

***Escherichia coli*, UN PETIT GRAN ORGANISME**

CARLOS BALSALOBRE

Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Adreça per a la correspondència: Carlos Balsalobre. Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Tel.: 934 034 622. Adreça electrònica: cbalsalobre@ub.edu.

RESUM

Els processos essencials que tenen lloc dins les cèl·lules, tant fisiològics com genètics o bioquímics, estan altament conservats entre tots els éssers vius. Els bacteris són microorganismes d'estructura cel·lular senzilla en comparació de les cèl·lules dels organismes superiors. A més, molts bacteris es divideixen molt ràpidament, són fàcilment manipulables i es poden fer créixer en una àmplia varietat de medis de cultiu. Tot això ha fet que els bacteris s'hagin fet servir molt extensament com a model biològic per respondre qüestions sobre processos bàsics de la biologia que són comuns a tots els éssers vius. Per exemple, l'estat actual del coneixement biològic, el desenvolupament de la biologia molecular i moltes de les aplicacions biotecnològiques derivades són resultat, en gran mesura, de l'estudi en bacteriologia. Entre tots els bacteris utilitzats en laboratoris de recerca *Escherichia coli* ha estat, sens dubte, el més utilitzat, i ha donat lloc a molts dels coneixements de què disposem avui dia sobre el funcionament, l'estructura i l'evolució dels éssers vius. En aquest capítol fem una visió sobre l'ús passat, present i futur com a model biològic dels bacteris en general i d'*E. coli* en particular.

Paraules clau: bacteri, *Escherichia*, microbiologia.

***Escherichia coli*, A LITTLE BIG ORGANISM**

SUMMARY

The basic physiological, biochemical and genetic processes that take place inside a cell are highly conserved among the different organisms. When compared with high organisms, bacteria are microorganisms that have a simple cell structure. Moreover, many bacteria can divide very quickly, are easy to handle and can grow in a broad variety of culture media. All these properties promoted that bacteria were used as model organisms to

answer relevant biological questions common in all living beings. Present knowledge in biology, development of molecular biology and many biotechnological applications are mainly due to bacteriological studies. Among all, there is one bacterium that has been very extensively used in biological studies, *Escherichia coli*. Most of knowledge we have nowadays on the structure, physiology and evolution of the living creatures is based in data from *E. coli* based studies. In this chapter, an overview on the pass, present and future use of bacteria, and more specifically of *E. coli*, as a model organism is done.

Key words: bacterium, *Escherichia*, microbiology.

QUÈ ÉS UN BACTERI?

La gran varietat d'organismes cel·lulars present sobre la Terra es pot dividir en dos grans grups: els organismes eucariotes, aquells en què les seves cèl·lules tenen el material genètic a l'interior d'una estructura membranosa —el nucli— que el separa del citosol, i els procariotes, en què les cèl·lules no contenen embolcall nuclear i el material genètic es troba lliure al citoplasma. A més, i a diferència de les procariotes, les cèl·lules eucariotes presenten tota una sèrie d'òrgans membranosos com els mitocondris, el reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi, etc. Dins els organismes eucariotes trobem els animals, les plantes, els fongs i els protists. Els organismes procariotes són organismes microscòpics, predominantment unicel·lulars i que es reproduïen asexualment per fissió binària. Mitjançant estudis de relacions filogenètiques s'han diferenciat dos grans dominis dintre dels organismes amb organització cel·lular procariota: els bacteris i els arqueus, aquests últims sovint associats amb ambients extrems. Els bacteris s'han dividit atenent a diferències estructurals de la paret cel·lular en grampositius i gramnegatius (Madigan *et al.*, 2003). En aquest capítol ens centrarem en l'ús passat, present i futur dels bacteris com a organismes model en biologia. Els organismes model, a causa de diverses característiques, són útils com a material experimental per obtenir infor-

mació sobre processos biològics bàsics, extensibles a altres grups d'éssers vius. Un organisme model hauria de ser un sistema senzill, de fàcil estudi. Propietats com un creixement ràpid, una mida reduïda, disponibilitat i facilitat de manipulació són desitjades a l'hora d'escollir el model experimental en un treball de recerca. Com s'exposarà en aquest capítol, molts bacteris compleixen aquests requisits.

Si bé les cèl·lules bacterianes, des d'un punt de vista estructural, són molt més simples que les cèl·lules dels organismes eucariotes, les diferències funcionals entre ambdues són molt més discretes. De fet, la major part dels processos essencials dintre de la cèl·lula, tant fisiològics com genètics o bioquímics, estan altament conservats entre tots els éssers vius, independentment de la presència o absència de nucli. Així, la composició química de les cèl·lules és similar, contenen els mateixos tipus de macromolècules: àcids nucleics, proteïnes, lípids i carbohidrats; utilitzen bàsicament les mateixes reaccions metabòliques per a la biosíntesi, obtenció i emmagatzemament d'energia a partir dels nutrients; i el flux de la informació genètica té lloc per processos aparentment idèntics. Aquesta dualitat, l'elevada conservació dels processos biològics bàsics i la simplicitat cel·lular van fer evident la idoneïtat dels bacteris com a model biològic per respondre qüestions fonamentals sobre l'estructura, el funcionament i l'evolució dels éssers vius. De fet, és remar-

