM methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide at 37 °C for 18 h. Activity values, expressed as pmoles/μg protein at 18 h, were the mean ± SE of three independent assays. Asterisks indicate values significantly different from that of the knockout mutant *EcNsat::cm* (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.000$ ). Expression of Sat analysed by Western blot in each culture supernatant is shown in the upper panel. **b** Spectrin degradation by EcN Sat. Spectrin (4 μg) was incubated with the indicated culture supernatants or left untreated. Reaction products were separated by SDS-6 % PAGE and stained by Commassie Blue. M, molecular mass marker

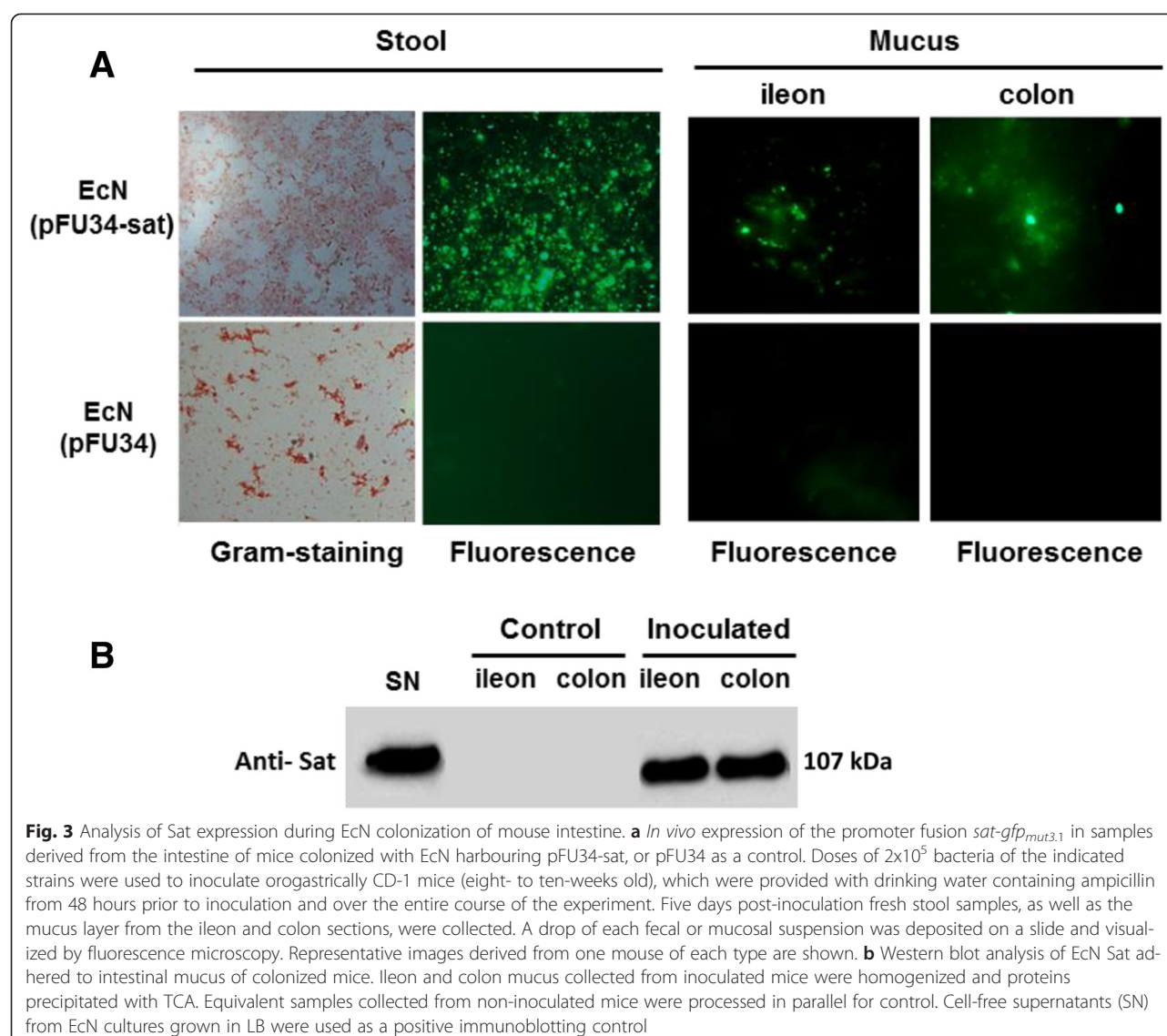
The absence of fluorescence background in control cells harboring the vector pFU34 grown in LB (see Additional file 1: Figure S1) prompted us to use this high-copy number fusion system for the analysis of *sat* expression *in vivo*. To this end, we inoculated orogastrically 8- to 10-week old CD-1 male mice with a suspension of EcN cells harboring plasmid PFU34-*sat* ( $n = 2$ ) or EcN cells harboring vector PFU34 ( $n = 2$ ). Control mice ( $n = 2$ ) were given PBS. Before starting the experiment stools were collected to assess the absence of Ap-resistant resident microbiota. Mice were given water containing 2 g/l ampicillin *ad libitum* 24 hours prior to inoculation and through the experiment. Five days post-inoculation, fresh fecal samples, as well as the mucus layer from ileon and colon sections, were collected and processed for quantification of bacteria by growth on LB-Ap plates. Two colonies of each bacterial count were analyzed by PCR with *sat* specific primers to confirm that the estimated colonization rates corresponded to the inoculated bacteria. A drop of each fecal or mucosal suspension was deposited on a slide and visualized by fluorescence microscopy.

