



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Y
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**ENDOCITOSIS DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A
UNIONES ESTRECHAS POR ACCIÓN DE EspF DE
Escherichia coli ENTEROPATÓGENA**

Tesis de Licenciatura

**Que para obtener el título de
Biólogo**

Que presenta

Ugalde Silva Paul Sebastian

**Responsable de Tesis:
Dr. Fernando Navarro García**

Octubre del 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Primero que nada quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis padres Lilia Silva Trejo y Carlos Ugalde Larios, y a mis hermanas Thania Libertad Ugalde Silva y Maira Karen Ugalde Silva, por su amor, cariño, apoyo incondicional, sus consejos y su paciencia.

De igual manera agradezco a mis abuelos Beatriz Larios, Otilia Trejo Salinas, Armando Silva Ruíz, a mis primos Alan Rodríguez Silva y David Basaldúa Silva, y a mi familia en general, por su amor, consejos y apoyo.

Así mismo agradezco infinitamente a mi tutor de tesis, Dr. Fernando Navarro García, por su apoyo y dedicación en la dirección del presente trabajo, además por su sincera amistad.

También deseo agradecer al Dr. Ignacio Peñalosa Castro, por su apoyo en el transcurso de la realización de mi licenciatura, además de sus consejos y amistad.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos Daniel, Julio, Jazmín, Farid, Michael, Raúl, Héctor, Gaby T., Jacobo, Lucia, Israel, Alejandra, Emanuel, Antonio, Gustavo, Israel R., Martín, Gaby R. y finalmente a Sije, por su amistad y apoyo incondicional.

Indice

Abreviaturas	5
Lista de figuras	8
Resumen	9
Introducción	10
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)	11
Lesiones A/E	12
Interacciones entre EPEC y la célula epitelial	14
Efecto de la infección por EPEC en las uniones estrechas	21
Acción de EspF en las lesiones A/E	25
EspF induce la pérdida de la resistencia eléctrica transepitelial	26
Redistribución de las proteínas asociadas a uniones estrechas provocada por EspF	28
EspF interacciona con proteínas relacionadas a mecanismos de endocitosis mediada por clatrina	30
Justificación	33
Objetivos	34
Estrategia experimental	35
Cultivos celulares y bacterias.....	35
Ensayo de infección.....	36
Inmunofluorescencia.....	37
Fraccionamiento celular	39
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	40

Inmunoprecipitación	41
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
Western-blots	42
Resultados	44
Translocación de EspF de EPEC E22wt en células RK13	44
EspF no interacciona con clatrina en ensayos de inmunofluorescencia	45
La infección de células RK13 por EPECwt induce la endocitosis de ocludina mediada por vesículas recubiertas por clatrina en ensayos de inmunofluorescencia	47
Clatrina interacciona con ocludina y no con EspF en ensayos de inmunoprecipitación	52
La cepa EPECΔespF no induce la endocitosis de ocludina mediada por clatrina en ensayos de inmunofluorescencia	56
Discusión	62
EspF no interacciona con clatrina directamente	63
EspF induce la redistribución de ocludina mediante vesículas recubiertas por clatrina	67
Conclusiones	74
Perspectivas	74
Bibliografía	75

Lista de Figuras

Fig. 1.	Lesión A/E (Attaching and Effacing) producida por EPEC.....	13
Fig. 2.	Modelo esquemático de las etapas de infección por EPEC.....	15
Fig. 3.	Sistema de secreción tipo III (SSTIII).....	17
Fig. 4.	Presencia y ausencia de EspF en células RK13 infectadas con EPEC wt y EPEC Δ <i>espF</i> respectivamente.....	47
Fig. 5.	EspF de EPEC y clatrina no interaccionan durante la infección en células RK13.....	49
Fig. 6.	La infección de células RK13 por EPECwt induce el aumento en la endocitosis mediada por clatrina de la proteína ocludina.....	53
Fig. 7.	La infección de células RK13 por EPECwt induce el aumento en la interacción entre vesículas recubiertas por clatrina y la proteína de uniones estrechas ocludina.....	56
Fig. 8.	Interacción de ocludina con clatrina en células RK13 en infección con EPECwt.....	59
Fig. 9.	Comparación de las cinéticas de interacción entre ocludina y clatrina en las fracciones celulares.....	61
Fig. 10.	La infección de células RK13 por EPEC Δ <i>espF</i> no induce el aumento en la endocitosis de ocludina mediada por clatrina.....	64
Fig. 11.	La infección de células RK13 por EPEC Δ <i>espF</i> induce un retraso en el aumento en la interacción entre ocludina y clatrina.....	67
Fig. 12.	El aumento a tiempos cortos en la interacción entre ocludina y clatrina depende de la translocación de EspF en las células.....	68

Introducción

Las enfermedades gastrointestinales, al igual que las infecciones entéricas, son de las enfermedades más comunes en la vida cotidiana de los humanos. Los millones de microorganismos que atacan el cuerpo humano a través del tracto gastrointestinal suman más de 6 millones de casos de este tipo de enfermedades cada año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que millones de niños menores de 2 años mueren anualmente a causa de enfermedades diarreicas en países en vías de desarrollo, y la muerte de un niño cada 15 segundos alrededor del mundo (Alper, 2003).

