

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. EL TRACTO GASTROINTESTINAL	3
2. MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	3
3. DIVERSIDAD DE NICHOS EN EL INTESTINO	8
3.1 Estómago	8
3.2 Intestino delgado	9
3.3 Intestino grueso	9
4. LA BARRERA MUCOSA DEL INTESTINO	10
4.1 Capa de mucus	10
4.2 Epitelio intestinal	11
4.3 Tejido conectivo (membrana basal y lamina propia)	13
4.3.1 Colágeno de tipo IV	15
4.3.2 Laminina	15
4.3.3 Fibronectina	15
4.3.4 Fibrinógeno	16
4.3.5 Colágenos de tipo fibrilar	16
4.4 Tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal	16
5. BACTERIAS LÁCTICAS	19
5.1 <i>Lactobacillus casei</i>	20
6. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS	21
7. CONTRIBUCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS A LA FUNCIÓN BARRERA INTESTINAL	24
7.1 Efectos sobre el epitelio	25
7.1.1 Incrementando la secreción de mucus por las células caliciformes	25
7.1.2 Produciendo ácidos grasos de cadena corta	26
7.1.3 Incrementando la secreción de péptidos antimicrobianos (β -defensinas) por parte de los enterocitos	27
7.1.4 Favoreciendo la estabilidad de las uniones estrechas disminuyendo la permeabilidad epitelial a patógenos o sus productos	28
7.1.5 Promoviendo la homeostasis intestinal a través de rutas de señalización específicas	29
7.2 Efectos sobre el sistema inmune asociado a mucosas	30
7.2.1 Incrementando el número de células productoras de inmunoglobulina A en la lámina propia	30
7.2.2 Promoviendo la secreción de la IgA al mucus luminal	31
7.3 Efectos sobre otros miembros de la microbiota	31
7.3.1 Compitiendo por sitios de unión con comensales o patógenos	31

7.3.2	Competiendo por la disponibilidad de sustrato	33
7.3.3	Produciendo sustratos metabolizables por determinados miembros de la microbiota beneficiosos para el hospedador	33
7.3.4	Matando (efecto bactericida) o inhibiendo el crecimiento (efecto bacteriostático) de bacterias patógenas al liberar factores antimicrobianos como las bacteriocinas	34
8.	PROCESO DE ADHESIÓN EPITELIAL	35
9.	MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA ADHESIÓN DE PROBIOTICOS	36
10.	SUPERFICIE CELULAR DE LOS LACTOBACILOS	38
10.1	Pared celular	40
10.1.1	Peptidoglicano	41
10.1.2	Ácidos teicoicos	43
10.1.3	Polisacáridos de pared	44
10.1.4	Proteínas de superficie	45
10.1.4.1	Proteínas unidas a la membrana por inserción de segmentos hidrofóbicos	45
10.1.4.2	Lipoproteínas	46
10.1.4.3	Proteínas ancladas covalentemente a pared por acción de las sortasas	46
10.1.4.4	Anclaje no covalente por dominios específicos que reconocen algún componente de la pared (CWBD1, CWBD2, LysM, GW, SLHD, WxL, SH3b)	50
10.1.4.5	Moonlighting proteins	53
11.	SISTEMAS DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LACTOBACILOS	55
11.1	SEC (<i>Secretion</i>)	55
11.2	Holin (Formador de poros)	56
11.3	(<i>Fimbrilin-Protein Exporter</i>)	56
11.4	<i>Peptide Efflux ABC Transporters</i>	57
12.	ADHESINAS DE LACTOBACILOS	57
12.1	Proteínas de unión a mucus	58
12.2	Proteínas de la capa de superficie (<i>S-layer</i>) como adhesinas	59
12.3	Proteínas que median la adhesión a la matriz extracelular	60
12.3.1	Unión a colágeno	60
12.3.2	Unión a fibronectina	61
12.4	Proteínas <i>moonlighting</i> como factores de adhesión	61
12.5	Adhesión mediada por factores no proteicos	62
12.5.1	Ácidos lipoteicoicos	62
12.5.2	Exopolisacáridos	63
	BIBLIOGRAFÍA	65