cable que, a la primera meitat del segle xx, diversos fisiòlegs i genetistes que van iniciar treballs en sistemes eucariotes van canviar a bacteris perquè aquests proporcionaven un material experimental més adient per respondre les qüestions biològiques bàsiques plantejades. Les aportacions al coneixement científic fetes per estudis en què s'utilitzaven bacteris, al llarg dels últims cent anys, són molt nombroses. Potser cal remarcar que el seu ús va ser essencial en la que es considera, sens dubte, una de les grans fites científiques del segle xx: la caracterització de la naturalesa química del material hereditari. Els estudis pioners de Griffith l'any 1928 i els treballs d'Avery, MacLeod i McCarthy l'any 1944 sobre la transformació del bacteri *Streptococcus pneumoniae* van provar que l'àcid desoxiribonucleic (DNA) era el material hereditari. La descripció de l'estructura per part de Watson i Crick l'any 1953 va ser el punt de partida de la biologia moderna (Glass, 1982).

***Escherichia coli*, LA «TOP MODEL» DINTRE DEL MÓN BACTERIÀ**

Són nombroses les espècies bacterianes que s'han utilitzat com a model experimental al llarg de la història recent de la ciència, però el bacteri *Escherichia coli* és possiblement l'organisme viu més estudiat. Alguns treballs fets amb aquest bacteri van permetre conèixer aspectes claus de la biologia, com ara la descripció d'un gran nombre de rutes metabòliques, la descripció detallada del concepte de gen, la resolució del codi genètic, els conceptes de mutació i recombinació, que han permès establir les bases moleculars de l'evolució dels éssers vius, etc. (Brock, 1990).

E. coli és un bacteri present al tracte gastrointestinal dels animals endodèrmics que

va ser descobert el 1885 per Theodor Escherich, un doctor alemany especialitzat en l'estudi de malalties infeccioses que afectaven els infants. Theodor Escherich va batejar aquest bacteri com a *Bacterium coli commune*. L'any 1919 es va proposar la designació *Escherichia coli*, encara que no va ser oficialment acceptada fins a l'any 1958 (Shulman *et al.*, 2007). *E. coli* és un bacil gramnegatiu no formador d'endòspores, mòbil i anaerobi facultatiu, és a dir, que pot créixer tant en presència com en absència d'oxigen (vegeu la figura 1). Ateinent a tota una sèrie de característiques morfològiques i bioquímiques *Escherichia* està inclosa en la família de les *Enterobacteriaceae*, en què trobem tant espècies de vida lliure a la natura, com membres dels gèneres *Klebsiella* i *Proteus*, com espècies que estan adaptades a viure en associació amb hostes vertebrats, que inclouen membres de gèneres bacterians com *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, etc. (Madigan *et al.*, 2003).

E. coli pot sintetitzar tots els components cel·lulars necessaris a partir de diferents fonts de carboni, és un bacteri fàcilment cultivable que pot créixer en una àmplia varietat de medis de cultiu, incloent-hi medis de composició química definida. La



FIGURA 1. Imatge de cèl·lules d'*E. coli* obtinguda per microscòpia electrònica de transmissió. Es poden observar unes estructures filiformes que corresponen als flagels.

temperatura òptima de creixement és de 37 °C i en condicions òptimes pot arribar a dividir-se cada 20 min (Neidhardt, 1996). Aquestes propietats, que són les desitjades en els organismes model, rapidesa i facilitat de creixement, no són exclusives d'*E. coli*, ja que també les presenten molts altres bacteris.

Llavors, per què *E. coli* ha estat organisme model en biologia durant els últims cent anys?

Les raons són diverses. A part de certes propietats intrínseques, com les esmentades anteriorment, és també el resultat de casualitats històriques i de la inèrcia que el coneixement facilita la generació de més coneixement. Al principi del segle xx, els bacteriòlegs interessats en estudis estructurals i fisiològics van escollir microorganismes que no fossin gaire virulents. Si bé, com veurem més endavant, hi ha soques d'*E. coli* que són importants patògens per a humans, les soques aïllades inicialment del tracte gastrointestinal de persones sanes i que s'han utilitzat de manera rutinària als laboratoris de recerca arreu del món compleixen aquest requisit. Així, les soques clàssiques de laboratori, denominades *K-12*, són innòcues per a l'ésser humà i no es requereixen mesures especials de contenció i bioseguretat per manipular-les al laboratori. Dos descobriments van ser decisius per potenciar la creixent popularitat d'*E. coli* entre la comunitat científica com a organisme model. El primer va ser la troballa per part de Massini el 1907 de variants d'*E. coli* aïllades del tracte gastrointestinal d'humans que no podien metabolitzar lactosa (*lac-*), al contrari de les soques tipus d'*E. coli*, que eren capaces d'utilitzar aquest sucre (*lac+*). Aquest aïllament *lac-* es va denominar *Escherichia coli-mutabile*. Es va observar que a partir d'aquestes variants *lac-*, apareixien revertents *lac+* amb una baixa freqüència. Aquests

descobriments van ser objecte d'acalorades discussions sobre l'origen de la variabilitat en bacteris i d'un intens debat sobre les visions lamarckianes i darwinianes de l'evolució. Treballs posteriors de Lewis (1934) i Luria i Delbrück (1943) amb *E. coli* van demostrar de manera convincent que les mutacions tenen lloc de manera espontània i es fan evidents sota pressió selectiva (Brock, 1990).

