



MASTER EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR, CELULAR Y
GENETICA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Papel de la proteína CLMP en la interacción entre epitelio
intestinal y *Campylobacter jejuni*.**

POR:

Francisco del Caño Ochoa

Grupo de Genómica y Mejora Animal.

Departamento de Genética

VºBº

JUAN JOSÉ GARRIDO PAVÓN

TUTOR Y DIRECTOR DEL TRABAJO



*MASTER EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR, CELULAR Y
GENETICA*

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

PROFESORES PROPUESTOS PARA LA REVISIÓN DEL TRABAJO

FIN DE MÁSTER:

- Enriqueta Moyano Cañete
- Carmen Michán Doña

V°B°

JUAN JOSÉ GARRIDO PAVÓN

TUTOR Y DIRECTOR DEL TRABAJO

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1. Células y Bacterias	6
4.2. Expresión de CLMP en células CHO	6
4.2.1. Clonación génica	6
4.2.1.1. Ligación	7
4.2.1.2. Transformación	7
4.2.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico	7
4.2.2. Construcción del vector pcDNA3 mCherry-CLMP.....	8
4.2.3. Transfección en células CHO.....	9
4.3. Silenciamiento de CLMP en células INT-407.....	9
4.4. PCR Cuantitativa a tiempo real (RTqPCR)	10
4.4.1. Aislamiento de ARN	10
4.4.2. Retrotranscripción (RT).....	10
4.4.3. RTqPCR.....	10
4.5. Western Blot	11
4.5.1. Extracción de proteína.....	11
4.5.2. Western Blot.....	11
4.6. Infección in vitro	11
4.6.1. Microscopía confocal.....	12
4.6.2. Ensayos de protección a la gentamicina.....	13
4.7. Análisis estadístico	13
5. RESULTADOS	14
5.1. Expresión de CLMP en células CHO	14
5.2. Silenciamiento de CLMP en células INT-407.....	20
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES.....	24
8. AGRADECIMIENTOS	25
9. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. RESUMEN

El desenlace de la infección producida por *Campylobacter jejuni* está determinado por las interacciones que se establecen entre las células del sistema inmune innato del hospedador y la bacteria. Uno de los eventos más importantes de la infección por este patógeno tiene que ver con la capacidad del microorganismo de adherirse y posteriormente invadir las células de la mucosa intestinal del hospedador. *Campylobacter* es una bacteria patógena para humano, pero considerada comensal en las especies de animales de abasto que coloniza, principalmente aves de corral y cerdos. Los mecanismos subyacentes a estas diferencias aún no han sido dilucidados, si bien parecen estar relacionados con una mayor capacidad de la bacteria para invadir el epitelio intestinal humano. En un estudio previo al presente trabajo, nuestro grupo de investigación identificó la proteína CLMP como un posible receptor para *Campylobacter* en las células de la mucosa intestinal. Con el fin de aportar conocimiento sobre la función de este receptor celular, en el presente trabajo se analizó el papel de CLMP en la interacción patógeno-hospedador, mediante una estrategia combinada consistente en el empleo de dos aproximaciones funcionales distintas: a) expresión heteróloga de la proteína CLMP en células CHO y b) silenciamiento mediante siRNA del gen CLMP en células INT-407. Los resultados mostraron un aumento de la interacción (adhesión e invasión) de *C. jejuni* con las células CHO transfectadas con CLMP y una inhibición de dicha interacción en las células INT-407 en las que el gen CLMP fue silenciado, demostrando que la presencia de CLMP está directamente relacionado con la capacidad del microorganismo de infectar las células epiteliales de la mucosa intestinal humana.

2. INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis o enfermedad causada por bacterias del género *Campylobacter* es una zoonosis que se ha convertido en los últimos años en un problema emergente en todo el mundo. *Campylobacter* constituye la principal causa de gastroenteritis bacteriana en humanos con 220.209 casos reportados en Europa en 2011 y una incidencia anual de 50,3 por cada 100.000 habitantes (Friis et al. 2009; EFSA and ECDC 2013). Dentro del género *Campylobacter*, las especies más frecuentemente aisladas son *C. jejuni* y *C. coli*, siendo *C. jejuni* la especie predominante (Nachamkin et al. 1998).

Aunque la infección por *Campylobacter* puede dar lugar a otras manifestaciones clínicas, comúnmente la campilobacteriosis cursa con una gastroenteritis aguda, originando un cuadro clínico que puede diferir en severidad y duración. Los síntomas asociados a la enfermedad

incluyen dolor y calambres abdominales, vómitos, diarrea (desde acuosa y no inflamatoria hasta sanguinolenta e inflamatoria), dolor de cabeza y a menudo fiebre.

La evolución de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa y del estado inmune del hospedador, siendo comúnmente una enfermedad autolimitante que remite en 4-7 días en personas inmunocompetentes, pero que en personas con un sistema inmune comprometido o deprimido puede dar lugar a complicaciones extraintestinales, como hepatitis, pancreatitis e incluso septicemia. Asimismo, la infección por *C. jejuni* también ha sido relacionada con complicaciones post-infectivas, como el Síndrome de Guillain-Barré (SGB), la causa más común de parálisis aguda neuromuscular en países desarrollados, o su variante el Síndrome de Miller-Fisher, así como con artritis reactiva (Ketley 1997; Nachamkin et al. 1998; Hannu et al. 2002; Yuki et al. 2004).

Debido a la amplia distribución que *Campylobacter* presenta en la naturaleza, colonizando el tracto gastrointestinal de un amplio rango de aves y mamíferos sin causar síntomas clínicos, diversas especies de animales domésticos y de compañía constituyen verdaderos reservorios naturales de la bacteria a través de los cuales, ya sea directa o indirectamente, los humanos pueden infectarse (Zilbauer et al. 2008; Acke et al. 2010).

El esfuerzo para reducir las infecciones por *Campylobacter* está directamente unido a un mayor entendimiento del proceso de interacción que ocurre entre patógeno y hospedador, y de la contribución de este proceso en la patogénesis de la enfermedad. *C. jejuni* es un enteropatógeno alimentario y por tanto, el intestino representa la principal vía de entrada e infección. El intestino es un sistema extremadamente complejo que participa en la protección del organismo frente a patógenos. Para llevar a cabo esta función, las células del epitelio intestinal se constituyen en monocapa, formando una barrera física contra agresiones externas. Por otro lado, uno de los primeros acontecimientos que tienen lugar en el establecimiento de una infección es la interacción y reconocimiento entre el patógeno y la célula del hospedador. Así, la adhesión de la bacteria al epitelio intestinal y su posterior invasión es un evento requerido para que tenga lugar el inicio del proceso inflamatorio y en consecuencia, la enfermedad gastrointestinal (Zilbauer et al. 2008).

La identificación de las interacciones que ocurren entre el hospedador y patógeno a nivel molecular es indispensable para el mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad (Ó Cróinín and Backert 2012). A diferencia de lo que ocurre con otros patógenos intestinales, el conocimiento sobre esta interacción en *Campylobacter* es bastante escaso. Hasta el momento, solo dos moléculas han sido descritas como receptores para *Campylobacter*, la proteína

HSP90 α y la fibronectina, aunque ninguna de ellas es responsable del porcentaje total de invasión observado en las células, indicando que podrían existir otras moléculas implicadas en el proceso de invasión bacteriana (Jin et al. 2003; Monteville et al. 2003).