Entre los agentes biológicos más comunes que producen cuadros diarreicos severos en niños se encuentra la bacteria *Escherichia coli*, la cual fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor Escherich. Él identificó a una bacteria a la que llamó *Bacterium coli commune*, la que posteriormente recibió oficialmente el nombre de *Escherichia coli* hasta 1958 en honor a su descubridor (Kuhnert *et al.*, 2000).

Escherichia coli

E. coli es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* de la tribu *Escherichia*. Esta bacteria es el organismo facultativo predominante en la flora natural del colon de la mayoría de los organismos de sangre caliente, la cual infecta el tracto gastrointestinal del recién nacido a los pocos días del nacimiento debido al contacto con los fluidos vaginales

de la madre (Simon y Gorbach, 1986), y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con el huésped mamífero en donde participara de manera importante en el control fisiológico (Nataro y Koper, 1998).

Hoy en día, se han caracterizado dentro de esta especie bacteriana serotipos especiales que pueden causar una variedad de enfermedades en seres humanos, siendo clasificadas en las siguientes categorías: patógenos extraintestinales y patógenos entéricos. Los patógenos extraintestinales de *E. coli* constituyen un grupo separado que principalmente causa infecciones en el tracto urinario en todas las categorías de edades, así como sepsis y meningitis en niños pequeños y animales jóvenes (Kuhnert *et al.*, 2000). Dentro de los patógenos entéricos se han podido caracterizar seis principales cepas de *E. coli* que provocan diarreas en el ser humano: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC). Cada una de estas cepas tiene codificados diferentes grupos de genes a nivel cromosomal y plasmídico que intervienen en su virulencia (Nataro y Koper, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000; Mühldorfer y Hacker, 1994).

***Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)**

Durante la década de 1940 se comenzó a establecer a *Escherichia coli* como el principal factor de ciertas enfermedades humanas. Investigadores de Estados Unidos y Europa descubrieron que ciertos serotipos somatoflagelares (O:H) de *E. coli* estaban asociados con casos esporádicos de diarrea infantil de verano y en

algunos brotes epidémicos de gastroenteritis en guarderías, por lo que se denominó a este grupo *E. coli* enteropatógena (EPEC) para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de flora normal (Nataro y Koper, 1998; Cunningham y Fujinami, 2000).

EPEC es una importante categoría de *E. coli* causante de diarrea en países en vías de desarrollo, la cual coloniza el epitelio del intestino delgado y grueso provocando diarrea acuosa en niños menores de 2 años en diferentes grados de severidad, aunque se ha reportado que los niños menores de 6 meses son más propensos a infecciones por esta bacteria. Algunos investigadores definían estas características patógenas en base solo a los serotipos somatoflagelares (O:H), pero EPEC es ahora definida en base a sus características patógenas propias que le ayudan a provocar estos síntomas (Nataro y Koper, 1998).

En condiciones de laboratorio EPEC puede causar diarrea en adultos con un inóculo grande de bacteria (10^8 a 10^{10}), pero se piensa que en infecciones naturales el inóculo es menor. Las infecciones por esta bacteria en adultos son menos probables que en niños, quizás debido a que los individuos adultos pierden ciertos receptores específicos a lo largo del desarrollo, aunque se han reportado casos de esta infección en adultos, en individuos sanos, los cuales probablemente consumieron un inóculo muy grande y en individuos inmunocomprometidos por otras enfermedades o por la edad (Nataro y Koper, 1998).

Lesiones A/E

Las infecciones por EPEC se caracterizan por tener una interacción muy particular con el epitelio intestinal del hospedero. Esta interacción es llamada lesión A/E (Attaching and Effacing), la cual es clasificada como un proceso multiestado que degenera las microvellosidades del enterocito mediante la reorganización de algunas proteínas implicadas en la estructuración del citoesqueleto de la célula epitelial (Fig. 1A). La bacteria lleva a cabo este proceso inicialmente con la adherencia al enterocito, lo que conlleva a la liberación de algunas proteínas hacia la célula huésped, las cuales están implicadas en la virulencia, y por consecuencia se lleva a cabo el esfacelamiento o destrucción de las microvellosidades y la formación de una estructura debajo de la bacteria conocida como pedestal (Finlay