Un altre fet important en la història d'*E. coli* va ser el descobriment que els bacteris, igual que les cèl·lules eucariotes, poden ser infectats per virus. Els virus bacterians, coneguts com a *bacteriòfags*, van ser descoberts per Herelle l'any 1917, quan estudiava casos de disenteria en humans causada per *Shigella*, un gènere bacterià molt proper a *Escherichia* (Waldor *et al.*, 2005). Aquest descobriment va donar un fort impuls a la virologia, ja que la facilitat de cultivar els bacteris va permetre el desenvolupament de tècniques per a l'estudi dels virus. Els treballs pioners sobre els cicles vitals d'aquests microorganismes acel·lulars es van fer amb diferents espècies d'enterobacteris, especialment *E. coli* (vegeu el capítol sobre el bacteriòfag lambda). Aquests treballs van donar una empenta important a l'establiment d'*E. coli* com a organisme model. Així, segons relaten les cròniques de l'època, Jacques Monod, influenciat pel treball de genetistes bacterians, va escollir aquest bacteri per a la realització d'estudis fisiològics sobre creixement bacterià. Amb aquests treballs es va dur a terme la descripció del fenomen de la diàuxia, en què s'observava que quan *Escherichia* creixia en presència de dos sucres diferents (glucosa i lactosa) mostrava dues fases de creixement exponencial separades per un període de temps en què no es detectava increment de la població bacteriana. Aquests resultats foren determinants per establir que no tots els gens a les

cèl·lules es troben expressant-se activament, sinó que hi ha mecanismes de regulació de l'expressió gènica que els modulen depenent de les condicions ambientals (Lewis, 2005). Finalment, va ser determinant per a l'establiment definitiu d'*E. coli* com a organisme model en les ciències biològiques que els mecanismes d'intercanvi genètic entre bacteris, com la conjugació i la transducció, tinguessin lloc de manera eficient en *Escherichia*. Això va permetre l'anàlisi genètica de diverses funcions cel·lulars.

Amb el pas del temps, un altre aspecte beneficiós de treballar amb *E. coli* es va fer evident: com més se sap més fàcil és aprendre més. Les qüestions científiques poden ser resoltes d'una manera més eficient i les dades obtingudes poden ser interpretades més apropiadament quan es disposa d'un ampli coneixement de l'estructura, bioquímica, fisiologia i genètica de l'organisme utilitzat. La recerca amb *E. coli* resultava més eficient i productiva que amb altres bacteris menys estudiats o amb cèl·lules eucariotes. Amb aquest avantatge afegit, *E. coli* es va establir com un dels principals organismes model en biologia i ha estat una eina fonamental per aclarir molts secrets sobre com funcionen els éssers vius.

Un punt d'inflexió en la història de la ciència moderna, que sens cap dubte ha influït tremendament la nostra societat, va ser el desenvolupament durant les dècades dels seixanta i setanta d'eines i metodologies que van permetre la manipulació *in vitro* del DNA, és a dir, el naixement de l'enginyeria genètica. Com no podria ser d'altra manera, el primer clonatge d'una molècula de DNA recombinant es va fer en *E. coli* l'any 1974 (Morrow *et al.*, 1974). Des de llavors, la facilitat amb la qual és possible moure i eliminar gens en aquest bacteri ha permès estudiar la funció d'un elevat nombre de gens presents al seu genoma

mitjançant l'anàlisi genètica de mutants, i això ha promogut un ràpid progrés en el coneixement del funcionament de la cèl·lula bacteriana.

És virtualment impossible enumerar els processos biològics que han estat descrits gràcies a estudis en què s'ha utilitzat *E. coli* com a model experimental. El seu ús ha estat clau per descriure la major part dels processos fisiològics que tenen lloc en una cèl·lula bacteriana. Per extensió, aquests coneixements han estat fonamentals per entendre la fisiologia de les cèl·lules eucariotes i dels organismes superiors, incloent-hi l'ésser humà. La biologia molecular, la immunologia, la virologia, la biologia cel·lular, la biologia del desenvolupament, etc., es basen en conceptes generats en estudis de genètica i fisiologia bacteriana.

Si bé en aquest capítol ens hem centrat en el paper d'*E. coli* com a model experimental en ciència, hi ha moltes altres espècies bacterianes que han estat intensament utilitzades pels científics com a models experimentals. Així, s'ha de fer ressaltar, per exemple, un altre membre de la família *Enterobacteriaceae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, abans denominada *Salmonella typhimurium*, que ha estat extensament estudiada. El procés d'intercanvi genètic mitjançant transducció, que va donar un important impuls al desenvolupament de la genètica bacteriana, es va descobrir en *Salmonella*. Aquest bacteri, que té una important rellevància sanitària, ha estat utilitzat com a model per elucidar mecanismes bacterians que intervenen activament en el desenvolupament d'un procés infecciós. Un altre exemple seria *Bacillus subtilis*, un bacil grampositiu que normalment es troba al sòl, que forma endòspores en condicions adverses de creixement, i ha estat utilitzat com a model experimental en estudis de diferenciació i divisió cel·lular, segregació cromosòmica, etc.