Por ello, en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo del doctor Bhide (Universidad de Kosice, Eslovaquia), se llevó a cabo la identificación de otras posibles moléculas implicadas en dicho proceso de reconocimiento entre patógeno y hospedador. Así, mediante ensayos LCA (Ligand Capture Assay, Pulzova et al. 2011) se identificó la proteína CLMP (CXADR like membrane protein) como una proteína candidata. CLMP es una proteína que se encuentra predominantemente expresada en intestino delgado, concretamente formando parte de las uniones estrechas (*Tight junctions*) en las células epiteliales (Raschperger et al. 2004). Debido a que las uniones estrechas son las uniones celulares que se encuentran en las zonas apicales del epitelio intestinal, las proteínas implicadas en esas uniones serán las primeras en contactar con cualquier bacteria que se encuentre en la luz intestinal. Asimismo, el hecho de que *Campylobacter* provoque un aumento de la permeabilidad intestinal ha sido directamente relacionado con la capacidad que tiene esta bacteria de desorganizar las uniones estrechas entre las células epiteliales (Chen et al. 2006). En relación con esto, recientemente se ha sugerido que el incremento de permeabilidad intestinal que tiene lugar tras la infección por *Campylobacter* podría estar asociado a un mayor riesgo de sufrir alguna enfermedad intestinal asociada a dicho incremento de permeabilidad, como la enfermedad celíaca o la enfermedad de Crohn (Riddle et al. 2012b).

Así, el presente trabajo proporcionará un mayor conocimiento sobre el papel que tiene la proteína CLMP en el reconocimiento entre epitelio intestinal humano y *C. jejuni*, lo cual resultará de gran interés en el estudio de la patogénesis de la campilobacteriosis, así como de otras enfermedades posiblemente asociadas a ella.

3. OBJETIVOS

El propósito final del presente trabajo es la caracterización funcional de la proteína CLMP con el fin de determinar su función en el proceso de interacción entre las células del epitelio intestinal humano y *C. jejuni*. Para ello, los objetivos propuestos fueron los siguientes:

- I. Expresión heteróloga de la proteína CLMP en células CHO.
- II. Silenciamiento de la proteína CLMP en células INT-407 mediante tecnología siRNA.

- III. Evaluación de la función de CLMP en la interacción patógeno-célula hospedadora, mediante técnicas de microscopía confocal y ensayo de protección a la gentamicina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Células y Bacterias

En nuestro estudio se usaron dos tipos celulares diferentes. Tanto la línea celular epitelio intestinal humano INT-407 (intestino delgado embrionario humano), como la línea celular CHO (células de ovario de hámster) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, PPA Laboratories) y 2 mM de L-glutamina (Life Technologies). Hasta llegar a la confluencia deseada, el medio de cultivo fue cambiado cada dos días, y las células fueron mantenidas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Por otra parte, la cepa de *C. jejuni* usada procede de un aislado clínico, y fue elegida debido a que fue la cepa usada en el previo ensayo de LCA (Ligand Capture Assay). Hasta su utilización, la bacteria fue conservada a -80°C en una solución crioprotectora conteniendo 15% de glicerol (VWR) en medio de cultivo Luria-Bertoni (LB, Conda). Dos días previos a la infección in vitro, las bacterias fueron sembradas en placas de agar sangre (Oxoid) durante 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia generadas con el sistema Anaerogen (Oxoid) y finalmente recogidas en tampón fosfato estéril (PBS) y cuantificadas mediante espectrofotometría (DO₆₀₀).

4.2. Expresión de CLMP en células CHO

Para evaluar el efecto de la proteína CLMP en la interacción con *C. jejuni*, la proteína recombinante CLMP-mCherry fue expresada en las células CHO. Para ello se siguieron los siguientes pasos.

4.2.1. Clonación génica

En primer lugar, se diseñaron cebadores para la amplificación de la secuencia completa de ADN copia (ADNc) del gen CLMP en humano (GeneBank NM 024769.2) mediante el uso del programa informático Oligo Primer Analysis Software v7.37 (Molecular Biology Insights). En dichos cebadores fueron incluidas las secuencias diana para las enzimas de restricción para su inserción en el vector de expresión: el cebador sentido con la secuencia de corte para EcoRV (5'-CCAGATATCACCATGGCCCTCCTCTTCTC-3') y el cebador antisentido con BamHI (5'-

CCAGGATCCGCGACCGTTTGGAA-3'). La amplificación de la secuencia se realizó usando como molde ADNc procedente de la línea celular INT-407 y siguiendo las siguientes condiciones de PCR: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificación (94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C durante 2 minutos), finalizando con una extensión final de 7 minutos a 72°C. La correcta amplificación del producto fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa (1%), tras lo cual el producto fue purificado mediante el sistema GENE CLEAN Turbo Kit (QBIogene) y cuantificado espectrofotométricamente mediante NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

4.2.1.1. Ligación

El producto amplificado fue ligado en el vector pGEM-T mediante el sistema pGEM-T Easy Vector System (Promega), en una reacción de 10µl incluyendo 1 µl de T4 DNA ligasa, 5µl de buffer de ligación 2x, 50 ng del vector pGEM-T Easy y 150 ng del producto de PCR (ratio inserto:vector de 3:1).

4.2.1.2. Transformación

A continuación, el producto de ligación fue usado en la transformación bacteriana. Para ello, se emplearon bacterias de la estirpe XL1-Blue de *E.coli*. La transformación se realizó mediante choque térmico, en presencia de β-mercaptoetanol, y las bacterias fueron incubadas con 25 ng del vector durante 3 minutos a 37°C. Seguidamente las bacterias se incubaron con 500 µl de medio LB a 37°C en agitación durante 1 hora, tras lo cual se sembraron en placas de agar suplementado con ampicilina y se dejaron crecer durante toda la noche.

4.2.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico

Las colonias resultantes fueron inoculadas en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina e incubadas a 37°C en agitación durante toda la noche. A continuación, el ADN plasmídico fue purificado mediante el método CTAB. Tras la purificación, la presencia del vector con el inserto fue verificada mediante doble digestión con las enzimas de restricción EcoRV y BamHI, en la que se usó una unidad de cada enzima en un volumen final de reacción de 20 µl (Roche). Asimismo, para comprobar que la secuencia del inserto era la correcta, la muestra se secuenció en el servicio de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI) mediante un secuenciador capilar ABI Prisma 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.2.2. Construcción del vector pcDNA3 mCherry-CLMP

Para expresar la proteína CLMP en las células CHO, se empleó el vector de expresión pcDNA3.1 (Promega). Con el fin de observar la expresión de la proteína mediante microscopía confocal, se diseñó una construcción recombinante para codificar la proteína resultante de la fusión de CLMP con la proteína reportera mCherry, que es visualizada de color rojo al microscopio debido a su energía máxima de excitación a 587 nm y de emisión a 610 nm. El proceso de creación de la construcción recombinante se llevó a cabo en dos fases que se ilustran en la Figura 1. En primer lugar, la secuencia de la proteína mCherry fue escindida de un vector donante, pET-H6-mCherry y posteriormente insertada en el vector de expresión pcDNA3.1. A continuación, la secuencia codificante de CLMP fue subclonada en este vector para la obtención final del vector recombinante pcDNA3.1-CLMP-mCherry. Este vector fue finalmente purificado a gran escala a partir de maxipreparaciones de *E. coli* XL1-blue mediante el kit JETstar 2.0 Plasmid Maxiprep (Genomed).

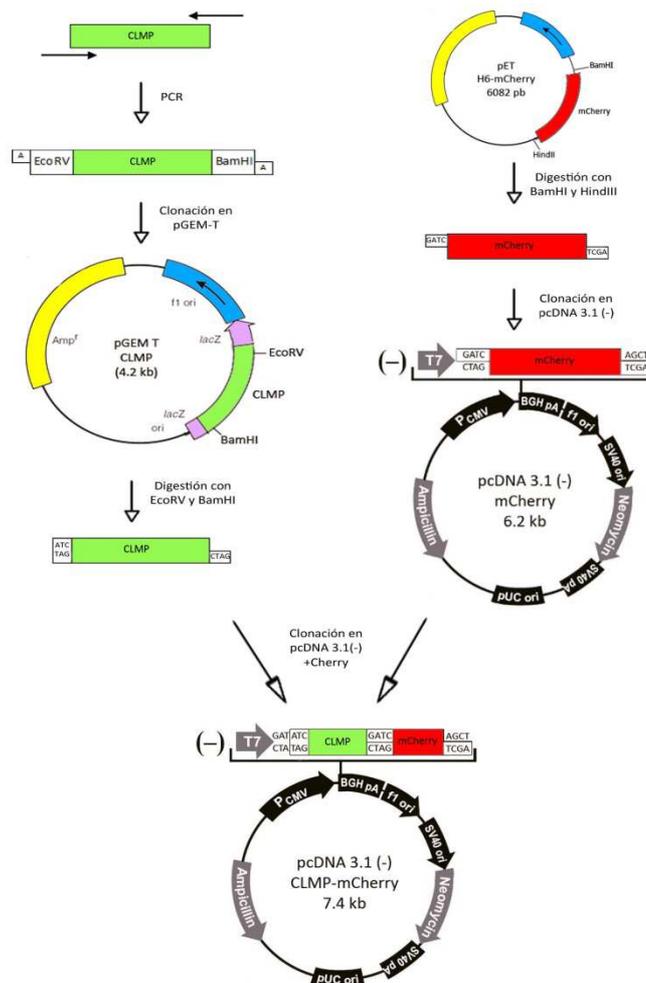


Figura 1. Esquema del proceso seguido para la construcción del vector utilizado en la expresión heteróloga de CLMP.

