

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA
Y FUNCIONAL DEL SISTEMA
MICROCINA MccH47/MccM EN
EL PROBIÓTICO *Escherichia
coli* NISSLE 1917**

DANIEL ANTONIO BRAVO VÁZQUEZ

Madrid, 2009

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Caracterización Genética y
Funcional del Sistema Microcina
MccH47/MccM en el Probiótico
Escherichia coli Nissle 1917**

Memoria que para optar al título de doctor
presenta **Daniel Antonio Bravo Vázquez**,
licenciado en Farmacia.

Directores de la Tesis: Dr. Fernando Baquero y
Dra. Rosario Baquero.

Servicio de Microbiología
Hospital Ramón y Cajal
Madrid, 2009

El Dr. **Fernando Baquero Mochales**, Profesor de Investigación, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal y

La Dra. **M^a Rosario Baquero Artigao**, Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Alfonso X el Sabio.

Por la presente, certifican que,

La memoria titulada “Caracterización genética y funcional del sistema microcina MccH47 / MccM en el probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917”, que presenta el doctorando **D. Daniel Antonio Bravo Vázquez**, Licenciado en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente, y optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid, a ocho de junio de dos mil nueve.

Dr. Fernando Baquero
Director de la Tesis
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario “Ramón y Cajal”
Madrid

Dra. María Rosario Baquero
Directora de la Tesis
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Alfonso X el Sabio
Madrid

Dr. Antonio Sillero
Profesor Emérito
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Madrid

Ami Famisia

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de los años transcurridos para elaborar esta memoria, he ido encontrando muchas personas cuya ayuda ha sido de valor incalculable a la hora de afrontar las adversidades. Estoy en deuda con todas ellas y quiero expresarles mi agradecimiento.

En primer lugar agradezco al Dr. Fernando Baquero, la supervisión de mi trabajo, así como la oportunidad que me brindó para trabajar en el servicio de microbiología. Siempre admiré su forma de vivir y sentir la microbiología.

A la Dra. Rosario Baquero, codirectora de este trabajo, por su amistad y su elegante forma de enseñarme.

A la Dra. Rosa del Campo. Por su inestimable ayuda, por sacar tiempo donde fuese para solucionar los problemas y avatares que surgían. Sinceramente sin su apoyo e insistencia, no hubiera sido posible.

Al Dr. Juan Carlos Galán, por las conversaciones de ciencia que tanto disfruté y por el ánimo que siempre transmite.

A mis numerosos compañeros de laboratorio de la Unidad de Genética Molecular: Felipe Moreno, José Luís San Millán, Concepción Hernández-Chico, Ignacio del Castillo, Manuela Villamar, Miguel Ángel, Francisco del Castillo, Eduardo González, Yolanda Santo Domingo, Noelia Valle, Ana Uriarte, Araceli, Alejandra Pera, Silvia, Montse, Ángeles, Rosa Calvo, Gema Villuendas, Luís, Julio Varea, Ana Valero, Lourdes, Carmen Martín, Miguel Virivay, Santos del Campo y Javier, Marisa Morosini, Carmen Turgentes. Rosario (secre), Isabel, Dori y Fernando. Con su ayuda constante y desinteresada me ayudaron a superar los momentos complicados.

A nuestros visitantes internacionales: Krist Mahanty y familia, de Nueva Zelanda; Sophie sablè y David Vignon, de La Rochelle (Francia); Gino Corsini y J. Antonio Castillo de Santiago de Chile; Delphine Ducreux de París, Vanessa Migliosi de Trento (Italia). Raúl Carozo de Córdoba (Argentina), Ibis, Jorge e Isis de la Habana (Cuba). De todos ellos aprendí nuevas formas de entender la vida.

A la Dra. Margarita Medina, por permitirme seguir creciendo, por su apoyo y su confianza. Sin su empuje no hubiera sido posible.

A mis compañeros del Departamento de Tecnología de Alimentos: Marga, Manuel Núñez, Pilar Gaya, Estrella Fernández, Chiqui, Joaquín, Eva, Sonia, Pilar π , Victoria, Juan Arqués, Jaime, Marta, Raquel, Rakel, María de Alba, Tomi, Rocío, Ana

Gil, Ana, Anita, Ana Gómez, Javi Calzada, Ángela, Tamar, Cristina, Bea, Elma, Máximo, Buenaventura, Sagrario, Pilar López, Noemí, David, Olga, Marcia y Eloisa (Brasil). Sin olvidarme de Ignacio Riscos y Pepe Baudín. Qué decir de todos vosotros, son tantas las cosas que he de agradecer: amistad, compañerismo, apoyo incesante, familiaridad, confianza. Gracias a todos.

A mis compañeros de Carrera: Ana Isabel Casado, Myriam, Rosa González Quevedo, Alfonso Candilejo, Alfredo Alcalde y Laura. Por confiar en mí.

A mis amigos: Ismael, Osvaldo, Marta, Félix, Carlos, Bea, Sergio, Juanma, Martín, Ximo, David V, Alberto, Iván y David Pardo. Por tantos momentos buenos y malos que hemos compartido, por la historia que nos enriquece y especialmente por confiar en mi.

A mis padres, que siempre han apoyado mis decisiones y con su estímulo han hecho posible que de una forma u otra consiguiera mis sueños.

A mi familia: Leo y Ernesto por hacerme participe de la ilusión familiar; Alba y Ana, mis dos pequeñas sobrinitas, que son la nueva ilusión de la familia; con especial cariño al ancianito abuelo José; María y Maite, mis cuñadas; mis primos Laura y Sergio; tío José; Antonia y Manolo y a los que ya no están. Es imposible que nombre a todos.

Al Prof. Antonio Sillero, tutor de esta tesis, por su interés en el tema de las microcinas y especialmente por su ayuda en la presentación de esta memoria.

A la Empresa Ardeypharm GMBH por la financiación que ha hecho posible que se desarrollara el trabajo.

Final mente, agradecer al Hospital Ramón y Cajal el haber podido realizar en sus instalaciones toda la parte experimental de esta memoria.

*"El tiempo es demasiado lento para aquellos que esperan
demasiado rápido para aquellos que temen,
demasiado largo para aquellos que sufren
y demasiado corto para aquellos que se regocijan.
Pero, para aquellos que aman, el tiempo
es la eternidad..."*
anónimo inglés

*"El tiempo es el mejor autor:
siempre encuentra un final
perfecto".*

Charles Chaplin

*"Las casualidades son esas
pequeñas circunstancias que
dan un giro a nuestra
existencia".*

Maria Zambrano

"Muere lentamente quien evita una pasión y su remolino de emociones"
Pablo Neruda

RESUMEN

La cepa comensal de *Escherichia coli* Nissle 1917, fue aislada en 1917 a partir de las heces de un soldado alemán que, a diferencia del resto de sus compañeros, no desarrolló un proceso de enterocolitis. Esta cepa es el componente activo del probiótico Mutaflor®, que se utiliza en el tratamiento de varios desordenes y alteraciones digestivas y se comercializa en Alemania. Estudios preliminares demostraron que la cepa producía una actividad bactericida que era activa frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente frente a cepas de *E. coli*.

En esta memoria, demostramos que la cepa Nissle 1917 produce dos actividades antibióticas del tipo microcina: la microcina H47 y una nueva microcina que hemos denominado microcina M. Ambas están codificadas en una misma región en el cromosoma y todos los genes implicados en su producción, exportación e inmunidad han sido caracterizados. Los genes estructurales y de inmunidad de ambas microcinas se encuentran en los extremos del fragmento de DNA implicado en la producción y los genes que codifican las proteínas de modificación y exportación, que son compartidas por ambas, se localizan en el centro del fragmento. La similitud entre las proteínas estructurales y las proteínas de inmunidad de las dos microcinas sugiere un mismo mecanismo de acción y, probablemente un origen común.

SUMMARY

Nissle 1917, a commensal strain of *E. coli* was isolated in 1917 from the stool of a German soldier who, in contrast to all his comrades, did not develop enterocolitis. This strain is the active component of the probiotic Mutaflor®, which is used for the treatment of various gastrointestinal disturbances and diseases and is commercialized in Germany. Previous studies demonstrated that the strain was able to produce a bactericidal activity active against *Enterobacteriaceae*, especially against strains of *E. coli*.

In this work, we demonstrate that the strain Nissle 1917 produces two microcin antibiotic activities: microcin H47 and a new one that we have called microcin M. Both are encoded on the same region on the chromosome and all the genes involved in their production, export and immunity have been characterized. Structural and immunity genes for both microcins are located on the extremes of the DNA fragment involved in production and the genes encoding modification and export proteins, that are shared by both microcins, are located in the middle of the fragment. The similarity found between structural proteins and between immunity proteins of both microcins, suggest the same mode of action and, probably, a common origin.

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing several large, oval-shaped biological cells with a textured surface. These cells are surrounded by a dense network of smaller, branching, and filamentous structures, possibly representing a microbial community or a specific tissue type. The overall appearance is highly detailed and complex.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 PROBIÓTICOS.	3
1.1.1 Presencia en el hospedador diana por adhesión a su epitelio intestinal.	3
1.1.2 Ausencia de patogenicidad.	4
1.1.3 Resistencia a las condiciones del aparato digestivo.	4
1.1.4 Capacidad de resistencia a los procesos tecnológicos.	5
1.1.5 Viabilidad durante toda la vida útil del producto.	5
1.1.6 Evidencia científica de los efectos beneficiosos específicos en estudios clínicos correctamente diseñados.	6
1.2 LA CEPA <i>Escherichia coli</i> NISSLE 1917	8
1.2.1 La cepa Nissle 1917 como probiótico.	9
1.2.2 Evidencias científicas que justifican la utilización de <i>E. coli</i> Nissle 1917.	10
1.2.3 Características más relevantes de de la cepa Nissle 1917.	11
1.3 LAS MICROCINAS.	13
1.3.1 Moduladores de los nichos ecológicos.	13
1.3.2 Definición de microcina.	13
1.3.3 Clasificación.	14
1.3.4 Aplicaciones de las microcinas.	16
1.4 SIDERÓFOROS.	17
1.4.1 Enterobactina.	17
1.4.2 Salmoquelina.	19
2. OBJETIVOS.	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	25
3.1 ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIÓFAGOS.	27
3.2 MEDIOS DE CULTIVO.	28
3.3 ANTIBIÓTICOS E INDICADORES.	28
3.4 OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES.	28
3.5 SOLUCIONES Y TAMPONES.	30
3.6 MÉTODOS.	31
3.6.1 Clonaje de regiones cromosómicas <i>in vivo</i> : El fago Mu.	31
3.6.2 Obtención de lisados de los bacteriófagos mini-MudII4042 y mini-Mud5005.	32
3.6.3 Aislamiento de los plásmidos mini-MudII4042 que recuperan el fenotipo productor de microcinas.	32

3.6.4 Aislamiento de mutantes no productores de microcina por medio de mutagénesis con transposones mini-Tn5.	32
3.6.5 Test de producción de microcina.	33
3.6.6 Test de inmunidad a la microcina.	33
3.6.7 Manipulaciones de DNA.	34
3.6.8 Test de complementación.	34
3.6.9 Clonación de genes por PCR	34
3.6.10 Secuenciación de los fragmentos de PCR.	34
3.6.11 Método de la PCR Vectorette.	35
4. RESULTADOS.	37
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA <i>E. coli</i> NISSLE 1917.	39
4.2. SISTEMA MICROCINA.	40
4.2.1 Intento de clonación del sistema microcina mediante el método de clonación in vivo empleando mini-Mu.	40
4.2.2 Inserciones con mini-MudII1681: mutante MFH20	40
4.2.3 Obtención de mutantes no productores de Microcina M mediante Inserciones mini-Tn5.	42
4.2.4 Obtención de fragmentos cromosómicos de Nissle 1917 capaces de restaurar la capacidad de producir microcina M en los mutantes aislados previamente.	44
4.2.5 Derivados del plásmido pRH7.1.	45
4.2.6 Secuenciación de la región clonada en el plásmido pRH7.1.	48
4.2.7 Comparación entre pRH7.1 y pEX4.	49
4.2.8 Nissle 1917 produce dos microcinas: MccH47 y MccM.	52
4.2.9 Secuencia del derivado pEX5 y pEX101.	55

4.2.10 El gen <i>mchA</i> es necesario para la producción de MccH47 y MccM.	55
4.2.11 Clonación de <i>mchA</i> .	56
4.2.12 Construcción del plásmido híbrido pHM1.	56
4.2.13 Genes de inmunidad específica y precursor de microcina M (<i>mcmI</i> y <i>mcmA</i>).	58
4.2.14 Genes de inmunidad específica y precursor de microcina H47 (<i>mchI</i> y <i>mchB</i>).	60
4.2.15 Mutagénesis sobre el plásmido híbrido.	62
4.2.16 Búsqueda del homólogo a <i>mchA</i> en el genoma de Mutaflor.	63
4.2.17 Clonación del homólogo a <i>mchA</i> .	64
4.2.18 Secuencia del plásmido pMM30.	65
4.3 DESCRIPCIÓN DE LOS GENES.	66
4.3.1 Gen precursor de la microcina M: <i>mcmA</i> .	66
4.3.2 Gen específico de inmunidad a microcina M: <i>mcmI</i> .	67
4.3.3 Gen precursor de la microcina H47: <i>mchB</i>	68
4.3.4 Gen de inmunidad de la microcina H47: <i>mchI</i> .	69
4.3.5 El gen <i>mchX</i> : Un gen de función desconocida.	70
4.3.6 Genes <i>mchC</i> y <i>mchD</i> : sistema de maduración.	71
4.3.7 Genes de transporte: <i>mchE</i> y <i>mchF</i> .	71
4.3.8 Los genes <i>mchA</i> y <i>mcmG</i> : codifican glicosiltransferasas.	72
4.3.9 Gene <i>mchS</i> : Enteroquelinesterasa.	74
4.3.10 Diferencias a la izquierda de <i>mchX</i> entre pEX4 y pRH7.1.	75
4.3.11 Diferencias a la derecha de <i>mchF</i> entre pEX4 y pRH7.1.	76
4.4 OTROS GENES FUERA DEL SISTEMA MICROCINA IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE MICROCINA Y/O EN LA ESTABILIDAD DE LAS CEPAS PRODUCTORAS.	80
4.4.1 Mutación “FinZ”.	80
4.4.2. Mutación TolC.	81

5. DISCUSIÓN.	83
5.1 MICROCINAS.	85
5.1.1 Un sistema genético compartido.	85
5.1.2 Sistema de secreción.	87
5.1.3 Genes estructurales de MccH47 y MccM.	88
5.1.4 Genes de inmunidad.	90
5.1.5 MccM y MccT.	92
5.1.6 Genes de modificación: 1) <i>mccG</i> , 2) <i>mccS</i> , 3) <i>mccC</i> y 4) <i>mccD</i> .	93
5.1.7 Otros Genes implicados.	95
5.1.8 Comparación con el genoma de <i>E. coli</i> O157:H7.	95
5.1.9 Modelo propuesto de la síntesis, modificación y exportación de MccM y MccH47	96
5.2 ADDENDUM A LA DISCUSIÓN.	98
5.2.1 El mapa genómico de la cepa <i>E. coli</i> Nissle 1917.	98
5.2.2 Resumen esquemático de los factores de adaptación en <i>E. coli</i> Nissle 1917.	101
6. CONCLUSIONES.	103
7. BIBLIOGRAFÍA.	107

FIGURAS

Figura 1.1 Presentación farmacéutica del preparado.	9
Figura 1.2 Agrupación genética del sistema enteroquelina.	18
Figura 1.3 Salmoquelinas.	19
Figura 3.1 Esquema del mecanismo de empaquetamiento del mini-Mu.	31
Figura 3.2 Esquema de los mini transposones Tn5.	33
Figura 4.1 Southern blot con ADN genómico de las cepas MC4100 (1), MFH20 (2) y Nissle 1917 (3).	41
Figura 4.2 Esquema de: (A) obtención de mutantes no productores de Microcina M. (B) Clonación de las inserciones en plásmidos y (C) Obtención de fragmentos cromosómicos de Nissle 1917 capaces de restaurar la capacidad de producir microcina.	43
Figura 4.3 Derivados plasmídicos de pRH7.1.	47
Figura 4.4 Estructura del plásmido pRH7.1.	48
Figura 4.5 Comparación de los plásmidos pEX4 y pRH7.1.	50
Figura 4.6 Plásmidos pHM1 y pHM2.	57
Figura 4.7 Placas con diferentes tapices indicadores.	60
Figura 4.8 Inserciones del mini transposón λ NK1316 sobre pMM21.	63
Figura 4.9 Southern Blot utilizando como sonda el producto amplificado de <i>mchA</i> ..	64
Figura 4.10 Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los péptidos precursores de microcinas.	66
Figura 4.11 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de inmunidad de las microcinas.	67
Figura 4.12 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen <i>mchB</i> de diferente origen.	69
Figura 4.13 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen <i>mchI</i> de diferente origen.	69

Figura 4.14 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las glicosiltransferasas.	74
Figura 4.15 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen de inmunidad específica a microcina M (<i>mcmI</i>) de diferentes orígenes.	77
Figura 3.16 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del final del gen <i>mcmA</i> Origen microcina H47 (pEX4) y Nissle 1917 pRH7.1.	78
Figura 4.17 Genoma de la cepa enterohemorrágica <i>E. coli</i> O157:H7.	79
Figura 5.1 Representación de los perfiles transmembrana para las dos proteínas de inmunidad.	92
Figura 5.2 Predicción dominios transmembrana de la proteína McmM con el programa informático DAS.	93
Figura 5.3 Predicción de los dominios transmembrana de la proteína McmT.	93
Figura 5.4 Comparación genoma de <i>E. coli</i> O157:H7 EDL933 y sistema microcina Nissle 1917.	96
Figura 5.5 Esquema donde se representa la captación y la secreción de las microcinas.	97
Figura 5.6 Mapa genómico de <i>E. coli</i> Nissle 1917 basado en el cromosoma de <i>E. coli</i> cepa MG1655. Se indican las Islas Genómicas (GEIs).	99
Figura 5.7 Valoración comparativa del tamaño del genoma de <i>E. coli</i> Nissle 1917 mediante digestión con <i>CeuI</i> , <i>AvrII</i> .	100
Figura 5.8 Resumen esquemático de los factores de adaptación en <i>E. coli</i> Nissle 1917.	101

TABLAS

Tabla 1.1 Características de las microcinas descritas.	15
Tabla 3.1 Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.	27
Tabla 3.2 Oligonucleótidos cebadores.	29
Tabla 4.1 Genes inactivados por las inserciones estudiadas.	44
Tabla 4.2 Fenotipos de inmunidad y producción de microcina.	51
Tabla 4.3 Fenotipos de inmunidad y producción de microcina.	53
Tabla 4.4 Fenotipos de inmunidad y producción de microcina.	54
Tabla 4.5 Fenotipos de inmunidad y producción de microcina.	56
Tabla 4.6 Fenotipos de inmunidad y producción de microcina.	58
Tabla 4.7 Fenotipos de inmunidad y producción de microcina.	61
Tabla 5.1 Porcentajes de igualdad en aminoácidos de las proteína accesorias y trasportadores ABC en las microcinas.	88
Tabla 5.2 Porcentaje de aminoácidos idénticos entre los precursores de las microcinas.	89
Tabla 5.3 Porcentajes de igualdad entre las proteínas de inmunidad de algunas microcinas.	91

Abreviaturas:

Ap	ampicilina
Ap ^R	resistente a ampicilina
(B)	<i>Bam</i> HI
Cm	cloranfenicol
Cm ^R	resistente a cloranfenicol
(E)	<i>Eco</i> RI
EBI	European Bioinformatics Institute
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
(G)	<i>Bgl</i> II
(H)	<i>Hind</i> I
IS	secuencia de inserción
Km	kanamicina
Km ^R	Resistente a kanamicina
M	Molar
MccE	microcina E-492
MccH47	microcina H47
MccI	microcina I
MccM	microcina M
MccN	microcina N24
MccV	microcina V
MF	Mutaflor
Mucts	Profagos con la mutación <i>cts62</i> , donde el gen <i>c</i> , codifica un represor termosensible.
(N)	<i>Nde</i> I
Nº	número
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open reading frame
(P)	<i>Pst</i> I.
Pb	pares de bases
SD	Shine-Dalgarno.

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing several large, oval-shaped biological cells with numerous fine, hair-like projections extending from their surfaces. The cells are arranged in a somewhat circular pattern, with smaller, similar structures scattered throughout the background. The overall appearance is that of a complex biological structure, possibly a microorganism or a specialized cell type.

INTRODUCCIÓN

1.1 PROBIÓTICOS

La palabra probiótico deriva de dos vocablos, del latín *-pro-* que significa por o en favor de, y del griego *-bios-* que quiere decir vida. La definición más reciente ha sido introducida por la OMS, definiendo probiótico como “organismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud” (WHO 2002). Esta última definición es la más amplia de todas las anteriores, y reconoce los resultados de recientes investigaciones que demuestran que el efecto probiótico no debe restringirse al ámbito intestinal.

Los probióticos, también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos, estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo y en ocasiones se utilizan para prevenir y tratar las infecciones entéricas y gastrointestinales (Perdigón *et al.*, 2002).

Según la OMS/FAO, para que se pueda considerar un microorganismo como probiótico, tiene que cumplir una serie de premisas:

1.1.1 Presencia en el hospedador diana por adhesión a su epitelio intestinal.

En un principio se consideraba que las cepas aisladas del ser humano podrían ejercer una acción probiótica más eficaz, dado que tendrían supuestamente mayor capacidad para colonizar el epitelio gastrointestinal que las cepas aisladas en otros ámbitos (Holzapfel y cols., 1998; Ouwehand y cols., 1999; Shortt, 1999). A pesar de ello, muchos preparados comerciales contienen cepas que no son de origen humano. (Dunne y cols., 2001). Así la capacidad de adhesión de una cepa al epitelio es una de las características que se han de tener en cuenta como criterio de selección para que un microorganismo pueda ser considerado como un nuevo probiótico (Rinkinen y cols., 2000, 2003; Kirjavainen y cols., 1998) independientemente de el origen (FAO/WHO (2002).

1.1.2 Ausencia de patogenicidad.

Algunas bacterias incluidas dentro de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como unas pocas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son reconocidas como microorganismos seguros para la salud humana (GRAS, "Generally Regarded As Safe") (Ishibashi y Yamazaki, 2001) y está admitida la ausencia de patogenicidad de una forma generalizada

Sin embargo, los probióticos son bacterias administradas vivas y cabe la posibilidad de que pudieran comprometer la salud del consumidor. Especies de *Streptococcus*, *Enterococcus* y algunas bacterias lácticas pueden ocasionar infecciones en humanos y animales, como por ejemplo endocarditis y abscesos hepáticos (Gasser., 1994). La OMS, apoyándose en las opiniones de diversos autores, propone unos criterios para evaluar el riesgo de cada cepa para la salud: presencia de factores de virulencia reconocidos, capacidad de invasión, resistencia a antibióticos y facilidad de intercambio de material genético mediante conjugación o transformación. (Salminen y cols., 1998a, O'Brien y cols., 1999; Rolfe, 2000 Ouwehand y cols., 2001)

1.1.3 Resistencia a las condiciones del aparato digestivo

Una cepa probiótica tiene que llegar al intestino, establecerse y mantenerse de un modo viable y de esta forma producir el efecto beneficioso para la salud. Todo ello implica una tolerancia y resistencia a la acidez del estómago y a las enzimas gástricas y pancreáticas (Zarate y cols., 2000; Dunne y cols., 2001; Fernández y cols., 2003; Reid y cols., 2006). Una vez en el intestino la bacteria tiene que adherirse al epitelio intestinal, la adhesión se realiza mediante los exopolisacáridos, las proteínas y los ácidos lipoteicoicos de la superficie celular (Pretzer y cols., 2005; Doron y cols., 2006; Ruas-Madiedo y cols., 2006). La capacidad de los probióticos para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales es una peculiaridad propia de cada cepa dentro de una misma especie (Charteris y cols., 1998; 1998a, Zavaglia y cols., 1998; Xanthopoulos y cols., 2000; Zárate y cols., 2000). Asimismo, la forma en la que se administran los probióticos puede modificar la supervivencia de las cepas. En el caso concreto de *L. rhamnosus* GG se demostró que la supervivencia era diferente si se ingería en forma de comprimidos, cápsulas, leches fermentadas o bebidas de soja (Saxelin y cols., (1993, 1995). Han de señalarse los resultados obtenidos por Del Campo *et al.*, 2005 en los que no se detectaron microorganismos probióticos del yogur en las heces de los sujetos

sanos sometidos al ensayo doble ciego en el que se administraban yogures frescos y yogures pasteurizados. Tan sólo se pudo poner de manifiesto mediante técnicas de hibridación, restos de DNA en el 10 % de los sujetos que en ese momento estaban tomando yogur fresco. Este resultado no contradice el efecto prebiótico ejercido por el yogur (García-Albiach, *et al.*, 2008). En esos ensayos se observaron mediante técnicas moleculares tipo DGGE y PCR cuantitativa, que los sujetos que consumían yogur, experimentaban cambios cualitativos en la composición de la flora intestinal, aumentando la proporción de *C. perfringens* y de bacterias lácticas en detrimento de *Bacteroides*.

1.1.4 Capacidad de resistencia a los procesos tecnológicos.

Los criterios tecnológicos más importantes que han de considerarse a la hora de seleccionar la cepa son: facilidad de cultivo, viabilidad y estabilidad del producto. Otros factores que afectan a la estabilidad durante el procesado y el almacenamiento son la temperatura, la acidez y la composición del producto, así como la resistencia de las cepas a la congelación y a la liofilización (Shah, 2000; Chagarovskii y Zholkevskaja, 2003; Wang y cols., 2004). En los productos lácteos se debe tener en cuenta la compatibilidad de los cultivos iniciadores (Oberman y Libudzisz, 1998). Factores como la aerotolerancia y la resistencia a bacteriófagos también deben de tenerse en cuenta a la hora de facilitar la manipulación.

1.1.5 Viabilidad durante toda la vida útil del producto.

Debe garantizarse la viabilidad de las cepas y la conservación de sus propiedades durante el proceso de producción, almacenamiento y distribución del probiótico. La presencia de la bacteria no debe suponer una modificación negativa de las propiedades organolépticas de los alimentos finales (Ouwehand y cols., 2001; Tuomola y cols., 2001). Se aplican los principios del sistema APPCC (Análisis de peligros y puntos de control críticos) para garantizar que los productos llegan al consumidor con la máxima calidad posible. La concentración de una cepa probiótica en un producto debe ser de 10^8 UFC/ml o superior (Shortt, 1999). La FAO/WHO (2002), recomendó que los datos acerca de género, especie, cepa, y su dosis mínima de microorganismos viables al final de su vida útil, tendrían que quedar marcados en la etiqueta de los productos, junto con la cantidad necesaria del producto que se debe consumir para obtener beneficio.

1.1.6 Evidencia científica de los efectos beneficiosos específicos en estudios clínicos correctamente diseñados.

El consumo de probióticos ha sido relacionado con un conjunto de efectos beneficiosos para la salud: mayor tolerancia a la lactosa, modulación del sistema inmunitario, disminución de los niveles de colesterol en sangre, disminución de la tensión arterial, protección frente algunas enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y tumorales (Gill, 2003). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* indicaron que existen ciertas cepas capaces de proporcionar efectos beneficiosos para la salud existiendo diferencias entre cepas de la misma especie (Naidu y cols., 1999). Es necesario estandarizar los efectos probióticos *in vivo* en cualquier laboratorio donde se realicen (Diplock y cols., 1999; Yoon y cols., 1999) y el efecto probiótico debe ser patente e inequívoco en al menos dos estudios humanos correctamente diseñados e independientes.

Beneficios más importantes observados:

- Las bacterias ácido lácticas producen una variación del pH intestinal, aportan enzimas hidrolíticas que mejoran la absorción de aminoácidos (Fernández y cols., 1987). También producen ácidos grasos de cadena corta (AGCCs), como el ácido butírico y el ácido propiónico, que suponen un suplemento energético para las células de la mucosa del colon (Rolfe, 2000; Leopold y Eilelelr, 2000) y permiten mantener un pH apropiado (Mallet y cols., 1989).

- Diversas especies como *L. rhamnosus GG*, *Lactobacillus reuteri*, *Sreptococcus boulardii*, *Bifidobacteria spp.* han demostrado tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la diarrea del viajero (Hilton y cols., 1997), causada por rotavirus (Saavedra y cols., 1994),

- En enfermedades hepáticas de muy diversas etiologías también se han demostrado efectos beneficiosos de los probióticos como *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* y *Enterococcus faecium* (Nanji y cols., 1994; Cunnihgam-Rungles y cols., 2000; Gorbach, 2000; De Santis y cols., 2000; Shanahan, 2001; Solga, 2003).

- *L. rhamnosus GG* mejora la sintomatología de la artritis crónica (Malin y cols., 1997), disminuye la duración de la diarrea aguda causada por rotavirus (Marteau y cols.,

2001) y reacciones alérgicas que cursan con eczemas (Isolauri y cols., 2000; Murch, 2001; Vanderhoof, 2008; Pohjavuori y cols., 2004.).

- *L. acidophilus* puede disminuir considerablemente el número de células cancerígenas en el colon de ratas (De Santis y cols., 2000). En otros estudios sobre animales con cáncer de colon se observa una disminución del número de células cancerígenas cuando ingieren *Lactobacillus GG* (Goldin y cols., 1996). La acción positiva de *Bifidobacterium longum* se observó también en ratas con tumores de mama (Orrhage y cols, 1994; Kim, Y. et al., 2008). Parece existir algunas evidencias científicas de que las bacterias lácticas pueden reducir el riesgo de cáncer por interacción con algunos productos mutagénicos.

- Tras la administración de *L. reuteri* los valores de colesterol y de los triglicéridos decrecieron en un 40 % de los sujetos (Taranto y cols, 1998) reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Se observó el mismo efecto tras la administración de *L. sporogenes* reduciendo un 32% los niveles de colesterol tras su administración durante 3 meses (Mohan, 1990). El tratamiento conjunto de *L. acidophilus* y de un prebiótico, como los fructooligosacáridos, disminuye las concentraciones de colesterol en suero (Schaafsma y cols., 1998; Giacco, R., et al., 2004).

- Mejoras en la sintomatología de la vaginosis tras la administración de algunas especies de lactobacilos, posiblemente por su producción de metabolitos ácidos (Mc Lean y Rosenstein, 2000).

- *Lactobacillus salivarius*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii* y *L. casei* posiblemente sean capaces de inhibir *Helicobacter pylori* (Aiba y cols., 1998, Bazzoli y cols., 1992; Michetti y cols., 1999; Marteau y cols., 2001; Mac Farlane y Cummings, 2002). Diversos estudios han mostrado una disminución en los síntomas clínicos de inflamación intestinal, pouchitis, Síndrome de Crohn y colitis ulcerosa tras consumo de diferentes cepas de lactobacilos (Gorbach y cols., 1987; Campieri y Gionchetti, 1999; Rembacken y cols., 1999; Caplan y Jilling, 2000; Rolfe, 2000; Sanan, 2001, Marteau y cols., 2001, Mc Farlane y Cummings, 2002; Ouwehand y cols., 2002). Todas estas enfermedades parecen tener una etiología bacteriana causando reactividad en tejidos, movilidad intestinal, alteraciones en la absorción, secreción y permeabilidad intestinal (Verdu y Collins, 2004). Con la administración terapéutica del probiótico se ejerce un

efecto beneficioso en estos desórdenes intestinales, por un aumento de las IgA, y en la regulación de las citoquinas inflamatorias.

Los microorganismos probióticos utilizados en la actualidad:

- Las Bacterias Ácido-Lácticas (LABs) constituyen el principal grupo de microorganismos probióticos:

- Especies de *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *L. casei*, *Lactobacillus crispatus*, *L. bulgaricus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *L. johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus*.

- Especies de *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*.

- Otras Bacterias Lácticas: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Leuconostoc mesenteroides*, y una serie de bacterias cuya actividad probiótica es controvertida como *Pediococcus acidilacti*, *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis*.

- Otros microorganismos: *Bacillus cereus toyoi*, ***Escherichia coli cepa Nissle 1917***, *Propionibacterium fredenreichii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii*.

1.2 LA CEPA *Escherichia coli* NISSLE 1917

La cepa *E. coli* Nissle 1917 (DSM 6601) de Colección Alemana de Microorganismos. Fue aislada en 1917 por el Profesor de Higiene y Salud Pública de la Universidad de Freiburg, el Dr. Alfred Nissle en la región de Dobrudsha, en la Península Balcánica. La cepa fue aislada a partir de las heces de un soldado combatiente en la 1ª Guerra Mundial que, a diferencia del resto de la tropa, no sufrió un proceso diarreico severo (Nissle, 1925). El Dr. Nissle estaba especialmente interesado en los procesos de antagonismo bacteriano entre bacterias filogenéticamente próximas, y supuso que dicha cepa de *E. coli* podría ejercer fenómenos antagónicos que favoreciesen el desplazamiento de los microorganismos patógenos. Posteriores estudios *in vitro* mostraron que la cepa Nissle 1917 podía inhibir a diferentes cepas de *E. coli* y otras enterobacterias (Papavassiliou, 1959; Nissle, 1925), lo que hizo suponer que

podría sintetizar una sustancia de naturaleza peptídica con carácter antibiótico que en aquel momento llamaron colicina X (Papavassiliou, 1959). Los estudios de antagonismo entre *E. coli* Nissle 1917 y otras enterobacterias, demostraron que la actividad antibacteriana inhibía a cepas de *E. coli*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, pero en cambio no afectaba a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacterium anitratum* o *Pseudomonas*. Los géneros *Salmonella* y *Proteus* también resultaron ser resistentes en la mayor parte de los ensayos realizados (Papavassiliou, 1961).

1.2.1 La cepa Nissle 1917 como probiótico.

La cepa Nissle 1917 es el componente activo del probiótico Mutaflor®. Este preparado farmacéutico está constituido por la cepa liofilizada y recubierta con una capa que la protege del pH ácido del estómago, liberándose en el tracto intestinal las bacterias probióticas. Se utiliza en algunos países, como en Alemania y en Polonia, dónde se posee una amplia experiencia empírica en el tratamiento de alteraciones y desordenes gastrointestinales (Grabig *et al.*, 2006; Krammer *et al.*, 2005; Kruist *et al.*, 2004; Lodinova-Zadnikova *et al.*, 2004; Malchow, 1997; Rembacken *et al.*, 1999).



Figura 1.1: Presentación farmacéutica del preparado.