The level of colonization was similar for all inoculated mice, around  $1-2 \times 10^9$  CFU/g of stool and  $3-5 \times 10^9$  CFU/g of mucus in ileon and colon sections (see Additional file 2: Table S1) whereas samples from non-inoculated mice gave no bacterial counts on LB-Ap plates. Expression of GFP was visualized only in samples collected from the two mice colonized with EcN harbouring the fusion plasmid pFU34-*sat* (Fig. 3a). These results indicated that EcN *sat* is expressed in distinct niches in the mouse intestine.

Expression of chromosome-encoded Sat was analysed by Western blot analysis of intestinal mucosa samples collected from inoculated mice using anti-Sat antibodies. Equivalent samples from non-inoculated mice were processed in parallel as a control. The presence of a 107 kDa protein in colon and ileon samples from inoculated mice confirmed *sat* expression during EcN intestinal colonization (Fig. 3b).

#### Sat-mediated cytotoxic effects on undifferentiated epithelial cells

The Sat protein secreted by UPEC and DAEC strains exerts cytotoxic effects on several epithelial cell lines. Internalized Sat induces disruption of F-actin cytoskeleton,

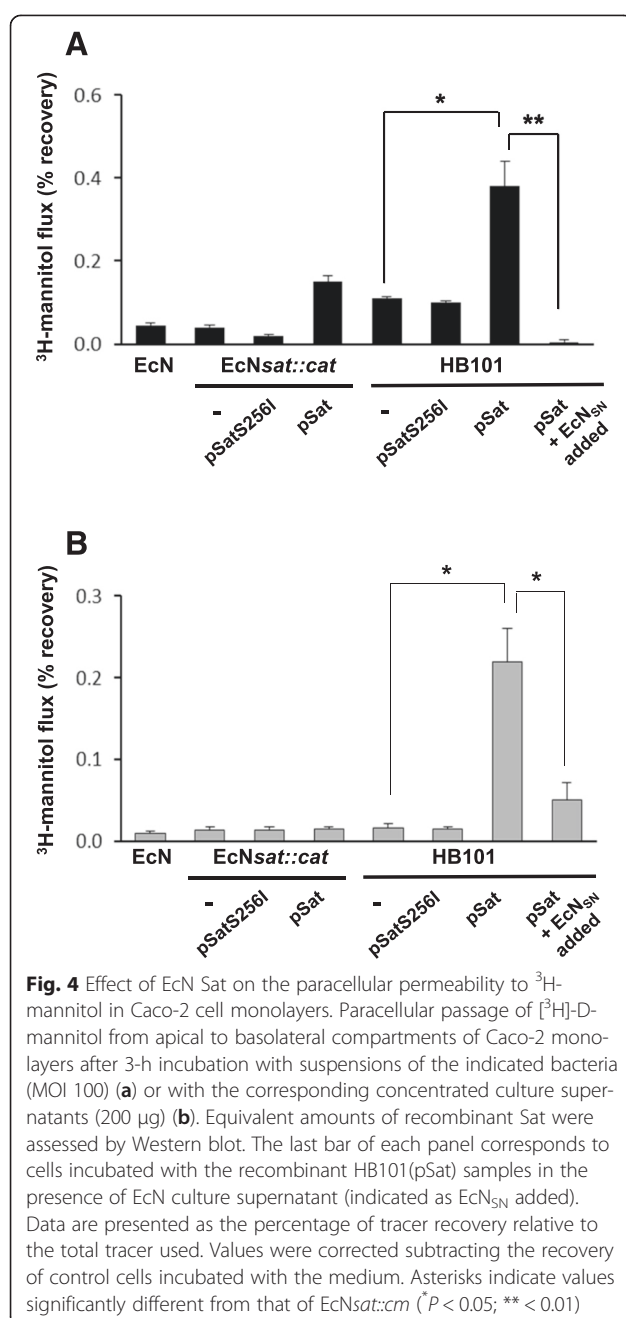


vacuolization and cell death in non-polarized epithelial cells [22], but these effects are not observed in fully differentiated Caco-2 cells [23]. As EcN Sat is an active protease we sought to examine whether the protein encoded in this probiotic strain could induce cytotoxicity in sub-confluent HeLa cells. To avoid cross-effects of other putative SPATEs encoded in the EcN genome like Vat [12], cell-free supernatants of strain HB101 expressing EcN Sat were used for this study. A decrease of cell viability, measured by the MTT assay, was observed in HeLa cells from 8 h-treatment with Sat-containing concentrated culture supernatants (see Additional file 3: Figure S2).