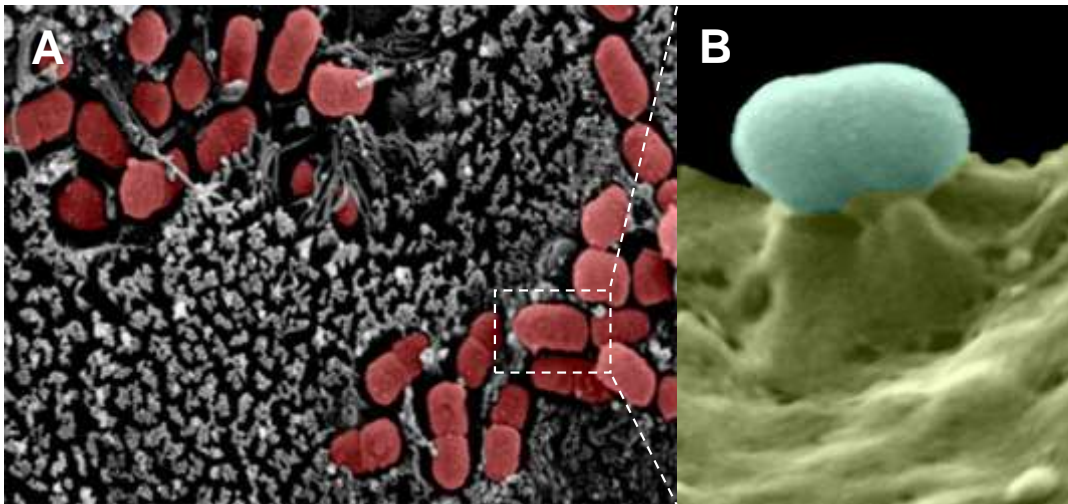


Figura 1. Lesión A/E (Attaching and Effacing) producida por EPEC. (A) Fotografía de microscopía electrónica donde se muestra lesiones A/E. Este tipo de lesiones se caracterizan por la unión íntima de la bacteria a la célula hospedera mediante la interacción de íntima con Tir, lo que conlleva al esfacelamiento o eliminación de las microvellosidades de la célula hospedera y a la formación de la estructura de tipo pedestal rica en actina. (B) Fotografía de microscopía electrónica de un pedestal producido por la unión íntima de EPEC a la célula hospedera (Dean *et al.* 2006).
pedestal producido por la unión íntima de EPEC a la célula hospedera (Dean *et al.* 2006).
et al., 1992, Goosney *et al.*, 2000, Cell *et al.* 2000).

La formación de la estructura tipo pedestal está relacionada con la polimerización y nucleación de los filamentos de actina y otras proteínas implicadas en la

estructuración del citoesqueleto del enterocito, como son actina, α -actina, fimbrina, miosina, talina, ezrina, entre otras. Estas proteínas han sido detectadas justo debajo de la bacteria, a lo largo de la estructura de tipo pedestal, la cual se extiende 10 μm sobre la superficie apical de la membrana de la célula epitelial (Fig. 1B) (Finlay *et al.*, 1992; Goosney (b) *et al.*, 2000; Celli *et al.* 2000).

Interacciones entre EPEC y la célula epitelial

Existen múltiples pasos que caracterizan la histopatología de las lesiones A/E. Donnenberg *et al.* en 1997 propusieron tres pasos primordiales para el desarrollo de las lesiones A/E, aunque Hicks *et al.* en 1998 propuso un cuarto paso que es la formación de microcolonias vía BFP (Fig. 2).

El paso inicial es la adherencia localizada. Esta es inducida por el factor de adherencia de EPEC (EAF) el cuál es un plásmido que codifica para una fimbria de tipo IV conocida como BFP (bundle-forming Pili) que es ensamblada por un operón constituido por 14 genes que abarcan 11.5 kb conocidos como *bfp* (*bfpA* a *bfpL*, *bfpP* y *bfpU*) (Sohel *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2003). La fimbria BFP guía la adherencia inicial de EPEC hacia la célula epitelial lo que provoca la formación de microcolonias en la zona apical del enterocito (Fig. 2A).