4.2.3. Transfección en células CHO

Para la expresión de la proteína CLMP en células CHO, se realizó una transfección transiente mediante el sistema de lipofectamina. Un día antes de la transfección, células CHO fueron sembradas en placas de 24 pocillos, siendo 150.000 células por pocillo. Al día siguiente, con un 60-70% de confluencia se procedió a la transfección. Para ello, en primer lugar una mezcla de 2 µl Lipofectamina 2000 (Life Technologies) y 1.1 µg de vector en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo OptiMEM (Invitrogen) fue incubado durante 20 minutos para favorecer la formación de complejos lípidos-ADN. Al mismo tiempo, el medio de cultivo de las células fue sustituido por 500 µl de OptiMEM (Invitrogen), para favorecer la transfección. Tras el tiempo de incubación, la mezcla fue añadida a las células. La transfección se llevó a cabo durante 6 horas a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂. Tras lo cual, el medio de transfección fue sustituido por el medio de cultivo regular.

4.3. Silenciamiento de CLMP en células INT-407

El silenciamiento del gen CLMP en la línea celular INT-407 fue realizado mediante el empleo de ARN interferente de pequeño tamaño (siRNA). Los siRNAs son pequeñas moléculas de ARN que presentan total complementariedad de bases con la región 3' UTR del ARN mensajero del gen a silenciar. Al unirse impiden la traducción del ARN mensajero. En nuestro caso se usó una mezcla de 3 siRNAs, procedentes de la casa comercial Santa Cruz (CLMP siRNA h, Santa Cruz), con diferentes dianas en la molécula de ARN mensajero, asegurando el silenciamiento.

En primer lugar, para determinar la combinación más eficiente en el silenciamiento de la molécula se usó diferente volumen de siRNAs (0.5, 1.5 y 3 µl) y de reactivo de transfección siRNA Transfection Reagent (0.75, 1.5 y 2.25 µl, Santa Cruz). Asimismo, para comprobar que lo observado en las células transfectadas se debe al uso del siRNA en concreto y no a la transfección en sí, y como control negativo del experimento, las células fueron tratadas con un siRNA control (Control siRNA-A, Santa Cruz), sin ninguna homología para ningún ARN mensajero de mamífero). Tras obtener el máximo de silenciamiento con la combinación de 3µl de siRNA-CLMP y 1.5 µl de reactivo de transfección, la transfección transiente se llevó a cabo en células INT-407 sembradas el día anterior (150.000 células por pocillo en placa de 24 pocillos) con una confluencia aproximada del 60-70%, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó la mezcla de siRNA (para el siRNA control y siRNA-CLMP) y reactivo de transfección en 50 µl de medio de transfección (siRNA Transfection Medium, Santa

Cruz) y se dejó incubar durante 30 minutos. A continuación, la mezcla se añadió a las células en un volumen final de 250 µl de medio de transfección. El periodo de transfección fue de 6 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Tras ello, el medio de transfección fue retirado, y reconstituido con medio fresco suplementado con SFB y L-glutamina hasta el día siguiente cuando se evaluó el silenciamiento.

4.4. PCR Cuantitativa a tiempo real (RTqPCR)

4.4.1. Aislamiento de ARN

El ARN total de las muestras fue aislado mediante el uso del kit comercial RNeasy mini (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Para evitar la contaminación por ADN genómico, las muestras fueron digeridas DNasa (RNase-Free DNase, Qiagen). La calidad y cantidad del ARN obtenido fue estimada mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría con NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.4.2. Retrotranscripción (RT)

Un total de 500 ng de cada muestra fueron retrotranscritos mediante el sistema qScript cDNA Supermix (Quanta), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó en un volumen final de 10 µl, incluyendo 2 µl de qScript cDNA SuperMix, 0.5 µl de la enzima retrotranscriptasa, y 3 µl de ARN (500 ng) en las siguientes condiciones: 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos y un último paso de 85°C durante 5 minutos para desactivar la enzima. El ADNc fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

4.4.3. RTqPCR

El análisis de expresión del gen CLMP se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa del transcrito en relación a la expresión del gen de referencia gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Los cebadores para CLMP y GADPH fueron diseñados previamente en el grupo de investigación mediante el uso del programa informático Beacon Designer (Biosoft International). La reacción de PCR a tiempo real se realizó en un volumen final de 15 µl, siendo 7.5 µl de Perfecta SYBR Green Supermix (Quanta), 0.4 µl de cada cebador (20 nM), 2 µl de ADNc diluido 1/3 y agua hasta alcanzar el volumen final. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Se añadió una etapa de 51 repeticiones de 10 segundos a 70°C, para asegurar la amplificación de un único producto de

PCR. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en triplicado. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001).

4.5. Western Blot

4.5.1. Extracción de proteína

Las células fueron tratadas con tripsina, lavadas con PBS y finalmente incubadas con una solución de lisis (7M Urea, 2M Tiourea y 4% Chaps p/v) en presencia de inhibidores de proteasas durante 1 hora a 4°C en constante agitación. A continuación, para favorecer la lisis completa, las muestras fueron sonicadas en tres pulsos de 15 segundos. Tras ello, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 12.000 rpm y 4°C. El sobrenadante resultante conteniendo la muestra proteica fue usado para la cuantificación proteica mediante el método colorimétrico de Bradford (Kit Protein Assay, Biorad).

4.5.2. Western Blot

Un total de 15 µg de cada muestra proteica obtenida en el paso anterior fue separada electroforéticamente en un gel SDS-PAGE de acrilamida al 12% (gel de 10 pocillos). Tras su completa migración, el gel fue electrotransferido a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore) y bloqueada con una solución al 5% de leche descremada en solución TBS-T. La incubación del anticuerpo primario se realizó a una dilución de 1/200 del anti-CLMP a 4°C y durante toda la noche. A continuación, la membrana fue lavada con TBS-T para eliminar restos del anticuerpo primario e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de anticuerpo secundario anticabra diluido 1/15000. Tras los correspondientes lavados, la reacción fue revelada usando la solución de revelado quimioluminiscente Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). La membrana resultante fue visualizada en el escáner de imagen FujiFilm Luminescent Image Analyzer LAS-3000.

4.6. Infección in vitro

Tras la verificación de 1) la expresión de la proteína mCherry-CLMP en células CHO y 2) el silenciamiento de CLMP en células INT-407, las células fueron incubadas con *C. jejuni* para evaluar mediante dos técnicas diferentes la influencia de la proteína CLMP en la interacción entre *C. jejuni* y las células de epitelio intestinal.

En todos los casos, la infección in vitro se realizó dos días después de la transfección con una confluencia celular de aproximadamente 90%, punto en el que se observó la mayor expresión de CLMP (en CHO) y silenciamiento (en INT-407). Dos días previos a la infección in vitro, la bacteria fue sembrada como ha sido previamente descrito. Tras obtener el inóculo bacteriano, las células fueron incubadas con una dosis infectiva de 1:100 (célula:bacteria) durante 3 horas a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂. Tras lo cual se retiró la bacteria mediante 3 lavados con PBS y se procedió de diferente modo según el método de cuantificación usado descrito a continuación.