1.2.2 Evidencias científicas que justifican la utilización de *E. coli* Nissle 1917:

- Se observó que la cepa *E. coli* Nissle 1917 fue capaz de inducir fuertemente la producción del péptido antimicrobiano humano beta-defensina-2 (hBD-2) por las células Caco-2 del epitelio intestinal. Este fenómeno fue dosis dependiente (Wehkamp. J., et al., 2004).
- El tratamiento de células Caco-2 con Nissle 1917 produjo la activación de la expresión de 126 genes que codifican moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria. Las más importantes: ligando 2 de la proteína de monocitos quimio-atrayente (MCP-I), proteína inflamatoria de macrófagos 2 alfa (MIP-2 α) y proteína inflamatoria de macrófagos 2 beta (MIP-2 β) (Ukena. S., et al., 2005).
- La cepa *E. coli* Nissle 1917, inhibió el ciclo celular y la expansión de células T de sangre periférica, no afectando a células T de la mucosa. Al mismo tiempo disminuyeron los niveles de ciclinas D2 y B1, la expresión de la proteína retinoblastoma contribuyendo en la disminución de la proliferación de células T en sangre periférica. También disminuyeron los niveles de: interleukina-2(IL-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón ganma. Por el contrario aumentaron los niveles de interleukina 10 (IL-10) en células T de sangre periférica (Sturm. A., et al., 2005).
- El probiótico mostró una eficacia y seguridad idéntica a la producida por el fármaco mesalazina (ácido 5 amino salicílico) en el tratamiento de la colitis ulcerosa (Kruis. W., et al., 2003 y 2004).
- En niños con un proceso diarreico agudo de etiología inespecífica, la administración de *E. coli* Nissle 1917 redujo el número de días y de deposiciones líquidas, disminuyendo la probabilidad de complicaciones (Henker. J., et al., 2007).
- La utilización de el probiótico en el ganado disminuye la probabilidad de padecer diarrea por los terneros, reduciendo se la utilización de antibióticos así como la posibilidad de aparecer resistencias (Von Buenau. R. et al., 2005).
- Por último, aprovechando la ventaja de la facilidad y rapidez de colonización de las mucosas, *E. coli* Nissle 1917, se utilizó como herramienta para sintetizar un péptido híbrido con actividad anti VIH (HIV-gp41-hemolisina A). Este péptido bloquea la entrada del virus en las células (Rao, S. et al., 2005).

1.2.3 Características más relevantes de de la cepa Nissle 1917:

Para su administración como probiótico, la empresa que comercializa Mutaflor encargó la realización de estudios a distintos grupos (incluido el nuestro en el Hospital Ramón y Cajal) para caracterizar la cepa a distintos niveles. Los resultados más significativos se mencionan en la continuación y se muestran esquemáticamente en el Figura 2:

- Gran capacidad de inhibir a microorganismos patógenos (Nissle, 1925).
Impide el crecimiento y reduce los niveles de toxina Shiga en cultivos de *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) (Reissbrodt *et al.*, 2009).
- Capacidad de modular el sistema inmunitario. Es importante resaltar que el serotipo de esta cepa es O6:K5:H1, ya que el antígeno O6 le confiere propiedades inmunomoduladores, (Grodanov. L., *et al.*, 2002).
- Ausencia de mecanismos de virulencia como: α -hemolisina, fimbrio-adhesinas P, y el fenotipo de polisacárido semirugoso (Blum *et al.*, 1995).
- Expresión de factores de adaptación como microcinas (trabajo que se presenta en esta tesis), sistemas de captación del hierro, producción de adhesinas y proteasas que contribuyen a la colonización del intestino humano (Grozdanov *et al.*, 2004).

La cepa Nissle 1917 es capaz de colonizar el intestino (Schultz *et al.*, 2005), se adhiere a la mucosa y a las células epiteliales sin dañarlas expresando las fimbrias de tipo I y fimbrias F1C (Stentebjerg-Olesen. B., *et al.*, 1999). Para aumentar su capacidad de crecimiento, multiplicación y adaptación al medio, la cepa expresa diferentes sistemas de captación de hierro tipo aerobactina, colibactina, enterobactina, yersiniabactina y también un sistema de captación de hierro dependiente de citrato y hemina (Grozdanov *et al.*, 2004).

Con estudios basados en técnicas de PCR se demostró la presencia de regiones comunes en cepas patógenas y no patógenas aisladas de diferentes orígenes. En la cepa Nissle 1917 muchos factores de adaptación conocidos se localizaron en cuatro islas genómicas (GEIs), que fueron parcialmente secuenciadas y analizadas.

E. coli partial Genomic Island I, strain Nissle 1917 (acceso: AJ586887)

E. coli partial Genomic Island II, strain Nissle 1917 (acceso: AJ586888)

E. coli partial Genomic Island III, strain Nissle 1917 (acceso AJ586889)

E. coli partial Genomic Island IV, strain Nissle 1917.

Utilizándose los datos disponibles del genoma de *E. coli* K12 cepa MG1655 y el de las cepas uropatógenas *E. coli* CFT073 y 536 se encontraron grandes similitudes en la estructura del genoma de todas estas cepas. Un ejemplo claro es el antígeno O6 que está ampliamente extendido entre aislados de *E. coli* patógenas (muy a menudo encontrado entre cepas uropatógenas). EL lipopolisacárido (LPS) formado por un hexa-acil lipido A bisfosforilado y un tetradecasacárido como unidad de repetición del antígeno O6, ambas partes unidas a un núcleo de tipo R1. El antígeno O6 en Nissle 1917 tiene la peculiaridad de estar formado por una única unidad de repetición. Esta característica le confiere un fenotipo rugoso responsable de muchas propiedades de la cepa en relación con la adhesión e inmunomodulación (Grodanov. L., et al., 2002).

1.3 LAS MICROCINAS.

1.3.1 Moduladores de los nichos ecológicos.

El ser humano es el soporte de numerosos microorganismos que forman parte de ecosistemas muy diferentes como la piel, las mucosas, etc., denominada microbiota. Una de las comunidades bacterianas más importantes se ubica en el intestino grueso, donde conviven diversas especies implicadas en procesos fisiológicos y patológicos.

Todas estas poblaciones están sometidas a constantes fluctuaciones, variaciones y sucesos que no pueden ser comprendidas en su totalidad por los procesos mecánicos, biológicos o de nutrición que tienen lugar en el huésped. Una parte de estos procesos podrían ser explicados con el concepto de amensalismo entre especies, ya que es conocido que algunas bacterias secretan compuestos antibióticos de naturaleza peptídica (bacteriocinas) que impiden el desarrollo de otros microorganismos (Reeves, 1965; Tagg *et al.*, 1976).

Inicialmente, las bacteriocinas producidas por *E. coli* (colicinas) parecían ser responsables de los fenómenos descritos anteriormente (Fredericq., 1963), (Pugsley., 1984) y (Riley., 2002), aunque rápidamente se constató que debido a su elevado peso molecular y su naturaleza proteica, las colicinas son inmediatamente inactivadas por proteasas (Baquero y Moreno., 1984), (Kolter y Moreno., 1992). Posteriormente se identificaron otros antibióticos de bajo peso molecular, denominados microcinas, que son resistentes a proteasas y se producen en medios pobres en nutrientes (Aguilar, *et al.* 1982). La mayoría de los organismos productores de estas microcinas pertenecen a la especie *E. coli*, aunque también existen otros géneros productores de microcinas como *Klebsiella* (de Lorenzo *et al.*, 1984), *Proteus* (Nieradko., 1976) y *Enterobacter* (Hamon y Perón., 1963) (Freitag y Friedrich., 1981).

1.3.2 Definición de microcina.

Las microcinas son sustancias con actividad antibiótica de bajo peso molecular (menos de 10.000 Daltons) producidas por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Baquero and Moreno, 1984), que se diferencian de las colicinas, no sólo por su tamaño sino porque su producción no es inducida por las condiciones o por los agentes

desencadenantes de la respuesta SOS (Asensio *et al.*, 1979; Baquero, and Moreno. 1984).

Las microcinas son activas frente a varias especies de bacterias Gram-negativas, filogenéticamente próximas a los microorganismos que las producen (Sánchez., 1981). Las cepas microcinogénicas son insensibles a la microcina que producen, característica que denominamos inmunidad. La mayoría de las microcinas son péptidos sintetizados en el ribosoma en forma de precursor, que después sufren una modificación enzimática específica, transformándolas en activas (Kolter and Moreno. 1992).

Casi todas las microcinas son producidas cuando las bacterias dejan de dividirse, es decir, cuando entran en fase estacionaria (Martin, Demain, A. L. 1980). Emplean sistemas activos de transporte celular para ser secretadas al medio externo, de forma que no afectan a la viabilidad de las células (Kolter and Moreno, 1992). Esta característica también las diferencia de las colicinas, que para ser liberadas al medio provocan la lisis celular activada por una fosfolipasa (Cavard, 2002; Pugsley and Schwartz, 1984).

1.3.3 Clasificación.

Experimentos de inmunidad cruzada entre cepas microcinogénicas, así como sus propiedades físico-químicas y su espectro de acción, permitieron clasificar inicialmente las microcinas en cinco clases: A, B, C, D y E. En años sucesivos, la lista se ha ido ampliando con nuevos tipos denominados: H, J, K, L y N. Algunas moléculas clasificadas inicialmente como colicinas, colicina X (San Millán *et al.*, 1987), microcina V, colicina G y colicina H, son en realidad microcinas porque tienen un peso molecular pequeño y porque su producción no se induce con los agente que dañan el DNA (Patzner *et al.*, 2003). En la Tabla.1.1, se resumen las principales características de las microcinas mejor caracterizadas:

Tabla 1.1 Características de las microcinas descritas.

Microcina	Masa molecular	Estructura	Localización	Modo de acción	Referencias
MccA15	0,5 kDa	Derivado de metionina	Plásmido	Inhibe la homoserina-O-succinil transferasa	Aguilar <i>et al.</i> , 1982.
MccB17	3,093 kDa	Péptido	Plásmido 5,5 Kb	Inhibe la replicación del DNA	Bayer <i>et al.</i> , 1995; Davagnino <i>et al.</i> , 1986; Garrido <i>et al.</i> , 1988; Genilloud <i>et al.</i> , 1989; Herrero y Moreno 1986; San Millan <i>et al.</i> , 1985; Vizán <i>et al.</i> , 1991; Yorgey <i>et al.</i> , 1994.
MccC7	1,177	Péptido	Plásmido 5 Kb	Inhibe la síntesis de proteínas	García-Bustos <i>et al.</i> , 1984; García-Bustos <i>et al.</i> , 1985; Guijarro <i>et al.</i> , 1995; Gonzalez-Pastor <i>et al.</i> , 1995. Novoa <i>et al.</i> , 1986.
MccD93	≤1,0	Péptido	Plásmido 2,3 Kb	Actúa a nivel del metabolismo del DNA	Aguilar <i>et al.</i> , 1983; Martínez y Pérez-Díaz., 1986; Martínez y Pérez-Díaz., 1990
MccE492	8,717	Péptido	Cromosómica 12 Kb	Despolarización de la membrana. Formación de canales iónicos.	De Lorenzo, 1984; De Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos <i>et al.</i> , 1993, 1999 y 2001; Wilkens <i>et al.</i> , 1997.
MccH47	4,865	Péptido	Cromosómica 12,3 Kb	Inhibe el componente de membrana F0 de la ATP sintetasa	Gaggero <i>et al.</i> , 1993; Laviña <i>et al.</i> , 1990; Rodríguez <i>et al.</i> , 1999
MccI47	6,276	Peptido	Cromosómico 12,3 Kb	Probable despolarización de membrana	Poey <i>et al.</i> , 2006
MccJ25	2,107	Péptido	Plásmido 5,2 Kb	Inhibición de la RNA polimerasa. División celular	Salomón y Farias, 1992; Solbiati <i>et al.</i> , 1996; Delgado <i>et al.</i> , 2001.
MccL	8,884	Péptido	Plásmido	Se piensa que despolariza la membrana. Ha de ser investigado.	Gaillard-Gendron., <i>et al.</i> , 2000; Pons <i>et al.</i> , 2004.
MccN24	7,457	Péptido	Plásmido 43,5 Kb	Despolarización de membrana.	O'Brien y Mahanty., 1994.
MccV	8,741	Péptido	Plásmido 4,5 Kb	Despolarización de la membrana	Fath <i>et al.</i> , 1994; Frick <i>et al.</i> , 1981; Yang y Konisky, 1984.

Se ha propuesto una nueva forma de clasificar las microcinas (Duquesne, Destoumieux-Garzón, *et al.*, 2007) de acuerdo con los siguientes criterios: i) presencia, naturaleza y localización de las modificaciones post-translacionales, ii) organización del conjunto génico, iii) secuencia del péptido señal. En base a estas normas, clasificamos:

- Clase 1: Péptidos con un peso molecular inferior a 5 kDa que sufren unas modificaciones post-translacionales grandes. MccB17, MccC7 y MccJ25.

- Clase II: Péptidos con un peso molecular comprendido entre 5 y 10 kDa.

Se subdivide a la vez en:

- Clase IIa: Poco modificadas, algunas presentan puentes disulfuro. MccV, MccN24 y MccL.
- Clase IIb: Microcinas lineales que en el extremo carboxilo sufren modificaciones transnacionales. MccE492, MccH47, MccI47 y MccM. Todas ellas codificadas en el cromosoma.

1.3.4. Aplicaciones de las microcinas.

A continuación se comentan algunas de las posibles utilidades del uso de las microcinas. Muchas de ellas precisan estudios mayores para ser evaluadas.

- Agentes prebióticos: basándonos en su potencial ecológico, las cepas productoras de microcina se estudiaron como agentes prebióticos, como por ejemplo a cepa Nissle 1917, sujeto de esta tesis, previene la invasión por *Salmonella sp.* en humanos (Altenhoefer, *et al.*, 2004). A largo plazo, la colonización y transmisión de esta cepa así como la presencia de microcina fue demostrada en cerdos de un modo claro (Kleta, *et al.*, 2006). La producción de microcina C7 por la cepa *E. coli* H22 impidió el desarrollo de *Shigella flexneri* (Cursino, *et al.*, 2006). Cepas productoras de MccJ25 se encontraron frecuentemente en el intestino de aves (Duarte, *et al.*, 2001). La microcina N24 inhibió el crecimiento de cepas patógenas de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.
- Agentes antitumorales: la microcina E492 induce cambios bioquímicos y morfológicos típicos de apoptosis en líneas celulares humanas (Hetz *et*

al., 2002). Los inductores de apoptosis son considerados de alto interés en el desarrollo de nuevas terapias antitumorales.

- Agentes antimicrobianos para la salud: La aparición de nuevas resistencias a los antibióticos convencionales es un hecho evidente en la actualidad. Las microcinas que presentan una gran variedad en los modos de acción con el inconveniente de la limitación de su bajo espectro de acción, pueden ser considerados modelos para el diseño y creación de antibióticos nuevo.
- Agentes antimicrobianos en seguridad alimentaria: El uso de bacteriocinas de Gram positivos está ampliamente distribuido. Son muy eficaces, frente microorganismos patógenos alimentarios Gran positivos, pero con reducida actividad frente Gran negativos. Por ese motivo se expresó heterológamente en bacterias ácido lácticas las microcina V, con un péptido señal de BAL y una actividad MccV (McCormick, *et al.*, 199).
- Numerosas enzimas que participan en las modificaciones post-translacionales en microcinas, pueden ser muy interesantes en la síntesis de nuevos antibióticos. Un ejemplo es la conjugación sideróforos (Thomas, *et al.*, 2004) bien de tipo hidroxamato o tipo catecol con los antibióticos vancomicina (Ghosh y Millar., 1996) o cefalosporinas (Weissberger, *et al.*, 1989) se logró aumentar la actividad antibacteriana.

1.4. SIDERÓFOROS

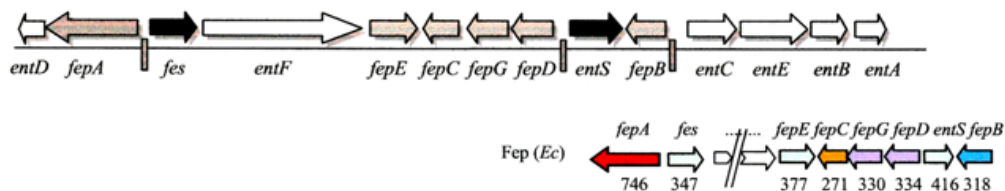
1.4.1. Enterobactina.

El crecimiento bacteriano en mamíferos está limitado por la cantidad del hierro disponible. El FeIII es insoluble y es rápidamente secuestrado por proteínas del hospedador (hemoglobina, ferritina, transferrina y lactoferrina), dejando cantidades de hierro francamente pequeñas, del orden de 10^{-24} M (Raymond, *et al.*, 2003) (Braun y Killmann., 1999). En condiciones de baja concentración de hierro, la bacteria aumenta la transcripción de un conjunto de genes que participan en el ensamblaje, exportación e importación de pequeñas moléculas quelantes de hierro, o sideróforos (Hantke, K. 2001). Enterobactina (Ent) es el sideróforo prototipo de las bacterias entéricas. Es una macrolactona trimérica de la *N*-(2,3-dihidroxibenzoil)-Serina (DHB-Ser). Los tres anillo catecol, forman un ligando hexadentado para coordinarse con FeIII. Y esto tiene una K_D

(constante de disociación) 10^{-52} M (Loomis y Raymond. 1991). Una vez que la enteroquelina es secretada, une FeIII, y este complejo Ent-FeIII es internalizado a través de receptores específicos (Braun y Braun. 2002). Después del transporte a través de la membrana, el hierro es liberado por la acción de una esterasa que hidroliza la macrolactona, originándose trímeros de DHB-Ser, dímeros y monómeros lineales (Brickman y McIntosh. 1992).

Los genes implicados en la biosíntesis, transporte y procesamiento de Ent, están agrupados en una región de 20 KB del cromosoma bacteriano controlado por el represor Fur que es dependiente de hierro (Crosa y Walsh, 2002). La biosíntesis de Ent a partir del ácido 2,3-dihidroxibenzoico y serina, requiere de la acción de EntB, EntD, EntE y EntF (Gehring, *et al.*, 1997) (Gehring, *et al.*, 1998) (Shaw-Reid, *et al.*, 1999) (Ehmann, *et al.*, 2000). Ent, después de haber sido sintetizada en el citoplasma celular, es exportada en un proceso que requiere la acción de EntS (Furrer, *et al.*, 2002). En el medio extracelular, Ent se une a FeIII y el complejo es reconocido por los receptores de membrana externa (Braun y Braun. 2002) y son importado por procesos de transporte activo (Braun y Braun. 2002). En el interior, para que el FeIII se libere se necesita la acción de la esterasa Fes.

La siguiente figura representa la disposición de los genes implicados en la síntesis, modificación y transporte del sideróforo enteroquelina.



Genes del transporte de enteroquelina

fepA	receptor
fes	esterasa
fepE	componente del transporte.
fepC	hidrolasa de ATP (importación).
fepG	proteína membrana interna (importación).
fepD	proteína membrana interna (importación).
entS	exportación enteroquelina.
fepB	proteína periplasmática de unión (importación).

Genes de la síntesis de enteroquelina

entD	formación de la macrolactona
entF	formación de la macrolactona
entC	isocorismato sintetasa
entE	proteína membrana interna.
entB	isocorismato piruvato hidrolasa
entA	2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa

Figura 1.2: Agrupación genética del sistema enteroquelina: seis genes implicados en el transporte, dos en el reconocimiento y liberación del hierro y otros seis implicados en la síntesis.

1.4.2 Salmoquelina

A partir de algunas cepas de *S. entérica* y *E. coli* uropatógenicas, se aislaron variantes de enteroquelina que fueron llamadas salmoquelinas. Estas variantes consisten en una molécula de enteroquelina que ha sido glicosilada en uno o en dos de los anillos 2,3-dihidroxibenzoil (DHB). En la Salmoquelina S4, la macrolactona está intacta con dos (DHB) glicosilados, cuando se hidroliza origina salmoquelian S2. Salmoquelina S1, si es un dímero (DHB)-Ser diglicosilado y salmoquelina SX si es un monómero DHB-Ser monoglicosilado. (Figura 1.2) (Bister *et al.*, 2004).

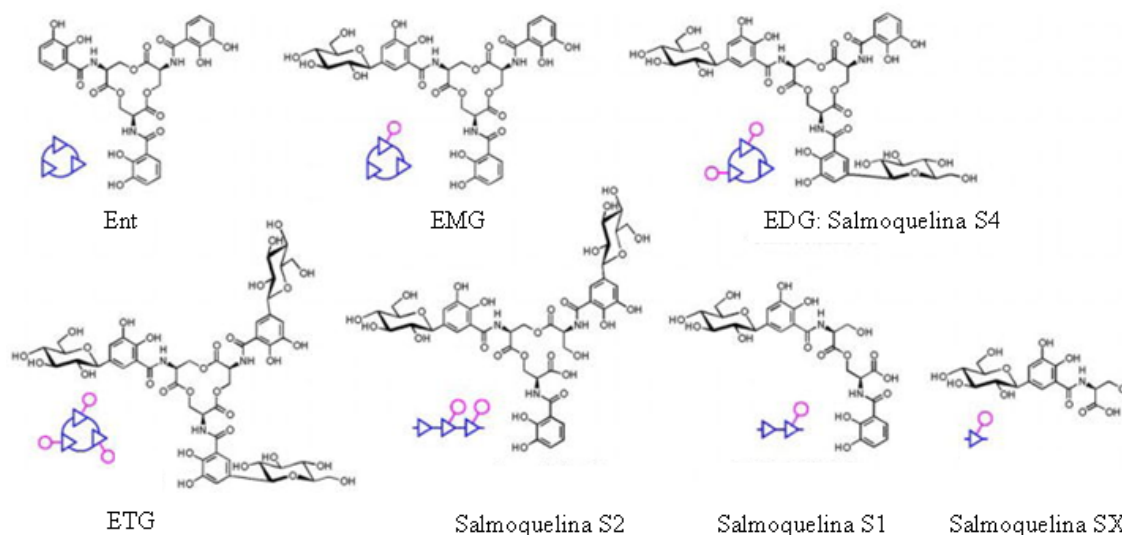


Figura 1.3: Estructura de la enterobactina (Ent), enterobactinas glicosiladas: EMG, enterobactina monoglicosilada; EDG, enterobactina diglicosilada; ETG, enterobactina triglicosilada. También se representa un esquema al lado de cada estructura, donde los triángulos azules representan DHB-Ser y los círculos rosas, representan glucosa. (Lin *et al.*, 2005).

Se propuso que la glicosilación podría prevenir el secuestro de la enteroquelina por las proteínas del suero: albúmina plasmática (Konopka y Neilands. 1984) y siderocalina, que es un tipo de lipocalina neutrofílica (componente del sistema inmune innato) (Goetz *et al.*, 2002). Finalmente todo esto conlleva a un aumento de las posibilidades de adaptación al medio de las bacterias productoras de salmoquelina.

Resumiendo, podemos decir que las salmoquelinas son *C*-glucosidos en los cuales el carbono C1' de la glucosa está unido al carbono C5' del anillo DHB (Bister *et al.*, 2004). El conjunto génico *iro* codifica 5 genes y colaboran con el conjunto génico *ent* en la biosíntesis de las salmoquelinas. El estudio de la secuencia del gen *iroB* permitió predecir que se trataba de una glucosiltransferasa. (Fischbach, *et al.*, 2005) estudiaron IroB, demostrando que realmente era una *C*-glucosiltransferasa que transforma Ent y la uridina-5'-difosfoglucosa (UDP-Glu) en monoglucosil-*C*-Ent (EMG), diglucosil-*C*-Ent (EDG) y triglucosil-*C*-Ent (ETG).

The background of the page is a grayscale micrograph. It features several large, dark, oval-shaped structures, possibly spores or cells, which are surrounded by a complex network of thin, branching, filamentous structures. The overall appearance is that of a biological specimen under a scanning electron microscope.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Clonación del sistema genético necesario para la síntesis de una actividad antibiótica producida por la cepa de *E. coli* Nissle 1917.
2. Determinación del fragmento o fragmentos mínimos necesarios para la producción e inmunidad a la sustancia antibiótica y expresión en *E. coli* K12.
3. Secuenciación de las regiones que son necesarias para la producción de la sustancia antibiótica y de la inmunidad a la misma.
4. Identificación de los posibles genes presentes en esa región y de sus hipotéticos productos.
5. Identificar la función de cada producto génico en la biosíntesis del antibiótico, basándose fundamentalmente en los fenotipos observados a partir de las mutaciones que inactiven uno o más genes y apoyados por el análisis de predicción de estructura secundaria de los polipéptidos deducidos y la comparación de los mismos con los existentes en las bases de datos.
6. Proponer un modelo que aclare el mecanismo de síntesis del antibiótico, de exportación e inmunidad.
7. Determinar la naturaleza de la sustancia antibiótica.
8. Realizar un análisis comparativo con otros sistemas microcina.

The image is a grayscale micrograph showing several large, roughly oval-shaped cells with a granular texture. These cells are surrounded by a dense network of thin, branching, filamentous structures that resemble a complex biological or material network. The overall appearance is that of a biological specimen, possibly a microorganism or a cell culture, viewed under a scanning electron microscope. The text 'MATERIALES Y MÉTODOS' is centered over the image in a bold, black, sans-serif font.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIÓFAGOS.

Las estirpes bacterianas, los plásmidos y los bacteriófagos utilizados en este trabajo se describen en la tabla siguiente:

Tabla 3.1

Cepas y Plásmidos	Genotipo / Fenotipo	Referencias
Cepas		
E. coli. Nissle 1917 (MF)		Nissle
MF Mu cts	MF Mu cts	Este trabajo
MF Nx	MF resistente a Nalidíxico	Este trabajo
MC4100	F ⁻ Δ(argF-lac)U169 araD139 deoCI FlibB5301 ptsF25 relA1 rpsL150	Casadaban (1976)
RYC1000	MC4100, Δrbs7, recA56 gyrA	Genilloud et al. (1984)
Pop3001.6	MC4100, maltT::Mu cts	M. Schwartz
Plásmidos		
P5005	Mud5005	Groisman et al. (1986)
pACYC184	Replicón p15A, Cm ^r , Tc ^r .	Chang and Cohen (1978)
pUC19	Replicón pMB1, Ap ^r , LacZ	Vieira and Messing (1982)
pUC13	Replicón ColE1, Ap ^r , LacZ	Messing (1983)
pUT mini-Tn5 Cm	Plásmido que porta el mini-Tn5 Cm Ap ^r Cm ^r	de Lorenzo et al. (1990)
pEX4	pUC13 portando el sistema microcina H47	Laviña et al. (1990)
pRH7	Plásmido mini-Mu portando 14Kb del genoma de la cepa <i>E. coli Nissle</i> 1917. Km ^r	Este trabajo
pHM1	Derivado pACYC184, productor microcinas H47 y M. Cm ^r	Este trabajo
pMCM1	pUC19, con el gen inmunidad a microcina M	Este trabajo
pMCHI	pUC19, con el gen inmunidad a Microc. H47	Este trabajo
pMCMA	pUC19, con el gen estructural de Microc. M	Este trabajo.
pMM156	pUC19, con el gen Orf-156	Este trabajo

3.2 MEDIOS DE CULTIVO.

El medio completo LB, medio mínimo M63 y medio P75 empleado en la propagación del fago λ , fueron preparados según la descripción de Miller (1992). El agar blando contiene 6 g de agar por litro.

3.3 ANTIBIÓTICOS E INDICADORES.

Ampicilina (Ap): se preparó en agua destilada a concentración de 8 mg/ml y se utilizó a concentraciones finales de 40 μ g/ml.

Cloranfenicol (Cm): se disolvió en etanol a una concentración de 6 mg/ml y se utilizó a concentraciones finales de 30 μ g/ml.

Kanamicina (Km): se preparó en agua destilada a concentración de 6 mg/ml y se utilizó a concentraciones finales de 30 μ g/ml.

Tetraciclina (Tc): se preparó en una mezcla de etanol y agua (en proporción 1:1) a concentración de 4 mg/ml y se utilizó a concentraciones finales de 20 μ g/ml.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido): se preparó en N,N-dimetilformamida a concentración de 10 mg/ml y se utilizó a concentraciones finales de 50 μ g/ml.

IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido): Se preparó en agua destilada a una concentración final de 0,5 mM.

3.4 OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se resumen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2

Oligonucleótido	Secuencia	USO
Bam-69	5'-CGGGATCCAACAGGTAGGTATTAATGAG-3'	Amplificar gen <i>mchI</i>
Sph-69	5'-ACATGCATGCATATAAACTCCATCATA-3'	
Xba-75	5'-GCTCTAGAGCTGATTTTCATGGGATTCGAAG-3'	Amplificar gen <i>mchB</i>
Eco-75	5'-GGAATTCCTGTAAAATAAAATAAAAATATA-3'	
Xba-73	5'-GCTCTAGATGTAAGGAGTTTTGTCGATG-3'	Amplificar gen <i>mcmI</i>
Eco-73	5'-GGAATTCAGATAGTTTTCTCATTTCAT-3'	
Xba-92	5'-GCTCTAGACGAAGGTGTTGAAATGAGAA-3'	Amplificar gen <i>mcmA</i>
Eco-92	5'-GGAATTC AATATAAGGTTTAACTTCCA-3'	
Gluc-trans1	5'-GCTGATGGATTTATTCATC-3'	Amplificar gen <i>mcmG</i>
Gluc-trans2	5'-TTGTT CAGCCATTTCCAGC-3	
Sph-39	5'-ACATGCATGCTTAGCACCTCAGTCAGGA-3'	Amplificar gen <i>mchX</i>
Bam-39	5'-CGGATCCTCTGGGTGAGGTCAGGTAAGA-3'	
Bam-229	5'-CGGGATCCTATGGTTACCTCTTCCT-3'	Amplificar gen <i>mcmM</i>
Hind-229	5'-CAACCCAAGCTTATCATATGAGATTGTAACAGA-3'	
Sph-156	5'-ACATGCATGCTGTATCAGAACAGCCATAAC-3'	Amplificar gen <i>mcmT</i>
Bam-156	5'-CGGATCCAAGTAGAACACTTTTTATATGAG-3'	
Xba-156	5'-GCTCTAGAACA CTTTTTATATGAGTTGC-3'	Amplificar gen <i>mcmT</i>
Eco-156	5'-GGAATTCCTGTATCAGAACAGCCATAAC-3'	
Bam-375	5'-CGGGATCCAGACGGACTTTTTTAATGC-3'	Amplificar gen <i>mchA</i>
Sal-375	5'-ACGCGTCGACATATCAGCAATACTATAACAATTA-3'	
MchA1	5'-ATTCTTTTTATTGGCCACCG-3'	Amplificar gen <i>mchA</i> (Cebadores internos)
MchA2	5'-TCCCGTTGTTTTTAATTTTC-3'	
Xba-58	5'-GCTCTAGATACACGAGAATATGAACTAT-3'	Amplificar el <i>orf-58</i>
Eco-58	5'-GGAATTCCTTACTTGTTGTTTAAAATT-3'	
Bam-424	5'-CGGATCCGAGGAGCTATTTTGTTTCGTC-3'	Amplificar gen <i>mchS</i>
Hind-424	5'-CCCAAGCTTGGGAGGAGCTATTTTGTTTCGTC-3'	
NK1316	5'-CATTTGATGCTCGATGAG-3'	Para mapear las inserciones de los transposones
Km903	5'-CGCGTATTCAGGCTGACC-3'	
Tn5-IS50R	5'-GCCGCACGATGAAGAGCAG-3'	

3.5. SOLUCIONES Y TAMPONES.

- Solución salina.
- Solución salina M63.
- Soluciones y tampones para la purificación del DNA
 - Tampón Tris
 - Tampón TE:
 - Tampón GTE:
 - Solución de NaOH/SDS:
- Tampones para el tratamiento del DNA con diferentes enzimas.
- Tampones empleados en la electroforesis del DNA.

Para la preparación de todos estos tampones y soluciones se siguieron las indicaciones descritas por Sambrook *et al.*, (1989).

3.6 MÉTODOS.

3.6.1 Clonaje de regiones cromosómicas *in vivo*: El fago Mu.

En este trabajo se emplearon dos derivados del fago Mu: el Mu dII4042 y el Mu d5005. Debido a su carácter defectivo (ver tabla), estos bacteriófagos no pueden multiplicarse autónomamente. Para obtener las suspensiones fágicas, fue necesario el uso de la cepa pop3001.6 la cual porta un fago *helper* Mu *cts*. Tanto los profagos defectivos como el *helper*, tienen la mutación *cts62*, en el gen *c*, que codifica un represor termosensible. Cuando incubamos la cepa a 42°C se inactiva a los represores codificados por los profagos y como consecuencia surge la lisis celular.

El fago Mu es un profago atemperado que se traspone aleatoriamente cientos de veces cuando tiene lugar su replicación. En la encapsidación del DNA del fago también se produce el empaquetamiento de DNA bacteriano que puede alcanzar hasta 39 Kb (Miller, 1992). La replicación del fago Mu puede ser utilizada para la clonación *in vivo* del genoma bacteriano de aquellas estirpes que son sensibles a la infección por Mu.