OBJETIVOS	77
CAPÍTULO 1: Adhesion properties of <i>Lactobacillus casei</i> strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix.	79
ABSTRACT	82
INTRODUCTION	83
MATERIALS AND METHODS	85
Strains and growth conditions	85
Adhesion to solvents test	86
<i>Ex vivo</i> binding assay	86
Microtitre plate binding assays	88
Yeast agglutination assay	89
Bioinformatic analysis	89
RESULTS	90
Adhesion properties to solvents	90
Binding to human colon fragments <i>ex vivo</i>	92
<i>In vitro</i> binding to mucin and ECM components	93
DISCUSSION	100
ACKNOWLEDGEMENTS	104
REFERENCES	105
CAPÍTULO 2: Characterization of a fibronectin-binding protein from <i>Lactobacillus casei</i> BL23	109
ABSTRACT	112
INTRODUCTION	113
MATERIALS AND METHODS	115
Strains and growth conditions	115
Construction of an <i>L. casei</i> BL23 <i>fbpA</i> mutant	115
Microtitre plate binding assays	117
Adhesion to solvents test	118
Adhesion to Caco-2 and HT-29 cell lines	119
Purification of 6X(His)FbpA and binding assays	119
Preparation of antiserum to 6X(His)FbpA	120
Isolation of cellular fractions and western blot	121
Statistical analysis.	121

RESULTS	122
Characterization of an <i>L. casei</i> BL23 strain mutated in <i>fbpA</i>	122
<i>L. casei</i> FbpA binds to fibronectin	126
Cellular location of FbpA	128
FbpA in other <i>L. casei</i> strains	129
DISCUSSION	132
ACKNOWLEDGEMENTS	135
REFERENCES	136
CAPÍTULO 3: Shotgun phage display of <i>Lactobacillus casei</i> BL23 against collagen and fibronectin	139
ABSTRACT	142
INTRODUCTION	143
MATERIALS AND METHODS	145
Strains and growth conditions	145
Construction and screening of an <i>L. casei</i> BL23 shotgun phage-display library	145
ELISA of individual clones	147
Protein expression and purification	147
<i>In vitro</i> binding assays	148
RT-PCR	149
RESULTS	150
Identification of <i>L. casei</i> peptides interacting with collagen and fibronectin by phage display	150
Ability of purified XpkR, ps356 and LCABL_01820 to bind collagen and fibronectin	153
Expression of <i>xpkR</i> , <i>ps356</i> and LCABL_01820 in <i>L. casei</i> BL23.	155
DISCUSSION	156
ACKNOWLEDGEMENTS	158
REFERENCES	159
CAPÍTULO 4: Identification of surface proteins from <i>Lactobacillus casei</i> BL23 able to bind fibronectin and collagen	163
ABSTRACT	166
INTRODUCTION	167
MATERIALS AND METHODS	169
Bacterial Strains and Growth Conditions	169
Isolation of <i>L. casei</i> Surface Proteins and Immunoplate Binding	169
Purification of GST Fusion Proteins	170
Immunoplate Binding Assays with Purified Proteins	171
RESULTS	172
<i>L. casei</i> BL23 Surface Proteins that Bind Fibronectin and Collagen	172
Verification of Binding of Enolase and GAPDH	174
DISCUSSION	176
ACKNOWLEDGEMENTS	178
REFERENCES	179
CAPÍTULO 5: Four sortase genes are present in the genome of <i>Lactobacillus casei</i> BL23. Mutant construction and characterization.	183

ABSTRACT	186
INTRODUCTION	188
MATERIAL AND METHODS	191
Strains and growth conditions	191
Homology searches	191
Construction of <i>L. casei</i> mutants in <i>srt</i> genes	193
Adhesion to solvents test	196
Adhesion to Caco-2 and HT-29 cell lines	196
Microtitre plate binding assays	197
Determination of enzymatic activities	198
Isolation of cellular fractions and localization of Nuc reporter fusions	198
RT-PCR analysis	199
Statistical analysis	199
RESULTS	200
The <i>L. casei</i> BL23 genome carries four sortase genes.	200
Putative sortase substrates in <i>L. casei</i> BL23.	204
Construction of mutants in <i>L. casei</i> BL23 sortases.	213
Characterization of the effect of sortase mutations in <i>L. casei</i>	215
Cell surface characteristics	215
Adhesion properties of <i>srt</i> mutants	217
Determination of enzymatic activities	219
Anchoring of a heterologous protein to <i>L. casei</i> surface.	221
Transcriptional analysis of sortase genes	221
DISCUSSION	223
ACKNOWLEDGEMENTS	228
REFERENCES	229
DISCUSIÓN GENERAL	233
CONCLUSIONES FINALES	247