4.6.1. Microscopía confocal

La infección in vitro se realizó como ha sido descrito en el apartado anterior con pequeñas modificaciones. Para facilitar el posterior manejo de las muestras en microscopía confocal, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de cristal situados en el fondo del pocillo. Para permitir la adherencia de las células al cubreobjetos, estos fueron tratados previamente con una solución de 0.1 mg/ml de poli-L-lisina (Sigma). Por otro lado, debido a que la tinción de la bacteria se realizó mediante una tinción vital con FITC (Pathirana et al. 2007), las bacterias fueron marcadas antes de la infección. Para ello, tras obtener el inóculo de bacterias, $1 \cdot 10^8$ bacterias fueron incubadas con una solución de 0.1 µg/ml de FITC (isotiocianato de fluoresceína, Sigma) durante 30 minutos a 37°C en agitación y oscuridad. A continuación las células fueron infectadas con la bacteria marcada.

Tras la infección las células fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se procedió al marcaje de los componentes celulares. En las células INT-407 se marcó el citoplasma, mediante marcaje de los filamentos de actina con una solución de 1 µg/ml de TRICT-faloidina (isotiocianato de tetrametil-rodaminaB conjugado con faloidina, Sigma) durante 1 hora a 37°C. En cambio, en las células CHO transfectadas no fue necesario el marcaje de citoplasma, puesto que la proteína mCherry (roja) señaló la localización de la proteína CLMP (en las células transfectadas con el vector mCherry-CLMP) o de la proteína mCherry (en las células transfectadas con el vector control).

Todas las células fueron marcadas con una solución 0.5µg/ml de DAPI (4',6-diamidina-2'fenilindol dihidrocloruro, Roche) durante 2 minutos a temperatura ambiente, y dispuestas en portaobjetos con la ayuda del medio de montaje Fluorescent Mounting Medium (Dako) y conservadas a 4°C hasta su utilización. Para la visualización de las muestras se usó un microscopio confocal LSM 5 Exciter Axio Observer. Z1 (Zeiss) con un objetivo Apochromat 40x

W NA 1.4 Oil DIC M27 y el programa informático ZEN 2008. Los láseres usados fueron de 405, 488 y 561nm, con una apertura de pinhole de 1AU. Las imágenes fueron procesadas mediante el uso del software de imagen ImageJ.

4.6.2. Ensayos de protección a la gentamicina

El ensayo de protección a la gentamicina se llevó a cabo para cuantificar la invasión de la bacteria. Para ello, las células fueron dispuestas como se indicó en el apartado de infección in vitro, y a continuación la monocapa celular fue lavada con PBS y tratada con medio de cultivo conteniendo 200 µg/ml de gentamicina durante 2 horas. El fundamento de este ensayo está en que el antibiótico no entra dentro de la célula, por lo que las bacterias intracelulares quedan protegidas de la gentamicina. Tras la incubación con gentamicina, la monocapa celular fue lisada con una solución de Tritón X-100 al 1%, que rompe las células pero no las bacterias. A continuación, diluciones seriadas de dicho lisado fueron sembradas en placa de agar Mueller-Hilton. Tras la incubación de las placas a 37°C y microaerofilia durante dos días, se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias resultantes (UFC).

4.7. Análisis estadístico

La significación estadística de los datos fue analizada mediante la prueba pareada T-Student con el programa de análisis SPSS 15.0, determinando previamente su distribución normal y homogeneidad de varianza.

5. RESULTADOS

La generación de enfermedad por parte de los microorganismos patógenos depende de su habilidad para interactuar con las células del hospedador (Watson and Galan 2005). Estudios previos han demostrado que *C. jejuni* coloniza el intestino delgado humano y a continuación se desplaza al colon, que es el órgano diana de la enfermedad (Poly and Guerry 2008). Después de la colonización exitosa de la mucosa del intestino, *C. jejuni* se adhiere a las células epiteliales a través de un número aún no determinado de adhesinas cuyo significado en relación con la patogénesis de enfermedad gastrointestinal que genera continua siendo incierto. Una de estas moléculas de adhesión es el receptor CLMP (Coxsackie and adenovirus receptor-Like Membrane Protein), expresado en las células de la mucosa intestinal y recientemente identificado por nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo del Dr. Bhide (University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovakia). En el presente trabajo se ha llevado a cabo una valoración funcional de CLMP como receptor de *Campylobacter* mediante una doble aproximación, (1) mediante la expresión de la molécula en células defectivas empleando un método de transfección heteróloga y (2) mediante el silenciamiento de su expresión en la línea celular INT-407 utilizando la tecnología siRNA. Los resultados se exponen a continuación.

5.1. Expresión de CLMP en células CHO

Se llevó a cabo un procedimiento de transfección en la línea celular CHO con el fin de inducir la expresión de la molécula en cultivos celulares en condiciones transientes ó transitorias. A continuación, las células fueron infectadas con el fin de estudiar el comportamiento de *C. jejuni* frente a la expresión del receptor. La línea celular CHO fue elegida entre varias líneas celulares para la realización de esta experiencia debido a su elevada eficiencia de transfección y a que no expresa el receptor CLMP en su membrana celular, siendo comprobado por Western Blot (Figura 2).

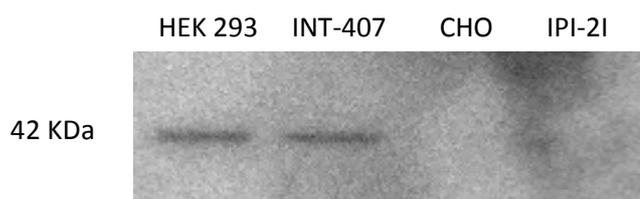


Figura 2. Western Blot realizado con lisados proteicos de varias líneas celulares para la comprobación de ausencia de expresión endógena de CLMP.

Para la transfección, en primer lugar la secuencia codificante de CLMP se obtuvo mediante RT-PCR empleando ARNm aislado de la línea celular INT-407 (derivada de tejido intestinal embrionario) y cebadores específicos. El producto de PCR obtenido (Figura 3A), con un tamaño de 1180 pb, fue purificado y a continuación subclonado en el vector de expresión *pcDNA3.1(-)mCherry* con el fin de generar una proteína de fusión CLMP-Cherry. La correcta disposición del inserto en el vector de clonaje fue demostrado mediante digestión con las enzimas de restricción utilizadas en el proceso de construcción (Figura 3B).

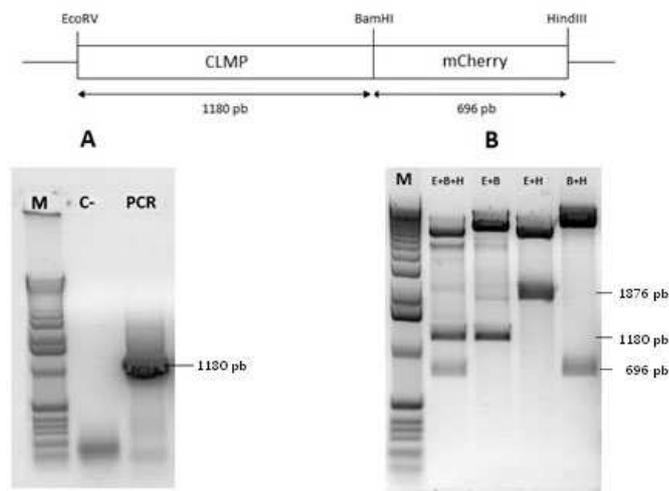


Figura 3. Esquema general de la construcción. (A) Electroforesis con el producto de PCR obtenido con los primers descritos anteriormente, donde C- es el control negativo. (B) Digestiones enzimáticas tras la obtención de la construcción. E: EcoRV; B:BamHI; H:HindIII. M: Marcador IX de Roche.

A continuación la construcción recombinante fue secuenciada, con el fin de confirmar que la secuencia de CLMP resultó clonada en el vector en la adecuada fase de lectura. La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos resultante, así como la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente a la proteína de fusión CLMP-Cherry. Se señalan también en la Figura 4, la localización de los cebadores empleados para la obtención de la secuencia CLMP y los dominios estructurales de este receptor de las células epiteliales INT-407: un péptido señal de 18 aminoácidos, un dominio extracelular constituido por 212 aminoácidos, una región transmembranaria de 16 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 127 aminoácidos.