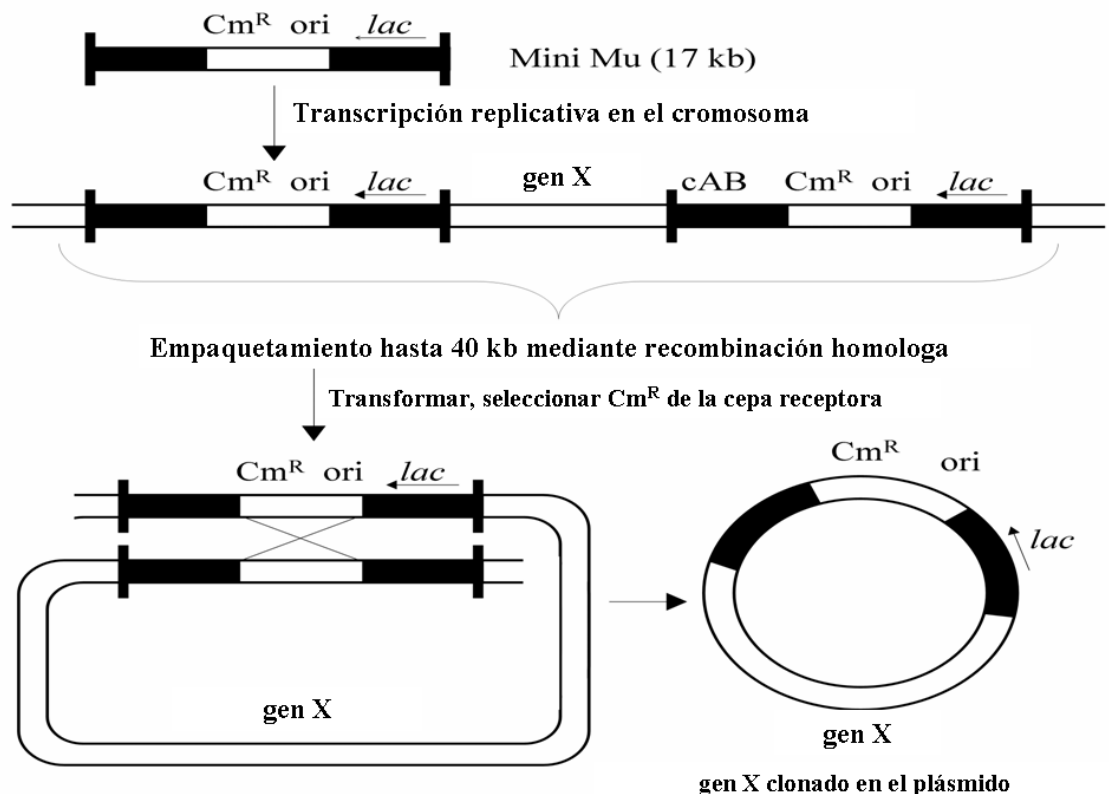


Figura 3.1: Esquema del mecanismo de empaquetamiento del mini-Mu. Ori, origen de replicación; Cm^R , resistencia a cloranfenicol; *lac*, operón lactosa.

3.6.2 Obtención de lisados de los bacteriófagos mini-MudII4042 y mini-Mud5005.

Se creció la estirpe pop3001.6, portando el plásmido pEG109 (que contiene el mini-MudII4042) ó portando el plásmido p5005 (que contiene el mini-Mud5005), en medio LB con el antibiótico de selección, (cloranfenicol para el pEG109 ó Kanamicina para el p5005) a 30° C durante la toda noche. Un nuevo cultivo con 5 ml de LB, se inoculó al día siguiente con 50 µl del cultivo de la noche. Se creció a 30° C hasta una $DO_{600\text{ nm}} = 0,2$ y a continuación se dio un choque térmico de 45° C durante 30 minutos sin agitación, para provoca la inducción de los fagos. Se añadieron al cultivo 2,5 µl de $MgSO_4$ 100 mM y se incubaron a 37° C con agitación vigorosa durante una hora. A continuación se añadieron 2 ó 3 gotas de cloroformo para facilitar la lisis de las células y se incubó durante diez minutos más. El lisado se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min para precipitar los restos celulares. Al sobrenadante se le añadieron nuevamente unas gotas de cloroformo y se repitió la centrifugación. Finalmente se conservó el lisado a 4° C.

3.6.3 Aislamiento de los plásmidos mini-MudII4042 que recuperan el fenotipo productor de microcinas.

Los mutantes de inserción (MFmuctsCmNx) se utilizaron como receptores. Se cultivaron en LB hasta principio de fase estacionaria ($DO_{600\text{ nm}} = 2$). Se mezclaron varias alícuotas de 0,1 ml de células con 0,1 ml del lisado del fago mini-Mud5005 sin diluir, y se le añadieron a cada tubo 5 µl de $MgSO_4$ 100 mM y 4µl de $CaCl_2$ 50 mM. Se dejaron en reposo para que tenga lugar la adsorción durante 20 min a 30° C. Después de esto, se añadió 1 ml de LB líquido a cada tubo y se incubaron 90 min a 30° C con agitación. Se plaquearon alícuotas de 100 µl en placas de LB que contenían cloranfenicol y kanamicina, y se incubaron durante toda la noche a 30° C.

3.6.4 Aislamiento de mutantes no productores de microcina por medio de mutagénesis con transposones mini-Tn5.

Para obtener mutantes de la cepa salvaje que no produjesen microcinas, se utilizaron los derivados mini-Tn5 (de Lorenzo *et al.*, 1990). Usamos como cepa receptora de las inserciones *E.coli* Nissle 1917Nx^r (resistente al ácido Nalidíxico).

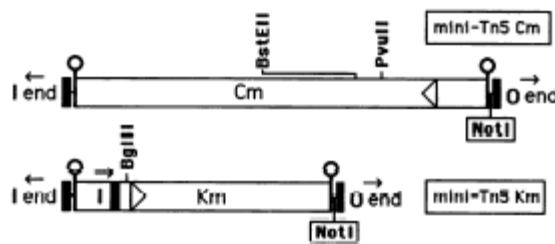


Figura 3.2: Esquema de los mini transposones Tn5. Portando el gen que confiere resistencia a cloranfenicol y a kanamicina respectivamente

3.6.5 Test de producción de microcina.

Para determinar la capacidad de una cepa para producir una microcina, se añadieron 2×10^7 células indicadoras *E. coli* (RYC-1000) suspendidas en 3 ml de agar semisólido a una placa de medio mínimo M63. Cada una de las colonias que se querían testar para la producción, se transfirieron con palillos sobre las placas anteriores y se incubaron durante 18 horas a 37° C. La bacteria indicadora (*E. coli* RYC-1000) es sensible a la microcina secretada por la cepa productora, y por lo tanto después de la incubación, se originan halos claros y de bordes bien definidos de inhibición.

Para comprobar que la actividad inhibitoria realmente corresponde con una microcina, se realizó un test sobre una membrana de tamaño de poro conocido que sólo permite el paso de moléculas menores a 10.000 Da. Esta prueba consistía en colocar la membrana sobre la placa de medio mínimo, sobre la membrana se depositó una colonia de la cepa que se quería probar. Se incubaron durante 18 horas a 37° C. Tras la retirada de la membrana con la cepa productora, se añadió la cepa indicadora mezclada con agar semisólido, y se incubó de nuevo a 37° C durante 18 h.

3.6.6 Test de inmunidad a la microcina.

La inmunidad se determina en placas de medio mínimo por la técnica del entrecruzamiento utilizando como cepas productoras RYC1000M (pEX4) y RYC1000 (pHM1), según el método descrito en (Pugsley and Oudega, 1987).

3.6.7 Manipulaciones de DNA.

El ADN plasmídico fue extraído con el sistema de purificación de plásmidos (Qiaprep spin miniprep kit) o por el método de lisis alcalina (Birnboim, 1979).

Transformaciones, ligaciones y electroforesis en geles de agarosa fueron realizadas como se recomienda en (Sambrook, 1989).

El ADN cromosómico fue obtenido conforme se describe en (Sambrook, 1989)

3.6.8 Test de complementación.

Los ensayos de complementación se realizan cuando queremos ver si se recupera un fenotipo, que se había perdido como consecuencia a una inserción de un transposón o por una mutación. Las células que contenían un plásmido, fueron transformadas con otro plásmido compatible. La selección fue realizada en medio LB con los marcadores de selección correspondientes a cada plásmido. Valoramos la recuperación del fenotipo productor y del fenotipo inmune.

3.6.9. Clonación de genes por PCR

Utilizando cebadores específicos a los que se les habían añadido un secuencia en el extremo 5' reconocible por una enzima de restricción permitiendo clonar en el vector, manteniendo el SD (Sambrook, 1989).

3.6.10. Secuenciación de los fragmentos de PCR

Para purificar y concentrar los productos de PCR previamente a su secuenciación se utilizo el Quia-Prep (Quiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. La secuenciación de los fragmentos se realizó con el kit ABI PRISM bigDye Terminator Cycle sequencing Ready reaction. Kit (Applied Biosystems) y analizado con un secuenciador automático ABIPRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas a través de búsqueda en el GenBank Database del NCBI mediante la utilización del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>, National Center for Biotechnology Information) y en la base de datos del “European Bioinformatics institute.url” (<http://www.ebi.ac.uk/>).

3.6.11. Método de la PCR Vectorette.

La PCR Vectorette un método que posibilita la amplificación de fragmentos de ADN en la situaciones que sólo conocemos uno de los extremos de la región que deseamos estudiar. Los fragmentos generados por esta técnica pueden secuenciarse rápidamente. (Arnold and Hodgson, 1991).

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing several large, oval-shaped biological cells with a textured surface. These cells are surrounded by a dense network of smaller, branching, and filamentous structures, possibly representing a microbial community or a specific tissue type. The overall appearance is highly detailed and complex.

RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *E. coli* NISSLE 1917

La caracterización fenotípica de la cepa *E. coli* Nissle 1917 aportó datos de interés, especialmente para abordar su estudio en el laboratorio. Esta cepa crecía bien en el medio completo LB y en el medio mínimo M63, esto es, no presentaba ninguna auxotrofia.

No se detectó resistencia a los antibióticos ensayados: ampicilina (Ap), kanamicina (Km), cloranfenicol (Cm), ácido nalidíxico (Nx) y tetraciclina (Tc). Por otra parte, pudimos comprobar su resistencia a los fagos P1 y λ y su susceptibilidad a los fagos T₄ y Mu. Esta resistencia a fagos limitó las herramientas para abordar la investigación genética de la cepa.

En la cepa Nissle 1917 se visualizaron dos plásmidos pequeños de 5,2 y 3 Kb, que carecían de marcadores de selección. Mediante ensayos de conjugación, se pudo comprobar que esta cepa admitía plásmidos de tipo F (de grupo de incompatibilidad incFI) y RP4 (perteneciente al grupo de incompatibilidad incP α). La cepa original se transformó con los plásmidos pBR322 y pACYC184, comprobando que la eficacia de transformación era 100 veces inferior a la observada en *E. coli* K12.

Para analizar si los genes responsables de la actividad microcina se localizaban en los plásmidos, éstos se co-transformaron con la ayuda de la selección antibiótica de pBR322 y pACYC184. Partiendo de la cepa salvaje transformada con pBR322 o pACYC184, se extrajeron todos los plásmidos y nuevamente se transformó *E. coli* K12, seleccionando con los marcadores Ap o Cm. Una vez obtenidos los transformantes, y comprobándose la existencia de los uno o los dos plásmidos pequeños originales de Nissle 1917, se testó la producción de sustancias inhibitorias. Ningún transformante exhibió actividad antibacteriana, demostrándose que dicha actividad no estaba codificada en los plásmidos.

Mediante los test clásicos de detección de microcinas, empleando membranas de celofán, pudimos comprobar que la cepa *E. coli* Nissle 1917 producía al menos dos actividades antibióticas diferentes. El halo de inhibición observado se reducía sensiblemente cuando en el medio se añadía isoleucina. Este resultado, descrito previamente (De Felice., *et al* 1979), indica que la cepa Nissle 1917 produce valina o algún compuesto análogo. La segunda actividad que se mantenía tras la adición de isoleucina era de tipo microcina.

Los ensayos de inmunidad cruzada con otras microcinas mostraron susceptibilidad a microcina B17 (MccB17), microcina C7 (MccC7), microcina V (MccV), microcina E492 (MccE492), microcina J25 (MccJ25), microcina L (MccL), microcina D93 (MccD93), microcina N24 (MccN24), y curiosamente resistencia a la microcina H47 (MccH47). Todas las cepas productoras de microcinas señaladas en el párrafo de arriba, fueron sensibles a la actividad sintetizada por la cepa Nissle 1917. Por ello concluimos que la actividad inhibitoria era una microcina diferente a las descritas hasta la actualidad y decidimos denominarla microcina M.

4.2. SISTEMA MICROCINA

4.2.1. Intento de clonación del sistema microcina mediante el método de clonación in vivo empleando mini-Mu.

Dada la sensibilidad de la cepa al fago Mu, decidimos emplear el sistema mini-MudII4042 (Groisman y Casadaban., 1986) para clonar los determinantes genéticos de la actividad microcina. Para ello, la cepa fue lisogenizada con un Mucts helper y después transformada con un plásmido que porta el mini-MudII4042 como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Después de la inducción, se obtuvo una librería genómica que se utilizó para transducir la cepa *E. coli* pop3001.6. Se analizaron más de 12.000 transductantes buscando clones que originaran halos de inhibición del crecimiento sobre un tapiz indicador, pero a pesar del gran número de clones estudiados no se consiguió detectar ningún productor de microcina.

4.2.2. Inserciones con mini-MudIII1681: mutante MFH20

Tras el resultado negativo anterior, se abordó el problema desde otro punto de vista, buscando mutantes de la cepa Nissle 1917 que perdieran la capacidad de producir microcina mediante inserciones con el derivado mini-MudIII1681. Para ello, se preparó una suspensión con las partículas virales mediante termo-inducción de la cepa *E. coli* POIII1681 a 42° C, y el lisado del fago fue utilizado para infectar a Nissle 1917 a 30° C.

Para buscar clones que hubieran perdido la actividad microcina, se testaron en placas de medio mínimo con *E. coli* K12 como indicador y suplementadas con isoleucina más de dos mil ochocientos clones resultantes de este ensayo. De todos los mutantes estudiados, tan sólo se encontraron nueve que habían perdido la capacidad de formar halos de inhibición. Seleccionamos el mutante denominado MFH20 para realizar

el estudio de la inserción responsable de la pérdida de actividad inhibitoria. Se empleó la técnica del vectorette (Arnold and Hodgson. 1991) para conocer la región adyacente al inserto, amplificando un fragmento de 600 pb. A continuación, para comprobar si el amplificado era de una región específica de la cepa Nissle 1917, realizamos experimentos de hibridación empleando como sonda el amplificado de 600 pb. Se pudo comprobar la existencia de una región similar en el cromosoma de *E. coli* K12.

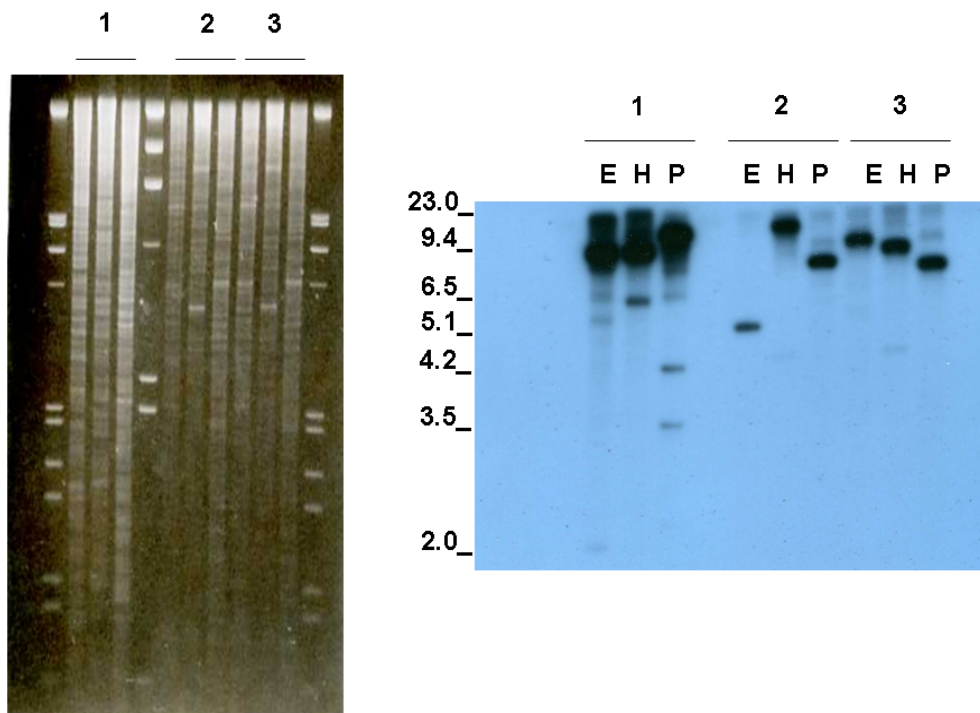


Figura 4.1: Southern blot con ADN genómico de las cepas MC4100 (1), MFH20 (2) y Nissle 1917 (3) digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (E), *HindIII* (H) y *PstI* (P). Como sonda se utilizó un producto de PCR de MFH20 de 600 pb.

El producto de PCR de 600 pb que utilizamos como sonda también fue clonado en el vector pGEM-T y secuenciando mostrando identidad con el gen *entF* de *E. coli*, que forma parte del operón implicado en la biosíntesis del sideróforo enteroquelina y codifica una enzima que activa residuos de serina.

Cómo el análisis de estos mutantes, era un trabajo tedioso, decidimos no continuar estudiando los ocho mutantes restantes y continuar el estudio realizando otro tipo de mutagénesis que simplificara el abordaje.

4.2.3. Obtención de mutantes no productores de Microcina M mediante Inserciones mini-Tn5

Aislamos nuevos mutantes de la actividad microcina empleando esta vez el método descrito previamente que se basa en el empleo de mini-transposones derivados de Tn5 (Berg, D. E. 1977, de Lorenzo, V 1990) como se describe en materiales y métodos. La producción de actividad antibiótica fue testada en 900 mutantes de la cepa Nissle 1917 *Mucts*, Nx^R obtenidos por inserción del mini-Tn5-Km y en 2000 clones obtenidos por inserción del mini-Tn5-Cm. Sólo se encontraron 6 clones Km^R y 5 Cm^R incapaces de formar halos de inhibición por microcina M pero que mantenían la actividad mutaflorina.

La cepa *E. coli* pop3001.6 fue transformada con el ADN plasmídico de los 11 mutantes (6 clones Km^R y 5 Cm^R) sin obtener clones resistentes a kanamicina o a cloranfenicol. Este dato significaba que todas las inserciones que impedían la síntesis de microcina se localizaban en el cromosoma de Nissle 1917 y confirmaba que dicha actividad no se encuentra localizada en los dos pequeños plásmidos que porta la cepa MF. Los cinco mutantes Nissle 1917 *Mucts*, $Nx^R Cm^R$ se denominaron: MFI7, MFI14, MFI15, MFI16 y MFI19. Los mutantes de inserción Km^R se guardaron por si fuese necesario el estudio posterior.

Nuevamente, para poder clonar las regiones cromosómicas responsables de la actividad microcina se realizó una muducción empleando el mini-Mud5005. Los derivados: MFI7, MFI14, MFI15, MFI16 y MFI19 fueron transformados con el plásmido que contenía el Mu *d5005*, que porta resistencia a Km, y mediante termo-inducción se obtuvieron los lisados fágicos de cada mutante Cm^R . Cada lisado se utilizó para transducir la cepa pop3001.6 y se seleccionaron clones resistentes a kanamicina y cloranfenicol. Varios clones fueron obtenidos para cada mutante de inserción, seleccionando un único clon representante para cada mutante de inserción Cm^R . Tras el aislamiento de los clones, se analizó el ADN plasmídico de cada uno a los que se los denominó pINS7.1, pINS14.1, pINS15.1, pINS16.1, y pINS19.1. Ver esquema explicativo a continuación (Figura 4.2). El análisis de restricción preliminar de los plásmidos pINS mostró regiones solapantes entre pINS7.1 y pINS15.1 pero no había similitud entre los fragmentos que originaban los restantes plásmidos.

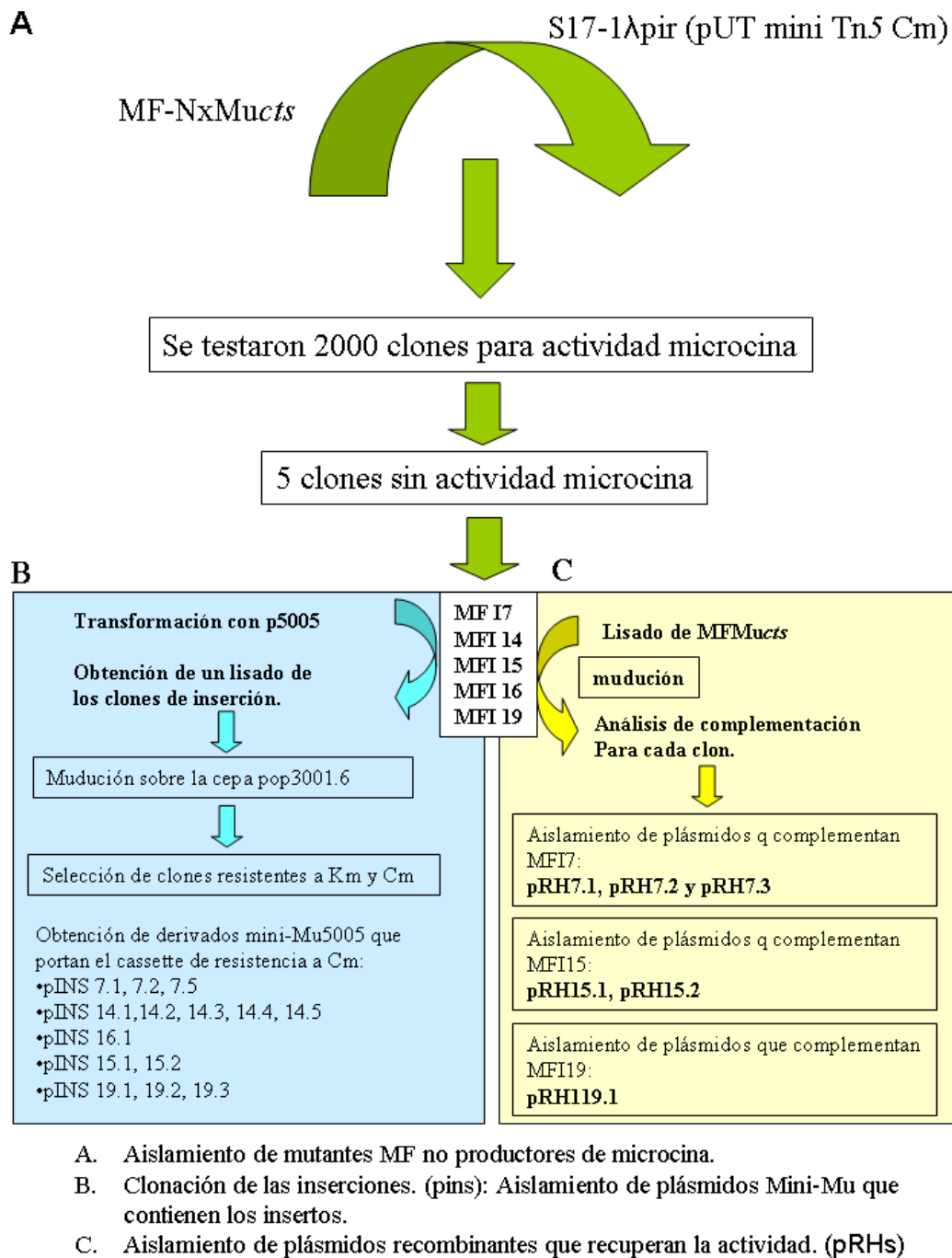


Figura 4.2: Esquema de: (A) obtención de mutantes MF no productores de Microcina M mediante Inserciones mini-Tn5. (B) Clonación de las inserciones en plásmidos (pINS). (C) Obtención de fragmentos cromosómicos de Nissle 1917 capaces de restaurar la capacidad de producir microcina M en los mutantes aislados previamente.

Para conocer el sitio de inserción en cada plásmido pINS, fue necesario clonar los fragmentos adyacentes a los cassettes Cm en el vector pUC18 y a continuación secuenciar con los cebadores universales directo y reverso. En la tabla siguiente se muestran los genes afectados en cada uno de los mutantes:

Inserción	Gen afectado
MFI7	<i>orf</i> con homología a <i>cvaB</i>
MFI14	<i>entF</i>
MFI15	<i>orf</i> con homología a <i>cvaB</i>
MFI16	<i>orf 1</i> , que está a la izquierda de <i>entF</i>
(MFI19	<i>tolB</i>

Tabla 4.1: Genes inactivados por las inserciones estudiadas.

Curiosamente en tres de los cinco casos (*tolB*, *entF* y *orf1*), los genes inactivados son cromosómicos y se encuentran en todas las cepas de *E. coli*, por lo que no son específicos de nuestra cepa. Sin embargo, cuando las secuencias nucleotídicas de las inserciones 7 y 15 se compararon con las secuencias incluidas en las bases de datos, revelaron que el transposón estaba insertado, en ambos casos, dentro de una ORF con alta homología con el gen *cvaB* que codifica una proteína perteneciente a la familia de los transportadores ABC y está implicada en la exportación de la microcina V (Boyer, A. E. and Tai, P. C. 1998; Fath, M. J. and Kolter, R. 1993; Gilson, L., *et al.*, 1990; Habarstein, L. S., *et al.*, 1995). Este resultado sugería que en los mutantes MFI7 y MFI15 los transposones se habían insertado en un gen específico del sistema microcina M, bloqueando la producción del antibiótico.

4.2.4. Obtención de fragmentos cromosómicos de Nissle 1917 capaces de restaurar la capacidad de producir microcina M en los mutantes aislados previamente.

Una vez obtenidos mutantes cromosómicos que habían perdido la capacidad de la cepa salvaje de producir microcina, el siguiente paso fue clonar el fragmento genómico

de la cepa original capaz de complementar la mutación y recuperar el fenotipo de producción. En un primer momento se centró el estudio en el mutante MFI7.

El experimento se llevó a cabo nuevamente empleando el sistema mini-Mu, preparando una librería genómica de la cepa salvaje Nissle 1917, con el Mud5005 con resistencia a kanamicina como marcador. Con esta librería se transdujo el clon MFI7, y se testaron 2000 clones resistentes a kanamicina para producción de microcina. Se aislaron de esta manera tres clones que no solo eran capaces de restaurar la capacidad de producción de microcina del mutante MFI7 sino que los halos obtenidos eran mucho mayores que los producidos por la cepa salvaje, El aumento de el tamaño del halo podía ser explicado por el hecho de haber clonado todo o parte del sistema microcina en multicopia. El ADN plasmídico de los clones que complementaban para producción de microcina fue extraído y los plásmidos fueron denominados pRH (de Recuperación de Halo): pRH7.1, pRH7.2 y pRH7.3. (Ver figura 4.2)

También pudimos comprobar que cuando introducíamos pRH7.1 en la cepa Nissle 1917 se producía un incremento en la producción del antibiótico; mientras que al transformar pRH7.1 en *E. coli* K12 no se observaba un fenotipo productor, pero sí la adquisición de la inmunidad específica a la microcina M producida por Nissle 1917.

Con todos los resultados anteriores, concluimos que en el fragmento de ADN clonado (pRH7.1) existían genes implicados directamente en la producción e inmunidad de la sustancia antibiótica, aunque deberían existir otros genes necesarios para conferir el fenotipo productor que no estaban presentes en el fragmento del pRH7.1. Cuando repetimos todos los experimentos anteriores con pRH7.2 y pRH7.3 observamos idénticos resultados.

Con los mutantes MFI14, MFI15, MFI16 y MFI19 se procedió de la misma manera que con el mutante MFI7. De esta manera, se obtuvieron plásmidos Mini-Mu que eran capaces de recuperar la producción para MFI15 (pRH15.1, pRH15.2) y MFI19 (pRH19.1). No se obtuvieron plásmidos que recuperaran la producción de los mutantes MFI14 y MFI16.

3.2.5. Derivados del plásmido pRH7.1

pRH7.1 es un derivado mini-Mu que contiene 13.963 pb de ADN genómico de Nissle 1917. Con la finalidad de facilitar el estudio del sistema genético se construyeron plásmidos más pequeños a partir de él. En primer lugar se construyeron derivados más

estables, eliminando los genes de inducción del Mu presentes en el plásmido, de esta forma era posible trabajar en condiciones más cómodas de temperatura (37°C) evitándonos la necesidad de utilizar cepas *Mucts*. Estas nuevas construcciones plasmídicas pueden observarse en la (figura 4.3) y se detallan a continuación:

- A partir de pRH7.1 se clonó una banda *HindIII* de 11.852 pb en pBR322 originando el plásmido **pMM1**.

- pMM1 fue digerido con *SphI* y religado de modo que conseguimos deletar un fragmento *SphI* de 1721 pb, la orientación de la banda en el nuevo derivado con relación al pBR322 es inversa. Este derivado se denominó **pMM2** (10.132 pb).

- A partir de pRH7.1 se clonó una banda *PstI* en pBR322, dicha banda contiene 2.292 pb de genoma Nissle 1917. Lleva también parte del Mu, que no afecta a la estabilidad de la construcción. El plásmido resultante se llamó **pMM8**.

- A partir de pMM1 se realizó una delección *NdeI* de modo que el plásmido resultante era un derivado pBR322 portando una banda de 5.030 pb de genoma Nissle 1917, también incluye una pequeña parte del Mu. Este plásmido fue denominado **pMM40**. Una delección *SmaI* de este plásmido originó el derivado **pMM41**.

De la misma manera que se preparó el pMM40, pero usando el pMM2, hicimos una delección *NdeI*. El plásmido resultante sería un derivado pBR322 con una banda de 6.830 pb de genoma Nissle 1917 y fue llamado **pMM50**. El plásmido resultó ser bastante inestable y/o tóxico para *E. coli* K12. Las células no crecían en medio mínimo y en medio completo se lisaban en pocas horas. Este fenotipo se describirá más tarde.

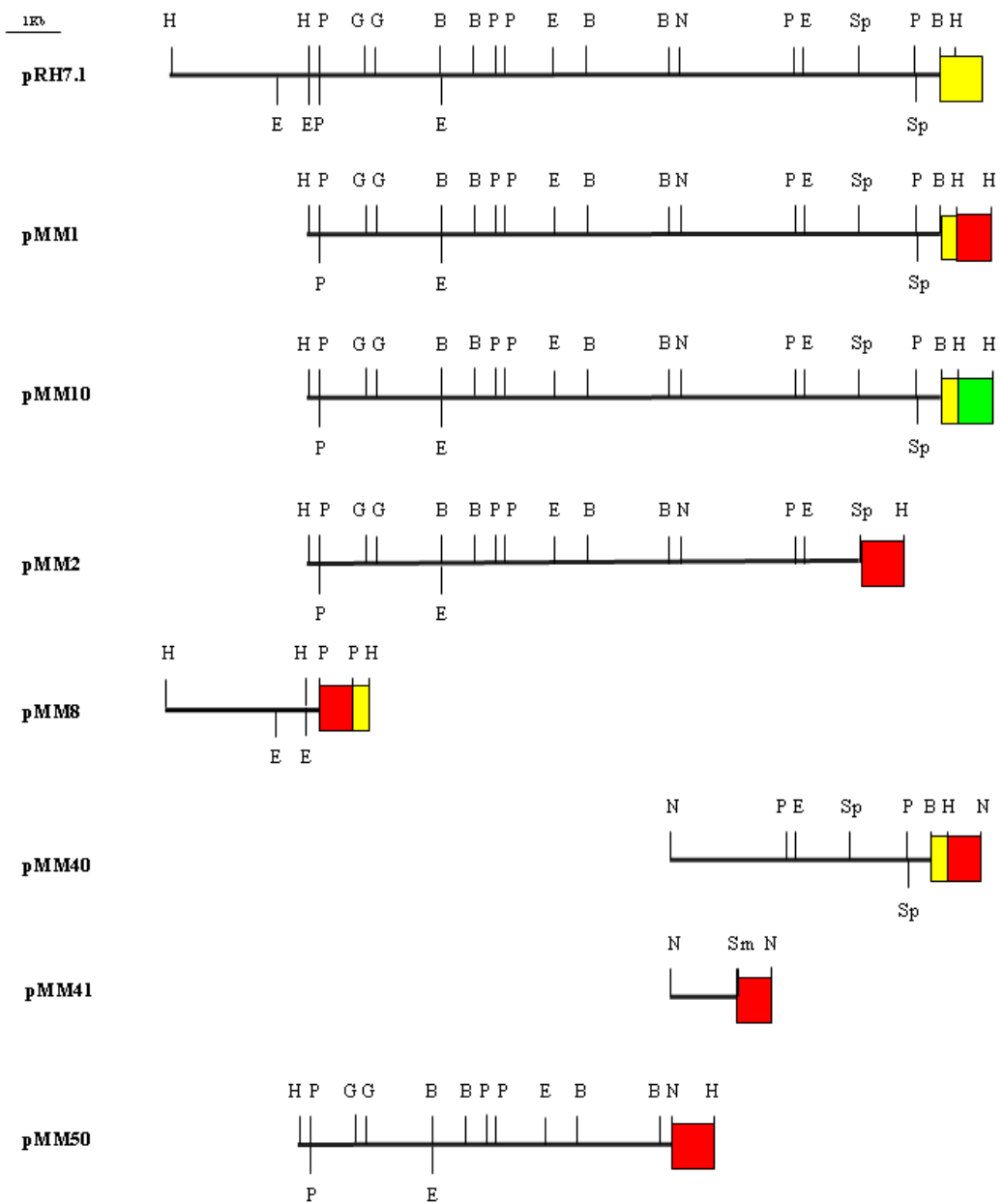


Figura 4.3: Derivados plasmídicos de pRH7.1. (Amarillo) derivado mini-Mu. (Rojo) pBR322. (Verde) pACYC184.

4.2.6. Secuenciación de la región clonada en el plásmido pRH7.1

Secuenciar este derivado parecía ser la mejor alternativa para poder continuar diseñando experimentos necesarios en la caracterización del sistema microcina. El análisis físico junto con la secuencia nos permitió aclarar la estructura de la región clonada en el plásmido que contenía un total de 13.963 pb de DNA cromosómico de la cepa Nissle 1917. Se identificaron los genes candidatos del sistema, precedidos todos ellos de un buen Shine-Dalgarno (SD) a la distancia adecuada para el inicio de la traducción. Mediante el programa ORF finder del NCBI, encontramos un total de 12 marcos de lectura abiertos (ORF).

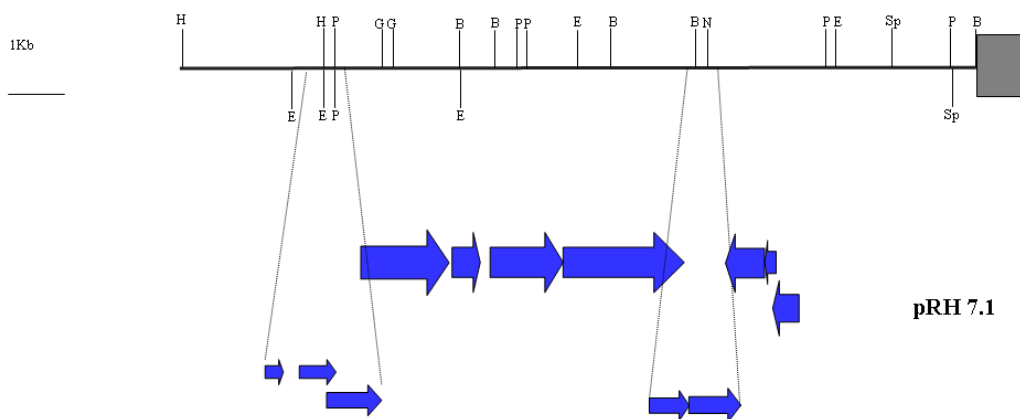


Figura 4.4: Estructura del plásmido pRH7.1 donde se indica mediante flechas los ORF. (B) *Bam*HI, (E) *Eco*RI (G) *Bgl*II, (H) *Hind*III, (N) *Nde*I, (P) *Pst*I.