Escherichia coli,
**UNA EINA IMPRESCINDIBLE
 EN ELS LABORATORIS
 DE RECERCA
 I EL DESENVOLUPAMENT
 BIOTECNOLÒGIC**

La manipulació genètica en *E. coli* és molt més fàcil que en qualsevol altre organisme. Per això, encara avui dia, aquest bacteri és el més utilitzat per al clonatge de molècules de DNA recombinant. Al llarg de les últimes dècades s'han desenvolupat tota una sèrie d'eines, com soques modificades genèticament i vectors de clonatge que poden ser fàcilment transferits a *Escherichia*, que han optimitzat tremendament el procés de clonatge en aquest organisme. Així, independentment que l'objectiu final sigui o no el clonatge en *Escherichia*, és una pràctica comuna clonar DNA inicialment en aquest bacteri, atenent a la facilitat amb què s'hi poden manipular les molècules de DNA, abans de transferir-les posteriorment a l'organisme destinatari. Una altra utilitat rellevant d'*E. coli* en els laboratoris d'investigació és l'ús per a l'expressió heteròloga de proteïnes, és a dir, la producció de proteïnes codificades en gens que han estat introduïts mitjançant enginyeria genètica. Tal com s'ha esmentat per al clonatge, també s'han dissenyat tota una sèrie de soques d'*E. coli* i vectors optimitzats per a la producció eficient de proteïnes tant per a ús en recerca bàsica com aplicada. L'avenç de la ciència va íntimament lligat al desenvolupament tecnològic i metodològic i *E. coli* és sovint l'organisme escollit per a l'optimització de noves metodologies experimentals, que posteriorment són aplicables a material biològic molt divers. Un bon exemple el tenim en el desenvolupament de la proteòmica, és a dir, les tècniques que pretenen identificar i quantificar cada una de les proteïnes presents en

una cèl·lula (Lee i Lee, 2003). Diversos estudis sobre el proteoma d'*E. coli*, disponible des de 1996, van ser pioners en l'ús d'aquestes metodologies (Appel *et al.*, 1996; Han i Lee, 2006). A part del seu ús com a eina en l'enginyeria genètica, *E. coli* és directament utilitzat en nombroses aplicacions biotecnològiques. Així, es fa servir per a la producció industrial de metabòlits, com ara aminoàcids i proteïnes, tant per a ús terapèutic com industrial. A més, està sent utilitzat per a la producció de DNA per a terapèutica gènica i per a la creació de vacunes (Pósfai *et al.*, 2006).

Escherichia coli, UN MODEL
 DE PATOGÈNESI BACTERIANA

E. coli és un bacteri altament especialitzat en la interacció amb organismes superiors i és un habitant freqüent del tracte gastrointestinal inferior de mamífers i ocells. La seva capacitat simbiòtica i l'èxit de la seva adaptació al tracte gastrointestinal és molt elevada, ja que es troba a la major part dels individus, encara que sigui un dels bacteris minoritaris de la població microbiana intestinal. La major part de les soques presents a l'intestí estableixen una relació de mutualisme amb l'hoste, en la qual *Escherichia* participa activament mitjançant la producció de vitamines que són absorbides per la mucosa intestinal (Wilson, 2005). Aquest tipus de soques, considerades beneficines, es denominen *comensals* i són les que es van aïllar i utilitzar durant dècades als laboratoris de recerca biològica. Malgrat tot, entre les soques que conformen l'espècie *E. coli* en trobem una gran varietat quant al tipus de relacions que poden establir amb l'organisme hoste. A més de les soques comensals, trobem un grup molt divers de soques d'*E. coli* que poden causar infeccions en diferents òrgans de l'hoste.

Així, n'hi ha que causen diferents tipus d'afeccions gastrointestinals amb severitat variable, infeccions del tracte urinari, meningitis i sèpsies (vegeu la taula 1). Això fa d'*E. coli* un dels patògens més versàtils que es coneixen (Croxen i Finlay, 2010). La incidència d'infeccions causades per *E. coli* és important tant des d'un punt de vista sanitari com econòmic. Així, *E. coli* és considerada la causa d'un terç de les diarrees infantils en els països subdesenvolupats, la causa més comuna d'infeccions urinàries no hospitalàries i un dels principals responsables de sèpsies en humans. A més, és també l'agent causal de moltes de les diarrees associades amb animals de granja. Entre les prioritats de les autoritats sanitàries europees en relació amb les malalties infeccioses trobem el control de les infeccions per soques enterohemorràgiques d'*E. coli*, a causa de la severitat del quadre clínic que poden causar.

Atenent a l'emergència actual de les malalties infeccioses com un problema sanitari a escala global de primer ordre, acompanyat de la problemàtica ineficàcia de moltes terapèutiques a causa del desenvolupament de resistència a antimicrobians per part dels bacteris patògens, s'ha fet evident la necessitat d'aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars implicats en l'establiment d'un procés infecció per part d'un microorganisme patògen. La descripció detallada de tots els passos que tenen lloc durant un procés infecció podria permetre el desenvolupament de noves terapèutiques per fer front a les malalties infeccioses. L'estudi de diferents patògens ha permès establir l'existència d'estructures i processos que estan altament conservats entre diferents patògens i que són, per tant, possibles dianes per al desenvolupament de nous agents terapèutics. A continuació es detallen dos exemples en què les soques patògenes d'*E. coli*

s'han utilitzat com a model experimental per estudiar aquests aspectes.