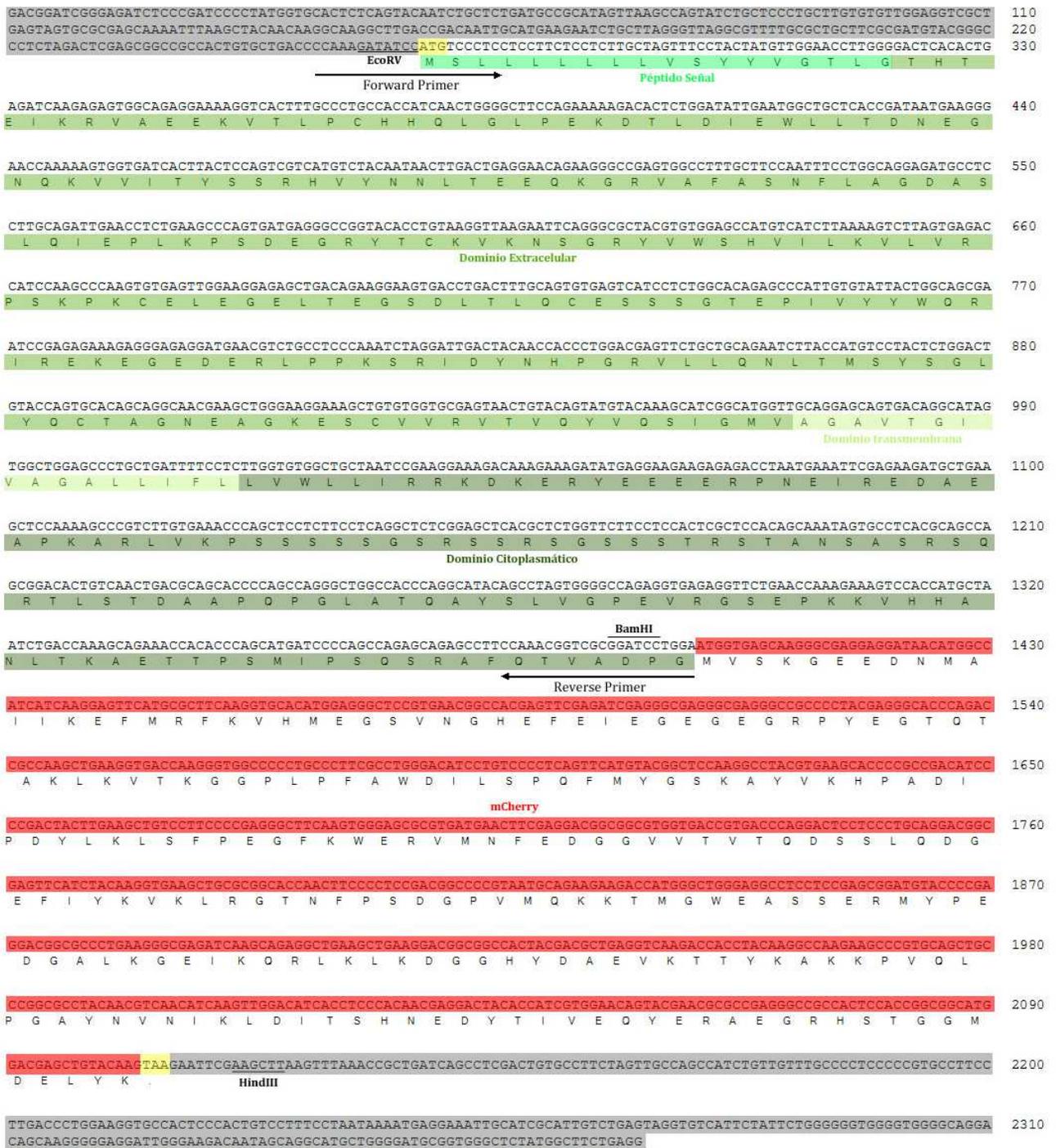


Figura 4. Secuencia nucleotídica y aminoácídica obtenida tras la clonación de la construcción. En amarillo, se observan los codones de inicio y fin de mensaje en la traducción. En distintos tonos de verde, se indican las distintas regiones de la proteína, mientras que en rojo se encuentra señalada la proteína reportera mCherry. En subrayado, se encuentran los sitios diana para cada enzima de restricción. Por último, las flechas indican la posición exacta en la secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para amplificar mediante PCR. En gris, se representa la secuencia perteneciente al vector de expresión.

El procedimiento de transfección para obtener dos tipos de cultivos celulares transitorios: el cultivo CLMP resultante de la transfección con la construcción recombinante *pcDNA3.1-CLMP/mCherry* y las células MOCK, transfectadas con el vector de expresión sin inserto CLMP. Como control de referencia también fueron utilizadas células CHO sin transfectar. El éxito de la transfección fue determinada mediante RT-PCR, empleando ARN total aislado de los tres tipos celulares anteriores y cebadores específicos que permitían amplificar un fragmento de CLMP de 108 pb. Los resultados se muestran en la Figura 5, en la que se observa que el ARNm de CLMP resultó expresado en las células CHO transfectadas con el vector recombinante.

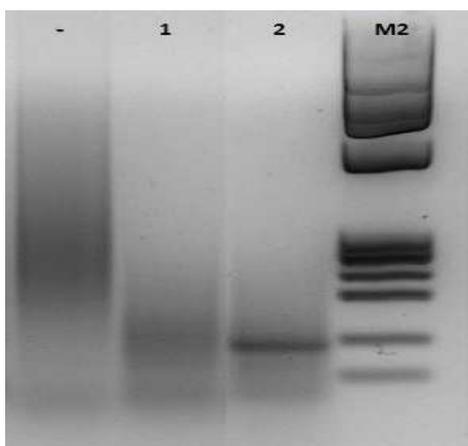


Figura 5. Análisis mediante RT-PCR del transcrito del gen CLMP en células CHO transfectadas (2), MOCK (1) y sin transfectar (-). M2: marcador de peso molecular IX de Roche.

Al mismo tiempo, la eficiencia de la transfección en cultivo fue también determinada mediante microscopía confocal. La figura 6 muestra la expresión de la proteína de fusión CLMP-Cherry en el cultivo celular transfectado, poniendo de manifiesto que la eficiencia de la transfección en las células CHO es de aproximadamente el 50%.

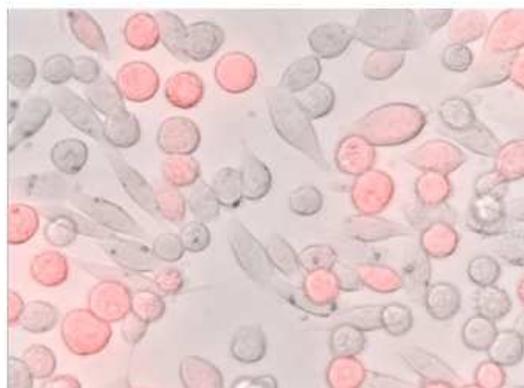


Figura 6. Imagen obtenida mediante microscopía de fluorescencia, donde se puede observar la eficiencia del proceso de transfección.

La interacción de CLMP con *C. jejuni* fue evaluada mediante microscopía confocal y ensayos de protección a la gentamicina. Para la microscopía confocal, las células CHO transfectadas fueron infectadas con *C. jejuni* durante 3 horas y posteriormente visualizadas en un microscopio LSM 5 Exciter (Carl Zeiss). Los resultados se muestran en la Figura 7, en la que se observan en azul los núcleos de las células (tinción con DAPI), en rojo, dependiendo del tratamiento, se representa el citoesqueleto teñidas con TRITC (A) o bien la fluorescencia ocasionada por la proteína mCherry del vector de expresión (B, C, D). Las bacterias están representadas en verde debido a la tinción con FITC.