#### Effect of EcN Sat on paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers

To test whether Sat from the probiotic strain EcN affects the intestinal epithelial barrier, paracellular permeability

of polarized Caco-2 cells was measured using  $^3\text{H}$ -mannitol as a marker at 3 h post-infection with wild-type EcN and the recombinant strains HB101 and EcN*sat::cat* expressing Sat from plasmid pSat, or expressing the inactive Sat-S256I protein (Fig. 4a). We assessed that both recombinant strains (HB101 and EcN*sat::cat*) displayed equal growth rates in the culture medium DMEM. Incubations with the corresponding concentrated cell-free supernatants were performed in parallel (Fig. 4b). A significant increase in the paracellular passage of mannitol from apical to basolateral compartment was observed only in Caco-2 monolayers incubated with samples of HB101 bearing plasmid pSat (either bacterial suspensions or concentrated cell-free supernatants). Expression of the inactive Sat-S256I variant in this strain did not affect paracellular permeability, which indicates that activity of EcN Sat on the barrier integrity depends on its



proteolytic activity. These results are in accordance with those described for the Sat protein from DAEC strains [23] and suggest that the Sat protein encoded by probiotic strains may also induce disassembly of tight junction proteins. However, expression of comparable EcN Sat levels in the same probiotic background (strain EcNsat::cat bearing pSat) did not affect the paracellular permeability to <sup>3</sup>H-mannitol (Fig. 4). It is known that EcN positively modulates the epithelial barrier function by promoting the formation of tight junctions [5–7]. Therefore, other factors secreted by this probiotic strain may

counteract the negative effect of Sat on tight junction-associated proteins. To test this hypothesis Caco-2 monolayers were incubated either with bacterial suspensions or concentrated culture supernatants of strain HB101(pSat) in the presence of cell-free supernatants collected from the probiotic strain. In both cases, supernatants from the probiotic strain confer protection against the Sat effect on paracellular permeability to mannitol (Fig. 4). Cell free supernatants obtained from the mutant strain EcNsat::cat produced the same protective effect (not shown).

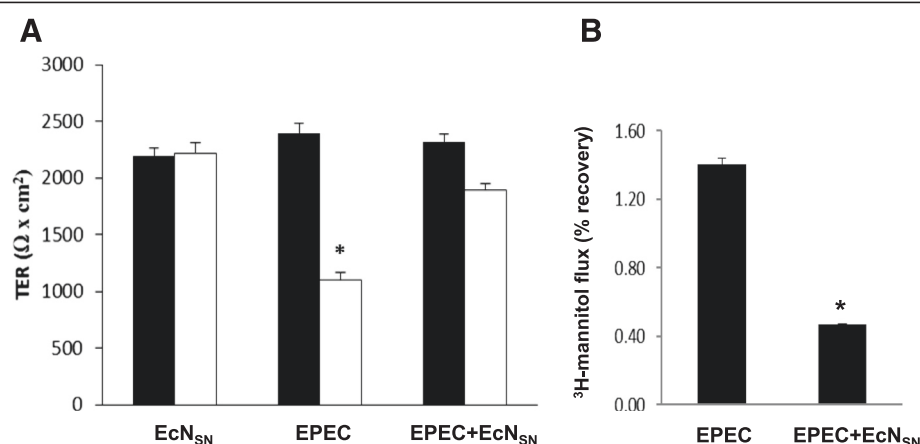
It has been described that the TcpC protein of EcN promotes upregulation of claudin-14 in HT-29/B6 cells, resulting in increased TER and reduced paracellular permeability to mannitol [7]. Other studies aimed at deciphering the mechanism by which EcN restores barrier integrity after enteropathogenic *E. coli* (EPEC) damage revealed that this probiotic strain induces ZO-2 expression and its redistribution to the cell membrane in polarized T84 cells. In this case the bacterial factor responsible for this effect was not identified [6]. Impairment of Sat-mediated damage of Caco-2 cell barrier by concentrated EcN culture supernatants (Fig. 4) indicated that the protective effect could be attributed to a secreted factor. Thus, we sought to evaluate the ability of EcN supernatants to prevent barrier disruption by EPEC in polarized Caco-2 cell monolayers. The reduction in TER caused by EPEC after 2 h-incubation was almost completely abolished when infection was performed in the presence of concentrated EcN supernatants (Fig. 5a). In addition, the EPEC- deleterious effect on paracellular permeability to mannitol was reduced by 70 % in the presence of EcN supernatant (Fig. 5b).

Overall these results indicate that EcN Sat is able to alter the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers. However, other factors secreted by the probiotic strain prevent barrier disruption caused by pathogen-related factors.

#### Effect of EcN Sat on gut colonization in mice

Some serine proteases of the SPATE family such as Pic [35] or SigA [40] contribute to intestinal colonization in animal models. In pathogenic *E. coli* strains, the corresponding knockout mutants displayed reduced colonization levels when compared to the wild-type strain. In contrast, other proteases of this family like SepA are not required for intestinal colonization [40].