Un pas essencial en l'establiment d'un procés infecció és l'adherència dels patògens a la superfície dels teixits de l'hoste. Això s'aconsegueix mitjançant l'expressió en la superfície dels bacteris de molècules que reconeixen específicament receptors presents a la superfície dels teixits. Aquestes molècules, denominades *adhesines*, es troben sovint a l'extrem d'unes estructures filiformes denominades *fimbries* (vegeu la figura 2). La descripció detallada del procés de síntesi, de l'estructura i dels aspectes funcionals de les fimbries es va fer principalment utilitzant soques d'*E. coli* que causen infeccions del tracte urinari (Hultgren *et al.*, 1996). Aquestes fimbries són dianes per al desenvolupament de molècules amb un possible ús terapèutic, ja que si se'n pogués bloquejar la capacitat d'adherència o la producció, els bacteris perdrien la capacitat de causar infecció (Aronson *et al.*, 1979; Aberg i Almqvist, 2007).

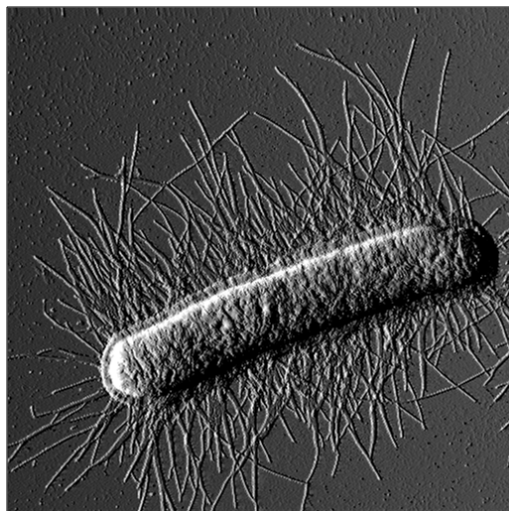


FIGURA 2. Imatge d'una cèl·lula fimbriada d'*E. coli* obtinguda per microscòpia de força atòmica.

TAULA 1. Diversitat dels aïllaments d'*Escherichia coli*

A. Soques comensals	
B. Soques patògenes	
B1. Intestinals	B2. Extraintestinals
<i>E. coli</i> enteropatogènica (EPEC)	<i>E. coli</i> uropatògena (UPEC)
<i>E. coli</i> enterohemorràgica (EHEC)	<i>E. coli</i> causant de meningitis a nounats (NMEC)
<i>E. coli</i> enterotoxigènica (ETEC)	Soques causants de sèpsia
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	
<i>E. coli</i> amb adherència difusa (DAEC)	

FONT: Adaptat de Croxen i Finlay (2010).

Un altre aspecte de la patogènesi és que la major part de patògens lliuren a l'espai extracel·lular o directament a les cèl·lules de l'hoste factors necessaris per induir la colonització i causar infecció mitjançant sistemes de secreció. Aquests sistemes es troben altament conservats en el món bacterià. *E. coli* ha estat l'organisme model per a la descripció de la majoria dels diversos sistemes de secreció bacterians (Desvaux *et al.*, 2009). Aquests sistemes són possibles dianes per al disseny de noves molècules antivirulència, ja que la inactivació selectiva de la secreció proteica per part dels patògens n'implicaria l'atenuació i l'eliminació posterior per part del sistema immunitari (Baron i Coombes, 2007).

La necessitat de disposar d'estratègies terapèutiques alternatives als antibiòtics ha fet ressorgir de nou l'interès per la fagoterapèutica, és a dir, l'ús dels bacteriòfags per a l'eliminació específica de bacteris patògens (vegeu el capítol 1). De fet, aquesta estratègia va ser utilitzada per al tractament de trastorns gastrointestinals durant la Segona Guerra Mundial per part de les tropes russes i alemanyes, però el descobriment dels antibiòtics en va aturar el desenvolupament. Com s'ha comentat, hi ha de

nou un interès en la possible aplicació de la fagoterapèutica en humans. Molts d'aquests estudis s'han fet amb bacteriòfags d'*E. coli*, anomenats *colifags* (Brüssow, 2005), i s'ha demostrat l'eficàcia d'aquests colifags per al tractament de malalties gastrointestinals en animals de granja (Smith *et al.*, 1987).

Escherichia coli COM A PROBIÒTIC

El terme *probiòtic* fa referència a la utilització de preparacions de microorganismes vius que en ser aplicades o ingerides en les quantitats apropiades exerceixen un efecte positiu sobre la salut. Aquest concepte va ser popularitzat al principi del segle xx per Metchnikoff, que va proposar que una flora microbiana del tracte gastrointestinal sana proporcionava protecció envers patògens intestinals. La presència de gèneres bacterians del grup fisiològic dels bacteris de l'àcid làctic a la flora intestinal, com *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, es considera que influeix positivament en la fisiologia de l'hoste, protegeix enfront d'infeccions entèriques i retarda processos d'envelliment cel·lular que poden causar malalties

greus (Klaenhammer, 2001). Aquestes propietats beneficioses que poden proporcionar certs bacteris han estat explotades des de llavors per millorar la qualitat de vida dels humans i millorar el rendiment a les explotacions ramaderes.