Una vez se completó la secuencia, se comparó en la base de datos EMBL detectando que algunos de los *orfs* eran prácticamente idénticos a los genes implicados en la producción de la microcina H47. Es importante recordar aquí que en los primeros experimentos de inmunidad cruzada con otras microcinas, la cepa productora de

microcina H47 era inhibida por Nissle 1917 mientras que la cepa Nissle 1917 era inmune a la microcina H47.

Los resultados de la secuenciación y de la inmunidad cruzada nos llevó a sospechar que tal vez, la cepa Nissle 1917 podría sintetizar dos actividades antibióticas diferentes: MccH47 (lo que explicaría la resistencia / inmunidad de Nissle 1917 a microcina H47) y una actividad tipo microcina diferente, la anteriormente denominada microcina M y que sería responsable de la actividad sobre H47.

4.2.7. Comparación entre pRH7.1 y pEX4.

El plásmido pEX4 es un derivado pUC13 que porta dos fragmentos *Hind*III con un tamaño total de 16.5 Kb y que contiene todos los determinantes genéticos necesarios para la síntesis, maduración, secreción e inmunidad de la microcina H47 (*mchA*, *mchX*, *mchI*, *mchB*, *mchC*, *mchD*, *mchE*, *mchF*) (Laviña., *et al.* 1990). Aunque con algunos cambios polimórficos, todos estos genes, excepto *mchA*, estaban también presentes en pRH7.1 (figura 4.5). El resultado más notable de la comparación de ambas estructuras era la presencia de un fragmento en el extremo izquierdo del plásmido pEX4, upstream *mchX*, que no estaba presente en pRH7.1. Teniendo en cuenta que al plásmido pRH7.1 le falta algún determinante para producir microcina en *E. coli* K12, era muy probable que dichos genes se encontrasen en esa región.

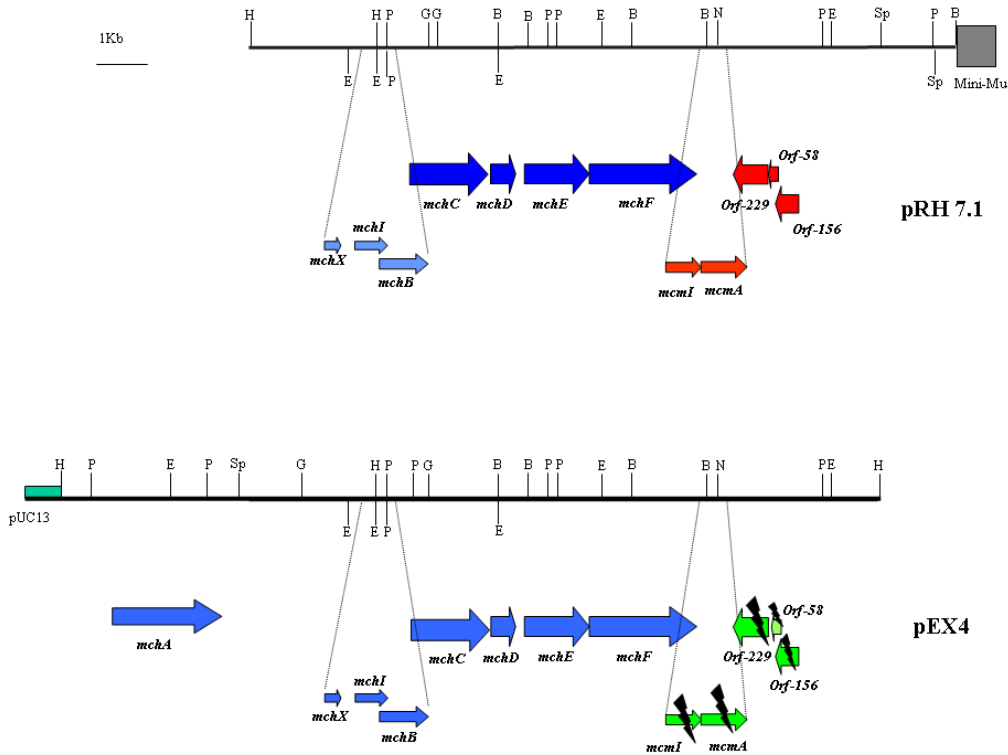


Figura 4.5. Plásmidos pEX4 y pRH7.1 a escala y de modo comparativo. Se indica mediante flechas los genes del sistema microcina H47 en azul y los ORF precedidos de un buen SD propios de la cepa Nissle 1917 en rojo. En verde se representan los ORF que no se expresan en el sistema microcina H47 del plásmido pEX4. Los sitios de restricción: (B) *Bam*HI, (E) *Eco*RI (G) *Bgl*II, (H) *Hind*III, (N) *Nde*I, (P) *Pst*I, (S) *Sal*I, (Sp) *Sph*I.

Partiendo de la base que pEX4 en *E. coli* K12 era capaz de dirigir la síntesis de MccH47 mientras que pRH7.1 no, y que en pRH7.1 estaban todos los genes necesarios para la síntesis de microcina H47, presentes en pEX4 a excepción de *mchA*, era lógico pensar que la presencia de *mchA* era la clave en la producción de al menos microcina H47. Para comprobarlo decidimos transformar una cepa con ambos plásmidos. Fue necesario construir un derivado de pRH7.1 que tuviese un replicón compatible con pEX4. Se clonó la banda *Hind*III de pMM1 (apartado 4.2.5) en el vector pACYC184 (replicon p15A y Cm^R), resultando **pMM10** (Figura 4.3). El nuevo plásmido con un replicón derivado del p15A era compatible con pEX4 cuyo replicón es pColE1. La cepa RYC1000 se transformó con el nuevo derivado pMM10 seleccionándose células Cm^R.

Al mismo tiempo, RYC1000 fue transformada con ambos plásmidos a la vez (pMM10 y pEX4), seleccionándose clones Ap^R y Cm^R. Los transformantes aislados se testaron para producción e inmunidad con cuatro tipos diferentes de tapices indicadores. En la siguiente tabla, se presentan los resultados obtenidos.

		TAPICES				
		RYC1000	RYC1000 (pMM10)	RYC1000 (pMM8)	RYC000 (pEX4)	RYC1000 (pMM10)(pEX4)
PRODUCTORES	RYC1000	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX4)	+	-	-	-	-
	RYC1000 (pMM10)	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMM10)(pEX4)	+	- (*)	+	+	-

Tabla 4.2: La tabla muestra los fenotipos de inmunidad y producción de microcina de la cepa *E. coli* RYC1000 transformada con pMM10 por una parte y con pMM10 más pEX4 por otra parte. (-); ausencia de actividad. (+); Presencia de actividad antibiótica. (*) Este resultado (-) se explicará más adelante.

Los resultados nos permitieron hacer las siguientes afirmaciones:

- pMM10 y pMM8 confieren inmunidad a MccH47.
- pMM10 no produce ninguna actividad frente a RYC1000.
- Cuando pMM10 y pEX4 están juntos, se observa actividad sobre un tapiz RYC1000 que es sensible a las microcinas H47 y M. También se detecta actividad sobre un tapiz RYC1000 (pEX4), esta cepa portaba inmunidad específica a microcina H47, con lo que quedaba demostrado que se estaba sintetizando la nueva microcina (MccM).
- El pMM10 confería inmunidad específica a microcina H47 pero también a microcina M.
- El fragmento cromosómico de Nissle 1917 clonado en pMM8 confiere inmunidad y/o resistencia a MccH47 pero no a la nueva microcina.
- pEX4 dirige la producción de MccH47 y confiere inmunidad específica a microcina H47 pero no a la nueva microcina.

El pMM10 por si solo no es capaz de dirigir la síntesis de microcina, pero en trans con pEX4 induce la síntesis de microcina H47 y M. Este último resultado apoyó fuertemente la idea de tener una nueva actividad microcina. Las células transformadas con los dos plásmidos sintetizaban MccH47 pero este fenotipo era debido a pEX4. El pMM10 estaría participando en la síntesis de la nueva actividad con la colaboración de algún o algunos genes presentes en pEX4. Pero desconocíamos si pRH7.1 también era capaz de sintetizar microcina H47. Para comprobarlo se realizaron los experimentos que se mencionan a continuación.

4.2.8. Nissle 1917 produce dos microcinas: MccH47 y MccM.

Para comprobar esta hipótesis utilizamos el plásmido pEX4 (Figura 4.5), y diseñamos los experimentos para eliminar el gen estructural de la microcina H47. En primer lugar realizamos una delección interna *Bgl*III de pEX4, eliminando un fragmento de 2.500 pb donde estaban localizados los genes *mchX*, *mchI* (inmunidad) y *mchB* (estructural) de la microcina H47 así como la región promotora de *mchX*, y dejamos la región que podría estar participando en la complementación de pMM10. El nuevo derivado fue denominado **pEX10.2**.

Después de transformar células competentes de *E. coli* RYC1000 con el **pEX10.2** y chequear la actividad microcina e inmunidad, vimos que las células resultaron ser sensibles a microcina H47 y al mismo tiempo, incapaces de sintetizar dicha microcina.

A continuación se transformó de nuevo *E. coli* RYC1000 con pMM10 y con pEX10.2, resultando células que producían tanto microcina H47 como microcina M y por supuesto eran inmunes a ambas actividades.

Tras estos resultados era evidente que *E. coli* Nissle 1917 sintetizaba dos tipos diferentes de microcinas, además de una actividad tipo valina. Los resultados se reflejan en la siguiente tabla:

		TAPICES					
		RYC1000	RYC1000 (pMM10)	RYC1000 (pEX4)	RYC1000 (pMM8)	RYC1000 (pEX10.2)	Nissle 1917
PRODUCTORES	Nissle 1917	H-MccM H-MccH	I-MccM I-MccH	H-MccM	H-MccM	H-MccM H-MccH	I-MccM I-MccH
	RYC1000 (pMM10)	–	–	–	–	–	–
	RYC1000 (pEX4)	H-MccH	I-MccH	I-MccH	I-MccH	H-MccH	I-MccH
	RYC1000 (pEX10.2)	–	–	–	–	–	–
	RYC1000 (pMM10) (pEX4)	H-MccM H-MccH	I-MccM I-MccH	H-MccM	H-MccM	H-MccM H-MccH	I-MccM I-MccH
	RYC1000 (pMM10) (pEX10.2)	H-MccM H-MccH	I-MccM I-MccH	H-MccM	H-MccM	H-MccM H-MccH	I-MccM I-MccH

Tabla 4.3: H; halo de inhibición, I; Inmunidad. MccM; microcina M. MccH; microcina H47.

Los experimentos también demostraron que pMM10 dirige la síntesis de las dos microcinas M y H47, con la participación de algún gen del sistema H47, y además esta construcción confiere inmunidad específica a ambas microcinas.

La región de pEX4 que está ausente en pRH7.1 se localiza a la izquierda de *mchX*, y está implicada en la complementación. Para comprobar que, en efecto la complementación era debida a la región que contiene el gen *mchA*, clonamos un fragmento *HindIII* de 6.216 pb de pEX4 en los vectores pUC13 y pACYC184, originando los plásmidos **pEX5** y **pEX101**, respectivamente. Estos nuevos plásmidos fueron empleados en ensayos de complementación para inmunidad y producción.

		TAPICES					
		RYC1000	RYC1000 (pEX5)	RYC1000 (pEX101)	RYC1000 (pEX5)(pMM10)	RYC1000 (pEX101)(pMM1)	Nissle 1917
PRODUCTORES	Nissle 1917	++	++	++	I	I	I
	RYC1000 (pMM10)	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX4)	+	+	+	I	I	I
	RYC1000 (pEX5)	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX101)	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMM10) (pEX5)	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMM1) (pEX101)	-	-	-	-	-	-
	Pop-3001.6 (pRH7.1)	-	-	-	-	-	-
	Pop-3001.6 (pRH7.1) (pEX101)	++	+	+	I	I	I

Tabla 4.4: La tabla muestra los fenotipos de inmunidad y producción de microcina de la cepa *E. coli* RYC1000 transformada con pMM10, con pMM10 más pEX4 y con pMM10 más los nuevos derivados de pEX4 (pEX5 y pEX101). (-): ausencia de actividad. (+): presencia de actividad antibiótica. (I): inmunidad.

Contrariamente a lo esperado, los dos nuevos derivados pEX5 y pEX101 no complementaron a pMM10, aunque si lo hicieron en el caso de pRH7.1, y tampoco confirieron inmunidad. Para aclarar este punto decidimos amplificar en gen *mchA* y clonarlo para emplearlo en los ensayos de complementación.

4.2.9. Secuencia del derivado pEX5 y pEX101.

El fragmento *Hind*III de 6.2 Kb se secuenció completamente y mediante el programa ORF finder del NCBI se encontraron tres ORFs de 375 aa, 424 aa y 39 aa, precedidos por un buen SD en los tres casos. El ORF de 375 aa se expresaba en el mismo sentido que los genes *mch* y por su emplazamiento se asumió que se trataba del gen *mchA*. El ORF de 39 aa correspondería con el gen *mchX*. El ORF de 424 aa, que no había sido descrito hasta el momento, estaría localizado en la zona que previamente se había denominado región silente.

Al final del fragmento, apareció un hipotético ORF, con un buen SD, pero que no estaba completo, y que asumimos que se trataba de *mchI*, que es un gen implicado en la inmunidad. Estos datos eran coherentes con la ausencia de inmunidad a MccH47 de las construcciones pEX5 y pEX101. A continuación se exponen los experimentos que realizamos con el fin de analizar cual o cuales de estos genes eran necesarios para la complementación de la construcción pRH7.1.

4.2.10. El gen *mchA* es necesario para la producción de MccH47 y MccM.

Obtención de mutantes de inserción

Realizamos una mutagénesis al azar con el minitransposón λ NK1324 (que confiere resistencia a cloranfenicol) sobre la cepa *E. coli* RYC1000 portando el plásmido pEX4. Tras la obtención de DNA plasmídico y transformación de *E. coli* RYC1000 todos los clones Cm^R Ap^R seleccionados se testaron para actividad microcina H47 obteniéndose 15 clones no productores.

Todos los derivados de inserción pEX4 que habían perdido la capacidad de producción fueron entonces transformados en la cepa de *E. coli* RYC1000 (pMM10). Todos a excepción de tres fueron capaces de complementar a pMM10, es decir, recuperaron fenotípicamente la capacidad de producción de la microcina H47. Los tres clones que no consiguieron recuperar la actividad H47 tampoco fueron capaces de complementar a pMM10 en la síntesis de microcina M. Tras amplificación y secuenciación de la región donde estaba insertado el transposón en los tres derivados de inserción, comprobamos que en todos los casos, la inserción interrumpía la expresión del gen *mchA* (pEX4 ∇ *mchA*). Con este resultado se demuestra que el gen *mchA* es

absolutamente esencial para sintetizar tanto microcina H47 como microcina M. La ausencia del gen *mchA* en todos los derivados pRH obtenidos a partir de la cepa original de Nissle 1917 explicaba la falta de producción de actividad microcina.

4.2.11. Clonación de *mchA*.

Un fragmento *Bam*HI-*Sal*I de 3.006 pb de pEX4, que incluía el gen completo *mchA*, se clonó en *E. coli* pACYC184 resultando el derivado que llamamos **pEX102**. Este plásmido fue utilizado en experimentos de complementación, cuyos resultados se reflejan en la tabla 4.5:

		TAPICES			
		RYC1000	RYC1000 (pMM8)	RYC1000 (pMM10)	Nissle 1917
PRODUCTORES	RYC1000	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX102)	-	-	-	-
	RYC1000 (pMM1)	-	-	-	-
	Pop3001.6 (pRH7.1) (pEX102)	H-MccM H-MccH	H-MccM I-MccH	I-MccM I-MccH	I-MccM I-MccH
	RYC1000 (pMM1) (pEX102)	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX4)	H-MccH	I-MccH	I-MccH	I-MccH
	RYC1000 (pEX4 ∇ <i>mchA</i>)	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX4 ∇ <i>mchA</i>) (pEX102)	H-MccH	I-MccH -	I-MccH	I-MccH
	Nissle 1917	H-MccM H-MccH	P-MccM I-MccH	I-MccM I-MccH	I-MccM I-MccH

Tabla 4.5: H; halo inhibición, I; Inmunidad. MccM; microcina M. MccH; microcina H47.

El nuevo derivado no complementó al plásmido pMM1, este resultado nos recuerda que tampoco pEX101 lo hizo.

4.2.12. Construcción del plásmido híbrido pHM1.

Con el fin de disponer de un único plásmido capaz de codificar la producción e inmunidad de las dos microcinas y así facilitar la caracterización del sistema genético, construimos un nuevo plásmido derivado de pACYC184 que porta un fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 5.846 pb cuyo origen es el pEX4 y otro fragmento *Hind*III de 11.852

pb procedente de pRH7.1. Este plásmido quimera resultante fue denominado pHM1, y con él se hicieron todas las pruebas fenotípicas que a su vez habíamos realizando con los otros derivados (actividad antibiótica e inmunidad). Asimismo, al igual que hicimos anteriormente con el pEX4 (ver apartado 4.2.9), realizamos una delección *Bgl*III sobre pHM1 con el fin de eliminar la producción de MccH47 a partir de pHM1, resultando el derivado **pHM2**. El esquema de los dos plásmidos híbridos se muestra en la (Figura 4.6) y los resultados fenotípicos en la tabla 4.6.

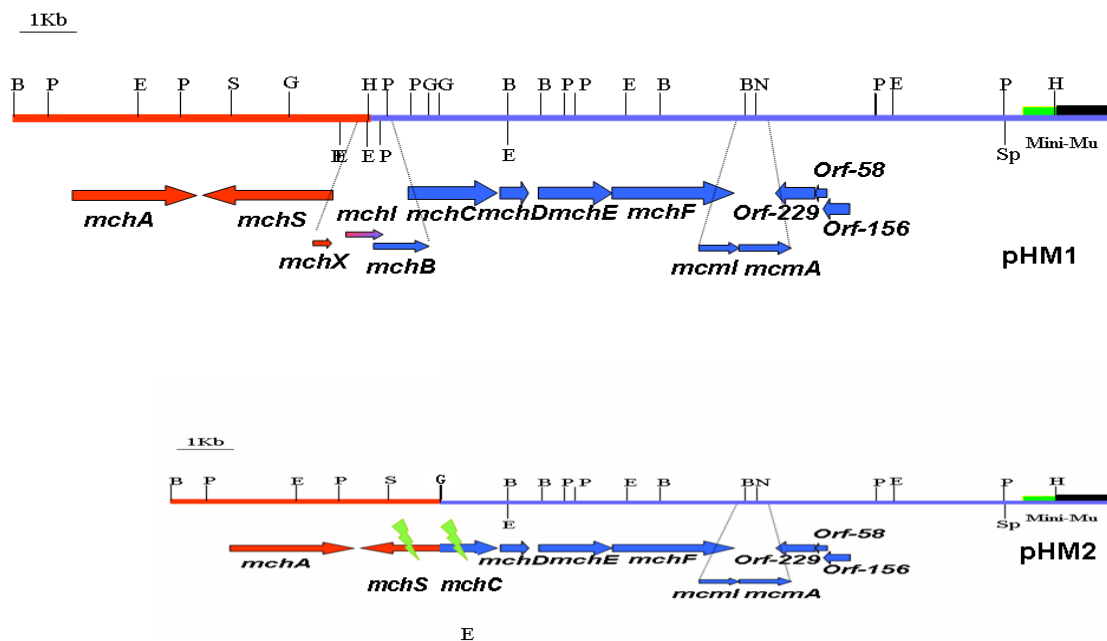


Figura 4.6: Plásmidos pHM1 y pHM2. En rojo se indica el fragmento procedente de pEX4 y en azul fragmento procedente de pRH7.1. En verde se muestra el fragmento residual miniMu y en negro el vector de clonación pACYC-184. Los sitios de restricción: (B) *Bam*HI, (E) *Eco*RI, (G) *Bgl*III, (H) *Hind*III, (N) *Nde*I, (P) *Pst*I, (S) *Sal*I, (Sp) *Sph*I.

		TAPICES						
		RYC1000	RYC1000 (pMM8)	RYC1000 (pEX4)	RYC1000 (pMM10)	RYC1000 (pHM1)	RYC1000 (pHM2)	Nissle 1917
PRODUCTORES	RYC1000	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX4)	+	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX4) (pMM10)	++	+	+	-	-	-	-
	RYC1000 (pHM1)	++	+	+	-	-	-	-
	RYC1000 (pHM2)	+	+	+	-	-	-	-
	Nissle 1917	+	+	+	-	-	-	-

Tabla 4.6: (+) Producción de microcinas, (++) mayor producción de microcina, (-) sin actividad.

Cuando pHM1 se introdujo en *E. coli* K12, la cepa era capaz de producir ambas microcinas, por otra parte también confirmamos que pHM1 confería inmunidad a las dos sustancias antibióticas. pHM2 no porta ni el gen estructural ni el gen de inmunidad a microcina H47 y por tanto, no observamos actividad microcina pero sorprendentemente vimos que si protegía a las células de microcina H47 externa. Este fenotipo será explicado más tarde. Además el plásmido pHM2, era capaz de sintetizar microcina M y conferir inmunidad a la misma.

4.2.13. Genes de inmunidad específica y precursor de microcina M (*mcmI* y *mcmA*).

Cuando se estudió la secuencia de pRH7.1 se vio que 38 pb a la derecha del gen *mchF*, el último gen del sistema MccH47 (ver figura 4.5), aparecían dos ORFs de 219 pb (*mcmI*) y 276 (*mcmA*) pb, que deberían codificar sendos péptidos de 73 y 92 aa,

respectivamente. Ambos genes solapaban 4 nucleótidos, de manera que el codon stop y el codon de iniciación estaban acoplados. Curiosamente el tamaño era muy similar al de los péptidos de estructura e inmunidad de la microcina H47 (*mchI* con 69 aa y *mchB* con 97 aa), haciendo suponer que podrían ser los genes de inmunidad y estructural de microcina M.

Para comprobar esta hipótesis, se amplificaron mediante PCR los dos genes y se clonaron en pUC19 juntos y por separado, dando lugar a las construcciones **pMcmIA**, **pMcmI** y **pMcmA**. Con estos derivados transformamos *E. coli* RYC1000, se testó producción, inmunidad y capacidad de crecimiento en medio mínimo.

Las bacterias portando cualquiera de los tres derivados crecían sin problema en medio mínimo pero no producían actividad microcina. Los plásmidos pMcmI y pMcmIA confirieron inmunidad no sólo a MccM, como era de esperar, sino también a MccH47, sin embargo pMcmA no confirió inmunidad a ninguna microcina. Tampoco mostró capacidad alguna de producción. Estos resultados indicaban que el ORF 73, debía ser el gen que codificaba la proteína de inmunidad y lo denominamos *mcmI*.

El orf 92 era un buen candidato para ser el gen precursor de la MccM. La falta de fenotipo de producción con el plásmido pMcmA podía ser fácilmente explicada por la falta de otros genes del sistema necesarios para su producción, como ocurre con la mayoría de las microcinas descritas. Para comprobar que dicha ORF era, en efecto el gen precursor de microcina M, los derivados **pMcmI**, **pMcmA** y **pMcmIA** se transformaron en la cepa portando el plásmido **pEX100** (derivado pACYC-184 portando la misma región que el pEX4) (Laviña., *et al.* 1990) con el fin de evaluar la posible complementación entre ellos.

Como era de esperar, cuando se introdujo pMcmA ó pMcmIA junto con pEX100 en *E. coli* K12, se observó producción de microcina M. Con lo que pudimos afirmar con rotundidad que el gen, que fue denominado *mcmA*, era el precursor de la microcina M y que precisaba de los mismos genes que la microcina H47 para dar lugar a la síntesis de antibiótico activo. Curiosamente, aquellas células que producían microcina M y que carecían del gen de inmunidad específica a la misma (presencia de pEX100 más pMcmA), al cabo de poco tiempo se lisaban y morían. Esta toxicidad no se observaba cuando las células sólo contenían el péptido estructural (pMcmA), lo que indicaba que el precursor era inactivo y necesitaría una modificación posterior para ser activo y

tóxico intracelularmente en ausencia de proteína de inmunidad. La (figura 4.7) muestra los halos de inhibición y fenotipos de inmunidad de estos derivados.

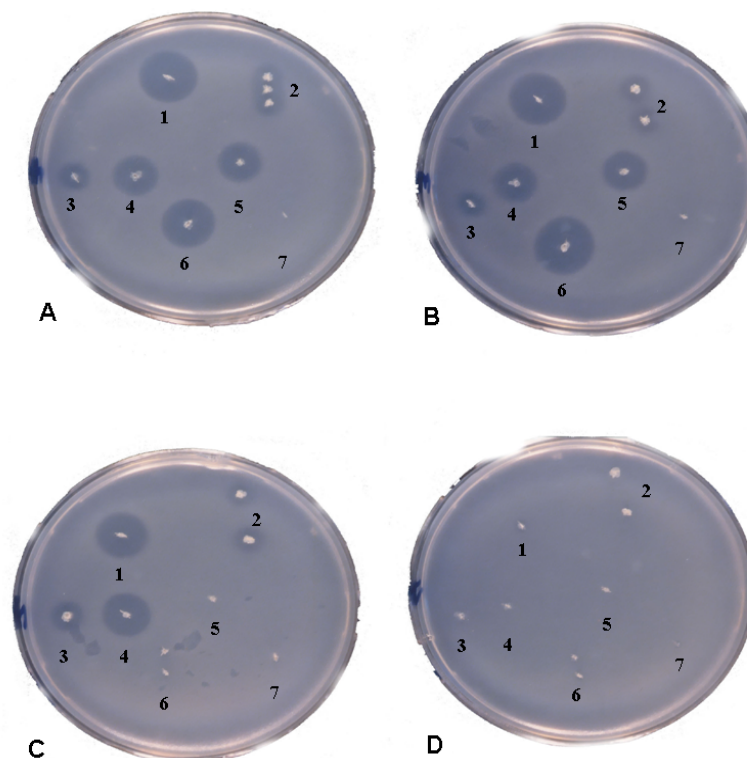


Figura 4.7: Placas con diferentes tapices indicadores, mostrando la actividad de cada plásmido: A) tapiz; RYC1000, B) tapiz RYC1000 (pMcmI), C) RYC1000 (pEX100), D) RYC-1000 (pEX100) (pMcmI). Cepas productoras; 1) RYC1000 (pHM1), 2) Nissle 1917, 3) MF (pMM1), 4) RYC1000 (pEX100) (pMcmIA), 5) RYC1000 (pEX4), 6) RYC1000.

4.2.14. Genes de inmunidad específica y precursor de microcina H47 (*mchI* y *mchB*).

De la misma manera que en el apartado anterior, decidimos amplificar y clonar los genes precursor y de inmunidad de la microcina H47, originando los derivados **pMchI** (incluye *mchI*), **pMchB** (incluye *mchB*) y **pMchIB** (incluye los dos genes acoplados *mchI* y *mchB*). Las tres nuevas construcciones se introdujeron en *E. coli* RYC1000 y se estudió nuevamente el fenotipo. Los plásmidos pMchI y pMchIB confirieron inmunidad específica a MccH47, siendo las células estables y creciendo sin problemas en medio mínimo. Por el contrario, las células que albergaban el plásmido pMchB, no conferían fenotipo productor ni crecieron en medio mínimo, resultando ser muy inestables. Con frecuencia aparecían mutantes espontáneos en las células que portaban únicamente el plásmido pMchB sin inmunidad específica. Uno de estos mutantes fue analizado,

comprobando que una secuencia de inserción evitaba la expresión del gen *mchB*, lo que nos hizo suponer que el gen codificaba un precursor activo, a diferencia de lo observado para la microcina M donde el precursor era inactivo.

		TAPICES							
		RYC1000	RYC1000 (pMcmI)	RYC1000 (pMchI)	RYC1000 (pMM8)	RYC1000 (pMcmIA)	RYC1000 (pMchIB)	RYC1000 (pEX100)	RYC1000 (pHM1)
PRODUCTORES	RYC1000	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMcmI)	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMcmA)	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMcmIA)	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMcmI) (pEX100)	+	+	-	-	+	-	-	-
	RYC1000 (pMcmA) (pEX100)	++	+	+	+	+	+	+	-
	RYC1000 (pMcmIA) (pEX100)	++	+	+	+	+	+	+	-
	RYC1000 (pMchI)	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMchB)	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pMchIB)	-	-	-	-	-	-	-	-
	RYC1000 (pEX100)	+	+	-	-	+	-	-	-
	RYC1000 (pHM1)	++	+	+	+	+	+	+	-
	RYC1000 (pHM2)	+	-	+	+	-	+	+	-

Tabla 4.7: (+) Producción de microcinas, (++) mayor producción de microcina, (-) sin actividad.

4.2.15. Mutagénesis sobre el plásmido híbrido.

Para poder identificar los genes del sistema que eran esenciales en la síntesis de las dos actividades antibacterianas, se realizó una mutagénesis con el mini-transposón λ NK1316 sobre la estirpe *E. coli* RYC1000 portando un nuevo plásmido híbrido. No fue posible la utilización del plásmido híbrido pHM1, debido a problemas con la compatibilidad entre los replicones y marcadores de resistencia del plásmido y del transposón por lo que fue necesario hacer una nueva construcción. Para ello, se clonó en el punto *Hind*III de pMM2, el fragmento *Hind*III de 4.690 pb de pEX4. La construcción resultante fue denominada **pMM21** de 16.342 pb (figura 4.8).

Como resultado de la mutagénesis se aislaron 150 clones Ap^R (resistencia codificada en el plásmido) y Km^R (resistencia codificada en el transposón) y tras asegurar que las inserciones eran plasmídicas, se estudiaron los fenotipos resultantes: producción de microcina, inmunidad, resistencia, así como estabilidad celular. Por otra parte, las inserciones también fueron secuenciadas para localizar con precisión la posición de cada transposón (figura 4.8). Fueron halladas inserciones en todos los ORFs del sistema con las excepciones del ORF 58 y del ORF 229.

Con el experimento de mutagénesis pudimos llegar a las siguientes conclusiones:

i) Cinco genes son esenciales para la síntesis de ambas microcinas, es decir, cuando se inactivan estos genes se abole la síntesis de los dos antibióticos. Estos genes eran *mchA*, *mchC*, *mchD*, *mchE* y *mchF*.

ii) Las inserciones en el gen *mchB* impedían la síntesis de microcina H47 e inserciones en *mcmA* interrumpían la síntesis de microcina M. Una inserción en el penúltimo codón de *mcmA* no afectaba a la síntesis de microcina M.

iii) Inserciones en el ORF 424 que decidimos denominar *mchS*, localizado en la llamada Región Silente (Laviña *et al.*, 1990) y en *mchX*, reducían cuantitativamente la producción. El gen *mchX* fue amplificado por PCR, clonado en un vector de expresión y transformado en *E. coli* RYC1000 junto con el plásmido mutagenizado (pMM21 ∇ *mchX*), no siendo capaz de revertir la inactivación del sistema microcina. Por tanto, la disminución de actividad originada por las inserciones en *mchX*, no son consecuencia de la inactivación del gen *mchX* sino que eran debidas al efecto polar sobre el gen precursor.

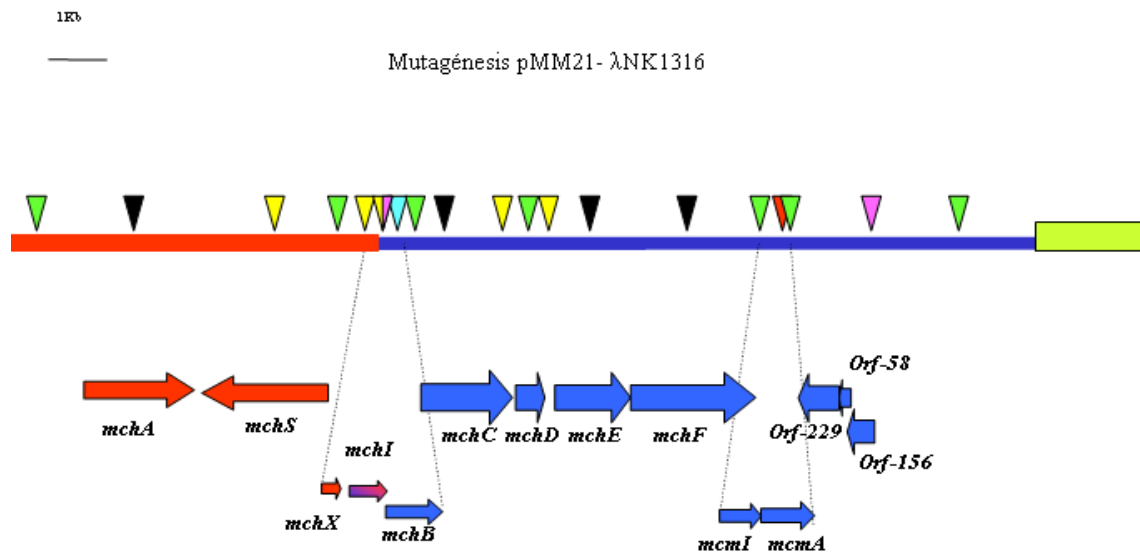


Figura 4.8: Esquema del pMM21 con las inserciones del mini transposón λ NK1316. Color negro de la inserción, fenotipo no productor de microcina; azul, sólo produce microcina M; rojo, sólo produce microcina H; amarillo, producción disminuida de actividad; verde, fenotipo salvaje; morado, no crece en medio mínimo. Bandas rojas de origen pEX4; azul, de origen Nissle 1917 y verde pACYC-184.

4.2.16. Búsqueda del homólogo a *mchA* en el genoma de Mutaflor.

En el fragmento cromosómico de Nissle 1917 clonado en el plásmido pRH7.1 no están todos los genes necesarios para la síntesis de microcina M como demostraron los experimentos descritos en los apartados anteriores y dejaron bastante claro que la presencia del gen *mchA* o quizás de un homólogo de éste era necesaria para la síntesis de esta microcina. Tomando como base la secuencia el fragmento *Hind*III de 6,2 Kb de pEX4 (plásmido que porta todo el sistema necesario para la producción de microcina H47), se diseñaron unos cebadores para amplificar el gen *mchA*, utilizando como molde el ADN genómico de las cepas RYC1000 (*E. coli* K12), Nissle 1917 y *E. coli* O157:H7 y como controles el ADN plasmídico de pEX4 y pMM21. Obtuvimos amplificaciones positivas en la cepa O157:H7, y en los plásmidos pEX4 y pMM21, pero no en las cepas RYC1000 y Nissle 1917.