To examine whether Sat has a role in gut colonization, the streptomycin-treated mouse model was used to compare the colonization capacity of the Sat deficient mutant versus the wild-type strain. Mice were inoculated with strain EcN Sm<sup>r</sup> R<sup>f</sup> (sat wild-type group) or with EcNsat::cat Sm<sup>r</sup> R<sup>f</sup> Cm<sup>r</sup> (sat mutant group). No significant differences in stool bacterial counts were observed



**Fig. 5** EcN culture supernatants impair EPEC-mediated effects on epithelial cell barrier. Caco-2 monolayers grown on Transwell filters were incubated with EPEC alone (MOI 50) or with EPEC (MOI 50) in the presence of EcN cell-free culture supernatant (200 µg total protein). Incubation of Caco-2 cells with EcN supernatants (EC<sub>SN</sub>) were performed in parallel as a control. **a** TER values before (black bars) and after 2 hours incubation (white bars) were presented. **b** Paracellular passage of [<sup>3</sup>H]-D-mannitol from apical to basolateral compartments of Caco-2 monolayers after 2-h incubation. Data are expressed as the percentage of tracer recovery relative to the total tracer used (\**P* < 0.05)

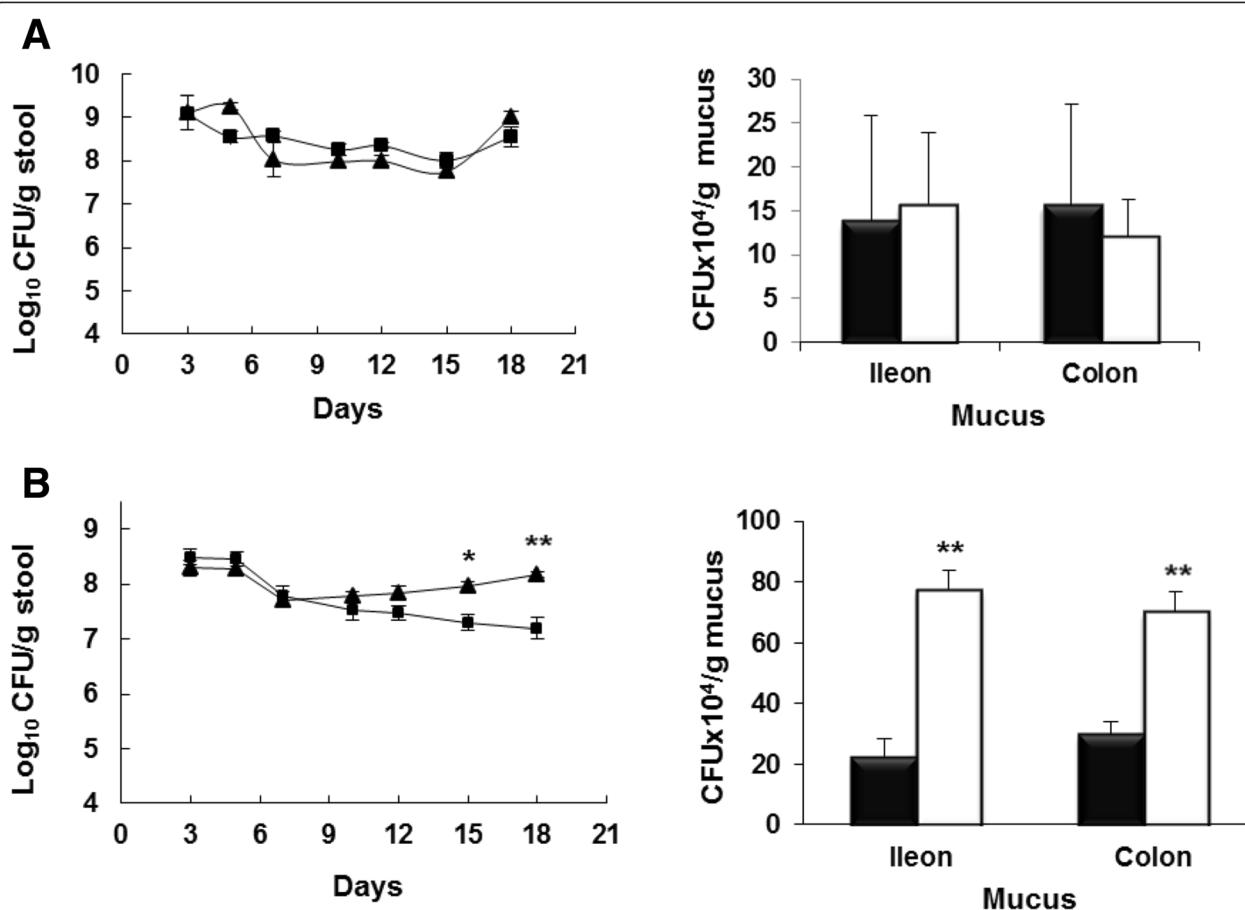
between the two groups through the experiment. For both strains colonization levels were between  $10^8$  to  $10^9$  CFU/g of stool (Fig. 6a). Quantification of adhered bacteria to mucus samples collected from ileon and colon on the last day of the experiment also yielded no significant differences between these strains when tested independently (Fig. 6a, right panel). These results suggested that Sat is not required for EcN colonization of the mouse intestine. They are in accordance with results obtained with UPEC strains in murine models of ascending urinary tract infections, in which the *sat* mutant colonized bladder and kidneys to the same extent as the wild type strain [18].