Els bacteris de l'àcid làctic no són els únics que tenen un important interès com a probiòtics. Des del començament del segle xx, també es va provar el possible ús de certes soques d'*E. coli* com a probiòtics per evitar processos patològics. Com s'ha comentat anteriorment, certes soques d'*E. coli*, denominades *comensals*, formen part de la flora intestinal dels animals endodèrmics. En el cas dels humans, aquestes soques estableixen una relació de mutualisme bàsicament des del moment del naixement. La flora intestinal està formada majoritàriament per microorganismes anaerobis. En el 90 % dels adults, *E. coli* és el microorganisme anaerobi facultatiu més abundant, encara que representi un component minoritari de la microflora del tracte gastrointestinal (Wilson, 2005; Tenaillon *et al.*, 2010). Durant la Primera Guerra Mundial, l'any 1917, Alfred Nissle, un metge alemany, va aïllar una soca d'*E. coli* d'un soldat que durant un període d'alta prevalença d'infeccions intestinals no en va patir cap. Es va veure que aquesta soca, denominada *Nissle 1917*, tenia un important efecte antagonístic enfront de patògens que causen afeccions gastrointestinals. Des de llavors i fins avui dia s'ha utilitzat l'administració oral de *Nissle 1917* en càpsules per a ús terapèutic sota el nom de Mutaflor® (Schultz, 2008). *Nissle 1917* presenta una sèrie de característiques especials que en permeten raonar el caràcter probiòtic: *a*) presenta la capacitat de produir diverses microcines que inhibeixen el creixement d'altres enterobacteris; *b*) presenta un lipopolisacàrid a la membrana externa amb propietats immunomoduladores que tenen

importància per la seva eficiència en el tractament de les colitis ulceroses; *c*) induïx la producció de defensines en les cèl·lules epitelials, estimulando el manteniment de la integritat física de la mucosa intestinal, i *d*) a més a més, alguns productes del seu metabolisme, com l'àcid acètic, promouen el moviment peristàltic del còlon. Diferents proves clíniques han mostrat la seva efectivitat enfront de la colitis ulcerosa, l'estrenyiment crònic i les diarrees agudes (Schulz, 2008).

Altres soques d'*E. coli* també han estat utilitzades com a probiòtics en ramaderia per evitar infeccions en animals de granja i incrementar d'aquesta manera la rendibilitat de les explotacions i eludir la possible transmissió de patògens als consumidors (Klaenhammer, 2001). S'ha observat que un còctel de disset espècies d'*E. coli* i una soca de *Proteus* protegeix les vedelles de la infecció per la soca d'*E. coli* enterohemorràgica O157 (Zhao *et al.*, 1998).

Actualment *E. coli* s'està utilitzant com a model per al disseny de probiòtics per a la prevenció i el tractament de malalties gastrointestinals. Diferents estudis han mostrat que molts patògens utilitzen estructures de la superfície de les cèl·lules de l'hoste com a diana per a: *a*) la unió dels bacteris, que promou la colonització i invasió dels teixits, o *b*) la unió de les toxines bacterianes, que causa així danys cel·lulars. Això ha permès el desenvolupament de noves estratègies antiinfectives basades a interferir amb aquests processos d'unió amb els receptors de l'hoste. Aquestes estratègies poden ser especialment útils en malalties gastrointestinals. Es basen en la creació de bacteris probiòtics, que, per tant, són inofensius i poden sobreviure al tracte gastrointestinal, que expressin a la seva superfície grans quantitats dels receptors diana per a una toxina o patògen concret. D'aquesta manera, en ser administrats

oralment i arribar a l'intestí, la major part de la toxina o el patògen present s'unirà al bacteri probiòtic en lloc de fer-ho a les cèl·lules de l'epiteli de l'hoste. Aquest segrest de les molècules inductores del procés patològic impedirà el desenvolupament de la malaltia (Paton *et al.*, 2006). El fet que *E. coli* sigui un organisme fàcilment manipulable genèticament i que es disposi de soques amb un elevat caràcter probiòtic ha fet que aquest hagi estat el microorganisme utilitzat per provar l'efectivitat d'aquestes estratègies antiinfecció. Hi ha dades experimentals prometedores en què es mostra la capacitat de retenció de diferents toxines bacterianes per part de soques manipulades genèticament que expressen els receptors específics de les toxines a la seva superfície (Watanabe *et al.*, 2004; Paton *et al.*, 2005).

L'ERA GENÒMICA

La primera seqüència genòmica completa d'un organisme cel·lular va ser la del bacteri *Haemophilus influenzae* l'any 1995 (Fleishmann *et al.*, 1995). Aquesta fita marca l'inici de l'era genòmica i va representar un important avenç en la història de la biologia. L'any 1997 es van completar i publicar les seqüències de dues soques K12 d'*E. coli* (Blattner *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1997). Una de les sorpreses que van proporcionar aquests estudis va ser que, sent *E. coli* l'organisme més estudiat, dels aproximadament 4.400 gens trobats uns 2.000 no havien estat caracteritzats experimentalment. Això indica l'existència d'un nombre important de proteïnes de funció desconeguda que podrien participar en processos encara desconeguts en *E. coli*. Avui dia disposem de la seqüència genòmica d'un elevat nombre d'organismes, incloent-hi les seqüències completes de 29