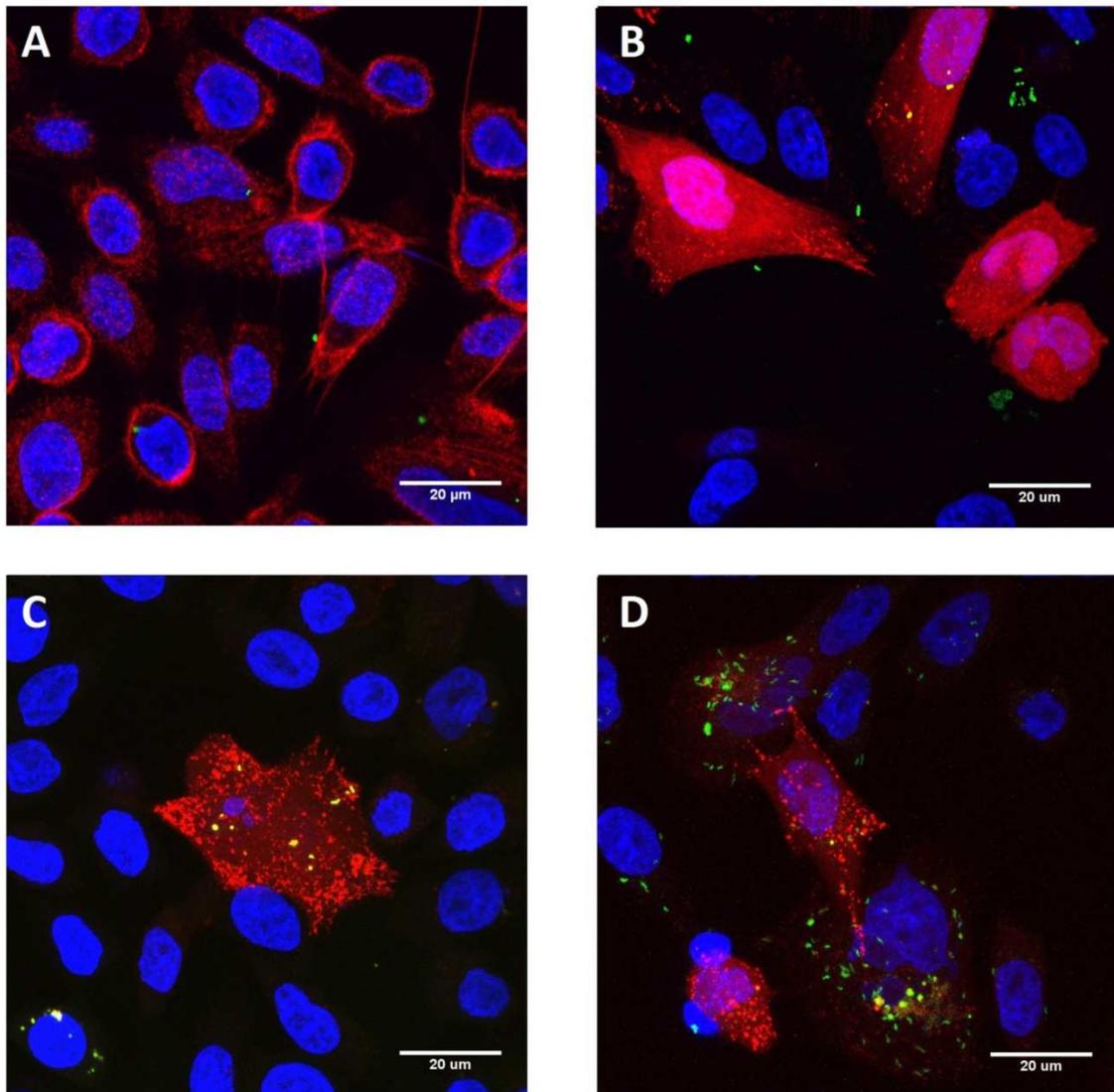


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la combinación de los distintos planos de Z de las células CHO. A: Células sin transfectar; B: Células transfectadas con el vector de expresión (MOCK). C y D: células transfectadas con la construcción recombinante de CLMP.

Las imágenes demuestran que el número de bacterias adheridas a las células CHO expresando CLMP (Figuras 7C y 7D) es significativamente mayor que el observado en las células CHO sin transfectar y MOCK (Figuras 7A y 7B). Mediante el uso del software ImageJ para el análisis de las imágenes digitales, fue posible cuantificar el nivel de bacterias presentes en cada uno de los cultivos celulares empleados (Figura 8), gracias a la separación de los tres canales de fluorescencia usados en la microscopia confocal.

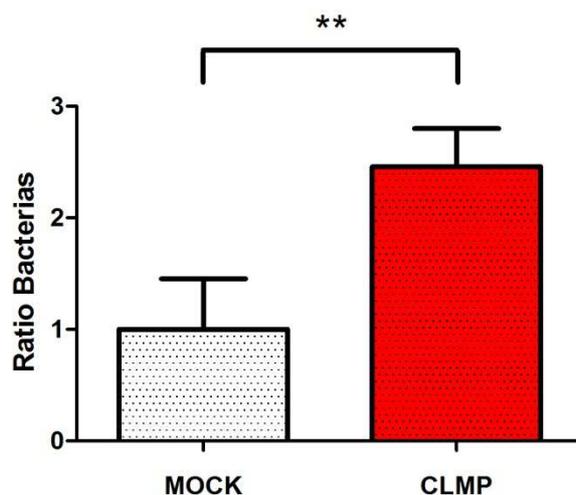


Figura 8. Representación gráfica de los datos obtenidos en la cuantificación de bacteria mediante ImageJ de las dos líneas transfectadas.

En la gráfica se representa el ratio de bacteria existente entre los dos tipos de células transfectadas donde se refleja que el número de bacterias observadas en las células transfectadas con el receptor CLMP es significativamente mayor (2,5 veces) que las observadas en las células MOCK.

Por último, la capacidad de invasión de *Campylobacter* en las células transfectadas fue analizada mediante ensayos de protección a gentamicina. En ellos, las células son infectadas durante 3 horas con *C. jejuni* y a continuación tratadas con gentamicina con el fin de eliminar la bacteria extracelular. A continuación el cultivo celular es lisado con Triton-X100 provocando que las bacterias que hayan logrado invadir la célula hospedadora queden liberadas y puedan ser crecidas en medio de Mueller-Hinton para su cuantificación. El resultado, que se muestra en la Figura 9, pone de manifiesto que la invasión en las células CLMP es 3 veces mayor que la observada en células MOCK.

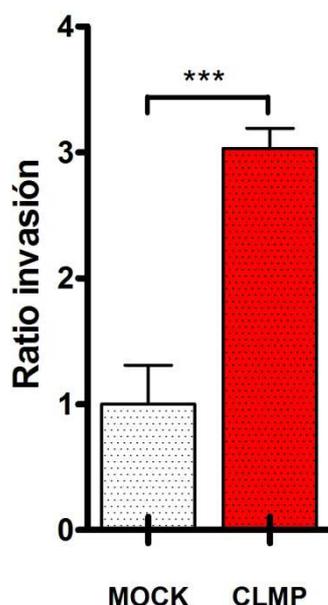


Figura 9. Representación gráfico de los datos obtenidos tras el recuento de UFC y normalización de los datos en el ensayo de protección a la gentamicina.

5.2.Silenciamiento de CLMP en INT-407

El silenciamiento génico mediante ARN de interferencia (small interference RNA-siRNA) ha experimentado un gran desarrollo durante los últimos años convirtiéndose en una alternativa real para el análisis funcional de genes(McManus and Sharp 2002).

En el presente trabajo se ha llevado a cabo el silenciamiento del gen CLMP en células INT-407 con el fin de estudiar el papel de dicho receptor en la infección por *Campylobacter* en humano. Para ello, las células INT-407 fueron transfectadas con un pool de siRNA diseñados para interferir la expresión del gen CLMP humano. La eficiencia del silenciamiento fue evaluada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), empleando el gen GADPH como referencia.