Es posible que Nissle 1917 presentara regiones intergénicas muy diferentes con lo que el cebador no se uniría al molde. Por ello, se probaron cebadores intragénicos del gen *mchA*, sin embargo, tampoco conseguimos una amplificación a partir de RYC1000 ni de

Nissle 1917. Decidimos entonces buscar genes homólogos a *mchA* en estas cepas, mediante Southern Blot utilizando como sonda el producto amplificado de *mchA* a partir de pEX4. Como se muestra en la figura 4.9, hubo hibridación positiva en las cepas *E. coli* Nissle 1917 y *E. coli* O157:H7 (que ya habíamos demostrado por PCR), mientras en *E. coli* RYC1000 la hibridación fue negativa. Este resultado demostraba la existencia de un gen homólogo a *mchA* en nuestra cepa.

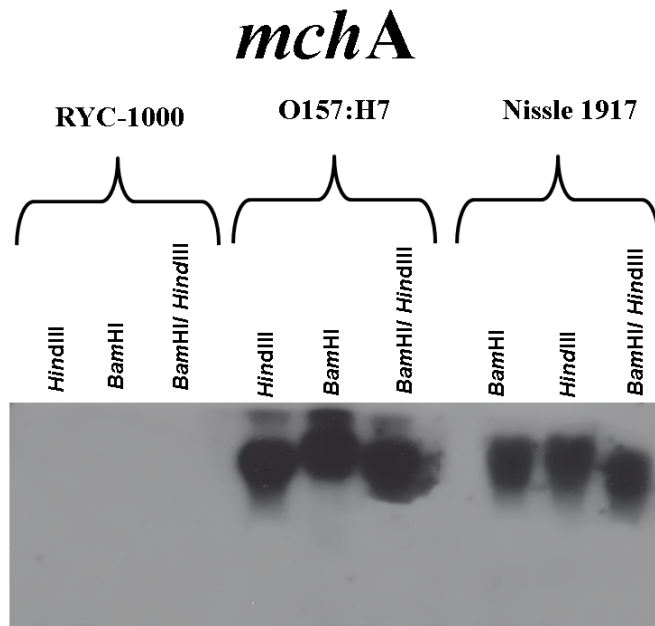


Figura 4.9: Southern Blot utilizando como sonda el producto amplificado de *mchA*. Se digirió el ADN de las cepas *E. coli* RYC1000, Nissle 1917 y *E. coli* O157:H7 con las enzimas de restricción *Hind*III, *Bam*HI y *Bam*HI-*Hind*III.

4.2.17. Clonación del homólogo a *mchA*.

Para clonar el gen homólogo de *mchA* a partir del genoma de Nissle 1917 empleamos nuevamente el método de clonación in vivo del mini-Mu. Así pues, se preparó una suspensión de partículas virales por termo-inducción de la cepa Nissle 1917 *mucts* (pEG109) a 42° C y con el lisado se infectó *E. coli* pop3001.6 (pMM21V2.4-Km-*mchA*), seleccionando los muductantes a 30° C. Esta cepa con el plásmido híbrido pMM21, lleva el gen *mchA* del sistema de la microcina H47 inactivado por la inserción descrita en el apartado 4.2.16.

Se chequeó la actividad microcina en un total de cuatrocientos clones Ap^R, Km^R Cm^R, obteniéndose un clon que recuperaba el fenotipo productor. El ADN plasmídico

de este clon fue extraído y empleado para transformar *E. coli* pop3001.6 seleccionando clones Cm^R. Dicho plásmido, al que denominamos **pGT1**, no producía ningún efecto sobre *E. coli* K12 pop3001.6 pero era capaz de inducir la producción de MccH47 y MccM cuando se encontraba junto con los plásmidos (pMM21∇2.4-Km-*mchA*) y (pRH7.1).

Con un análisis de restricción se estimó que el tamaño del inserto presente en pGT1 era aproximadamente de 35 Kb. Debido al gran tamaño y a que la presencia de algunos genes del Mu era un inconveniente, decidimos hacer derivados más pequeños y más estables. La nueva construcción, **pMM30**, portaba dos fragmentos *Hind*III: uno de 3,9 kb, procedente del mini-Mud4042 (que incluye el replicón y el marcador Cm), y otro de 7,8 Kb del genoma de Nissle 1917. Este plásmido era estable en *E. coli* pop3001.6 y RYC1000, e introducido en *E. coli* pop3001.6 (pRH7.1), y RYC1000 (pMM1) conseguía recuperar la producción de ambas microcinas.

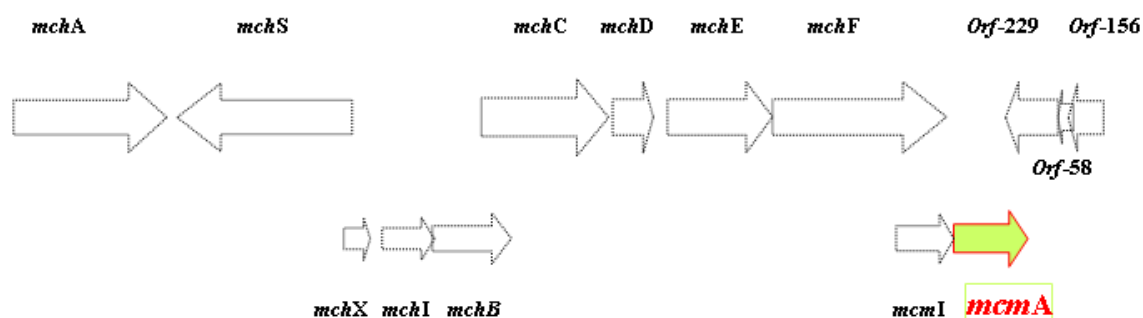
4.2.18. Secuencia del plásmido pMM30

La secuencia del plásmido pMM30 se realizó conforme se describe en el apartado de métodos. El fragmento *Hind*III resultó tener un tamaño de 7.810 pb y contener tres marcos de lectura abiertos, uno de ellos incompleto. El tamaño de dichos ORFs era de 371 aa, 1.261 aa y 294 aa (incompleto). El ORF de 371 aa tenía un tamaño muy similar a *mchA* (375 aa), por tanto era un buen candidato para ser el homólogo que andábamos buscando.

Utilizando la secuencia del plásmido, se diseñaron unos cebadores que permitieron amplificar el ORF de 371 aa utilizando como molde pMM30 y clonarlo en el vector pACYC-184. Cuando el nuevo derivado obtenido, **pMM31**, se introdujo en RYC1000 (pMM1) y RYC1000 (pMM21∇2.4-Km-*mchA*) se consiguió recuperar la actividad de ambas microcinas, H47 y M. Además, también se complementó la capacidad de síntesis de microcina H47 al transformar *E. coli* RYC1000 (pEX4∇*mchA*) (ver apartado 4.2.11) con pMM31. El nuevo gen clonado, al que llamamos **mcmG** era la clave que cerraba el sistema de producción de las microcinas en Nissle 1917.

4.3. DESCRIPCIÓN DE LOS GENES:

4.3.1. Gen precursor de la microcina M: *mcmA*.



Tras secuenciación del gen *mcmA* y comparación de la hipotética proteína ([CAE55705](#)), que con las secuencias incluidas en las bases de datos vimos que presentaba homología con otras proteínas que también tenían relación con microcinas como MchB (precursor de la microcina H47, 38% de identidad)(Rodríguez *et al.*, 1999), CvaC (precursor de la microcina V, 35% de identidad)(Wilson., *et al.* 1990), MtfS (precursor de la microcina 24, < 20% identidad)(O'Brien & Mahanty, 1996) ó MceA (precursor de la microcina E492, 28% de identidad)(Lagos *et al.*, 2001). (Ver tabla 5.2 del apartado 5.2.3 de la discusión). En el extremo carboxilo terminal de los péptidos precursores de microcinas H47, M y E492 hay una región rica en serina y glicina, quizás sea esta la zona que sufre las modificaciones postraduccionales. A continuación mostramos los alineamientos encontrados entre estas proteínas:

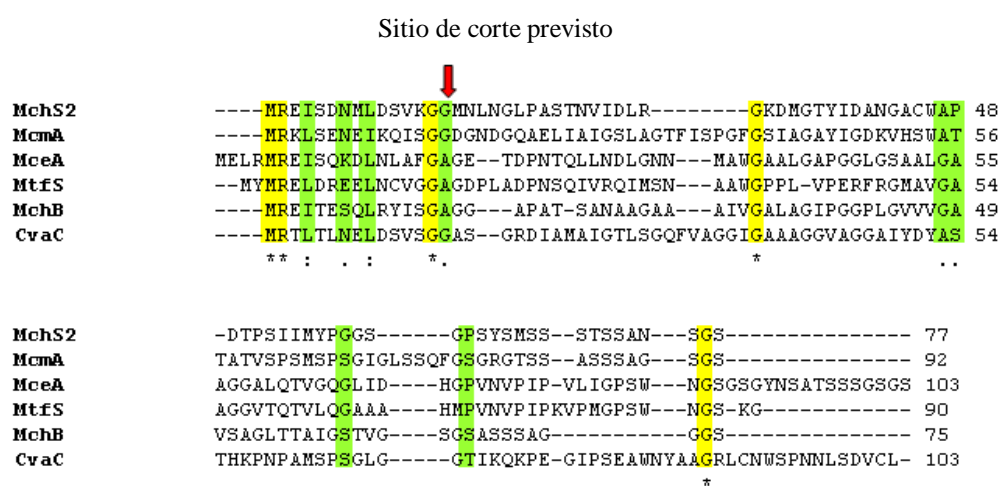
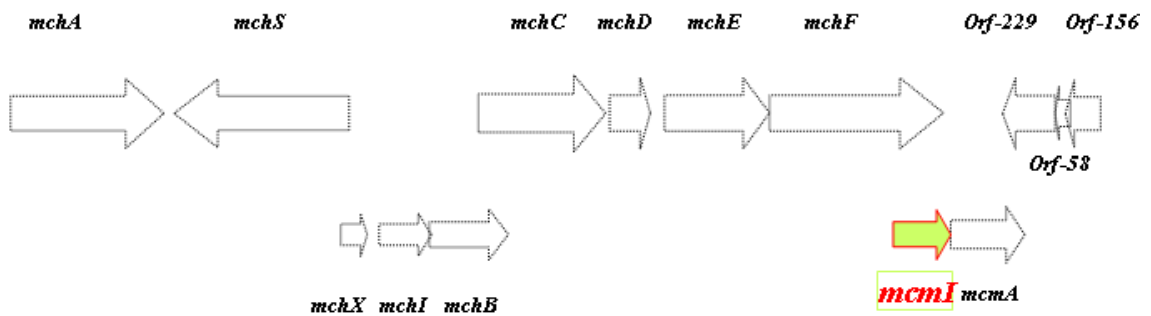


Figura 4.10: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los péptidos precursores de las microcinas; CvaC: microcina V; MtfS: microcina N24; MceA: microcina E492; McmA: microcina M; MchB: microcina H47 y MchS2: microcina I47.

En amarillo se resaltan los aminoácidos idénticos mientras que en verde los aminoácidos equivalentes.

4.3.2. Gen específico de inmunidad a microcina M: *mcmI*.

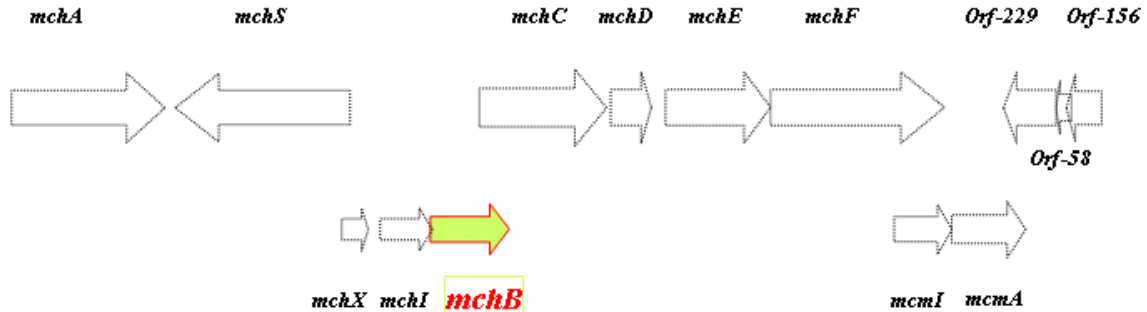


Éste gen codifica la proteína de inmunidad para la Microcina M y tras ser comparada con las bases de datos se comprobó que presentaba identidad con otras proteínas de inmunidad a microcinas: MchI (inmunidad a microcina H47, 16% de identidad) (Rodríguez & Laviña., 1998), Cvi (inmunidad a microcina V, 22% de identidad) (Gilson *et al.*, 1990), MceB (inmunidad a microcina E492, 21% de identidad) (Wilkins *et al.*, 1997) y MtfI (inmunidad a microcina 24, 22% de identidad) (O'Brien & Mahanty, 1996).

Cvi	MDRKRTKLEL-LFAFIINATAIYIALAIYDCVFRGKDFLSMHTFCFSALMSAICYFVGDN	59
McmI	MGEVKKDIKITVIAFVINYLFFYIPVSLYLSYYYGYNFFNLYMFFLSLVVTFLSLWLNVN	60
MchI	MS--YKKLSQLTAIFSLPITILLVLSLRLIVGEGNSYVDVF-LSEIIFLGFIELIHGIR	57
	* * : : : : * : : . : . .	
Cvi	YYSISDKIKRRSYENSDDSK	78
McmI	FYFFTNLIAK-VLK-----	73
MchI	RILVWSGWKNGS-----	69
	

Figura 4.11: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de inmunidad de las microcinas; Cvi: microcina V; McmI: microcina M y MchI: microcina H47. En azul se resaltan los aminoácidos idénticos o equivalentes.

4.3.3. Gen precursor de la microcina H47: *mchB*



El gen precursor de la microcina H47 (Gaggero *et al.*, 1993) codifica un péptido que sería activo sin sufrir previamente modificaciones como se describió en el apartado 4.2.12. La secuencia de este gen (secuencia obtenida a partir de la cepa Nissle 1917) y la proteína deducida fue comparada con las secuencias ya existentes en las bases de datos. Se observaron algunos polimorfismos de DNA con respecto a la secuencia publicada anteriormente por Laviña (Rodríguez *et al.*, 1999) pero que no afectaban a la secuencia de aminoácidos (figura 4.12).

Identidad = 291/294 (98%), Positivos = 291/294 (98%)

```

mchB (1): 1 ATGGGATTTCGAAGGATTCTGGTCTGGTCAGGCTGGAAAAACGGAAGTTAAATATGATGGA 60
  |||
mchB (2): 1 ATGGGATTTCGAAGGATTCTGGTCTGGTCAGGCTGGAAAAACGGAAGTTAAATATGATGGA 60

mchB (1): 61 GTTTATATGCGAGAAATAACAGAATCACAGTTAAGATATATTTCCGGGGCGGGAGGTGCG 120
  |||
mchB (2): 61 GTTTATATGCGAGAAATAACAGAATCACAGTTAAGATATATTTCCGGGGCGGGAGGTGCG 120

mchB (1): 121 CCAGCGACTTCAGCTAATGCTGCAGGTGCTGCAGCTATTGTTGGAGCTCTCGCCGGAATA 180
  |||
mchB (2): 121 CCAGCGACTTCAGCTAATGCTGCAGGTGCTGCAGCTATTGTTGGAGCTCTCGCCGGAATA 180

mchB (1): 181 CCTGGTGGTCCACTTGGGGTTGTAGTTGGAGCCGTATCTGCCGTTTGACAACAGCAATT 240
  |||
mchB (2): 181 CCTGGTGGTCCACTTGGGGTTGTAGTTGGAGCCGTATCTGCCGTTTGACAACAGCAATT 240

mchB (1): 241 GGCTCGACCGTGGGAAGTGGTAGTGCCAGTTCCTCTGCTGGTGGCGGTAGCTAA 294
  |||
mchB (2): 241 GGCTCGACCGTGGGAAGTGGTAGTGCCAGTTCCTCTGCTGGTGGCGGTAGCTAA 294
  
```

Péptido: 100% idéntico.

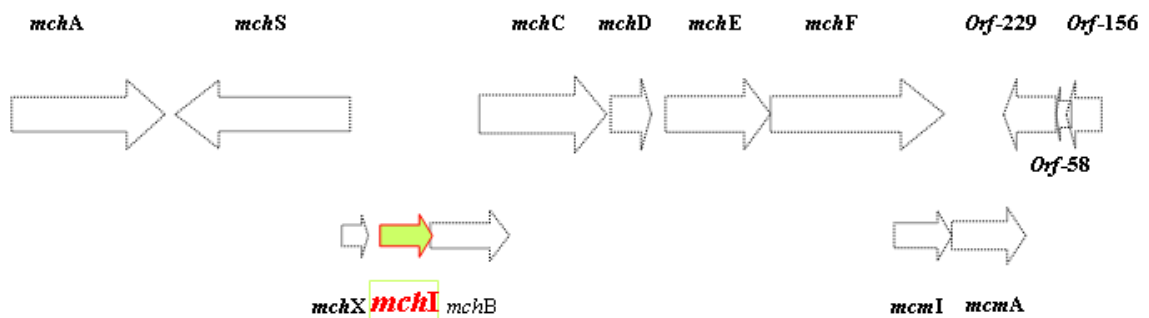
```

MCHB (1): 1 MREITESQLRYISGAGGAPATSANAAGAAI VGALAGIPGGPLGVVVGAVSAGLTTAIGS 60
  MREITESQLRYISGAGGAPATSANAAGAAI VGALAGIPGGPLGVVVGAVSAGLTTAIGS
MCHB (2): 1 MREITESQLRYISGAGGAPATSANAAGAAI VGALAGIPGGPLGVVVGAVSAGLTTAIGS 60
  MREITESQLRYISGAGGAPATSANAAGAAI VGALAGIPGGPLGVVVGAVSAGLTTAIGS
  
```

MCHB (1): 61 TVGSGSASSSAGGGS 75
 TVGSGSASSSAGGGS
 MCHB (2): 61 TVGSGSASSSAGGGS 75

Figura 4.12: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen *mchB*. Origen sistema microcina H47 Laviña (1) y origen Nissle 1917 (2). Contorno azul muestra las diferencias nucleotídicas.

4.3.4. Gen de inmunidad de la microcina H47: *mchI*.



Este gen es el responsable de la inmunidad a microcina H47 (Gaggero *et al.*, 1993) (Rodríguez *et al.*, 1998). Codifica un péptido de 69 aa y confiere inmunidad exclusivamente a microcina H47. La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos obtenidos a partir de Nissle 1917 fueron comparadas con las ya incluidas en la base de datos, detectándose cinco polimorfismos que supusieron tres cambios aminoacídicos, aunque en dos de los tres casos la sustitución fue por un aa equivalente. Los dos péptidos MchI (cepa original productora de MccH47) y MchI (cepa Nissle 1917) conferían inmunidad a MccH47. Es más, al construir los plásmidos híbridos, la unión de las dos bandas en el punto *HindIII* comentado en el apartado 4.3.11 originaba un gen *mchI* híbrido, que mantenía la función inmune. La siguiente figura muestra los alineamientos:

Identidad = 205/210 (97%), Positivos = 205/210 (97%),

```

mchI (1): 1 ATGAGTTATAAAAACTGTC CCAATTGACGGCTATATT CAGTTACCTATTACTATCTTA 60
          |||
mchI (2): 1 ATGAGTTATAAAAACTGTA CCAATTGACGGCTATATT TAGTTACCTCTTACTATCTTA 60

mchI (1): 61 TTGGTTTCACTTTCATCCCTTCGGATTGTTGGCGAAGGGAATTCTTATGTTGACGTTTTT 120
          |||
mchI (2): 61 TTGGTTTCACTTTCATCCCTTCGGATTGTTGGCGAAGGGAATTCTTATGTTGACGTTTTT 120

mchI (1): 121 CT AAGCTT TATAATATTTCTTGGTTTTATTGAGCTGATTCATGGGATTCGAA GATT C TG 180
          |||
mchI (2): 121 CT AAGCTT TATAATATTTCTTGGTTTTATTGAGCTGATTCATGGGATTCGAA GATT TTG 180
    
```

HindIII

```

mchI (1): 181 GTCTGGTCAGGCTGGAAAAACGGAAGTTAA 210
              |||
mchI (2): 181 GTCTGGTCAGGCTGGAAAAACGGAAGTTAA 210
  
```

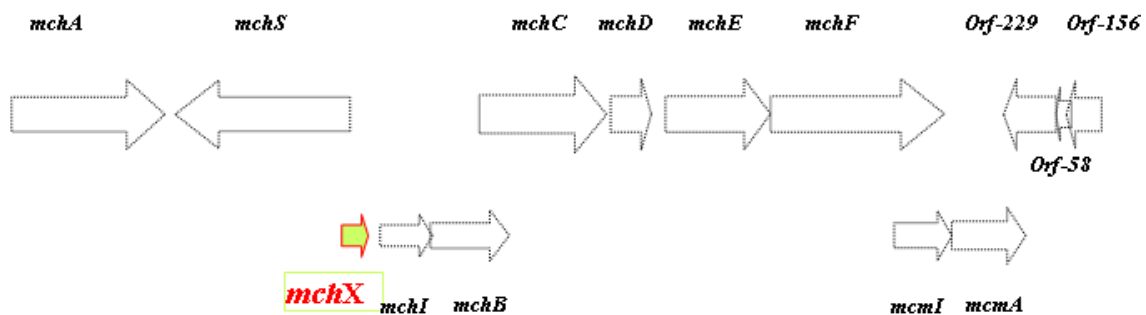
Idénticos = 66/69 (95%), Positivos = 68/69 (98%).

```

MCHI (1): 1 MSYKKLSQLTAIFSLPITILLVSLSSLRIVGEGNSYVDVFLSFIIFLGFIELIHGIRIL 60
              MSYKKL QLTAFSLP+TILLVSLSSLRIVGEGNSYVDVFLSFIIFLGFIELIHGIR+IL
MCHI (2): 1 MSYKKLYQLTAIFSLPLTILLVSLSSLRIVGEGNSYVDVFLSFIIFLGFIELIHGIRKIL 60
              MSYKKL YQLTAIFSLPL TILLVSLSSLRIVGEGNSYVDVFLSFIIFLGFIELIHGIRKIL
MCHI (1): 61 VWSGWKNGS 69
              VWSGWKNGS
MCHI (2): 61 VWSGWKNGS 69
  
```

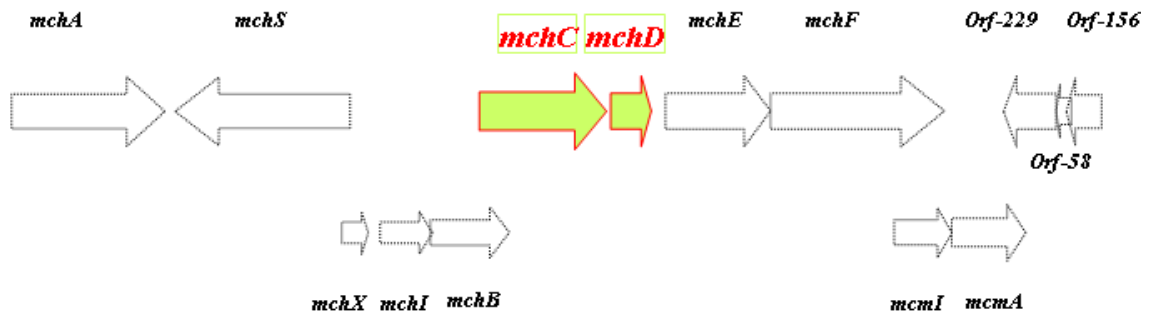
Figura 4.13: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas del gen *mchI*. Origen sistema microcina H47 Laviña (1) y Origen Nissle 1917 (2). En azul se resaltan las diferencias nucleotídicas. En amarillo se resaltan las diferencias en la secuencia aminoacídica. (+) Sustitución equivalente.

4.3.5. El gen *mchX*: Un gen de función desconocida.



Este gen está presente en el fragmento clonado de la cepa *E. coli* Nissle 1917 y en el sistema de la microcina H47. El péptido tiene un tamaño de 39 aa. Los experimentos desarrollados durante la elaboración de esta tesis demostraron que el producto de este gen no es necesario en la síntesis de las microcinas H47 y M. Una inserción en *mchX* disminuyó la actividad, aunque todo parecía indicar que era debido al efecto polar sobre *mchB*. Rodríguez y Laviña propusieron que formarían un mismo operón los genes *mchX*, *mchI* y *mchB* (Rodríguez *et al.*, 1998). El producto de *mchX* participaría en la regulación de la expresión del propio operón (Poey *et al.*, 2006).

4.3.6. Genes *mchC* y *mchD*: sistema de maduración.



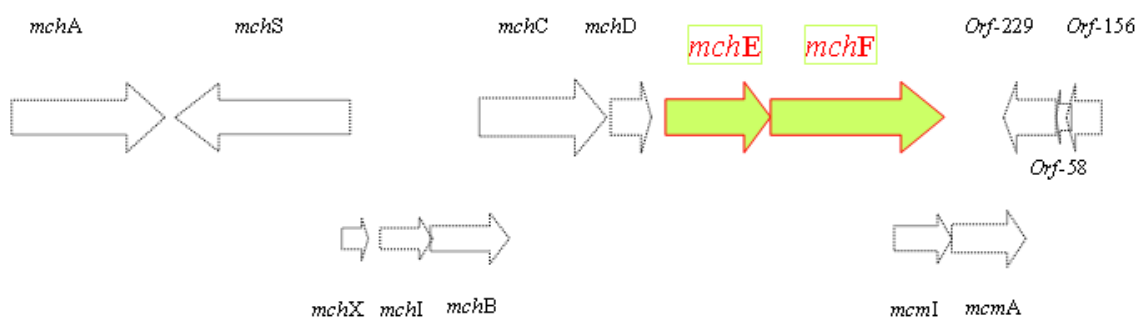
La proteína que codifica *mchD* tiene un tamaño de 150 aa y presenta semejanzas con secuencias de aciltransferasas, como por ejemplo HlyC, necesaria para la acilación de la hemolisina de *E. coli* (Stanley *et al.*, 1988).

Se conoce por las bases de datos que estos genes también están presentes en las islas de patogenicidad de *E. coli* CFT073 (NC004431), *E. coli* H47 (AJ009631), *E. coli* CA46 (AJ515251) y *E. coli* CA58 (AJ515252).

La proteína MchD es absolutamente imprescindible para la actividad Microcina.

Se desconoce la función de la proteína MchC de 516 aa, aunque pensamos que no es necesaria para la síntesis de microcina M. El derivado pHM2 fue capaz de dirigir la síntesis de microcina M, a pesar de que el gen *mchC* no estaba presente en dicho plásmido. Una inserción en el gen *mchC*, abolió la capacidad de producir microcina en el plásmido pMM21. Muy posiblemente este fenómeno sea debido a un efecto polar sobre la expresión de los otros genes como *mchD*. Por el contrario, debemos considerar también la posibilidad de que la proteína MchC sea necesaria para la actividad microcina H47 (Poey *et al.*, 2006)

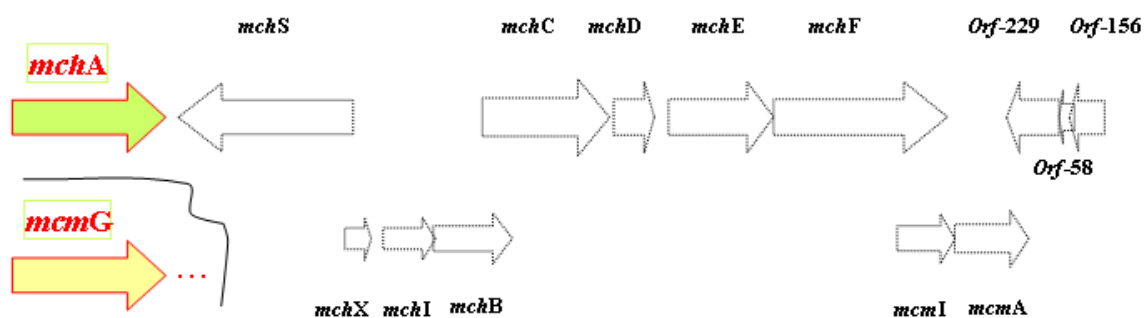
4.3.7. Genes de transporte: *mchE* y *mchF*.



El gen *mchF* codifica una proteína de 698 aa que presenta un 89% de identidad al producto del gen *cvaB*, que es un transportador del tipo ABC que participa en la exportación de microcina V (Gilson *et al.*, 1990) (Azpiroz *et al.*, 2001). Este tipo de sistemas requieren la presencia de una proteína accesoria para la secreción.

El gen *mchE* codifica para una proteína de 424 aa con una identidad del 97% con el producto del gen *cvaA*, proteína accesoria para la secreción de la microcina V (Boyer *et al.*, 1998).

4.3.8. Los genes *mchA* y *mcmG*: codifican glicosiltransferasas.



Cuando se comparó la secuencia aminoacídica de la proteína MchA, codificada por el gen *mchA*, con la base de datos, los resultados indicaron que se trata de una glicosiltransferasa con 96% de identidad a la glicosiltransferasa de la cepa entero-hemorrágica *E. coli* O157: H7 (N° acceso AE005274). A nivel nucleotídico, además de presentar una gran homología con el gen que codifica la glicosiltransferasa de *E. coli* O157:H7, también presenta alta homología con otros genes que codifican glicosiltransferasas como: *mcmL* de la cepa *E. coli* C46 (98% de identidad) (N° acceso: AJ515251), *mcmL* de la cepa *E. coli* C58 (98% de identidad) (N° acceso: AJ515252), *mceC* (glucosil-transferasa de *Klebsiella pneumoniae* cepa RYC492 (productora de MccE) (83% identidad) (N° acceso: AF063590).