soques diferents d'*E. coli*. Entre aquestes, trobem diverses soques K12, soques comuns no-K12 i soques patògenes. La genòmica ha permès el desenvolupament de metodologies d'estudi integrals, que permeten, per exemple, l'estudi del patró d'expressió gènica global de la cèl·lula mitjançant l'ús de microxips. També ha permès la creació d'eines de treball com la col·lecció Keio de soques mutants per a cada un dels 3.985 gens no essencials d'*E. coli* i la biblioteca de clons ASKA, que permet la sobreexpressió de qualsevol de les proteïnes codificades en *E. coli* (Baba *et al.*, 2006; Kitagawa, 2005). Aquestes eines faciliten la determinació sistemàtica de funcions en gens i proteïnes mitjançant l'anàlisi genètica. Totes aquestes metodologies i estratègies a escala genòmica poden potencialment proporcionar grans quantitats d'informació per ampliar el coneixement del funcionament dels bacteris i, per extensió, de tots els éssers vius. Com a resultat de l'enorme quantitat d'informació que s'ha recollit sobre *E. coli* durant els últims cent anys (fenotip de mutants, seqüència genòmica, vies reguladores i metabòliques) disposem de coneixement detallat sobre la regulació gènica, l'activitat proteica, centenars de reaccions enzimàtiques, vies metabòliques i interaccions reguladores d'aquest organisme model. Malgrat tot, entendre com tots aquests processos funcionen per formar una cèl·lula viva requereix una caracterització més detallada i integrar el coneixement experimental disponible amb models matemàtics i informàtics, és a dir, cal fer servir aproximacions de biologia de sistemes (*systems biology approaches*). *E. coli* és sens dubte el millor candidat per desenvolupar aquestes noves estratègies per entendre millor el funcionament d'un ésser viu, atenent a la quantitat d'informació bàsica disponible i a la facilitat de manipulació. Diverses metodologies de biologia de siste-

mes han estat aplicades amb èxit de manera pionera en l'estudi de processos fisiològics complexos en *E. coli*, com són la quimiotaxi i la biosíntesi d'aminoàcids (Alexander i Zhulin, 2007; Hernandez-Montes *et al.*, 2008). Un esforç per entendre el funcionament global de la cèl·lula d'*E. coli* accelerarà el desenvolupament de noves tecnologies, tant experimentals com informàtiques, que seran aplicables a altres microorganismes, plantes o animals. Així, des de la descripció de la seqüència genòmica d'*E. coli*, s'han fet anàlisis a escala global del seu transcriptoma (RNA), proteoma (proteïnes) i metaboloma (metabòlits), mitjançant l'ús de xips de DNA, electroforesi bidimensional en gel associada a espectrometria de masses, cromatografia líquida i de gasos associada a espectrometria de masses i bioinformàtica. Un valor afegit és que *E. coli* no és només l'organisme model més estudiat sinó que també és un microorganisme utilitzat en aplicacions industrials i biotecnològiques. A més, com ja s'ha comentat anteriorment, estableix relacions amb organismes hoste, tant beneficioses com perjudicials, per la qual cosa representa un model perfecte, mitjançant estudis de biologia de sistemes, per poder establir models d'estil de vida lliure i associat a organismes superiors, cosa que pot proporcionar informació important per entendre el comensalisme i els processos de patogènesi microbiana.

ESTÀ PASSANT DE MODA *Escherichia coli*?

A mesura que avança el coneixement científic, les qüestions no resoltes són cada vegada menys bàsiques. L'especialització de la recerca científica implica la necessitat de seleccionar organismes com a models experimentals que siguin adients per

als estudis plantejats. És obvi que els investigadors interessats en la fisiologia dels organismes superiors no poden utilitzar sempre bacteris com *E. coli* per demostrar les seves hipòtesis. Així, hi ha un nombre cada vegada més elevat d'organismes model en biologia, molts dels quals són tractats en els diferents capítols d'aquest volum monogràfic, i que han mostrat ser efectius per a l'àmbit científic corresponent. Igualment, el nombre de microorganismes utilitzats com a model experimental en microbiologia s'ha incrementat també en les últimes dècades. Per exemple, si uns microbiòlegs estan interessats a esbrinar els mecanismes implicats en les capacitats dels bacteris de degradar components tòxics presents a la natura no té cap sentit utilitzar *E. coli* com a model. Bacteris com *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Caulobacter* o *Listeria*, etc., estan sent intensament estudiats, i el coneixement derivat pot ser extensible a altres microorganismes relacionats bé per la seva semblança filogenètica, ecològica o fisiològica.

Tot això indica que l'època daurada d'*E. coli* ha finalitzat? Bé, no hi ha cap dubte que perquè la ciència avanci es requereix una diversificació dels organismes model per utilitzar, però *E. coli* és encara l'organisme viu més estudiat i és utilitzat, com s'ha mostrat en diferents apartats d'aquest capítol, en molts estudis com a organisme model per intentar respondre qüestions bàsiques i particulars de rellevància per a l'avenç del coneixement bàsic i aplicat.

A més a més, la seqüenciació del genoma ha provat que desconexim d'*E. coli* molt més del que no ens pensàvem. Hi ha un gran nombre de gens que codifiquen proteïnes desconegudes que possiblement proporcionen funcions fins ara no descrites. Per tant, encara queda molta feina a fer, hem d'aprofundir en el coneixement d'aquest bacteri fascinant, fet que sens

dubte pot proporcionar informació rellevant per entendre els sistemes biològics.

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a Francisco Muñoa i a Cristina Madrid, del Departament de Microbiologia de la Universitat de Barcelona, la lectura crítica del text inicial i els suggeriments fets.