To better assess the contribution of Sat to intestinal colonization we approached competition experiments between the specific *sat* mutant and the wild-type strain. This approach is more sensitive for the evaluation of the colonization efficiency in streptomycin-treated mice [35]. Mice were given simultaneously  $1 \times 10^5$  CFU of each strain (co-infection group), and bacteria in stools were counted for 18 days. Results showed that wild type EcN was outcompeted by the *sat* mutant strain (Fig. 6b). The values of CFU/g stool were similar for both strains within the first several days (around  $5 \times 10^8$  CFU/g of stool) but significant differences were observed around day 10. After this time, colonization by wild-type EcN fell to  $10^7$  CFU/g stool at day 18. At the end of the experiment, bacterial counts in stools yielded percentages of 70 % for the mutant strain EcN*sat::cat* versus 30 % for the wild-type EcN. At day 18, quantification of adhered bacteria to the intestinal mucus layer also showed a higher proportion of the Sat deficient strain (70–80 % versus 20–30 % of the wild type strain).

Recently, an *in vivo* study performed with *Citrobacter rodentium* assigned to a class I SPATE protein (Crc1) a putative role in immunomodulation by controlling leukocyte infiltration and proinflammatory cytokines levels in mouse intestine [41]. Moreover, some class II SPATE proteins, like Pic and Tsh, cleave leukocyte surface glycoproteins causing diverse effects in leukocyte activation, migration and signalling [42]. A proteomic analysis aimed at identifying potential host targets of Sat from UPEC revealed a protein in the kidney membrane that is similar to the leukocyte function associated molecule 1 (LFA-1) [20]. LFA-1 is a member of the  $\beta 2$ -integrin family of cell surface receptors. This protein is a multifunctional adhesion molecule involved in various interactions in the immune system being involved in leukocyte migration [43]. Since lymphocyte migration to the gut is required for immune homeostasis, we sought to analyse whether surface associated LFA-1 in leukocytes could be degraded by EcN Sat. To this end we performed flow cytometry analyses of human PBMCs treated for 3 h with supernatants of strains EcN*sat::cat*, EcN*sat::cat* bearing plasmid pSat, HB101, and HB101 bearing either plasmid pSat or pSat-S256I. Labelling with anti-LFA-1 (anti CD-11/CD-18) antibodies that recognize the native protein followed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG did not show any significant difference between samples. These results indicated that leukocyte-associated LFA-1 is not a target of EcN Sat. Therefore the ability of the *sat* mutant strain to outcompete EcN in the intestinal tract cannot be attributed to a Sat effect on gut immune function mediated by LFA-1.

At present we cannot explain why the *sat* mutant outcompetes wild type EcN in the streptomycin-treated





**Fig. 6** Colonization of the mouse intestine by EcN and EcNsat::cat. **a** Two sets of four mice were fed independently with  $2 \times 10^5$  CFU of strain EcN Sm<sup>r</sup> Rf<sup>r</sup> (squares) or the mutant strain EcNsat::cat Sm<sup>r</sup> Rf<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup> (triangles). **b** Competition experiments: One set of four mice were fed with  $2 \times 10^5$  CFU of a mixture (1:1) of strains EcN Sm<sup>r</sup> Rf<sup>r</sup> (squares) and the mutant strain EcNsat::cat Sm<sup>r</sup> Rf<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup> (triangles). Three independent biological assays were performed for these competition experiments (total  $n = 12$ ). At the indicated times, stool samples were collected and processed for bacterial counting. Results are expressed as Log<sub>10</sub> CFU/g stool (left panels). At day 18, mice were sacrificed and sections from ileum and colon were removed from each mouse. The mucus layer from each fragment was scraped, homogenized and processed for bacterial quantification. Results, expressed as CFUx10<sup>4</sup>/g of mucus, were the mean  $\pm$  SE of the three independent biological assays (right panels). Asterisks indicate values significantly different from that of the parental strain EcN (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.000$ )

mouse model. Since growth rates of both strains in *in vitro* cultures are indistinguishable, this fact could be associated to a better performance of the *sat* mutant in the mouse intestine. In this sense, it has been described that mutations in *envZ*, which result in reduced expression of some outer membrane proteins, render EcN a better colonizer than the wild type EcN [44]. As EcN resides associated with other members of the microbiota in the mouse intestine, authors hypothesize that surface differences between the *envZ* mutant and wild-type EcN could result in different binding affinities for mixed biofilms, allowing the mutant strain to colonize niches than the wild-type strain cannot do. These mutants display reduced levels of specific porins, being more resistant to colicin and bile salts. In this context, the outer membrane of the *sat* mutant lacks the autotransporter  $\beta$ -

barrel domain, which presents a porin structure. We may speculate that this difference in bacterial surface may modify interactions with other microbiota members and/or the sensitivity to antimicrobial products released by other intestinal strains.