Cuando se comparó el gen homólogo a *mchA* procedente del genoma de Nissle 1917 (*mcmG*, de 371 aa) con las secuencias incluidas en las bases de datos, observamos que la proteína que codificaba, *mcmG*, también presentaba homología con diversas glucosiltransferasas: identidad del 99% con *IroB* (387 aa) de la cepa uropatogénica *E. coli* (Dobrindt *et al.*, 2001)(Welch *et al.*, 2002) (N° acceso: Q8FIW3), 99% de identidad con *IroB* (371 aa) de la isla de patogenicidad de tipo III presente en la cepa uropatogénica *E. coli* 536 (Dobrindt., *et al.*, 2001) (N° de acceso Q83WA1), 86% de

identidad con IroB (371 aa) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, (McClelland, M *et al.*, 2001) (N° acceso Q8ZMN4), 86% identidad con IroB de (371 aa) de *Salmonella enterica* serovar Typhi cepas Ty2 y CT18 (Parkhill, J., et al., 2001) (N° acceso: P96056) y 75% de identidad con MceC (370 aa) de *K. cepa* RYC492 (Lagos *et al.*, 2001) (N° de acceso: Q93GK9). Todas estas proteínas también presentaron homologías con glicosiltransferasas de *Streptomyces peucetius* (N° acceso: L47164) y *Streptomyces fradiae* (N° acceso: AAF00215), implicadas en la biosíntesis de los antibióticos daunorubicina y urdamicina, respectivamente (Otten *et al.*, 1995; Faust *et al.*, 2000).

```

MCML: CA46 -----MRKRILFIGPPLYGLLYPLISLAQAFRVIGHDVISSAGKFANKAA 46
MCML: CA58 -----MRKRILFIGPPLYGLLYPLISLAQAFRVIGHDVISSAGKFANKAA 46
IROB: O157:H7 -----MRKRILFIGPPLYGLLYPLISLAQAFRVIGHDVISSAGKFANKAA 46
MCHA -----MRKRILFIGPPLYGLLYPLISLAQAFRVIGHDVISSAGKFANKAA 46
MCECC -----MRILFIGPPLYGLLYPVIISLAQAFRVNGHEVVASAGKFTHKAA 44
MCMG: (Nissle) -----MRILFVGPPLYGLLYPVLISLAQAFRVNGHEVLIASGGQFAQKAA 44
IROB: CTF073 MRRLPDLDRQAERDFLMRILFVGPPLYGLLYPVLISLAQAFRVNGHEVLIASGGQFAQKAA 60
IROB: 536 -----MRILFVGPPLYGLLYPVLISLAQAFRVNGHEVLIASGGQFAQKAA 44
IROB: Sall -----MRILFVGPPLYGLLYPVLISLAQAFRVNGHEVLIASGGQFAQKAA 44
*****:*****:***** **:::*.:::***

```

```

MCML: CA46 EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHQEELRKKSNI---IGHFSFFSDEMADNLIDFAGKWRPDL 103
MCML: CA58 EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHQEELRKKSNI---IGHFSFFSDEMADNLIDFAGKWRPDL 103
IROB: O157:H7 EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHQEELRKKSNI---IGHFSFFSDEMADNLIDFAGKWRPDL 103
MCHA EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHQEELRKKSNI---IGHFSFFSDEMADNLIDFAGKWRPDL 103
MCEC DAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHQEELRKKSNIT---VGHFSFFSDEMADRLVDFAGQWHPDL 101
MCMG EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHHEAQRKKSNIGTQMGNFSSFFSEEMADHLVEFAGHWRPDL 104
IROB: CTF073 EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHHEAQRKKSNIGTQMGNFSSFFSEEMADHLVEFAGHWRPDL 120
IROB: 536 EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRHHEAQRKKSNIGTQMGNFSSFFSEEMADHLVEFAGHWRPDL 104
IROB: Sall EAGLVVFDVAVPSLDSEAGYRQEARLKENNIGTKMGNFSSFFSEEMTDPLVAFAGQWRPDL 104
:*****. *:*****: * **:* * :*:*****:*** * * :***:***

```

```

MCML: CA46 IVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 163
MCML: CA58 IVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 163
IROB: O157:H7 IVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 163
MCHA IVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 163
MCEC IVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 161
MCMG IIVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 164
IROB: CTF073 IIVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 180
IROB: 536 IIVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 164
IROB: Sall IVYPPPLGAGPLVAAKYRIPSVMLAVGFAHTSAHIQMLNRSLSNAYRRHGVSGPLCDLAW 164
*:****. ***:**** * * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **

```

```

MCML: CA46 IDVAPPSMSILKNAEPEVISMRYIPYNGGAVKETWWDSDRKRLLISLGTVKPMDGLE 223
MCML: CA58 IDVAPPSMSILKNAEPEVISMRYIPYNGGAVKETWWDSDRKRLLISLGTVKPMDGLE 223
IROB: O157:H7 IDVAPPSMSILKNAEPEVISMRYIPYNGGAVKETWWDSDRKRLLISLGTVKPMDGLE 223
MCHA IDVAPPSMSILKNAEPEVISMRYIPYNGGAVKETWWDSDRKRLLISLGTVKPMDGLE 223
MCEC IDVTPPSMSILKNDGEPVISMRYIPYNGGAVWEPWERRPDRKRLLVSLGTVKPMDGLD 221
MCMG IDVTPPSMSILENDGEPVISMRYIPYNGGAVWEPWERRPDRKRLLVSLGTVKPMDGLD 224
IROB: CTF073 IDVTPPSMSILENDGEPVISMRYIPYNGGAVWEPWERRPDRKRLLVSLGTVKPMDGLD 240
IROB: 536 IDVTPPSMSILENDGEPVISMRYIPYNGGAVWEPWERRPDRKRLLVSLGTVKPMDGLD 224
IROB: Sall IDVTPPSMSILENDGEPVISMRYIPYNGGAVWEEWERTPDRKRLLVSLGTVKPMDGLD 224
***:*****: * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **

```

```

MCML: CA46 LISWVMSANEVDADIILQLAINARTGLRKLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 283
MCML: CA58 LISWVMSANEVDADIILQLAINARTGLRKLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 283
IROB: O157:H7 LISWVMSANEVDADIILQLAINARTGLRKLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 283
MCHA LISWVMSANEVDADIILQLTINARTGLRKLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 283
MCEC LISWVMSANEVEADIILQLAMNARAGLRKLPSNVRLVWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 281
MCMG LIAWVMSASEVDAEILHISANARSDLRSLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 284
IROB: CTF073 LIAWVMSASEVDAEILHISANARSDLRSLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 300
IROB: 536 LIAWVMSASEVDAEILHISANARSDLRSLPSNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 284
IROB: Sall LISWVMSANEVDADIILHLPANARSDLRSLPPNVRLVDWIPMGVFLNGADGFIHHGGAG 284
**:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **:* * * **

```

```

MCML: CA46      NTLTALYSGIPQIVFGEGADRSVNAEIVAKRGCGIIPDKHGLTSDLVNRLLYDDSLRFCS 343
MCML: CA58      NTLTALYSGIPQIVFGEGADRSVNAEIVAKRGCGIIPDKHGLTSDLVNRLLYDDSLRFCS 343
O157:H7         NTLTALYSGIPQIVFGEGADRSVNAEIVAKRGCGIIPDKHGLTSDLVNRLLYDDSLRFCS 343
MCHA           NTLTALYSGIPQIVFGEGEDRSVNAETVAMRGCGIIPDKHGLTSDLVNRLLYDDSLRFCS 343
MCEC           NTLTALYNGIPQIVFGEGADRPVNAKAVAERGCGIIPGDHGLTSDLVNTFLYDDSLRLCS 341
MCMG           NTLTALHAGIPQIVFGQGADRPVNARVVAERGCGIIPGDVGLSSNMINAFLNRRSLRKAS 344
IROB: CTF073    NTLTALHAGIPQIVFGQGADRPVNARVVAERGCGIIPGDVGLSSNMINAFLNRRSLRKAS 360
IROB: 536       NTLTALHAGIPQIVFGQGADRPVNARVVAERGCGIIPGDVGLSSNMINAFLNRRSLRKAS 344
IROB: Sa11      NTLTALHAGIPQIVFGQGADRPVNARAVVERGCGIIPGKSGLTSSMINTFLGNRALREAS 344
                *****: *****:* **.***.*.*****..**:*:::*:*:*:*:*

```



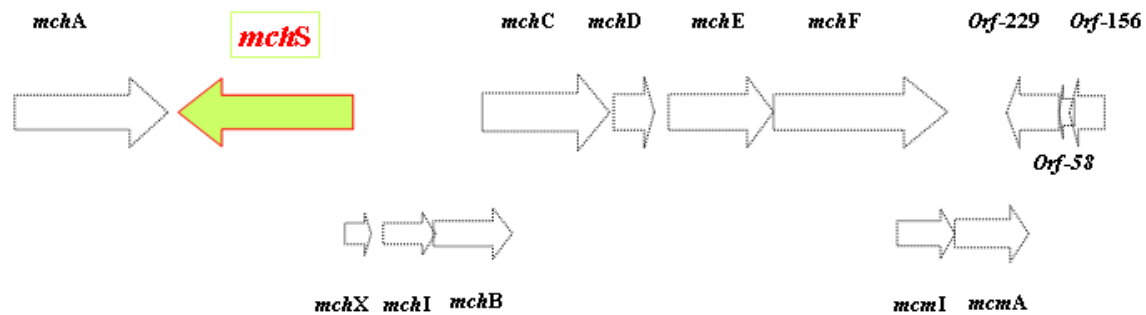
```

MCML: CA46      EQVAAEMAEQFSPAETIAEVLMRKLNNGK--- 372
MCML: CA58      DQVAAEMAEQFSPAETIAEVLMRKLNNGK--- 372
IROB: O157:H7   DQVAAEMAEQFSPAETIAEVLMRKLNNGKQL- 374
MCHA           DQVAAEMAEQFSPAETIAEVXDEKIKKNREIIV 375
MCEC           AQVAAEMAEQFSPAETIAGVLVAKLKTIWQ--- 370
MCMG           EEVAAEMAAQFCPGEVAKSLITMVQKG----- 371
IROB: CTF073    EEVAAEMAAQFCPGEVAKSLITMVQKG----- 387
IROB: 536       EEVAAEMAAQFCPGEVAKSLITMVQKG----- 371
IROB: Sa11      QEVAAEMAAQFCPTEVAKKLIAMLQHG----- 371
                :***** **.***.*.*****..**:*:::*:*:*:*:*

```

Figura 4.14: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las glicosiltransferasas: McmL, de la cepa *E. coli* CA46; McmL, de *E. coli* CA58; IroB, de *E. coli* O:157:H7; MchA, RYC-1000 H47; MceC, de *Klebsiella pneumoniae* cepa RYC492; McmG de Nissle 1917; IroB, de *Salmonella enterica*; IroB, de *E. coli* 536 e IroB, de *E. coli* CFT073. En gris se marcan los aminoácidos idénticos en todos los alineamientos.

4.3.9. Gene *mchS*: Enteroquelinesterasa.

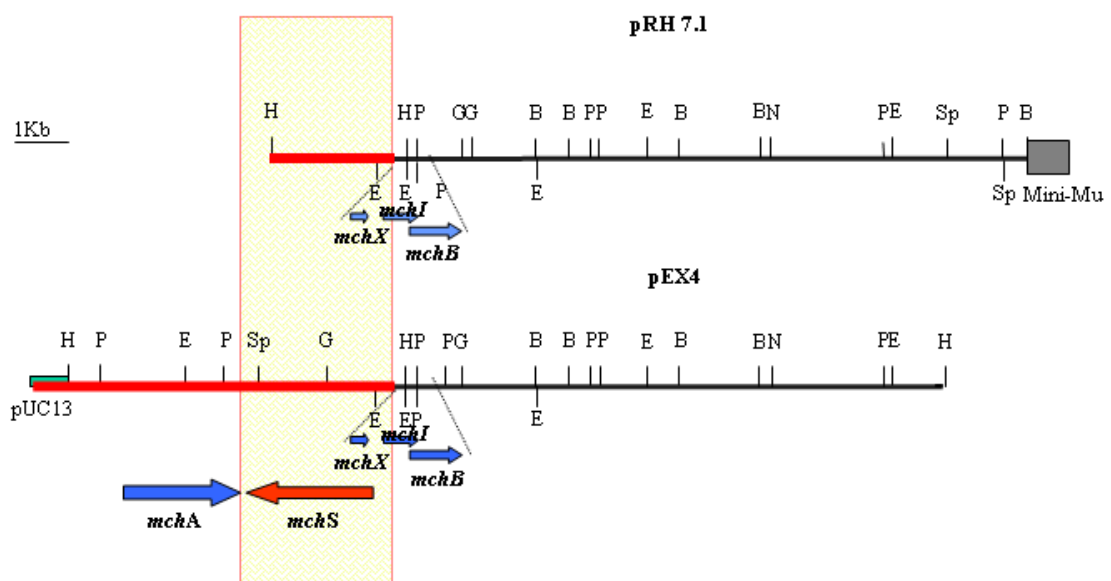


Cuando analizamos la secuencia de pEX101 (capítulo 4.2.10), encontramos un gen que denominamos *mchS* por estar en la región silente descrita por Laviña *et al.*, 1993). Este gen codifica una proteína de 424 aa con 56% de identidad con la enteroquelinesterasa *IroD* (Gilson *et al.*, 1990)(Azpiroz *et al.*, 2001 (409 aa) de la isla de patogenicidad de tipo III de *E. coli* 536 (Dobrindt., *et al.*, 2001) (Nº de acceso: Q93K71), 74% de identidad con *MceD* (414 aa) de *K. pneumoniae* cepa RYC492 (Nº acceso: Q93GK8), 98% identidad con *McmK* (424 aa) de la cepa *E. coli* CA46 (Nº acceso: Q83ZB0) y 95% identidad con *McmK* (424 aa) de *E. coli* CA58 con (Nº acceso: Q83ZA1).

Cuando estudiamos la secuencia del plásmido pMM30 descubrimos un ORF que no estaba completo porque en él se había insertado el miniMud4042. La proteína deducida del fragmento del gen clonado, tenía una identidad del 100% con IroD de *E. coli* O6 (Welch *et al.*, 2002) (Nº acceso: Q8FIW5) y un 99% de identidad con IroD de la isla de patogenicidad tipo III de *E. coli* 536 (Dobrindt, *et al.*, 2001) (Nº de acceso Q93K71).

Tenemos que señalar que toda la secuencia nucleotídica del plásmido pMM30 (7.810 pb) tiene una identidad del 99% con el fragmento comprendido entre las bases 29.416 y 36.186 de la secuencia de la isla de patogenicidad tipo III de *E. coli* 536 (Dobrindt, *et al.*, 2001) (Nº de acceso X16664). Los genes *iroB* e *iroD* codificarían parte del sistema de captación de hierro (sideroforo de tipo catecol “Salmoquelina” (Patzner *et al.*, 2003).

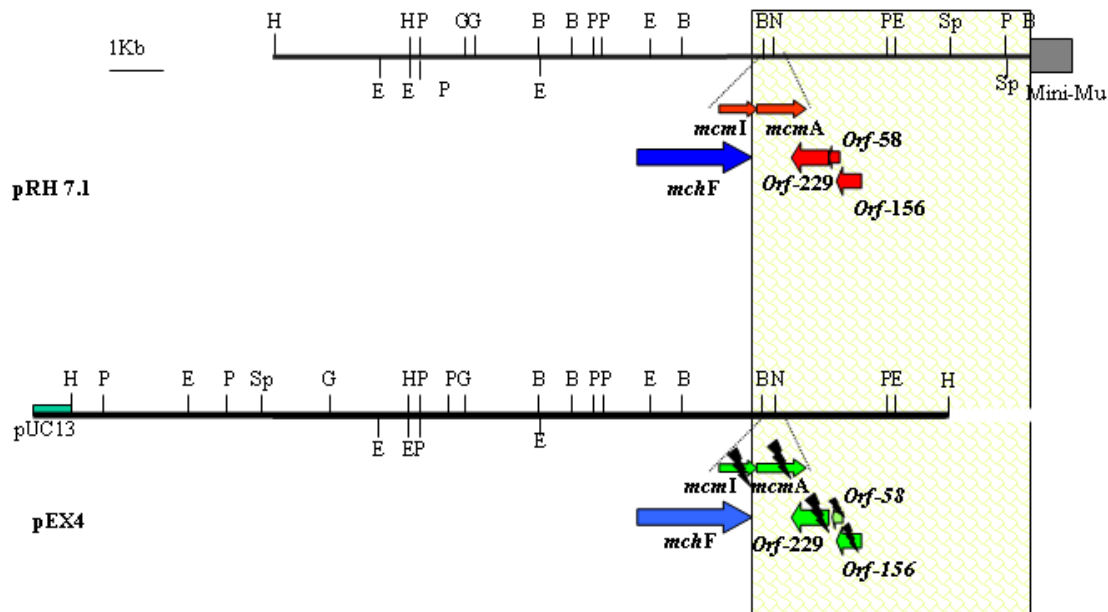
4.3.10. Diferencias a la izquierda de *mchX* entre pEX4 y pRH7.1.



La identidad del conjunto génico del sistema procedente de Nissle 1917 y del sistema H47 termina 756 pares de bases por delante del gen *mchX*. A la izquierda de *mchX* encontramos la transposasa de la IS3 cuya secuencia tiene un gran parecido con la hallada en la secuencia de la isla de patogenicidad SHI-2 de *Shigella flexneri* de 23,8 kb (Nº acceso AF141323.1) (Moss *et al.*, 1999), que contiene los genes que codifican el

sideróforo aerobactina implicado en la captación de hierro y de un gen *shiD* que confiere inmunidad a microcina V. Este gen no posee ningún tipo de identidad con el gen de inmunidad a microcina V, *cvi* de la cepa *E. coli* pColV, (Nº de acceso AJ223631). Los genes del sistema aerobactina también están presentes en el plásmido pColV, presentando *iucA* (92%), *iucB* (94%), *iucC* (95%) e *iucD* (97%) de identidad con sendos genes en *Shigella flexneri* (Vokes et al., 1999).

4.3.11. Diferencias a la derecha de *mchF* entre pEX4 y pRH7.1.



35 pb a la derecha del gen *mchF* en pRH7.1 aparecen los genes *mcmI* y *mcmA*, de inmunidad específica y precursor respectivamente a la microcina M como ya habíamos descrito con anterioridad. En pEX4, secuenciamos el fragmento equivalente a esta región utilizando los mismos cebadores empleados para secuenciar pRH7.1. Al analizar la nueva secuencia descubrimos que los dos genes estaban presentes también en el sistema de H47, con algunos cambios polimórficos. Dedujimos las secuencias aminoacídicas que correspondían a cada gen, y comprobamos que ambos genes *mcmI* y *mcmA* habían sufrido mutaciones originando sendos codones “stop” y, por tanto, se originaba la terminación incompleta de la proteína correspondiente. Con esta prueba, podíamos explicar que el sistema pEX4 no estaba capacitado para sintetizar microcina M.

A.

```

mcmI: (pEX4)      ATGGGGGAGGTTAAGAAGGATATAAAAAATAACAGTGATTGCTTTTGTATCAATTATCTG 60
mcmI: (pRH7.1)   ATGGGGGAGGTCAGAAGGATATAAAAAATAACAGTGATTGCTTTTGTATCAATTATCTG 60
                  *****

mcmI: (pEX4)      TTCTTTTATATTCCGGTGTCAATTATATCTTAGTTATTACTATAGATATAATTTTTTTAAT 120
mcmI: (pRH7.1)   TTCTTTTATATTCCGGTGTCAATTATATCTTAGTTATTACTATAGATATAATTTTTTTAAT 120
                  *****

                  stop
mcmI: (pEX4)      CTATATATGTTTTTTT-ATCACTTGTAGTTACATTTTTATCGTTTGGTTAAACGTGAAT 179
mcmI: (pRH7.1)   CTATATATGTTTTTTTATCACTTGTAGTTACATTTTTATCGTTTGGTTAAACGTGAAT 180
                  *****

mcmI: (pEX4)      TTTTACTTCTTCACAAATTTATAGCGAAGGTGTTGAAATGA 216
mcmI: (pRH7.1)   TTTTACTTCTTCACAAATCTTATAGCGAAGGTGTTGAAATGA 222
                  *****

```

B.

```

.....
mcmA: (pEX4)      ATGAGAAAATCTGAAAATGAAATAAAACAAATATCTGGAGGTGACGGGAATGACGGG 60
mcmA: (pRH7.1)   ATGAGAAAATCTGAAAATGAAATAAAACAAATATCTGGAGGTGACGGGAATGACGGG 60
                  *****

mcmA: (pEX4)      CAGGCAGAATTAATTGCTATTGGTTCACCTGACAGGTACGTTTATTAGCCCGGGATTGGT 120
mcmA: (pRH7.1)   CAGGCAGAATTAATTGCTATTGGTTCACCTGACAGGTACGTTTATTAGCCCGGGATTGGT 120
                  *****

mcmA: (pEX4)      TCTATTGCAGGGGCTTATATAGGTGATAAAGTACATTCATGGGCAACGACTGCGACGGTT 180
mcmA: (pRH7.1)   TCTATTGCAGGGGCTTATATAGGTGATAAAGTACATTCATGGGCAACGACTGCGACGGTT 180
                  *****

                  STOP
mcmA: (pEX4)      AGTCCCTCCATGTCTCCCTCAGGTATAGGATTATCATCCTAGTTTGGATCCGGCAGATGT 240
mcmA: (pRH7.1)   AGTCCCTCCATGTCTCCCTCAGGTATAGGATTATCATCCAGTTTGGATCCGGCAGAGGT 240
                  *****

mcmA: (pEX4)      ACATCAAGTGCTTCTTCGTCTGCGGGGAGTGGAATTA 282
mcmA: (pRH7.1)   ACATCAAGTGCTTCTTCGTCTGCGGGGAGTGGAATTA 279
                  *****

```

Figura 4.15: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas: (A) del gen de inmunidad específica a microcina M (*mcmI*). (B) del gen precursor de microcina M (*mcmA*). Origen (pEX4) sistema microcina H47 y origen (pRH7.1) Nissle 1917. (*) Coincidencias nucleotídicas entre ambas secuencias. Contorno amarillo, codon stop.

Por detrás de estos dos genes en la cepa Nissle 1917, encontramos tres orfs que se transcriben en sentido opuesto. Estos genes fueron denominados: *orf-229* que denominamos *mcmM*, *orf-58* y *orf-156* que denominamos *mcmT*.

mcmM codifica una hipotética proteína de membrana de de 228 aa con siete dominios transmembrana. Es 100% idéntica a una hipotética proteína de membrana de la cepa *E. coli* CFT 073, un 96 % de identidad con el orf-228 de la PAI III-536 (isla de patogenicidad de tipo III de la cepa uropatogénica *E. coli* 536) (Dobrindt., *et al.*, 2001) (Nº de acceso X16664), con 62% de identidad con MceF, proteína implicada en la secreción de la microcina E492 (Lagos *et al.*, 2001) y también tiene parecido con la proteína CvpA (37%) que codifica una proteína cromosómica de *E. coli* K12 de función

desconocida pero que tampoco parece necesaria para la síntesis de microcina M ya que cuando fueron introducidos los plásmidos pEX100, equivalente a pEX4, junto con la construcción pMcmIA (apartado 4.2.14 tabla 4.7) se logró la síntesis de ambas microcinas H47 y M sin estar presente el gen *mcmM*.

En el caso del **ORF 58**, no se ha encontrado ninguna secuencia de proteína en la base de datos que se parezca a la secuencia aminoacídica de éste. Encontramos identidad del 99% a nivel de ADN con la secuencia de la “isla de patogenicidad de tipo III de la cepa uropatogénica *E. coli* 536 (Dobrindt., *et al.*, 2001).

Finalmente *mcmT* es un gen que determina una proteína de 156 aa que tiene tres dominios transmembrana y presenta identidad con la proteína de membrana presente en la PAI III-536 y con una proteína de membrana presente en la cepa *E. coli* O157: H7 (identidad del 95%). Este gen cuando lo expresamos en *E. coli* K12, vemos que confiere resistencia a las microcinas H47 y M. En base a este resultado, ahora podemos explicar por qué el plásmido pMM40 (construcción descrita en el apartado 4.2.5), que porta los genes *mcmM*, *orf-58* y *mcmT*, confiere resistencia a las microcinas H47 y M, y también parcialmente a las microcinas MccV y E492.

Sin embargo, pMM41 (apartado 4.2.5), que no porta el gen *mcmT* completo pero si porta los genes *mcmM* y *orf-158*, no confiere resistencia. Por PCR se clonó el gen *mcmT* en el vector de alto número de copias pUC19 y tras introducirlo en la cepa *E. coli* RYC1000 se observó resistencia a las dos microcinas H47 y M. De alguna forma, podemos decir que *mcmT* es responsable de la resistencia inespecífica que confiere el plásmido pRH7.1 a las microcinas mencionadas.

Estos tres genes (*mcmM*, *orf-58* y *mcmT*), se encuentran degenerados en pEX4. Es en esta zona donde se pierde la igualdad entre los dos plásmidos pEX4 y pRH7.1, 30 pb después del codon “stop” de *mcmA*. Los genes *mcmM*, *orf 58* y *mcmT*, no estaban íntegros, pero si detectamos muchos restos ancestrales en la región:

```

                                mcmA-Stop
pEx4_      GCTTCTTCGTCTGCGGGGAGTGGAAATTAACCTTATATTGTTAATGA-----
pRH7.1     GCCTCTTCGTCTGCGGGGAGTGGAAAGTTAAACCTTATATTGTTAATGAAGCACCTGTTAC
          ** *****

pEx4_      -----TGCCTATGTAATGGTTTAAGTTAGGCTCCTCCGAAC
pRH7.1     AGGTGCTTCATTATATGATAATGGTGCCTATGTAACGCTTTAAGTTAGGCTCCTCCGAAC
          ***** * *****

                                NdeI
pEx4_      GTTTATCATTTTATGCATACCGCATAGTAAACAATGCTAGTCCGTTTAATTTTATCATAT
pRH7.1     GTTTATTATTTTATGCATACCGCATAGTAAACAATGCCA-TCCGTTTA-TTTTATCATAT
          ***** * *****

```

```

pEx4_ CAGATTGTAACAGAAAATGCTCTGTTAATGGGAATAACTGATATAAGCTAGATATTGTAT
pRH7. CAGATTGTAACAGAAAATGCTCTGTTAATGAGTATAACTGATAGAAGCCAGATATTGTAT
***** * ***** *
    
```

Figura 4.16: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del final del gen *mcmA* Origen microcina H47 (pEX4) y Nissle 1917 pRH7.1. (*) Coincidencias nucleotídicas entre ambas secuencias. Secuencia en rojo, gen *mcmA*. Contorno rojo, codon stop del gen *mcmA*. Contorno azul, sitio de restricción *NdeI*.

La secuencia después de terminar el sistema microcina en la cepa Nissle 1917, es prácticamente idéntica al operón *fim* en la cepa *E. coli* 4787 (N° acceso U098571). Cuando miramos en el cromosoma de la cepa enterohemorrágica (*E. coli* O157:H7) encontramos que los genes que codificaban para la glucosiltransferasa y para esta proteína de membrana (McmT), están localizados de forma contigua. En Nissle 1917 estos dos genes se encuentran flanqueando los extremos del operón microcina (Figura 4.17). Todo el DNA secuenciado del pRH7.1 a partir del gen *mcmT* presenta 100 % identidad al genoma secuenciado y recientemente publicado de la cepa uropatogénica *E. coli* CFT073 (Welch *et al.*, 2002) (N° acceso: AE016758, pares de bases 273878-284628). Esta misma región presenta asimismo, alta identidad con la cepa uropatogénica *E. coli* 536, en un 96 % y un 94 % de identidad con la región que codifica para la subunidad mayor de S-fimbrias de la cepa *E. coli* UTI89 (Chen S. L., *et al* 2006)

Genoma de *E. coli* O157:H7 EDL933 :

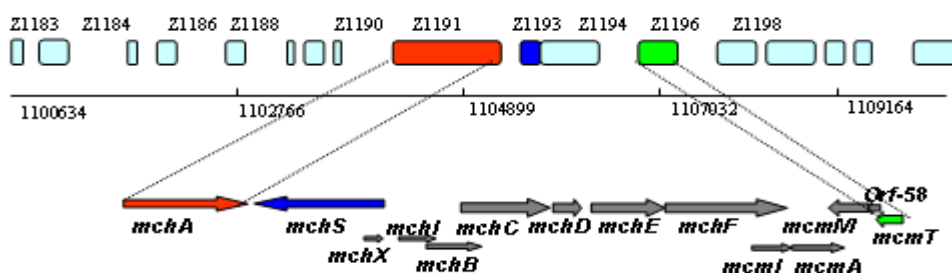


Figura 4.17: Genoma de la cepa enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 EDL933, donde encontramos que los genes flanqueantes del sistema microcina H47 y M, aparecen muy próximos. Resto de los genes del sistema no están presentes.

4.4. OTROS GENES FUERA DEL SISTEMA MICROCINA IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE MICROCINA Y/O EN LA ESTABILIDAD DE LAS CEPAS PRODUCTORAS

4.4.1. Mutación “FinZ”.

La cepa RYC1000 *E. coli* K12 no presenta dificultades para crecer en medio mínimo M63 pero cuando se le introdujo el plásmido pEX4, las colonias adquirieron un aspecto mucoide y translúcido en medio completo LB y eran incapaces de crecer en medio M63. Los transformantes aun con estas alteraciones morfológicas mantuvieron la capacidad de producir actividad microcina en medio mínimo. Era evidente que algún problema de toxicidad estaba teniendo lugar en el interior de la bacteria. Se hizo una mutagénesis con el mini-transposón Tn5 (Berg, D. E. 1977, de Lorenzo, V 1990) sobre la cepa RYC1000 (pEX4) con la finalidad de conseguir un mutante resistente al efecto nocivo observado. Se aisló un clon que crecía en medio M63 y con capacidad de sintetizar microcina H47. La inserción del transposón estaba localizada en el genoma de la cepa porque el ADN plasmídico se introdujo sobre una cepa RYC1000 y los transformantes resultantes no mostraron resistencia a Km (la resistencia a kanamicina codificada en el transposón). De la cepa con la inserción cromosómica se eliminó el plásmido pEX4 mediante cultivos sucesivos sin presión antibiótica de Ap. Finalmente se consiguió un clon resistente a Km y sensible a Ap (sin pEX4). Fue llamado RYC1000M. Sobre RYC1000M se introdujo de nuevo pEX4, y se observó producción normal de microcina y un crecimiento normal en medio mínimo, tolerante a microcina H47 y ligeramente más sensible a microcina M.

Con el mini-MudII4042 se clonó la región cromosómica donde estaba localizada la inserción y se secuenció. El análisis de la secuencia reveló que el transposón estaba localizado en el gen *finZ*. Este gen codifica el polipéptido FinZ que presenta un motivo de unión a ADN. Actúa como regulador transcripcional uniéndose al promotor de *finA* (gen que codifica la subunidad mayor de las fimbrias de tipo I), aumentando la expresión (Yeh, K. S. *et al.*, 1995). El gen *finZ* también podría regular negativamente los genes *flhDC* del operon de flagelos implicados en movilidad. Podríamos decir que es un modulador de cambio entre fase móvil y fase de adherencia de la bacteria

(Swenson, D. L. et al., 1992; Yeh, K. S. *et al.*, 1995; Yeh, K. S. *et al.*, 2002; Clegg *et al.*, 2002).

4.4.2. La mutación *tolC*.

TolC es una proteína de membrana externa que participa en la secreción de numerosos compuestos entre ellos las microcinas formando un canal continuo que interacciona con el transportador de la membrana interna, en nuestro caso, en el espacio periplasmático con la proteína accesoria MchE. La secreción de las microcinas H47 y M necesitan TolC para ser liberados al medio extracelular. Mutantes en TolC (4100 (*tolC::Tc*) con el plásmido pMM21) no mostraron actividad microcina.

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing several large, oval-shaped biological cells with a textured surface. These cells are surrounded by a dense network of smaller, branching, and filamentous structures, possibly representing a microbial community or a specific tissue type. The overall appearance is highly detailed and complex.

DISCUSIÓN

5.1 MICROCINAS.

Este trabajo fue comenzado con el propósito de caracterizar el sistema genético implicado en la síntesis de una sustancia antibiótica producida por una cepa de *E.coli* con un pasado muy interesante aunque no con un presente y futuro de menor interés dado que es utilizada en la preparación de una especialidad farmacéutica empleada en el tratamiento de diversos trastornos intestinales, con una utilización creciente en el mercado en muchos países de Europa. La empresa farmacéutica alemana ARDEYPHARM, fabricante de Mutaflor, estaba interesada en conocer la naturaleza de la sustancia antimicrobiana y los genes involucrados en su síntesis. Durante el desarrollo de los experimentos nos hemos encontrado con numerosos problemas técnicos debidos inicialmente a las escasas herramientas genéticas que podíamos emplear con la cepa y posteriormente a la complejidad de los sistemas encontrados. A pesar de ello, hemos conseguido solventar los problemas y encontrar caminos que han permitido llevarnos a la caracterización genética y funcional del sistema microcina MccH47/MccM en el probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917.

5.1.1 Un sistema genético compartido.

Desde la primera descripción de las microcinas (Asensio *et al.*, 1976) se han publicado numerosos artículos que nos han permitido conocer su naturaleza, su síntesis, maduración secreción y modo de acción. Si bien la mayoría de ellas están codificadas en plásmidos, existen algunas excepciones como es el caso de la microcina H47, (Laviña *et al.*, 1990), la microcina E492 sintetizada por *Klebsiella pneumoniae* (de Lorenzo., 1984) y la microcina 24 (O'Brien y Mahanty., 1994) que están codificadas en el cromosoma. Las cepas productoras de microcinas que se describieron en los primeros años únicamente parecían producir un solo tipo de microcina. Sin embargo, hace unos años se describió una cepa de *E.coli* aislada del contenido intestinal de una oca (Gaillard-Gendron *et al.*, 2000) que producía cuatro microcinas (B17, D93, J25 y L), todas ellas codificadas en diferentes plásmidos (Sablé S. *et al.*, 2003).

La cepa Nissle 1917 sintetiza dos microcinas que están codificadas en el cromosoma. Nuestros resultados fueron los primeros que han permitido describir una cepa que produce dos microcinas codificadas a nivel cromosómico, pero lo que es aun mucho más interesante es que las dos microcinas comparten genes del sistema para su maduración y exportación (Patzner. *et al.*, 2003).

El sistema genético de la microcina H47 fue descrito como un sistema cromosómico de 10 Kb en el que se localizaban todos los genes necesarios para la producción del antibiótico (Laviña *et al.*, 1990, Gaggero *et al.*, 1993). A partir de la cepa Nissle 1917 se clonó un fragmento de 13.963 pb en el que residen la mayor parte de los genes necesarios para la síntesis de ambas microcinas: genes precursores, genes de inmunidad específica, genes de exportación y genes implicados en la maduración del antibiótico, cuya misión es lograr un cambio en la estructura molecular de la microcina, facilitando el reconocimiento por los transportadores y/o las dianas de acción. A diferencia de lo que ocurre con el sistema genético de la microcina H47, en el fragmento de 14 Kb de la cepa Nissle 1917 no estaban presentes todos los elementos necesarios para conseguir actividad inhibitoria. Subclonando un fragmento de 6.216 pb (apartado 4.3.1) del pEX4, plásmido que contiene todo el sistema para la producción de microcina H47 (Laviña *et al.*, 1990), observamos que complementaba la región de 14 Kb clonada de la cepa Nissle 1917, lográndose así sintetizar ambas microcinas. Posteriormente fue posible clonar un segundo fragmento del genoma de Mutaflor (Nissle 1917) equivalente a el fragmento de 6.2 kb del pEX4 que también complementaba para la actividad inhibitoria. En este nuevo fragmento encontramos una serie de genes que están presentes en regiones cromosómicas conocidas como “islas de patogenicidad o colonización” de varias cepas de *E.coli*. En estas regiones se localizan genes que capacitan a las bacterias para alcanzar y colonizar los distintos nichos ecológicos. En esta nueva región cromosómica fue hallado un gen que tenía un alto grado de homología con una familia de genes que codifican para glucosiltransferasas. Este gen, al que denominamos McMG, resultó ser indispensable para la síntesis de las dos microcinas aún estado en un locus diferente del resto del sistema. En ese mismo fragmento también se localizó un gen que codificaba para una proteína de 1261 aa similar a los transportadores de tipo ABC. Finalmente se localizó un gen que no fue clonado entero y que estaba relacionado con el metabolismo del sideróforo enteroquelina (enteroquelinesterasa). Nuestros resultados indican por tanto, que el sistema MccM forma parte de una posible isla de colonización en la cepa Nissle 1917, lo que se confirmó en los estudios de secuenciación completa de la cepa. (Grozdanov, *et al.*, 2004).

5.1.2 Sistema de secreción.

El sistema de secreción de las microcinas producidas por la cepa Nissle 1917, está constituido por un sistema de transporte de tipo ABC (ATP binding cassette), con un nivel de igualdad extraordinariamente alto con el sistema implicado en exportar microcina V. El gen *mchF* codifica una proteína de 698 aa que presenta un 89% de identidad al producto del gen *cvaB*, un exportador del tipo ABC, que participa en la exportación de la microcina V (Gilson *et al.*, 1990) (Azpiroz *et al.*, 2001). Este tipo de transportador necesita de la colaboración de otra proteína, que se suele denominar como proteína accesoria de la secreción. En nuestro sistema esta proteína, de 424 aa, está codificada por el gen *mchE* y tiene un 97% de identidad con el producto del gen *cvaA*, proteína accesoria para la secreción de colicina V (Boyer *et al.*, 1998). El dominio ATPasa de la proteína de membrana citoplasmática CvaB ó en su lugar MchF promovería la exportación de la microcina. Por otra parte, estos transportadores también participan en la escisión del péptido señal a la altura del doble motivo glicina-glicina ó alanina-glicina (Figura 4.10, apartado 4.3.1) durante la exportación (Havarstein *et al.*, 1995). CvaA está anclada a la membrana citoplasmática y se extiende fundamentalmente por el periplasma donde se conecta con TolC, una proteína de membrana externa. CvaB conecta con TolC por medio de CvaA. TolC es una proteína trimérica constituida por láminas β , formando un canal en la membrana externa y un túnel de α -hélices en el periplasma (Koronakis *et al.*, 2000). El canal CvaA/CvaB/TolC permite la secreción de microcina V a través de las membranas (Tseng *et al.*, 1999). Dada la gran homología existente entre las proteínas que exportan microcina V y las proteínas de nuestro sistema MchE y MchF, es muy probable que el mecanismo de exportación de MccM y MccH47 siga el modelo descrito anteriormente. En la tabla siguiente se muestran los porcentajes de igualdad para los sistemas de transporte de varias microcinas.