BIBLIOGRAFIA

- ABERG, V.; ALMQVIST, F. (2007). «Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence». *Org. Biomol. Chem.*, 5: 1827-1834.
- ALEXANDER, R. P.; ZHULIN, I. B. (2007). «Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signalling and adaptation in microbial chemoreceptors». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 104: 2885-2890.
- APPEL, R. D.; SANCHEZ, J. C.; BAIROCH, A.; GOLAZ, O.; RAVIER, F.; PASQUALI, C.; HUGHES, G. J.; HOCHSTRASSER, D. F. (1996). «The SWISS-2DPAGE database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, its status in 1995». *Nucleic Acids Res.*, 24: 180-181.
- ARONSON, M.; MEDALIA, O.; SCHORI, L.; MIRELMAN, D.; SHARON, N.; OFEK, I. (1979). «Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside». *J. Infect. Dis.*, 139: 329-332.
- BABA, T.; ARA, T.; HASEGAWA, M.; TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; BABA, M.; DATSENKO, K. A.; TOMITA, M.; WANNER, B. L.; MORI, H. (2006). «Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection». *Mol. Syst. Biol.*, 2: 2006-2008.
- BARON, C.; COOMBES, B. (2007). «Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm». *Infect. Disord. Drug Targets.*, 7: 19-27.
- BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. (1997). «The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12». *Science*, 277: 1453-1462.
- BROCK, T. D. (1990). *The emergence of bacterial genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BRÜSSOW, H. (2005). «Phage therapy: the *Escherichia coli* experience». *Microbiology*, 151: 2133-2140.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. (2010). «Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity». *Nature Review Microbiology*, 8: 26-38.
- DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; TALON, R.; HENDERSON, I. R. (2009). «Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue». *Trends Microbiol.*, 17: 139-145.
- FLEISCHMANN, R. D. [et al.] (1995). «Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd». *Science*, 269: 496-512.
- GLASS, R. E. (1982). *Gene function. E. coli and its heritable elements*. Berkeley, Los Angeles: University of California Press.
- HAN, M.-J.; LEE, S. Y. (2006). «The *Escherichia coli* proteome: past, present and future prospects». *Microbiology and molecular biology reviews*, 70: 362-439.
- HERNANDEZ-MONTES, G.; DIAZ-MEJIA, J. J.; PEREZ-RUEDA, E.; SEGOVIA, L. (2008). «The hidden universal distribution of amino acid biosynthetic networks: a genomic perspective on their origins and evolution». *Genome Biol.*, 9: R25.
- HULTGREN, S. J.; JONES, C. H.; NORMARK, S. (1996). «Bacterial adhesins and their assembly». A: NEIDHARDT, F. C. [ed.]. *Escherichia coli and Salmonella*. Washington: ASM Press, p. 2723-2756.
- KITAGAWA, M.; ARA, T.; ARIFUZZAMAN, M.; IOKA-NAKAMICHI, T.; INAMOTO, E.; TOYONAGA, H.; MORI, H. (2005). «Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research». *DNA Res.*, 12: 291-299.
- KLAENHAMMER, T. R. (2001). «Probiotics and prebiotics». A: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. [ed.]. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, p. 797-812.
- LEE, P. T.; LEE, K. H. (2003). «*Escherichia coli*: a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics». *Biotechnology and bioengineering*, 84: 801-814.
- LEWIS, M. (2005). «The lac repressor». *CR Biol.*, 328: 521-548.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.
- MORROW, J. F.; COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; BOYER, H. W.; GOODMAN, H. M.; HELLING, R. B. (1974). «Replication and transcription of eukaryotic DNA

- in *Escherichia coli*». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 1743-1747.
- NEIDHARDT, F. C. (1996). «The enteric bacterial cell and the age of bacteria». A: NEIDHARDT, F. C. [ed.]. *Escherichia coli and Salmonella*. Washington: ASM Press, p. 1-3.
- PATON, A. W.; JENNINGS, M. P.; MORONA, R.; WANG, H.; FOCARETA, A.; RODDAM, L. F.; PATON, J. C. (2005). «Recombinant probiotics for treatment and prevention of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea». *Gastroenterology*, 128: 1219-1228.
- PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. (2006). «Designer probiotics for prevention of enteric infections». *Nature Rev. Microbiology*, 4: 193-200.
- PÓSFAL, G. [et al.] (2006). «Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*». *Science*, 312: 1044-1046.
- SCHULTZ, M. (2008). «Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease». *Inflamm. Bowel Dis.*, 14: 1012-1018.
- SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. (2007). «Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?». *Clinical Infectious Diseases*, 45: 1025-1029.
- SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B.; SHAW, K. M. (1987). «The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages». *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1111-1126.
- TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. (2010). «The population genetics of commensal *Escherichia coli*». *Nature Reviews Microbiology*, 8: 207-217.
- WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. (2005). *Phages. Their role in pathogenesis and biotechnology*. Washington: ASM Press.
- WATANABE, M.; MATSUOKA, K.; KITA, E.; IGAI, K.; HIGASHI, N.; MIYAGAWA, A.; WATANABE, T.; YANOSHITA, R.; SAMEJIMA, Y.; TERUNUMA, D.; NATORI, Y.; NISHIKAWA, K. (2004). «Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* infections». *J. Infect. Dis.*, 189: 360-368.
- WILSON, M. (2005). *Microbial inhabitants of humans*. Cambridge: Cambridge University Press.
- YAMAMOTO, Y. [et al.] (1997). «Construction of a contiguous 874-kb sequence of the *Escherichia coli* K12 genome corresponding to 50.0-68.8 min on the linkage map and analysis of its sequence features». *DNA Res.*, 4: 91-113.
- ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; HARMON, B. G.; BROWN, C. A.; MUELLER, P. O.; PARKS, A. H. (1998). «Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria». *J. Clin. Microbiol.*, 36: 641-647.