#### Prevalence of the *sat* gene in natural *E. coli* intestinal isolates

Epidemiological studies have shown a high prevalence of the *sat* gene in *E. coli* strains associated with urinary tract infections [18, 23]. Concerning strains causing intestinal infection, *sat* was detected in 46 % of 35 Afa/Dr DAEC strains isolated from diarrhoeagenic samples [23]. Similarly, a study aimed at evaluating the prevalence of several cytotoxins of the SPATE family in enteroaggregative *E. coli* (EAEC) isolates showed high frequency of the

*sat* gene in this group (74.5 % of 55 strains analysed). However, this study also revealed the absence of *sat* in all the enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), EPEC or enteroinvasive *E. coli* (EIEC) isolates analysed in parallel (10 strains of each group) [45]. In order to assess the prevalence of *sat* among natural *E. coli* intestinal isolates we performed a PCR survey. For this study we selected 29 *E. coli* strains of the ECOR collection [46] recovered from stools of healthy individuals. The strains were examined by PCR using specific primers that allow amplification of the DNA sequence encoding Sat. This screening showed ten positive isolates that yielded the expected *sat* amplification fragment (34.8 %). Accuracy of the PCR product was verified by nucleotide sequencing. Distribution of these ten *sat* positive isolates among the *E. coli* phylogenetic groups revealed a high prevalence of strains belonging to phylogenetic groups associated with virulent strains that cause extra-intestinal infections (80 %), namely group D (6 isolates) and group B2 (2 isolates) (Table 2). Only one intestinal isolate fits into the phylogenetic group A generally associated with non-pathogenic *E. coli* strains [47]. Expression of *sat* in these strains was evaluated by immunodetection of the secreted protein with specific antibodies against the passenger domain of Sat. All the intestinal isolates with the *sat* gene yielded a cross-reactive protein band in the Western blot analysis.

The Sat protein from the probiotic EcN differs in eight residues with respect to the UPEC protein, whereas only

three changes that fit into the non-conservative category (N352D, N729D and D894N) were observed when compared to the protein from DAEC strains (see Additional file 2: Table S2). Interestingly, among the commensal *sat* positive strains identified in this study, only EcoR56 displayed the same amino acid sequence as the Sat protein from pathogenic DAEC (D352, D729 and N894). The other strains expressed a Sat protein with N352, N729 and D894 residues as EcN Sat or with only one conservative change (N729S) (Table 2).

The presence of multiple virulence factors in the probiotic strain EcN raises the question as to why this strain does not cause symptomatic infections. Several possibilities have been proposed [12]. First, virulence genes may be inactivated in probiotic or commensal strains. On the other hand, some of these genes may encode factors that increase overall fitness during colonization of the human gut. As stated above, the distinction between virulence and fitness factors is not always clear. In addition, the role of a given virulence factor in pathogenesis may depend on the genetic background of the strain. In this sense, TcpC protein that is expressed by the probiotic strain EcN has been shown to contribute to UPEC virulence. This protein, with high prevalence in Gram-negative pathogens, contains a Toll/IL-1 receptor (TIR)-binding domain. In pathogens, TcpC interacts with Myd88 and inhibits TLR signalling and downstream pathways. By this mechanism, TcpC impairs innate immunity causing inflammation and tissue damage [48, 49]. However, in strain EcN, which displays anti-inflammatory and immunomodulatory effects, TcpC was shown to improve the intestinal barrier through upregulation of the tight junction-protein claudin-14 [7].

**Table 2** Characteristics of the *sat* positive strains from the ECOR collection isolated from stools of healthy humans<sup>a</sup>

| Strain               | Serotype              | Group | Sat amino acid residue at position |     |     |
|----------------------|-----------------------|-------|------------------------------------|-----|-----|
|                      |                       |       | 352                                | 729 | 894 |
| CFT073 <sup>b</sup>  | O6:K2:H1              | B2    | D                                  | D   | N   |
| IH11128 <sup>b</sup> | O75:K5:H <sup>+</sup> | B2    | D                                  | D   | N   |
| EcN <sup>b</sup>     | O6:K5:H1              | B2    | N                                  | N   | D   |
| ECOR24               | O15:NM                | A     | N                                  | N   | D   |
| ECOR35               | O1:NM                 | D     | N                                  | N   | D   |
| ECOR36               | O79:H25               | D     | N                                  | N   | D   |
| ECOR38               | O7:NM                 | D     | N                                  | N   | D   |
| ECOR39               | O7:NM                 | D     | N                                  | S   | D   |
| ECOR41               | O7:NM                 | D     | N                                  | S   | D   |
| ECOR43               | ONT:HNT               | E     | N                                  | S   | D   |
| ECOR49               | O2:NM                 | D     | N                                  | N   | D   |
| ECOR51               | O25:N                 | B2    | N                                  | N   | D   |
| ECOR56               | O6:H1                 | B2    | D                                  | D   | N   |