Los resultados de expresión relativa, calculados según el método descrito por Livak (Livak and Schmittgen 2001), se representan en la Figura 10. En ella se observa una reducción del nivel de expresión de CLMP de 3,7 veces con respecto al obtenido en las células transfectadas con un siRNA control.

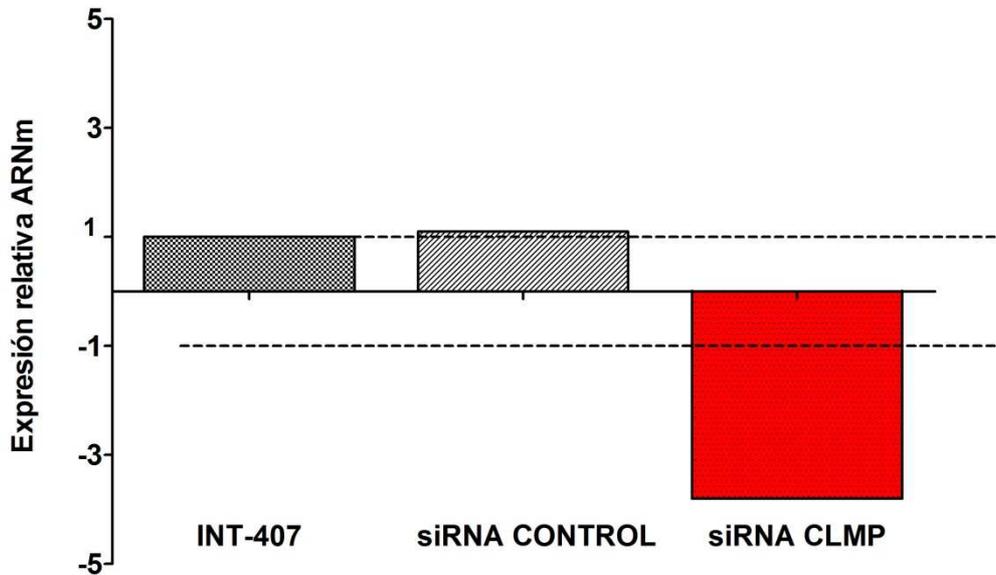


Figura 10. Representación gráfica de los datos de expresión relativa obtenida para los tres tipos de células.

A continuación, el cultivo celular silenciado fue infectado con *C. jejuni* y el resultado analizado mediante microscopía confocal y ensayos de protección a la gentamicina. La Figura 11 muestra los resultados obtenidos, en los que se observa una relación directa entre la reducción de la expresión del receptor CLMP como consecuencia del silenciamiento génico y la reducción en el número de bacterias interaccionando con la monocapa celular transformada, en comparación con el elevado número de bacterias observadas en las células sin transfectar y control.

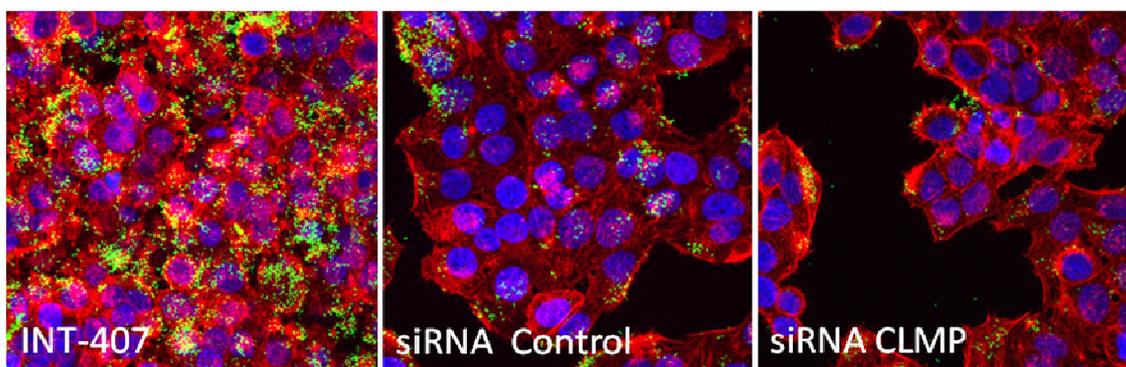


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la combinación de los distintos planos de Z de las células INT-407. Se ilustran los tres tipos: sin tratar (INT-407), silenciadas con un siRNA control y con el siRNA para CLMP.

La Figura 12 muestra la cuantificación de la interacción patógeno-célula mediante el software ImageJ, observándose que el número de bacterias en interacción con la monocapa celular transfectada con el siRNA de CLMP es un 37% menor que en aquellas transfectadas con el siRNA control.

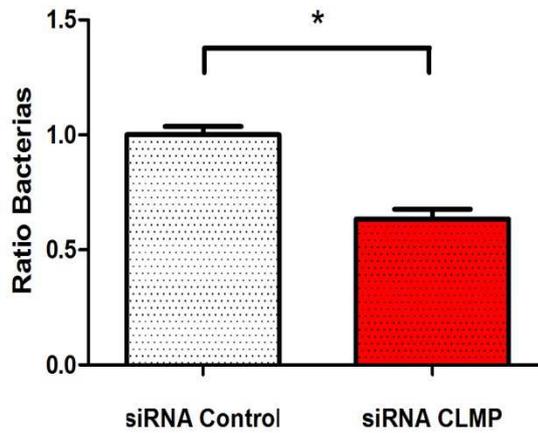


Figura 12. Representación gráfica de los datos obtenidos en la cuantificación de bacteria mediante ImageJ.

Finalmente, la capacidad de invasión de *Campylobacter* en las células INT-407 silenciadas fue evaluada mediante un ensayo de protección a la gentamicina. El objetivo fue determinar si la reducción en la expresión de CLMP modificaba el comportamiento de la bacteria en su habilidad de invasión de las células del epitelio intestinal. Los resultados muestran que el nivel de invasión celular resultó reducido en un 38% en las células con una menor de expresión de CLMP (Figura 13).

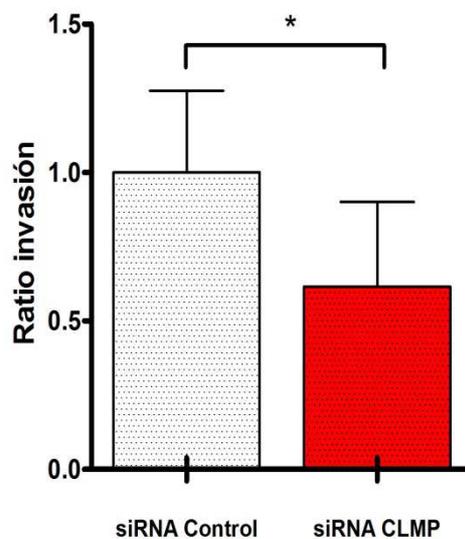


Figura 13. Representación gráfico de los datos obtenidos tras el recuento de UFC en el ensayo de protección a la gentamicina.

6. DISCUSIÓN

A pesar de que se trata de la mayor causa de gastroenteritis a nivel mundial, los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de *Campylobacter* son hasta el momento escasamente entendidos. Uno de los primeros acontecimientos que ocurren en la infección es el reconocimiento o interacción entre el patógeno y su la célula diana en el hospedador. La caracterización de estas interacciones a nivel molecular es, por tanto, indispensable para una mejor comprensión de la patogénesis.