	Proteínas accesorias				Exportador ABC				
	CvaA	MchE	MceH	MtfA	CvaB	MchF	MceG	MtfB	
CvaA	100	97	91	71	CvaB	100	89	87	73
MchE		100	94	71	MchF		100	92	75
MceH			100	72	MceG		100	77	
MtfA				100	MtfB				100

Tabla 5.1: Porcentajes de igualdad en aminoácidos de las proteína accesorias y trasportadores ABC para las microcinas: microcina V (CvaA/B), microcina H47 y microcina M (MchE/F), microcina E492 (Mce H/G) y microcina 24 (MtfA/B).

Recordemos que en los clones MFI7 y MFI15 (apartado 4.2.3) las inserciones estaban localizadas en un gen con homología a *cvaB*. Ahora podemos decir que estás inserciones estaban afectando a *mchF*. Otro resultado interesante fue descrito en el (apartado 4.2.15) donde vimos que inserciones sobre el plásmido híbrido que afectaban a los genes *mchE* o *mchF* impedían observar actividad inhibitoria.

Asimismo, hemos comprobado la importancia de TolC en la secreción de MccM y MccH47 al medio ya que una cepa TolC⁻ no es capaz de conferir un fenotipo productor (apartado 4.4.2).

Por último, señalar que el sistema de trasporte MchE/MchF/TolC, es capaz de secretar microcina V. El sistema fue perfectamente capaz de reconocer y exportar al antibiótico al medio externo en cantidades perfectamente detectables, apartado de resultados (4.4.7).

5.1.3 Genes estructurales de MccH47 y MccM.

En el fragmento clonado a partir del genoma de la cepa Nissle 1917 encontramos un pequeño gen (*mchB*) que resultó ser idéntico al gen estructural de la microcina H47 como ya fue comentado en el capítulo de resultados. En el mismo fragmento clonado detectamos un segundo gen (*mcmA*) con un cierto parecido al primero. Especialmente en el extremo carboxilo terminal. Los genes fueron clonados y expresados en *E. coli* K12 demostrándose que en efecto, codificaban las dos microcinas H47 y M, respectivamente. Los genes son altamente parecidos entre si y además son muy parecidos a otros genes precursores de microcinas. La tabla siguiente nos da idea de ello:

	Microcinas				
	McmA	MchB	CvaC	MceA	MtfS
McmA	100	38	35	28	<20
MchB		100	22	40	27
CvaC			100	<20	<20
MceA				100	45
MtfS					100

Tabla 5.2: Porcentaje de aminoácidos idénticos entre los precursores de las microcinas: McmA microcina M, MchB microcina H47, CvaC microcina V, MceA microcina E492 y MtfS microcina 24.

En base a los resultados que se observaron al clonar los genes precursores de MccH47 y MccM podemos decir que el precursor de la microcina M carece de actividad y necesita de otros productos codificados en el mismo conjunto génico para ser funcionalmente activo. Una vez activada, la molécula resultaba tóxica para las células desprovistas de inmunidad específica. Por el contrario, el precursor de microcina H47, es nocivo para la célula hospedadora sin inmunidad, sin la necesidad de ser previamente activado. Estos resultados que fueron descritos en los capítulos 4.2.13 y 4.2.14, ayudaron a comprender fenotipos extraños no comprendidos hasta el momento. Un ejemplo de ello era el de la toxicidad del derivado pMM50, en el que están presentes todos los genes necesarios para lograr actividad con la excepción de *mchA* y *mchI*. Una publicación, posterior a estos resultados, también demostraba por experimentos similares que el precursor de microcina H47, que estaba en el sistema de la microcina H47 (Rodríguez, *et al.*, 1998) era una molécula activa.

Analizando la estructura de los precursores de ambas microcinas, hemos de señalar dos cosas especialmente interesantes: i) en el extremo N-terminal encontramos el doble motivo glicina, lugar donde suponemos tiene lugar la escisión del péptido señal (consultar la figura 4.10 del apartado 4.3.1). Esta tarea sería desarrollada por el exportador MchF que presentaría un dominio catalítico en su extremo amino terminal del mismo modo que aparece en CvaB. Esta es una región muy conservada en los transportadores del tipo ABC y estaría constituido por una cisteína en la posición 32 (Havarstein *et al.*, 1995) ii) también nos resulto muy curiosa la secuencia de aminoácidos encontrada en el extremo carboxilo de las proteínas estructurales MchB y McmA (figura 4.10 apartado 4.3.1). Los diez últimos aminoácidos son idénticos y fundamentalmente son serinas y glicinas. Esto nos hace suponer que este extremo C-

terminal, podría ser el centro responsable de la actividad, pero también cabe la posibilidad de pensar que puede ser una zona susceptible a modificaciones post traduccionales.

5.1.4 Genes de inmunidad.

En el sistema clonado de Nissle 1917 localizamos un gen que codificaba un péptido de 69 aa idéntico al gen que confería inmunidad específica a microcina H47, *mchI* (Rodríguez. E., 1998). También presentaba alto grado de igualdad con otros genes que conferían inmunidad a otras microcinas descritas. Gracias a los experimentos descritos en el capítulo de resultados (3.2.14 y 3.3.4), pudimos demostrar que este gen confería inmunidad específica a microcina H47. Por otra parte, en el fragmento clonado de Nissle 1917, se encontró otro gen al que denominamos *mcmI* que codificaría una proteína de 73 aa, un tamaño muy parecido al de MchI. Según los resultados del apartado (4.2.13) pudimos comprobar que el producto de *mcmI* confería inmunidad específica a microcina M. El hecho de que fuera posible conseguir inserciones localizadas en ambos genes de inmunidad en el plásmido híbrido pMM21 sin perder la viabilidad celular puede explicarse por la existencia del gen *mcmT* de 156 aa que confiere tolerancia a ambas microcinas. Los experimentos realizados por Rodríguez y colaboradores mostraban que no era posible localizar inserciones en *mchI* probablemente debido a que los derivados que se obtenían no eran viables (Rodríguez. E., 1998).

Otro experimento que no podemos dejar de comentar en profundidad es la construcción del derivado pMM50. Recordemos que este plásmido porta el gen precursor de microcina H47 (*mchB*), el precursor de microcina M (*mcmA*), inmunidad a microcina M (*mcmI*), el sistema de transporte (*mchE* y *mchF*) y algunos genes de “maduración” (*mchC* y *mchD*), pero no está presente ni el gen de inmunidad a microcina H47 (*mchI*), ni tampoco lo está el gen que codifica la hipotética proteína de membrana que confería resistencia a los dos microcinas H47 y M (*mcmT*). Dicho plásmido introducido en RYC1000 producía la lisis celular. Este resultado apoya la hipótesis discutida en el apartado anterior, de que el péptido MchB es activo, sin necesidad de modificaciones, y que sin la presencia de la proteína de inmunidad MchI o la proteína McmT, las células mueren.

Aunque no se conocen muy bien los mecanismos de actuación de estas proteínas de inmunidad, los perfiles de hidrofobicidad y las fusiones TnPhoA, sugieren que MchI

estaría localizado en la membrana citoplasmática (Rodríguez. E., 1998). MchI presenta dos dominios transmembrana muy claros y que nosotros hemos podido localizar también en McmI, utilizando el mismo programa informático que se utilizó en el mencionado trabajo. (Ver figura 4.2). Estos datos sugieren que la inmunidad se debe a la exportación de la microcina.

Tabla 5.3

Proteínas de inmunidad					
	McmI	MchI	Cvi	MceB	MtfI
McmI	100	16	22	21	22
MchI		100	<20	35	<20
Cvi			100	<20	<20
MceB				100	39
MtfI					100

En la tabla 5.3 se dan los porcentajes de igualdad entre las proteínas de inmunidad de algunas microcinas. McmI para microcina M, MchI para microcina H, MceB es la inmunidad a microcina E492, Cvi es la inmunidad para colicina V y MtfI es la proteína de inmunidad para microcina 24.

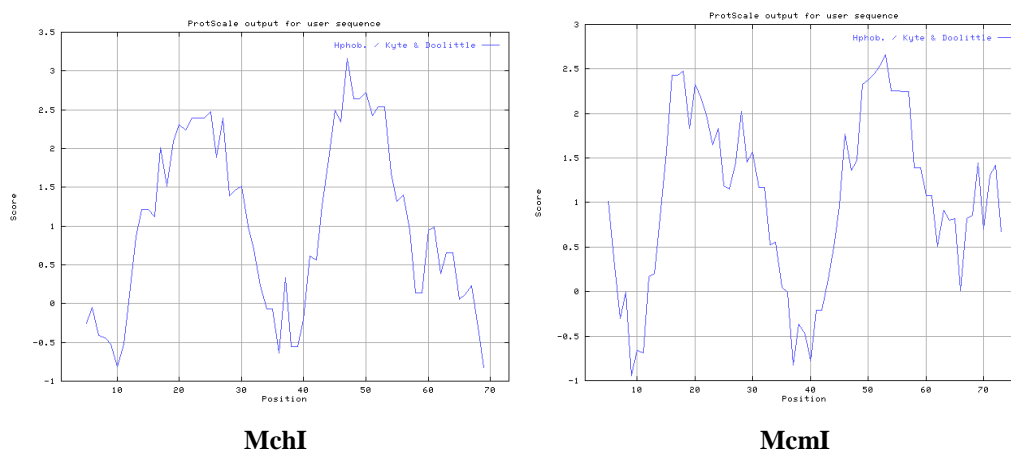


Figura 5.1: se representan los perfiles transmembrana para las dos proteínas de inmunidad obtenidos con el programa de predicción de dominios transmembranales que utiliza el método de Kyte y Doolittle (1982). Este programa se encuentra a disposición en el la web (www.expasy.ch).

5.1.5 McmM y McmT.

• **McmM**, es una hipotética proteína de membrana de 228 aa, con 7 dominios transmembrana (Figura: 5.2). Tiene homologías con otras proteínas integrantes de sistemas microcina como **MceF** del sistema de microcina E 492 (Lagos *et al.*, 2001), también tiene parecido con la proteína CvpA (37% de igualdad) que codifica una proteína cromosómica de *E.coli* K12 de función desconocida pero que es necesaria para la producción de microcina V codificada en el plásmido pCOLV-K30 (Fath *et al.*, 1989) y con la hipotética proteína de membrana codificada por el *orf*-228 de la isla de patogenicidad de tipo III de la cepa uropatogenica *E.coli* 536 (Dobrindt., *et al.*, 2001). CvpA y MceF son dos proteínas necesarias para la actividad microcina V y microcina E492 respectivamente. Sin embargo, McmM no es necesaria para la actividad microcina H47. La secuencia realizada en esta tesis del plásmido pEX4 reveló que el gen que codificaba para esta proteína no estaba presente en el sistema descrito anteriormente por (Laviña., *et al.*,1990). Por otra parte, podemos decir que tampoco es necesaria para la actividad microcina M, como quedó demostrado con los experimentos de complementación (pEX4 y pMcmIA) en los que se observaban las dos actividades no estando presente McmM.

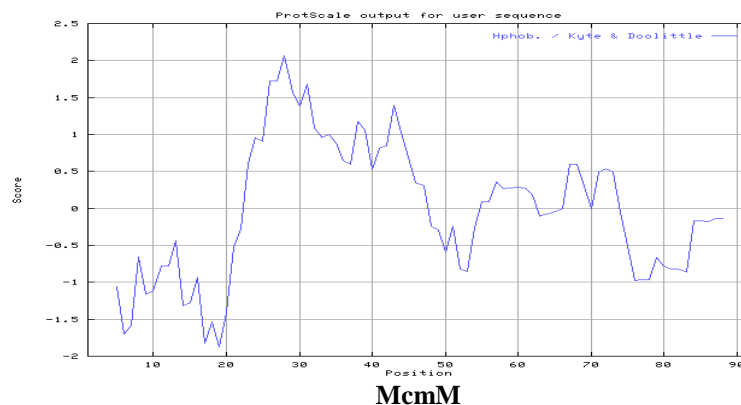


Figura: 5.2: Predicción dominios transmembrana de la proteína McmM con el programa informático DAS.

• **McmT** es una hipotética proteína de membrana de 156 aa y que muestra tres dominios transmembrana (Figura: 5.3). Presenta un 98% de igualdad con la proteína codificada por el *orf*-6 presente en la PAI III-536, y un 95 % de igualdad con una proteína de membrana presente en la cepa *E. coli* O157: H7. Nuestros resultados mostraron que era responsable de conferir resistencia inespecífica a microcina H47 y M de modo total desde el medio externo y resistencia parcial a las microcinas E492 y microcina V.

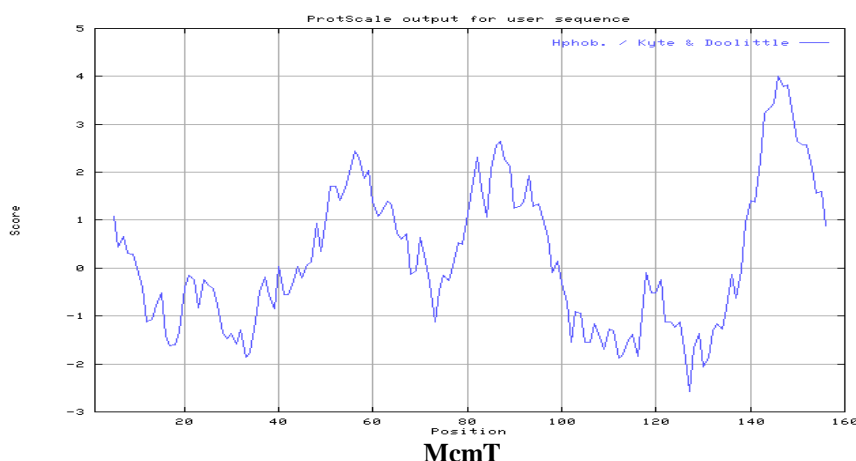


Figura: 5.3. Predicción de los dominios transmembrana de la proteína McmT.

5.1.6 Genes de modificación: *mchC*, *mchD*, *mcmG* y *mchS*.

1) *mchC* y *mchD*: Estos genes estarían implicados en las modificaciones post-traduccionales. El gen *mchC* que presenta homología con el gen *mceJ* (del sistema microcina E492) es necesario para la actividad de la microcina H47, ya que inserciones en el gen impedían la síntesis de MccH47 (Gaggero *et al.*, 1993) pero su función se desconoce. Nuestros resultados sugieren que este gen no es necesario para la síntesis de microcina M, dado que el plásmido pMH2 (con una delección que afecta casi en su totalidad al gen *mchC* permaneciendo un pequeño fragmento del carboxilo terminal), fue capaz de sintetizar microcina M activa. También es necesario recordar que se aisló una inserción en *mchC* cuando se efectuó la mutagénesis sobre el plásmido pMM21, y esta inserción abolió la síntesis de microcina, sin embargo dicho fenotipo puede ser debido a efecto polar de la inserción. El gen *mchD*, presenta homología con el gen *mceI* (del sistema E492) y es responsable de las modificaciones post-traduccionales que tienen lugar en el extremo C terminal del péptido. Cuando se retira el gen *mceI* del cluster se previene la maduración de la microcina E-492 (Nolan, *et al.*, 2007).

2) *mcmG*: *mcmG* codifica una glucosiltransferasa absolutamente necesaria para la producción de MccM y MccH47. Recordemos que dicho gen está localizado en una región del cromosoma de la cepa Nissle 1917 diferente a la región donde se localiza el sistema principal. Las glucosiltransferasas están presentes en cepas de *Escherichia coli*: MchA (glucosiltransferasa del sistema H47), en *Klebsiella* MceC (glucosiltransferasa del sistema E492) y en algunas cepas de *Salmonella* como IroB. Dichas enzimas añaden moléculas de glucosa sobre el núcleo del sideróforo enteroquelina (descrito en la introducción, apartado 1.1.5) y son esenciales para la síntesis de las microcinas del

grupo IIb. Las moléculas de glucosa disminuyen la afinidad de las proteínas plasmáticas como la albumina (Konopka y Neilands. 1984) y las siderocalinas por los sideróforos (Goetz *et al.*, 2002). Señalar también que en este caso la glucosa puede estar desempeñando un papel esencialmente estructural, permitiendo la unión del núcleo enteroquelina con el péptido microcina. Sin la molécula de glucosa, no sería posible obtener microcina funcional. La hipótesis más probable es que al no estar unida a la enteroquelina, la microcina no sería reconocida por los receptores específicos de tipo catecol.

3) *mcmK*: *mcmK* codifica una proteína con función esterasa que presenta homología a otras esterases: MchS1 del sistema microcina-H47, MceD del sistema microcina E-492 y con IroD e IroE de *Salmonella*. Suponemos que la esterasa hidroliza el enlace éster y libera el núcleo enteroquelina del péptido activo. Mutantes nulos de *McmK*, continuaron produciendo microcina probablemente porque la función esterasa sea realizada por la enzima Fes que es la esterasa del sistema enteroquelina en *E. coli*. No se han conseguido mutantes nulos para Fes dada su inviabilidad (Azpiroz, *et al.*, 2004).

5.1.7 Otros Genes implicados.

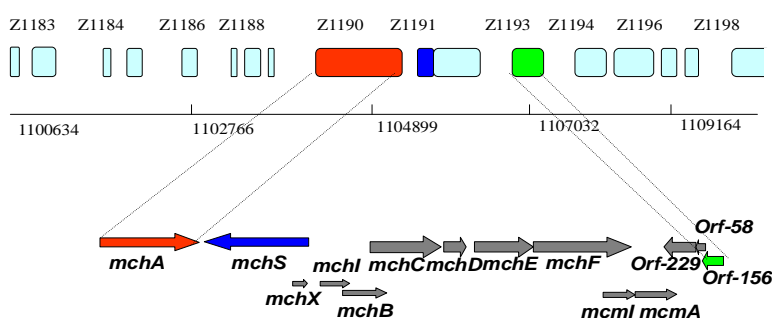
El mutante de inserción 14 (MFI14) está afectando en el gen *entF* y el mutante 16 (MFI16) está localizado en el ORF previo a *entF*. Dos mutantes independientes están afectando al mismo locus, indicando que la proteína EntF que participa en la síntesis de enterobactina, es necesaria para la producción y/o maduración de las microcinas H y M. EntF presenta homología con TycA y GrsA (Rusnack *et al.*, 1991). TycA está implicada en la activación y racemización de fenilalanina en la síntesis del decapeptido cíclico tirocidina (Weckermann *et al.*, 1988). GrsA participa en la activación y racemización de fenilalanina en la ruta biosintética de gramicidina S (Krätzschmar *et al.*, 1989). La tirocidina y la gramicidina S son antibióticos peptídicos cíclicos de *Bacillus s.f.* La enteroquelina, también es un péptido cíclico y es de síntesis no ribosomal.

La secuencia de la inserción 19.1 reveló que el gen afectado era *tolB*. TolB es una proteína que podría estar implicada en la exportación de la microcina al exterior de la bacteria. TolB es uno de los componentes del sistema Tol que se sabe que es mediador de la captación de algunas colicinas (Cao, *et al.*, 2002) a través de la membrana citoplasmática.

5.1.8 Comparación con el genoma de *E. coli* O157:H7

El gen *mchA* (que codifica una glucosiltransferasa) es el primer gen del sistema descrito en el sistema de producción de MccH47 y el gen *mcmT* (que codifica una proteína de membrana que confiere resistencia a microcina M y H47) es el último gen encontrado en el sistema microcina de la cepa Nissle 1917. Cuando se construyó el sistema híbrido (apartado 4.2.12), los genes *mchA* y *mcmT* quedaron dispuestos en ambos extremos del fragmento híbrido. Curiosamente nos encontramos esta misma disposición en la cepa patogénica de *E. coli* O157:H7, donde estos genes aparecen prácticamente contiguos (Fig 5.4) habiendo desaparecido prácticamente toda la región central.

Genoma de *E. coli* O157:H7 EDL933 :



***mchA* :** Glicosiltransferasa implicada en maduración.

***Orf-156*:** Proteína transmembrana. Confiere resistencia a ambas microcinas.

Figura 5.4: Comparación genoma de *E. coli* O157:H7 EDL933 y sistema microcina híbrido RYC1000 H47 / Nissle 1917.

5.1.9 Modelo propuesto de la síntesis, modificación y exportación de MccM y MccH47

Los genes *mcmA* y *mcmI* son los genes precursor y de inmunidad de la microcina M. Los genes *mchB* y *mchI* son los genes precursor y de inmunidad específica de la microcina H47 respectivamente. Las microcinas M y H47 son sintetizadas como péptidos precursores que necesitan sufrir un proceso de maduración. El péptido McmA es inactivo cuando es expresado en alto número de copias, a diferencia del peptido precursor MchB que en un alto número de copias manifiesta toxicidad para la célula

hospedadora desprovista de inmunidad específica. Son numerosos los resultados que indican que los péptidos necesitan sufrir maduración, para tener actividad, ser exportados y ser reconocidos por los receptores específicos de las células diana.

La maduración que proponemos tendría lugar en el extremo C terminal del péptido sobre la cola de serinas, donde podría actuar el complejo MchC/MchD. A continuación tendría lugar la unión de una molécula de β -D-glucosa mediante un enlace O-glucosídico al carbono 6 de la glucosa, ésta a su vez se uniría mediante un enlace C-glucosídico por el carbono 1, a la primera unidad dihidroxibenzoil-serina (DHB-Serina) en el C5, de la misma forma que sucede con la microcina E-492 (Thomas *et al.*, 2004) (Duquesne *et al.*, 2007a). En este proceso de maduración, participarían activamente las proteínas: MchG, MchD, EntF.

La secreción activa está mediada por un exportador ABC (ATP binding cassette) (Figura 5.5), la hidrólisis de molécula de ATP genera energía suficiente para transferir hacia el exterior la microcina saliendo a través de la proteína de membrana externa TolC. La proteína MchF, no sólo es responsable de la hidrólisis del enlace de alta energía ATP, sino también de la escisión del péptido señal.

La microcina es captada por la célula sensible (figura 5.5), siendo reconocida por el receptor y mediante vía TonB, ExbB/ExbD es internalizada en el interior celular. El flujo energético, provoca en estas proteínas de membrana interna, cambios conformacionales que originan la apertura de poros en la membrana externa.

Desconocemos por el momento el modo de acción de la microcina M, pero se sabe que la microcina H47 podría actuar a nivel del canal de protones F_0 ATP sintasa. Mutantes de inserción en esta estructura fueron resistentes a la acción de microcina H47 (Azpiroz, *et al.*, 2001).

Este tipo de microcinas actúan por el mecanismo conocido como “caballo de Troya”, la microcina imita una estructura esencial para la célula diana permitiendo su reconocimiento por los receptores usados en funciones vitales de la bacteria, o bien es secretada como una molécula inofensiva y después se transforma en tóxica en la bacteria sensible. Una vez en el espacio periplásmico puede unirse a enzimas necesarias de la bioquímica celular o interactuar con la membrana interna para formar estructuras que desestabilizan y matan (Duquesne., Petit *et al.*, 2007).

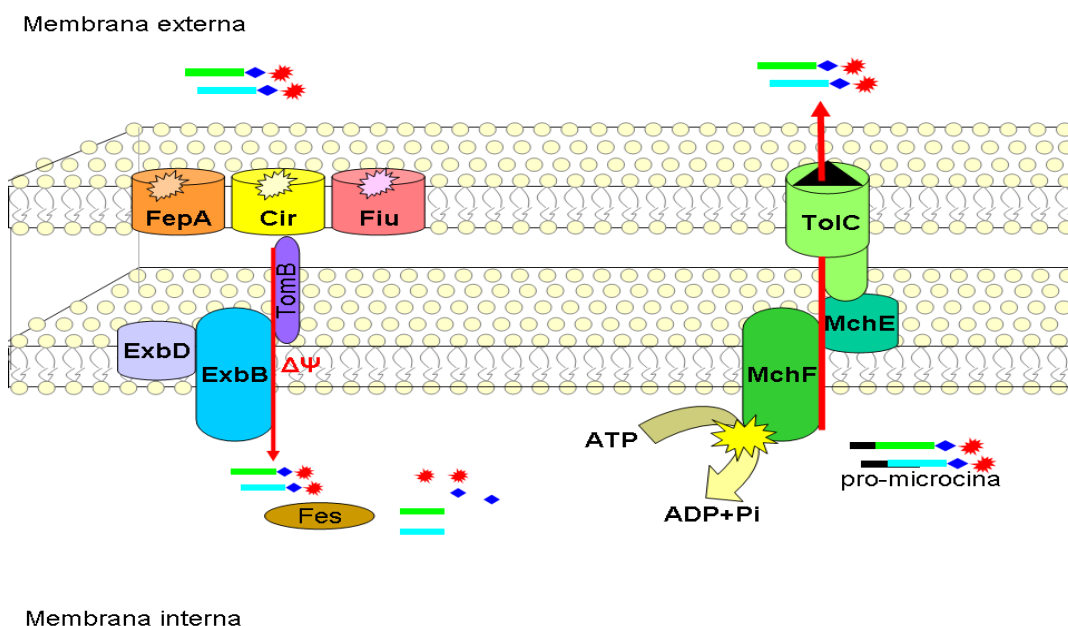


Figura 5.5: Esquema donde se representa la captación y la secreción de las microcinas.

Rectángulo verde microcina H47, rectángulo azul, microcina M, Con rectángulos negros, premicrocinas; rombo azul, molécula de glucosa; estrella roja, enteroquelina.

Addendum a la discusión

5.2.1. El mapa genómico de la cepa *E. coli* Nissle 1917.

Durante la realización de esta tesis, varios grupos también participaban en el estudio de la cepa para dilucidar otros factores que estuvieran relacionados con las propiedades probióticas de Nissle 1917.

Para poder entender a nivel genético sus propiedades de colonización y comensalismo, se realizaron numerosos estudios fundamentalmente a tres niveles:

- Estudio contextual de la secuencia de los genes tRNA, como indicadores de integración en el cromosoma de ADN adquirido por transferencias horizontal.
- Análisis de la secuencia de 280 kb de las islas genómicas (GEIs) que codifican factores de adaptación importantes.
- Comparación del genoma de la cepa Nissle 1917 con el de otras cepas de *E. coli* mediante hibridación DNA-DNA.

Muchos de los factores de adaptación de la cepa Nissle 1917 se encuentran localizados den cuatro islas (GEIs) que fueron parcialmente secuenciadas y analizadas.

- *E. coli* partial Genomic Island I, strain Nissle 1917 (acceso: AJ586887)
- *E. coli* partial Genomic Island II, strain Nissle 1917 (acceso: AJ586888)
- *E. coli* partial Genomic Island III, strain Nissle 1917 (acceso AJ586889)
- *E. coli* partial Genomic Island IV, strain Nissle 1917.

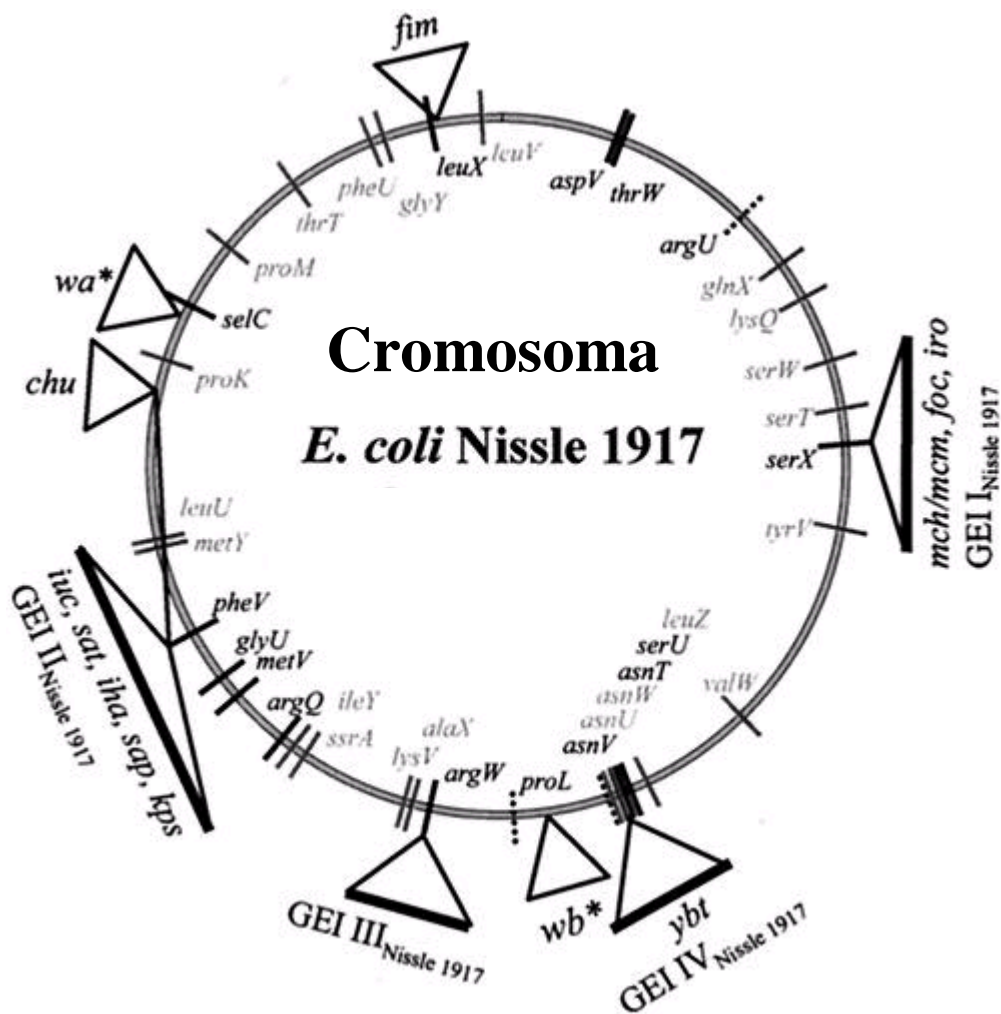


Figura 5.6: Mapa genómico de *E. coli* Nissle 1917 basado en el cromosoma de *E. coli* cepa MG1655. Se indican las Islas Genómicas (GEIs) de I a IV y pequeñas isletas que codifican factores de adaptación insertadas en la posición que ocupan en el cromosoma, próximos a los genes de tRNA. Se indican las posiciones de los genes que codifican tRNAs que son lugares “calientes” de inserción en el cromosoma para la transferencia horizontal de DNA. También se indican los sitios de restricción *Ceu I*. Las líneas grises indican genes tRNA con un contexto de secuencia idéntico a *E. coli* K12 MG1655. Las líneas negras indican genes de tRNAs en un contexto idéntico a la cepa

uropatogénica (UPEC) O6 CFT073. Las líneas discontinuas indican genes tRNA con una secuencia de la región por debajo del gen “downstream” no conocida aun. Las abreviaturas *fim*, determinantes de fimbrias del tipo I; *mch / mcm*, determinantes de las microcinas H y M; *foc*, determinantes de las fimbrias FC1; *iro*, determinantes de salmoquelina; *ybt*, determinante de yersiniabactina; *iuc*, determinantes de aerobactina; *sat*, determinantes de la proteasa Sat; *iha*, determinantes de la adhesina Iha; *sap*, determinantes del autotransporte tipo Sap; *kps*, determinante capsular; *chu*, determinante de la captación de hemina Chu; *wa/wb*, grupo de genes necesarios para la síntesis del LPS (lipopolisacárido).

Las diferencias genéticas detectadas entre las cuatro cepas de *E. coli* estudiadas se muestran en la figura 3.

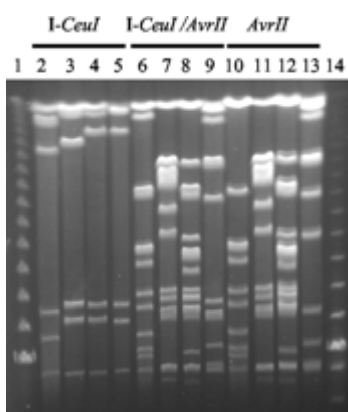


Figura 5.7 Valoración comparativa del tamaño del genoma de *E. coli* Nissle 1917 mediante digestión con *CeuI*, *AvrII* y la combinación de ambas, seguido de PFGE. ADN genómico de *E. coli* MG1655, Nissle 1917, CFT073, y 536 se digirió con las enzimas de restricción indicadas. Los fragmentos originados se separaron mediante PFGE. Carril 1, marcador de peso molecular PFGE lambda; carriles 2, 6 y 10, cepa *E. coli* MG1655; carriles 3, 7 y 11, *E. coli* Nissle 1917; carriles 4, 8 y 12, *E. coli* CFT073; carriles 5, 9 y 13, *E. coli* 536; carril 14, marcador de peso molecular de rango bajo.

Estas cuatro islas genómicas no están presentes en *E. coli* K12 cepa MG1655. Contienen la mayoría de los determinantes de factores de adaptación conocidos de la cepa Nissle 1917. La estructura del genoma y la organización genética de la cepa Nissle 1917 se parece más a la cepa uropatogénica CFT073 que a la cepa uropatogénica 536. Existen también diferencias entre las dos primeras cepas, que son las responsables de que la cepa Nissle 1917 carezca de patogenicidad.