<sup>a</sup> Analyzed strains that did not yield *sat* amplification in the PCR screening: ECOR strains 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 26, 28, 42, 53, 54, 56, 59, 61 and 63

<sup>b</sup> Strains CFT073 (UPEC), IH11128 (Afa/Dr DAEC) and EcN were included for comparison

## Conclusions

Sat is one of the proteins with cytotoxic activity encoded in the EcN genome. Here we show that EcN Sat is a functional protease that is expressed in the mouse intestinal tract. Our results, together with other reports, indicate that both Sat function and Sat cytotoxicity may rely on other host- and bacterial factors. Regarding host factors, it should be stressed that Sat cytotoxic effects depend on the cellular line and the differentiation state. Sat-mediated disruption of actin cytoskeleton, vacuolization and cell detachment were not observed in monolayers of polarized Caco-2 cells, a model that mimics intestinal epithelium and barrier. It has been suggested that putative regulatory mechanisms may operate in polarized epithelia, which may impair Sat access or action on target intracellular proteins [23]. Considering the strain background, our results show that Sat-mediated increase in paracellular permeability of Caco-2 monolayers is impaired by other secreted factors encoded in the probiotic strain EcN. Thus, the role of Sat in

intestinal pathogenesis relies on the pattern of genetic determinants responsible for the bacterial pathotype. Expression of particular virulence factors may help Sat to meet specific intracellular target substrates.

At present the role of Sat in the probiotic strain remains elusive. Although Sat contributes to pathogenicity in the urine tract, the prevalence of *sat* in *E. coli* strains isolated from intestinal microbiota of healthy individuals suggests that Sat may not act as a virulence factor in the human gut. This hypothesis is in accordance with the very low prevalence of *sat* among several *E. coli* enteropathogenic groups (ETEC, EIEC, EPEC). The high prevalence of *sat* in intestinal *E. coli* strains of group D suggests that the presence of this gene may be advantageous for pathogenesis in extra-intestinal environments.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Expression analysis of the transcriptional fusion *sat-gfp<sub>mut3.1</sub>* in EcN grown in different conditions. (PDF 173 kb)

**Additional file 2: Table S1.** Bacterial populations in mouse stool, and ileal and colonic mucus at five days postinoculation with the indicated strains. Table S2. Variations in Sat sequence among *E. coli* strains. (PDF 165 kb)

**Additional file 3: Figure S2.** Effect of EcN Sat on cell viability. (PDF 197 kb)

## Abbreviations

Ap: Ampicillin; CFU: Colony forming units; Cm: Chloramphenicol; DAEC: Diffusely adherent *Escherichia coli*; DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium; EAEc: Enteraggregative *Escherichia coli*; EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917; EIEC: Enteroinvasive *Escherichia coli*; EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli*; ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*; FCS: Fetal calf serum; GFP: Green fluorescent protein; IPTG: Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside; LB: Luria-Bertani broth; LFA-1: Leukocyte function associated molecule; MM: Minimal medium; MOI: Multiplicity of infection; OD: Optical density; OMVs: Outer membrane vesicles; PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; PBS: Phosphate buffer saline; PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride; Rf: Rifampicin; RFU: Relative fluorescence units; Sat: Secreted autotransporter toxin; SDS: Sodium dodecyl sulphate; Sm: Streptomycin; SPATEs: Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*; Tc: Tetracycline; TCA: Trichloroacetic acid; TER: Transepithelial electrical resistance; UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli*.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contribution

LB and JB conceived of the study with the participation of RG in experimental design. LB and JB wrote the manuscript. RG and LA carried out data interpretation and statistical analysis as well as participated in revising the manuscript. LT prepared Caco-2 cultures, constructed the plasmids and mutant strains, and carried out activity measurements and Western blot analysis, as well as the *in vivo* mice experiments. MJF and MAC carried out PBMCs isolation and MTT assays. In addition, MJF performed flux cytometry analysis. RM-V carried out the paracellular permeability assays using mannitol as tracer and CSA performed the PCR screening of *sat* prevalence in ECOR human intestinal isolates. All authors read and approved the final manuscript.

## Authors' informations

Microbiota and Intestinal Epithelium Group, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB) and Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona. M.J. Fabrega

is a recipient of a predoctoral fellowship from the "Ministerio de Economía y Competitividad", Spain.

## Acknowledgments

This study was supported by grant AGL2012-34985 (co-financed with European Commission ERDF funds) from the "Ministerio de Economía y Competitividad", Spain, to LB. We acknowledge laboratories Ardeypharm for providing strain EcN, Brett Finley for the EPEC strain E2348/69, and Petra Dersch for plasmid PFU34.

## Author details

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain.