En el presente trabajo hemos caracterizado un nuevo receptor celular, la proteína CLMP, implicado en el reconocimiento de *C. jejuni*. Hasta la fecha, tan solo dos proteínas, HSP90 α y la fibronectina han sido caracterizadas como receptores celulares para *Campylobacter* (Jin et al. 2003; Monteville et al. 2003). Por el contrario, un mayor número de proteínas bacterianas han sido descritas como adhesinas implicadas en la interacción con las células humanas, entre las que se encuentran las proteínas CadF, JlpA o Peb1 (Konkel et al. 1997; Pei et al. 1998; Jin et al. 2001). Debido a la dificultad que existe en evaluar la contribución de cada receptor en la adherencia e invasión de *C. jejuni* a las células del hospedador, el uso de bacterias y células knockout para esas proteínas ha resultado de gran utilidad. Así, diversos estudios han mostrado que la ausencia del receptor jlpA en *Campylobacter* resulta en una reducción del 19% en la adherencia de la bacteria a las células HEp-2, mientras que la no expresión del receptor bacteriano CadF reduce en más del 50% la adhesión a células INT-407 (Jin et al. 2003; Monteville et al. 2003). De acuerdo con esto, y por primera vez desde el lado del hospedador, nuestro estudio mostró una reducción en la interacción con el patógeno de aproximadamente un 29-39% en las células silenciadas para el receptor CLMP, lo cual apoya los resultados obtenidos por estos autores, indicando que en el proceso de interacción podrían estar participando más de un receptor. Asimismo, nuestro trabajo por primera vez utiliza la expresión heteróloga de la proteína para determinar la función de la proteína CLMP en la capacidad de invasión de *Campylobacter*.

Aunque el mecanismo de invasión de *Campylobacter* más estudiado ha sido el de la invasión apical, diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la translocación bacteriana ya sea por vía transcelular o paracelular (Grant et al. 1993; Bras and Ketley 1999; MacCallum et al. 2005). De igual modo, recientemente ha sido descrito un nuevo mecanismo de invasión en *C. jejuni*, la subvasión. Mediante este mecanismo, y asociado con una previa translocación paracelular, la bacteria es capaz de llegar rápidamente a la membrana basal de

las células, desde donde invade con mayor eficiencia que en la membrana apical (van Alphen et al. 2008).

En nuestro estudio hemos comprobado el papel fundamental de la proteína CLMP como receptor necesario en la invasión de *Campylobacter* de las células epiteliales intestinales. CLMP es una proteína de membrana que forma parte de las uniones estrechas (UE) que se disponen entre células epiteliales, principalmente en epitelio intestinal, siendo necesaria para el correcto desarrollo embrionario intestinal (Raschperger et al. 2004; van der Werf et al. 2013). Interesantemente, estudios recientes han mostrado que *Campylobacter* es capaz de desorganizar las UE, poniendo en peligro la integridad del epitelio como barrera física y posibilitando su translocación a través de ella (Chen et al. 2006). Por ello, la unión de la bacteria a la proteína CLMP, localizada en las UE, podría estar facilitando el reconocimiento por parte de la bacteria de la localización de las UE en el epitelio previo al proceso de translocación.

Por otro lado, la pérdida de las UE ha sido directamente relacionada con un incremento en el nivel de permeabilidad intestinal, que a su vez ha sido descrito como una consecuencia de la campilobacteriosis, facilitando la translocación de bacterias no invasivas a través del epitelio intestinal (Kalischuk et al. 2009). El hecho de que *Campylobacter* provoque un aumento de la permeabilidad intestinal ha llevado recientemente al estudio de la campilobacteriosis como un factor de riesgo para un gran número de enfermedades relacionadas con dicho incremento. Así, actualmente *Campylobacter* se ha propuesto como posible agente etiológico de enfermedades como la celiaquía y la enfermedad de Crohn, entre otras (Riddle et al. 2012a; Riddle et al. 2012b).

Por tanto, el descubrimiento de CLMP como un nuevo receptor, implicado en la invasión del epitelio intestinal por *Campylobacter* podría ser de gran relevancia, debido a su localización estratégica en las UE del epitelio. Aunque en nuestro estudio hemos demostrado su papel en la invasión por *Campylobacter*, estudios más detallados serán necesarios para definir su función precisa en el proceso de translocación bacteriana.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros datos indican que la proteína humana CLMP está claramente implicada en la interacción entre las células del epitelio intestinal humano y *C. jejuni*, siendo esta interacción necesaria para que tenga lugar el mayor nivel de invasión. Serán necesarios

estudios posteriores para esclarecer el papel de esta proteína dentro de cada uno de los mecanismos de invasión exhibidos por *C. jejuni*.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a D. Juan José Garrido Pavón, tutor y director de este trabajo, por haberme iniciado y guiado en mis primeros pasos en la investigación. Muy agradecido con el resto de integrantes del grupo de Genómica y Mejora Animal (AGR-231) del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, sobretodo a Ángela Moreno López y Ángeles Jiménez Marín, por su gran ayuda en todo momento. Cabe destacar la especial colaboración de Carmen Aguilar Jurado, la cuál ha sido mi referente en el laboratorio y un gran apoyo en todo momento para el seguimiento y la elaboración de este trabajo. No puedo olvidar a mis compañeros y amigos con los cuales he compartido despacho e incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme a Erena, Gema, Gemilla, Júber, Miguel, Nati, Rodrigo, Sara y Sonia. No quisiera olvidarme de Reyes y Juana, que siempre han estado dispuestas a echar una mano con cualquier cosa.

9. BIBLIOGRAFIA

Acke E, McGill K, Lawlor A, Jones BR, Fanning S et al. (2010) Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from pets in Ireland. *Vet Rec* 166(4): 102-106.

Bras AM, Ketley JM (1999) Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. *FEMS Microbiol Lett* 179(2): 209-215.

Chen ML, Ge Z, Fox JG, Schauer DB (2006) Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 74(12): 6581-6589.

EFSA, ECDC (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses Zoonotic, Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11(4): 3129.

Friis LM, Keelan M, Taylor DE (2009) *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 77(4): 1553-1560.

Grant CC, Konkel ME, Cieplak W, Jr., Tompkins LS (1993) Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun* 61(5): 1764-1771.

Hannu T, Mattila L, Rautelin H, Pelkonen P, Lahdenne P et al. (2002) *Campylobacter*-triggered reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford)* 41(3): 312-318.

Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM, Chan VL (2003) JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol* 5(3): 165-174.

Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P et al. (2001) JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol* 39(5): 1225-1236.

Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG (2009) *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog* 1(1): 2.

Ketley JM (1997) Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143 (Pt 1): 5-21.

Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE, Jr., Cieplak W, Jr. (1997) Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 24(5): 953-963.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25(4): 402-408.

MacCallum A, Hardy SP, Everest PH (2005) *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. *Microbiology* 151(Pt 7): 2451-2458.

McManus MT, Sharp PA (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3(10): 737-747.

Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME (2003) Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149(Pt 1): 153-165.

Nachamkin I, Allos BM, Ho T (1998) *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol Rev* 11(3): 555-567.

Ó Cróinín T, Backert S (2012) Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front Cell Infect Microbiol* 2: 25.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Visvanathan K, Hamilton JA, Reynolds EC (2007) Flow cytometric analysis of adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral epithelial cells. *Infect Immun* 75(5): 2484-2492.

Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ et al. (1998) Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun* 66(3): 938-943.

Poly F, Guerry P (2008) Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr Opin Gastroenterol* 24(1): 27-31.

Pulzova L, Kovac A, Mucha R, Mlynarcik P, Bencurova E et al. (2011) OspA-CD40 dyad: ligand-receptor interaction in the translocation of neuroinvasive *Borrelia* across the blood-brain barrier. *Sci Rep* 1: 86.

Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J (2004) CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 279(1): 796-804.

Riddle M, Murray J, Cash B, Pimentel M, Porter C (2012a) Pathogen-Specific Risk of Celiac Disease Following Bacterial Causes of Foodborne Illness: A Retrospective Cohort Study. *Digestive Diseases and Sciences*: 1-4.

Riddle MS, Gutierrez RL, Verdu EF, Porter CK (2012b) The chronic gastrointestinal consequences associated with *Campylobacter*. *Curr Gastroenterol Rep* 14(5): 395-405.

van Alphen LB, Bleumink-Pluym NM, Rochat KD, van Balkom BW, Wosten MM et al. (2008) Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 10(1): 53-66.

van der Werf CS, Hsiao NH, Conroy S, Paredes J, Ribeiro AS et al. (2013) CLMP is essential for intestinal development, but does not play a key role in cellular processes involved in intestinal epithelial development. *PLoS One* 8(2): e54649.

Watson RO, Galan JE (2005) Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. *Cell Microbiol* 7(5): 655-665.

Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M et al. (2004) Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11404-11409.

Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, Bajaj-Elliott M (2008) *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(2): 123-129.