Comentarios

5.2.2. Resumen esquemático de los factores de adaptación en *E. coli* Nissle

1917

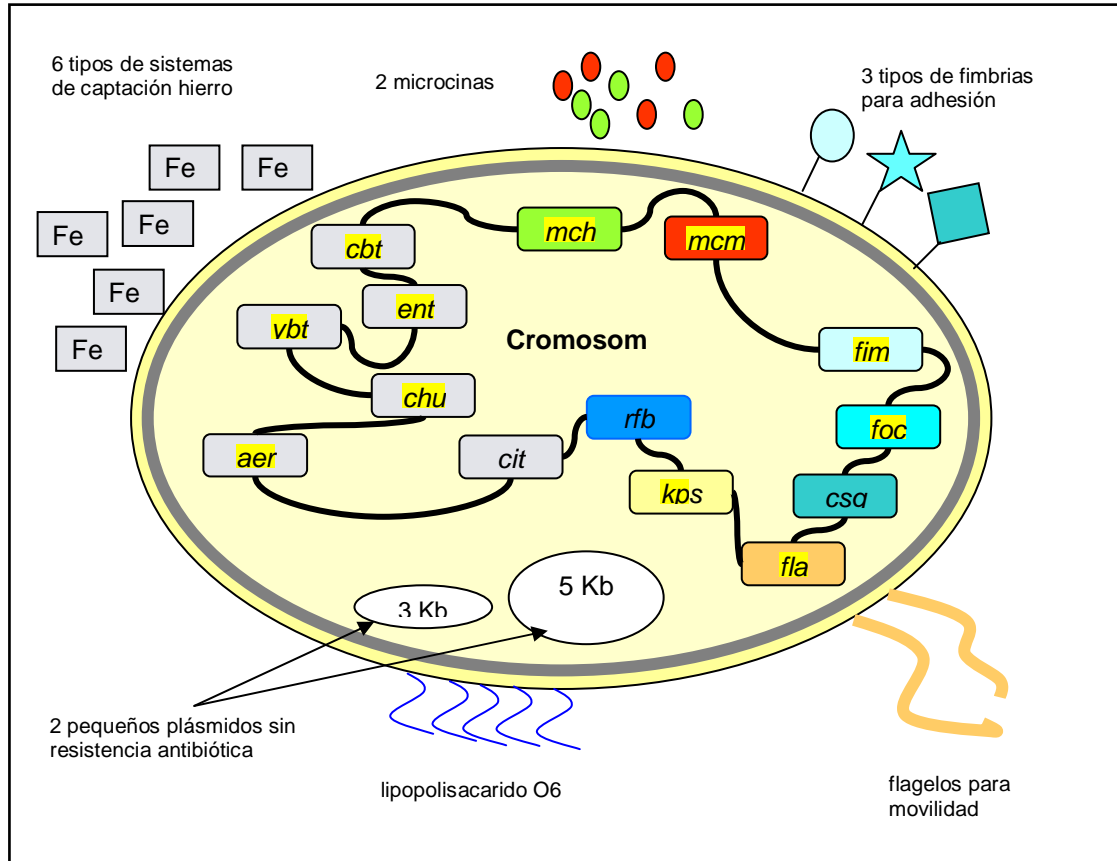


Figura 5.8: Características más significativas de la cepa *E. coli* Nissle 1917. Las abreviaturas *fim*, determinantes de fimbrias del tipo I; *mch* / *mcm*, determinantes de las microcinas H y M respectivamente; *foc*, determinantes de las fimbrias FC1; *ybt*, determinante de yersiniabactina; *aer*, determinantes de aerobactina; *sat*, determinantes de la proteasa Sat; *iha*, determinantes de la adhesina Iha; *kps*, determinante capsular; *ent*, determinantes enteroquelina; *chu*, determinante de la captación de hemina Chu; *fla*, determinantes de los flagelos; *cbt*, transportador en la membrana externa de enterobactina; *cit*, sistema de transporte del dicitrato férrico.

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing several large, oval-shaped cells with a textured surface. These cells are surrounded by a dense network of smaller, branching, and filamentous structures, possibly representing a microbial community or a specific tissue type. The overall appearance is highly detailed and complex.

CONCLUSIONES

1. La cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 produce dos actividades antibióticas de tipo microcina denominadas microcina M y microcina H. Todos los genes necesarios para la producción de ambas microcinas y para la inmunidad a las mismas se han localizado en una región cromosómica de 13.963 pb a excepción del locus *mcmG*, implicado en la producción de MccH47 y MccM, que se encuentra en otra región de cromosoma.
2. Los genes de *mcmI* y *mcmA* codifican las proteínas de inmunidad (McmI, 73 aa) y estructural (McmA, 92 aa) de la MccM respectivamente. Ambos genes solapan 4 nucleótidos, de manera que el codon stop y el codon de iniciación están acoplados. El tamaño de dichos péptidos es muy similar al de las proteínas estructural y de inmunidad de la microcina H47 (MchI, 69 aa y MchB, 97 aa). Estos 4 genes están presentes en la región clonada de la cepa Nissle 1917, pero en la cepa RYC1000 H47, en la que se describió por primera vez la producción de microcina H47, tan sólo son funcionales los genes *mchI* y *mchB*, ya que *mcmI* y *mcmA* presentan sendos cambios polimórficos que se traducen en codones stop.
3. Los sistemas microcina H47 y microcina M en *E. coli* Nissle 1917 comparten los genes de modificación y transporte.
4. El gen *mchA* que codifica una glucosiltransferasa y es absolutamente necesario para la producción de actividad microcina H47, está presente en la cepa RYC1000 H47 upstream del gen *mchI* y ausente en la cepa Nissle 1917. En el genoma de Nissle 1917, el gen homólogo a *mchA* que permite la producción de MccH47, fue localizado en otra región del genoma y demonizado *mcmG*.
5. En el extremo carboxilo terminal de los péptidos precursores de las dos microcinas existen numerosos residuos de serina y glicina, proponemos esta zona como la región que sufre las modificaciones postraduccionales.
6. Los genes *mcmG*, *mchK*, *mchC* y *mchD* codifican enzimas de modificación postraduccionales. El gen *mcmG*, homólogo a *mchA*, codifica una glucoiltransferasa McmK homólogo a MchS, es una esterasa que participaría en la hidrólisis del complejo enteroquelina-microcina, sin embargo no parece ser esencial para la actividad antibiótica posiblemente porque la proteína Fes, en *E. coli* K12, supla esta función. MchD, es una aciltransferasa que posiblemente participa en la acilación de la región enteroquelina. La función de MchC es

- desconocida, pero sabemos que es necesaria sólo para la actividad microcina H47.
7. El sistema de secreción de las microcinas producidas por Nissle 1917 es del tipo ABC (ATP binding cassette). MchF es una proteína anclada a la membrana interna con un dominio que hidroliza ATP y una región que cataliza la escisión del péptido precursor a la altura del doble motivo glicina-glicina. Necesita la presencia de una proteína accesoria, MchE que está anclada en la membrana citoplásmica y se extendería por el periplasma donde conectaría con la proteína de membrana externa TolC. El canal MchE/MchF/TolC, permitiría la secreción de las dos microcinas H47 y M.
 8. MchT, es una proteína hipotética de membrana de 156 aa y muestra tres dominios transmembrana, confiere resistencia a microcina M y H47 y resistencia parcial a las microcinas E492 y microcina V.
 9. El gen *entF* de *E. coli*, que forma parte del operón implicado en la biosíntesis del sideróforo enteroquelina y codifica una enzima que activa residuos de serina, es necesario para ambas actividades microcina.
 10. Estas microcinas actuarían por el mecanismo “Caballo de Troya”, donde la microcina imita la estructura de un sideróforo, que es esencial para la captación de hierro, permitiendo que sea reconocida por los receptores (Cir, Fiu y FepA) específicos de este sistema de captación de hierro.

The background of the page is a grayscale micrograph showing various biological structures. There are several large, dark, oval-shaped objects, possibly spores or cells, surrounded by a network of thin, branching, filamentous structures. The overall appearance is that of a complex biological or microbial environment.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., Baquero, F., Martínez, J. L., Asensio, C. 1983. Microcin 15n: a second antibiotic from *Escherichia coli* LP15. *J Antibiot* (Tokyo). **36**:325-7.
- Aguilar, A., Perez-Diaz, J. C., Baquero, F., Asensio, C. 1982. Microcin 15m from *Escherichia coli*: mechanism of antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother*. **21**:381-6.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir AMA., A Takagi, A., Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol*. **93**: 2097-2101.
- Arnold, C and Hodgson, I. J. 1991. Vectorette PCR: a novel approach to genomic walking. *PCR Methods Appl*. **1**:39-42.
- Asensio, C. J., Pérez-Díaz, C., Martínez, M. C., Baquero, F. 1976. A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **69**:7-14
- Azpiroz, M. F., Lavina, M. 2004. Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:1235-41.
- Azpiroz, M. F., Rodriguez, E., Lavina, M. 2001. The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**:969-72.
- Baquero, F., Moreno, F. 1984. The microcins. *FEMS Microbiol. Lett*. **23**:117-124.
- Bayer, A., Freund, S., Jung, G. 1995. Post-translational heterocyclic backbone modifications in the 43-peptide antibiotic microcin B17. Structure elucidation and NMR study of a ¹³C,¹⁵N-labelled gyrase inhibitor. *Eur J Biochem*. **234**:414-26.
- Bazzoli, F., Zagari, R. M., Fossi, S., Morelli, M. C., *et al.*, 1992. *In vivo Helicobacter pylori* clearance failure with *Lactobacillus acidophilus*. *Gastroenterology*. **102**:A38.
- Berg, D. E. 1977. Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5. En *DNA Insertion elements, Plasmids and Episomes*. Bukhari, A.I., Shapiro, J.A., and Adhya, S.L. (eds). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp.205-212.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res*. **7**:1513-1523.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K., Süßmuth, R. D. 2004. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals*. **17**:471-481.
- Blum, G., Marre, R., Hacker, J. 1995. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection*. **23**:234–236.

- Boyer, A. E., Tai, P. C. 1998. Characterization of the *cvaA* and *cvi* is modulated by downstream sequences. *J. Bacteriol.* **180**:1662-1672.
- Braun, V., Braun, M. 2002. Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr Opin Microbiol.* **5**:194-201.
- Braun, V., Killmann, H. 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci.* **24**:104-109.
- Brickman, T. J., McIntosh, M. A. 1992. Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J Biol Chem.* **267**:12350-12355.
- Bullen, J.J. 1976. Iron-binding proteins and other factors in milk responsible for resistance to *Escherichia coli*. *Ciba Found Symp.* **42**:149-169
- Campieri, M., Gionchetti, P. 1999. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative?. *Gastroenterology.* **116**:1246-9.
- Cao, Z., Klebba, P. E. 2002. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie.* **84**:399-412.
- Caplan, M. S., Jilling, T. 2000. Neonatal necrotizing enterocolitis: possible role of probiotic supplementation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **30**:18-22
- Castilho, B. A., Olfson, P., and Casadaban, M. J. 1984. Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. *J. Bacteriol.* **158**:488-495.
- Cavard, D. 2002. Assembly of colicin A in the outer membrane of producing *Escherichia coli* cells requires both phospholipase A and one porin, but phospholipase A is sufficient for secretion. *J Bacteriol.* **184**:3723-33.
- Chagarovskii, V. P., Zholkevskaja, I. G. 2003. Biotechnology of yogurt and kefir production, study of their effect on human health. *Mikrobiol Z.* **65**:67-73.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* **61**:1636-43.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol.* **26**:333-7.
- Chen, S.L., Hung, C.S., Xu, J., Reigstad, C.S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T., Meyer, R.R., Ozersky, P., Armstrong, J.R., Fulton, R.S., Latreille, J.P., Spieth, J., Hooton, T.M., Mardis, E.R., Hultgren, S.J and Gordon, J.I. 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci.* **103**:5977-82.

- Clegg, S., Hughes, K. T. 2002. FimZ Is a Molecular Link between Sticking and Swimming in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184**: 1209-1213
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O., Lagos, R. 2002. The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie.* **84**:539-44.
- Crosa, J. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:517-530.
- Crosa, J. H., Walsh, C. T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**:223-249.
- Cunningham-Rundles, S., Ahrné, S., Bengmark, S., Johann-Liang, R., Marshall, F., Metakis, L., Califano, C., Dunn, A. M., Grasse, C., Hinds, G., Cervia, J. 2000. Probiotics and immune response. *Am J Gastroenterol.* **95**:22-5.
- Davagnino, J., Herrero, M., Furlong, D., Moreno, F., Kolter, R. 1986. The DNA replication inhibitor microcin B17 is forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins.* **1**:230-8.
- Delgado, M. A., Rintoul, M. R., Farias, R. N., Salomón, R. A. 2001. *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol.* **183**:4543-50.
- De Felice, M., Levinthal, M., Iaccarino, M and Guardiola, J. 1979. Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Rev.* **43**: 42–58.
- De Lorenzo, V. 1985. Factors affecting microcin E492 production. *J Antibiot (Tokyo).* **38**:340-5.
- De Lorenzo, V. 1984. Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol.* **139**:72-5.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik U., Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol.* **172**:6568-72
- De Lorenzo, V., Martinez, J. L., Asensio, C. 1984. Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J Gen Microbiol.* **130**:391-400.
- De Lorenzo, V., Pugsley, A. P. 1985. Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother.* **27**:666-9.
- De Santis, A., Famularo, G., De Simone, C. 2000. Probiotics for the hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* **95**:323-4.

- Del Campo, R., Bravo, D., Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., García-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F. J., Abraira, V., Baquero, F. 2005. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Appl Environ Microbiol.* **71**:547-549.
- Deng, W., Liou, S. R., Plunkett, G. III, Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D. C., Blattner, F. R. 2003. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J. Bacteriol.* **185**:2330-2337
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. 1999. Scientific Concepts in Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British-Journal-of-Nutrition.* **81**:1-27.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Funfstuck, R., Hacker, J. 2001. S-Fimbria-encoding determinant *sfa(I)* is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun.* **69**:4248-56.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., Dobrindt, J. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **70**:6365-6372
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., Schiffrin, E. J. 1999. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci.* **82**:863-9.
- Doron, S., Gorbach, S. L. 2006. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **4**:261-75.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr.* **73**:386-392
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep.* **24**:708-734.
- Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., Rebuffat, S. 2007. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **13**:200-209.
- Ehmann, D. E., Shaw-Reid, C. A., Losey, H. C., Walsh, C. T. 2000. The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:2509-2514.

- FAO/WHO (www.who.int/entity/foodsafety/publications/). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, 2002.
- Fath, M. J., Mahanty, H. K., Kolter, R. 1989. Characterization of a purF operon mutation which affects colicin V production. *J Bacteriol.* **171**:3158-61.
- Fath, M. J., Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017.
- Fath, M.J., Zhang, L, H., Rush, J., Kolter, R. 1994. Purification and characterization of colicin V from Escherichia coli culture supernatants. *Biochemistry.* **33**:6911-7.
- Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Kunzel, E., Rohr, J., Bechthold, A. 2000. Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in Streptomyces fradiae Tu2717. *Microbiology.* **146**:147-54.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* **94**:449-55.
- Fischbach, M. A., Lin, H., Liu, D. R., Walsh, C. T. 2005. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:571-576.
- Fredericq, P. 1963. On the nature of colicinogenic factors: a review. *J Theor Biol.* **4**:159-65.
- Freitag, V. and Friedrich, O. 1981. Bacteriocin typing of Enterobacter cloacae strains. *Zentralbl Bakteriol A.* **249**:63-75.
- Frick, K. K., Quackenbush, R. L., Konisky, J. 1981. Cloning of immunity and structural genes for colicin V. *J Bacteriol.* **148**:498-507.
- Furrer, J. L., Sanders, D. N., Hook-Barnard, I. G., McIntosh, M. A. 2002. Export of the siderophore enterobactin in Escherichia coli: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol.* **44**:1225-1234.
- Gaggero, C., Moreno, F., Laviña, M. 1993. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* **175**:5420-5427.
- Gaillard-Gendron, S., Vignon, D., Cottenceau, G., Graber, M., Zorn, N., van Dorsselaer, A., Pons, A. M. 2000. Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett.* **193**:95-8.
- García-Albiach, R., José, M., de Felipe, P., Angulo, S., Morosini, M. I., Bravo, D., Baquero, F., del Campo, R. 2008. Molecular analysis of yogurt containing Lactobacillus

delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr.* **87**:91-6.

Garcia-Bustos, J. F., Pezzi, N., Mendez, E. 1985. Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* **27**:791-7.

Garcia-Bustos, J. F., Pezzi, N., Asensio, C. 1984. Microcin 7: purification and properties. *Biochem Biophys Res Commun.* **119**:779-85.

Garrido, M. C., Herrero, M., Kolter, R., Moreno, F. 1988. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**:1853-62.

Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur.* **92**:45-67.

Gehring, A. M., Bradley, K. A., Walsh, C. T. 1997. Enterobactin biosynthesis in Escherichia coli: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry.* **36**:8495-8503.

Gehring, A. M., Mori, I., Walsh, C. T. 1998. Reconstitution and characterization of the Escherichia coli enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry.* **37**:2648-2659.

Genilloud, O., Moreno, F., Kolter, R. 1989. DNA sequence, products, and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17. *Bacteriol.* **171**:1126-35.

Giacco, R., Clemente, G., Luongo, D., Lasorella, G., Fiume, I., Brouns, F., Bornet, F., Patti, L., Cipriano, P., Rivellese, A. A., Riccardi G. 2004. Effects of short-chain fructo-oligosaccharides on glucose and lipid metabolism in mild hypercholesterolaemic individuals. *Clin Nutr.* **23**:331-40

Gill, H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **17**:755-73.

Gilson, L., H. K. Mahanty, and R. Kolter. 1990. Genetic analysis of and MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* **9**:3875-3884.

Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N., Strong, R. K. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell.* **10**:1033-1043.

Gonzalez-Pastor, J. E., San Millan, J. L., Castilla, M. A., Moreno, F. 1995. Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J Bacteriol.* **177**:7131-40.

Gorbach, S.L. 2000. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol.* **95**:2-4.

- Gorbach, S. L., Chang, T. W., Goldin, B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet*. **26**:1519.
- 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., Sturm, A. 2006. *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis via Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways. *Infect Immun*. **74**:4075-82.
- Groisman, E. A., Casadaban, M. J. 1986. Mini-Mu bacteriophage with plasmids replicons for in vivo cloning and *lac* gene fusing. *J. Bacteriol.***168**:357-364.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Dobrindt, U. 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. **186**:5432-41.
- Guijarro, J. I., Gonzalez-Pastor, J. E., Baleux, F., San Millan, J. L., Castilla, M. A., Rico, M., Moreno, F., Delepierre, M. 1995. Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. *J Biol Chem*. **270**:23520-32.
- Hacker, J., Hentschel, U., Dobrindt, U. 2003. Prokaryotic Chromosomes and Disease. *Science*. **301**:790 – 793.
- Haller, D., Blum, S., Bode, C., Hammes, W. P., Schiffrin, E. J. 2000. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun*. **68**:752-9.
- Hamon, Y and Peron Y. 1963. Study of the bacteriocinogenic power in the genus *Cloaca*. *Ann Inst Pasteur*. **104**:127-31.
- Hantke, K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. **4**:172-177.
- Hansen, J. N. 1993. Antibiotics synthesized by posttranslational modification. *Annu Rev Microbiol*. **47**:535-64.
- Habarstein, L. S., Diep, D. B., Nes, I. F. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol*. **16**: 229-240
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B. M., Bolbot, Y. K., Maydannik, V. G., Elze, M., Wolff, C., Schulze, J. 2007. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr*. **166**:311-8.
- 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. *J. Bacteriol*. **172**:6557-6567.

Herrero, M., Moreno, F. 1986. Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* **132**:393-402.

Hilton, E., Kolakowski, P., Singer, C., Smith, M. 1997. Efficacy of *Lactobacillus GG* as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med.* **4**:41-43.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis, in't Veld, J. H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* **41**:85-101.

Ishibashi, N., and Yamazaki, S. 2001. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr.* **73**:465-470.

Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., Salminen, S. 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy.* **30**:1604-10.

Kim, Y., Lee, D., Kim, D., Cho, J., Yang, J., Chung, M., Kim, K., Ha, N. 2008. Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212. *Arch Pharm Res.* **31**:468-73.

Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Salminen, S. J. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett.* **167**:185-9.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **12**:39-85.

Kleckner, N., et al. 1991. *Methods Enzymol.* **204**:152-155.

Kolter, R., Moreno, F. 1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu Rev Microbiol.* **46**:141-63.

Konopka, K., Neilands, J. B. 1984. Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry.* **23**:2122-2127.

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., Hughes, C. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature.* **22**:914-9.

Krammer, H. J., Schlieger, F., Harder, H., Franke, A., Singer, M. V. 2005. Probiotics as therapeutic agents in irritable bowel syndrome. *Z Gastroenterol.* **43**:467-71.

Krammer, H., Schlieger, F., Singer, M. V. 2005. Therapeutic options of chronic constipation. *Internist (Berl).* **46**:1331-8.

Kratzschmar, J., Krause, M., Marahiel, M. A. 1989. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol.* **171**:5422-9.

Kruis, W., Bar-Meir, S., Feher, J., Mickisch, O., Mlitz, H., Faszczyk, M., Chowers, Y., Lengyele, G., Kovacs, A., Lakatos, L., Stolte, M., Vieth, M., Greinwald, R. 2003. The

optimal dose of 5-aminosalicylic acid in active ulcerative colitis: a dose-finding study with newly developed mesalamine. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **1**:36-43.

Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut.* **53**:1617-23.

Kyte, J., Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* **157**:105-32.

Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J. A., Vergara, Monasterio, O. 2001. Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol Microbiol.* **42**:229-43.

Lagos, R., Villanueva, J. E., Monasterio, O. 1999. Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J Bacteriol.* Jan;**181**(1):212-7.

Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., Monasterio, O. 1993. Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membrane. *FEBS Lett.* **321**:145-8.

Lavina, M., Gaggero, C., and Moreno, F. 1990. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **172**:6585-8.

Leopold, C. S., Eikeler, D. 2000. Basic coating polymers for the colon-specific drug delivery in inflammatory bowel disease. *Drug Dev Ind Pharm.* **26**:1239-46.

Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R., Walsh, C. T. 2005. *In vitro* characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc.* **127**:11075-11084.

Liu, J. 1994. Microcin B17: postranslational modifications and their biological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 4618-4620.

Lodinova-Zadnikova, R., Prokesova, L., Tlaskalova, H., Kocourkova, I., Zizka, J., Stranak, Z. 2004. Influence of oral colonization with probiotic *E. coli* strain after birth on frequency of recurrent infections, allergy and development of some immunologic parameters. Long-term studies. *Ceska Gynekol.* 69 Suppl **1**:91-7.

Loomis, L. D., Raymond K. N. 1991. Solution equilibria of enterobactin and metal-enterobactin complexes. *Inorg. Chem.* **30**: 906–911

Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. 2002. Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis.* **15**:501-6.

Malchow, H. A. 1997. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?. *J Clin Gastroenterol.* **25**, 653–658.

Malin, M., Verronen, P., Korhonen, H., Syväoja, E. L., Salminen, S., Mykkänen, H., Arvilommi, H., Eerola, E., Isolauri, E. 1997. Dietary therapy with *Lactobacillus* GG, bovine colostrum or bovine immune colostrum in patients with juvenile chronic arthritis: Evaluation of effect on gut defence mechanisms. *Inflammopharmacology*. **5**:219-36.

Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., Schrezenmeir, J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr*. **73**:430S-436S

Martin, J. F., Demain, A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev*. **44**:230-51.

Martinez, J. L., Perez-Diaz, J. C. 1990. Cloning of the determinants for microcina D93 production and analysis of three different D-type microcina plasmids. *Plasmid*. **23**:216-25.

Martinez, J. L., Perez-Diaz, J. C. 1986. Isolation, characterization, and mode of action on *Escherichia coli* strains of microcin D93. *Antimicrob Agents Chemother*. **29**:456-60.

McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R. K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.

McLean, N. W., Rosenstein, I. J. 2000. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol*. **49**:543-52.

Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L., Corthésy-Theulaz, I. 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*. **60**:203-9.

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Miyama, A., Ozaki, M., Amano, T. 1961. Double colicinogenicity of *Escherichia coli* K235. *Biken J*. **4**:1-11.

Mohan, J. C., Arora, R., Khalilullah, M. 1990. Preliminary observations on effect of *Lactobacillus sporogenes* on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients. *Indian J Med Res*. **92**:431-2.

Moss, J. E., Cardozo, T. J., Zychlinsky, A., Groisman, E. A. 1999. The selC-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol*. **33**:74-83.

Murch, S. H. 2001. Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet*. **357**:1057-9.

- Nadathur, S. R., Gould, S. J., Bakalinsky, A. T. 1995. Antimutagenicity of an acetone extract of yogurt. *Mutat Res.* **334**:213-24.
- Naidu, A. S., Bidlack, W.R., Clemens, R. A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr.* **39**:13-126.
- Nanji, A. A., Khettry, U., Sadrzadeh, S. M. 1994. Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med.* **5**:243-7.
- Nieradko, J. 1976. Proticin types of *Proteus mirabilis* strains isolated from various environments. *Przegl Epidemiol.* **30**:41-45.
- Nissle, A. 1925. Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. *Dtsch Med Wochenschr.* **44**, 1809–1813.
- Novoa, M. A., Diaz-Guerra, L., San Millan, J. L., Moreno, F. 1986. Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J Bacteriol.* **168**:1384-91.
- Oberman, H., Libudzisz, Z. 1998. Fermented milks. En *Microbiology of Fermented Foods* 2nd Edition. Wood, B. J. B. (ed). Blackie, London. Springer. pp.308-345.
- O'Brien, G. J., Chambers, S. T., Peddie, B., Mahanty, H. K. 1996. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* **20**: 185-90
- O'Brien, G. J., Mahanty, H. K. 1994. Colicin 24, a new plasmid-borne colicin from a uropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Plasmid.* **31**:288-96.
- Otten, S. L., Ferguson, J., Hutchinson, C. R. 1995. Regulation of daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by the *dnrR2* locus. *J Bacteriol.* **177**:1216-24
- Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, J. A., Nord, C. E., Rafter, J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res.* **311**:239-48
- Ouwehand, A. C., Niemi, P., Salminen, S.J. 1999. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* **177**:35-8.
- Ouwehand, A. C., Isolauri, E., He, F., Hashimoto, H., Benno, Y., Salminen, S. 2001. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol.* **108**:144-5.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**:279-89.
- Papavassiliou, J. 1959. Production of colicines in Simmons's citrate agar. *Nature.* **184**:1339-40.

- Papavassiliou, J. 1961. Biological characteristics of colicine X. *Nature*. **190**:110.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T. T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T. S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. **413**:848-852.
- Patzer, S.I., Baquero, M. R., Bravo, D., Moreno, F., Hantke, K. 2003. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechol siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology*. **149**:2557-70.
- Perdigon, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J. C., Medici, M. 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr*. **56**:21-6.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci*. **78**:1597-606.
- Perna, N. T., Plunkett, G. III, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E., Potamousis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A., Blattner, F. R. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. **409**:529-533.
- Poey, M. E., Azpiroz, M. F., Lavina, M. 2006. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**:1411-8.
- Pohjavuori, E., Viljanen, M., Korpela, R., Kuitunen, M., Tiittanen, M., Vaarala, O., Savilahti, E. 2004. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. **114**:131-6.
- Pons, A. M., Delalande, F., Duarte, M., Benoit, S., Lanneluc, I., Sablé, S., Van Dorsselaer, A., Cottenceau, G. 2004. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:505-513.
- Pretzer, G., SNEM, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., de Vos, W. M., van der Meer, R., Smits, M. A., Kleerebezem, M. 2005. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*. **187**:6128-36.
- Pugsley, A. P. 1984. The ins and outs of colicins. Part II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol Sci*. **1**:203-205.
- Pugsley, A. P., and Oudega, B. 1987. Methods for studying colicins and their plasmid, p. 105-161. In K. G. Hardy (ed.), *Plasmids, a practical approach*. IRL Press, Oxford.

- Pugsley, A. P., Schwartz, M. 1984. Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO J.* **3**:2393-7.
- Rao, S., Hu, S., McHugh, L., Lueders, K., Henry, K., Zhao, Q., Fekete, R. A., Kar, S., Adhya, S., Hamer, D. H. 2005. Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:11993-8. Epub 2005 Jul 22.
- Raymond, K N., Dertz, E. A., Kim, S. S. 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:3584-3588.
- Reeves P. 1965. The bacteriocins. *Bacteriol Rev.* **29**:24-45.
- Reid, G., Kim, S. O., Köhler, G. A. 2006. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **46**:149-57.
- Reissbrodt. R., Hammes, W. P., dal Bello, F., Prager, R., Fruth, A., Hantke, K., Rakin, A., Starcic-Erjavec, M., Williams, P. H. 2009. Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by non-pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **290**:62-69.
- Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M. & Axon, A. T. 1999. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.* **354**: 635–639.
- Riley, M. A. and Wertz, J. E. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu Rev Microbiol.* **56**:117-137.
- Rinkinen, M., Mättö, J., Salminen, S., Westermarck, E., Ouwehand, A. C. 2000. *In vitro* adhesion of lactic acid bacteria to canine small intestinal mucus. *J Anim Physiol Anim Nutr.* **84**:1-2.
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C. 2003. Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet Microbiol.* **97**:55-61.
- Rodríguez, E., Gaggero, C., Laviña, M. 1999. The structural gene for microcin H47 encodes a peptide precursor with antibiotic activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(9):2176-82.
- Rodríguez, E., Laviña, M. 1998. Genetic analysis of microcin H47 immunity. *Can J Microbiol.* **44**:692-7.
- Rogers, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J Bacteriol.* **16**:321-5.
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr.* **130**:396S-402S.

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Salminen, S. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot.* **69**:2011-5.

Rusnak, F., Sakaitani, M., Drueckhammer, D., Reichert, J., Walsh, C. T. 1991. Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the entF gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry.* **30**:2916-27.

Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A., Yolken, R. H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* **344**:1046-9.

Sable, S., Duarte, M., Bravo, D., Lanneluc, I., Pons, A. M., Cottenceau, G., Moreno, F. 2003. Wild-type *Escherichia coli* producing microcins B17, D93, J25, and L; cloning of genes for microcin L production and immunity. *Can J Microbiol.* **49**:357-61.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol.* **44**:93-106.

Salomón, R. A., Farias, R. N. 1992. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **174**:7428-35.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sánchez, F. 1981. Clasificación genética de las microcinas. Tesis Doctoral. Fac. Ciencias UAM.

San Millán, J. L., Kolter, R., Moreno, F. 1987. Evidence that colicin X is microcin B17. *J Bacteriol.* **169**:2899-901.

San Millan, J. L., Kolter, R., Moreno, F. 1985. Plasmid genes required for microcin B17 production. *J Bacteriol.* **163**:1016-20.

San Millan, J. L., Hernandez-Chico, C., Pereda, P., Moreno, F. 1985. Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity. *J Bacteriol.* **163**:275-81.

Saxelin, M., Ahokas, M., Salminen, S. 1993. Dose-response on the fecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in 2 different formulations. *Microb. Ecol. Health Dis.* **6**: 119-122

Saxelin, M., Pessi, T., Salminen, S. 1995. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol.* **25**:199-203.

- Schaafsma, G., Meuling, W. J., van Dokkum, W., Bouley, C. 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur J Clin Nutr.* **52**:436-40
- Schultz, M., Watzl, S., Oelschlaeger, T. A., Rath, H. C., Gottl, C., Lehn, N., Scholmerich, J., Linde, H. J. 2005. Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) in vivo. *J Microbiol Methods.* **61**:389-98.
- Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci.* **83**:894-907.
- Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A. M., Berg, C., Walsh, C. T. 1999. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol.* **6**:385-400.
- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Farias, R. N., Salomón, R. A. 1996. Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J Bacteriol.* **178**:3661-3.
- Solga, S. F. 2003. Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses.* **61**:307-13.
- Shortt, C. 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci Tech.* **10**: 411-417.
- Stentebjerg-Olesen, B., Chakraborty, T., Klemm, P. 1999. Type 1 fimbriation and phase switching in a natural *Escherichia coli* fimB null strain, Nissle 1917. *J Bacteriol.* **181**:7470-8
- Strahsburger, E., Baeza, M., Monasterio, O., Lagos, R. 2005. Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:3083-6.
- Sturm, A., Rilling, K., Baumgart, D. C., Gargas, K., Abou-Ghazalé, T., Raupach, B., Eckert, J., Schumann, R. R., Enders, C., Sonnenborn, U., Wiedenmann, B., Dignass A. U. 2005. *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun.* **73**:1452-65
- Swenson, D. L., Clegg, S., 1992. Identification of ancillary fim genes affecting fimA expression in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **174**:7697-704.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* **40**:722-56.

- Taranto, M. P., Medici, M., Perdigón, G., Ruiz Holgado, A. P., Valdez, G. F. 1998. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci.* **81**:2336-40.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Afonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J. C., Rebuffat, S. 2004. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem.* **279**:28233-28242
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A., Saier, M. H. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **1**:107-125.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr.* **73**:393S-398S
- Ukena, S. N., Westendorf, A. M., Hansen, W., Rohde, M., Geffers, R., Coldewey, S., Suerbaum, S., Jan Buer, J., Gunzer, F. 2005. The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Medical Genetics.* **6**: 43.
- Verdu, E. F., Collins, S. M. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Irritable bowel syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **18**(2):315-21
- Vizan, J. L., Hernandez-Chico, C., del Castillo, I., Moreno, F. 1991. The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J.* **10**:467-76.
- Von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T., Krueger, M. 2005. *Escherichia coli* Strain Nissle 1917: Significant Reduction of Neonatal Calf Diarrhea. *J Dairy Sci.* **88**:317-323
- Wagner, W., Kuhn, M., Goebel, W. 1988. Active and inactive forms of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **369**:39-46.
- Wang, Y. C., Yu, R.C., Chou, C. C. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int J Food Microbiol.* **1**:209-17
- Weckermann, R., Furbass, R., Marahiel, M. A. 1988. Complete nucleotide sequence of the *tycA* gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Res.* **16**:11841.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., III y 16 autores mas. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:17020-17024.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J. M.,

- Stange, E. F. 2004. NF-kappa B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: A novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun.* **72**: 5750-5758.
- Wek, R. C., Hauser, C. A., Hatfield, G. W. 1985. The nucleotide sequence of the ilvBN operon of Escherichia coli: sequence homologies of the acetohydroxy acid synthase isozymes. *Nucleic Acids Res.* **13**:3995-4010.
- Wilkins, M., Villanueva, J. E., Cofre, J., Chnaiderman, J., Lagos, R. 1997. Cloning and expression in Escherichia coli of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from Klebsiella pneumoniae. *J Bacteriol.* **179**:4789-94.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. 2000. Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* **17**: 205-215
- Yang, C. C., Konisky, J. 1984. Colicin V-treated Escherichia coli does not generate membrane potential. *J Bacteriol.* **158**:757-9.
- Yang, R., Ray B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology.* **11**:281-291.
- Yeh, K. S., Hancox, L. S., Clegg, S. 1995. Construction and characterization of a fimZ mutant of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol.* **177**:6861-5.
- Yeh, K. S., Tinker, J. K., Clegg, S. 2002. FimZ binds the Salmonella typhimurium fimA promoter region and may regulate its own expression with FimY. *Microbiol Immunol.* **46**:1-10.
- Yorgey, P., Lee, J., Kordel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D., Kolter, R. 1994. Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:4519-23.
- Yoon, H., Dubarry M, Bouley C, Meredith, C., Portier, A. 1999. New insights in the validation of systemic biomarkers for the evaluation of the immunoregulatory properties of milk fermented with yogurt culture and Lactobacillus casei (Actimel (R)): A prospective trial. *Int J Immunother.* **15**: 79-89.
- Zarate, G., Chaia, A. P., Gonzalez, S., Oliver, G. 2000. Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J Food Prot.* **63**: 1214-1221
- Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Perez, P., De Antoni, G. 1998. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. *J Food Prot.* **61**:865-873
- Zhang, L. H., Fath, M.J., Mahanty, H. K., Tai P.C., Kolter, R. 1995. Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics.* **141**(1):25-32.