Received: 5 May 2015 Accepted: 25 October 2015

Published online: 30 October 2015

## References

- Kruis W, Fris P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 2004;53(11):1617–23.
- Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917-features of a versatile probiotic. *Microb Ecol Health Dis*. 2009;21:122–58.
- Jacobi CA, Malfertheiner P. *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis*. 2011;29:600–7.
- Trebichavsky I, Splichal I, Rada V, Splichalova A. Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* Nissle 1917. *Nutr Rev*. 2010;68(8):459–64.
- Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One*. 2007;2(12):e1308.
- Zyrek A, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol*. 2007;9:804–15.
- Hering NA, Richter JF, Fromm A, Wieser A, Hartmann S, Günzel D, et al. TspC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKCζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunol*. 2013; doi:10.1038/mi.2013.55
- Cress BF, Linhardt RJ, Koffas MA. Draft genome sequence *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (Serovar O6:K5:H1). *Genome Announc*. 2013;1:e0004713.
- Reister M, Hoffmeier K, Krezdorn N, Rotter B, Liang C, Rund S, et al. Complete genome sequence of the Gram-negative probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917. *J Biotech*. 2014;187:106–7.
- Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2004;186:5432–41.
- Sun J, Gunzer F, Westendorf AM, Buer J, Scharfe M, et al. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol*. 2005;117:147–61.
- Vejborg RB, Friis C, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972. *Mol Genet Genomics*. 2010;283:469–84.
- Hancock V, Vejborg RM, Klemm P. Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Mol Genet Genomics*. 2010;284:437–54.
- Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun*. 2001;69:1231–43.
- Henderson IR, Navarro-García F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68:692–744.
- Dautin N. Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins*. 2010;2:1179–206.
- Ruiz-Perez F, Nataro JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity and role in virulence. *Cell Mol Life Sci*. 2013; doi:10.1007/s00018-013-1355-8

18. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. Identification of *sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2000;38:53–66.
19. Dutta PR, Capello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun*. 2002;70:7105–13.
20. Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes F-E, Mobley HLT. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic. *Infect Immun*. 2006;74(11):6124–34.
21. Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL. *Sat*, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun*. 2002;70(8):4539–46.
22. Liévin-Le Mola V, Comenge Y, Ruby V, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL. Secreted autotransporter toxin (*Sat*) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. *Cell Microbiol*. 2011;13(7):992–1013.
23. Guignot J, Chaplais C, Coconnier-Polter MH, Servin AL. The secreted autotransporter toxin, *Sat*, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2007;9(1):204–21.
24. Taddei CR, Fasano A, Ferreira AJ, Trabulsi LR, Martinez MB. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;250(2):263–9.
25. Grozdanov L, Zähringer U, Blum-Oehler G, Brade L, Henne A, Knirel YA, et al. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2002;184:5912–25.
26. Boronat A, Aguilar J. Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J Bacteriol*. 1979;140:320–6.
27. Fuqua WC. An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques*. 1992;12:223–5.
28. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
29. Uliczka F, Pisano F, Kochut A, Opitz W, Herbst K, Stolz T, et al. Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. *PLoS One*. 2011;6(6):e20425.
30. Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, et al. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1190–203.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–73.
32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;222:680–5.
33. Aguilera L, Tolozza L, Giménez R, Odena A, Oliveira E, Aguilar J, et al. Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics*. 2014;14:222–9.
34. Roig-Pérez F, Cortadellas N, Moretó M, Ferrer R. Intracellular mechanisms involved in docosahexaenoic acid-induced increases in tight junction permeability in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2010;140:1557–63.
35. Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun*. 2009;77(6):2465–73.
36. Leatham MP, Banerjee S, Autieri SM, Mercado-Lubo R, Conway T, Cohen PS. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun*. 2009;77(7):2876–86.
37. Konkel ME, Tilly K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbiol Infect*. 2000;2:157–66.
38. Duong N, Osborne S, Bustamante VH, Tomljenovic AM, Puente JL, Coombes BK. Thermosensing coordinates a cis-regulatory module for transcriptional activation of the intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Biol Chem*. 2007;282:34077–84.
39. Kamp HD, Higgins DE. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002153.
40. Munera D, Ritchie JM, Hatzios SH, Bronson R, Fang G, Schadt EE, et al. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. *Nat Commun*. 2014;5:3080.
41. Vijayakumar V, Santiago A, Smith R, Smith M, Robins-Browne RM, Nataro JP. Role of class I serine protease autotransporter in the pathogenesis of *Citrobacter rodentium* colitis. *Infect Immun*. 2014;82(6):2626–36.
42. Ruiz-Perez F, Wahid R, Fatherty CS, Kolappaswamy K, Rodriguez L, Santiago A, et al. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:12881–6.
43. Salmi M, Jalkanen S. Molecules controlling lymphocyte migration to the gut. *Gut*. 1999;45:148–53.
44. Adediran J, Leatham-Jensen MP, Mokszycki ME, Frimodt-Møller J, Krogfelt KA, Kazmierczak A, et al. An *Escherichia coli* Nissle 1917 missense mutant colonizes the streptomycin-treated mouse intestine better than the wild type but is not a better probiotic. *Infect Immun*. 2014;82(2):670–82.
45. Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(2):294–301.
46. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*. 1984;157(2):690–3.
47. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555–8.
48. Cirl C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, Fisher H, et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med*. 2008;14:399–406.
49. Yadav M, Zhang J, Fischer H, Huang W, Lutay N, Cirl C, et al. Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathog*. 2010;6(9):e1001120.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