El segundo paso de la infección implica un sistema proteico de secreción tipo III (SSTIII), el cual funciona como una jeringa molecular que transloca proteínas efectoras dentro de las células hospederas (Fig. 2B) (Gal-Mor y Finlay, 2006). EL

SSTIII está compuesto por alrededor de 20 proteínas diferentes, de las cuales, la mayoría son localizadas en la parte interior de la membrana celular de la bacteria,

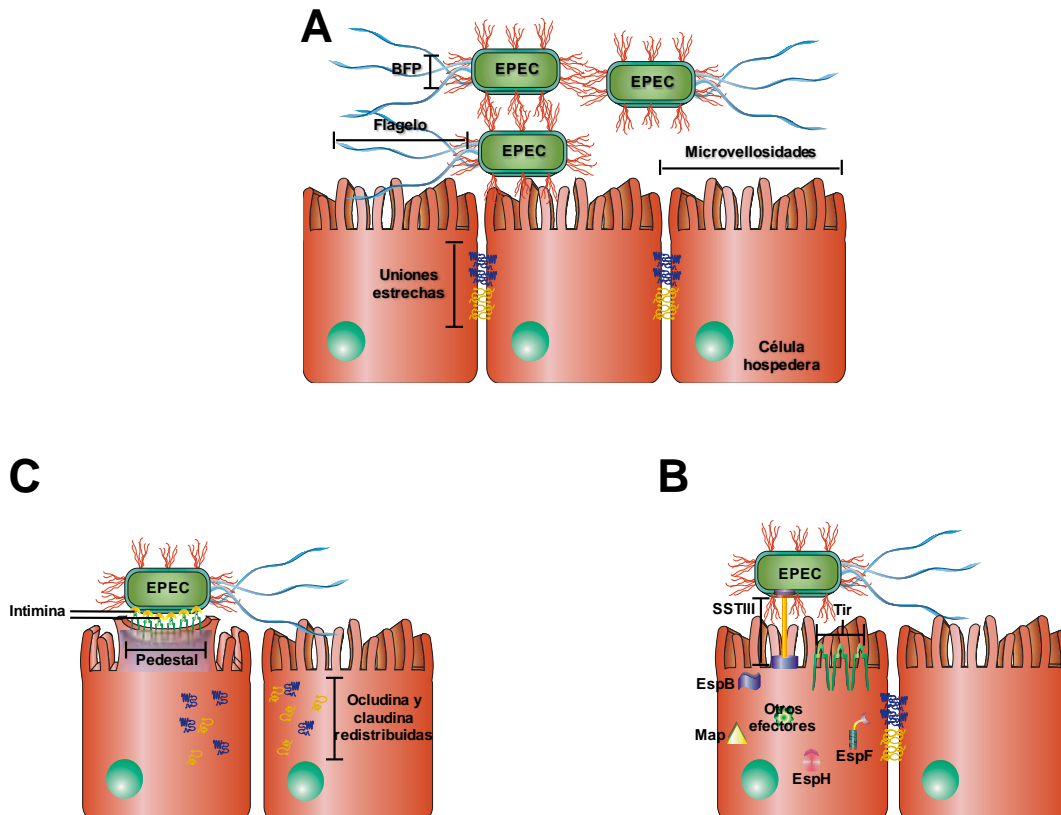


Figura 2. Modelo esquemático de las etapas de infección por EPEC. (A) El contacto inicial se lleva a cabo mediante el flagelo y el BFP. (B) Una vez adherida la bacteria a la célula epitelial, EPEC inyecta proteínas efectoras a la célula mediante el SSTIII, entre ellas se encuentra Tir, la cual se inserta en la membrana de la célula hospedera exponiendo una región en el espacio extracelular. (C) Intimina se une estrechamente a Tir y se induce el re-arreglo del citoesqueleto, favoreciendo la formación del pedestal de actina, la desaparición de las microvellosidades y el deterioro de las uniones estrechas, provocando finalmente la lesión A/E. (D) Las bacterias unidas íntimamente interactúan mediante el BFP con otras bacterias no unidas íntimamente induciendo la formación de microcolonias. y otras se cree que son citoplasmáticas como algunas GTP-ases asociadas a la

membrana celular del enterocito, como RhoA, Rac1 y Cdc42 (Fig. 3A) (Hueck, 1998; Celli *et al.*, 2000).

El sistema de secreción tipo III así como otras proteínas implicadas en las lesiones A/E están codificados a lo largo de una isla de patogenicidad cromosomal de 35 kb conocida como locus de esfacelamiento del enterocito (LEE). Hacker *et al.* en 1997, propusieron que la adquisición de nuevos genes por transferencia

horizontal, como también la transformación con DNAs desnudos, la transducción con fagos, o la conjugación de plásmidos o fragmentos de cromosoma, pueden generar nuevos prototipos patogénicos estables que pueden ser heredados de generación en generación, como son las islas de patogenicidad.

LEE contiene 41 marcos de lectura abierta y está organizada en 5 operones policistrónicos (LEE1-LEE5). Esta isla de patogenicidad codifica para las proteínas translocadoras EspA, EspD y EspB, las cuales son parte del sistema de secreción tipo III y son necesarias para translocar efectores dentro de la célula hospedera. Así también codifica para otras moléculas implicadas en la patogenicidad, como son: la adhesina intimina, la cual es esencial para la unión íntima con Tir en la membrana citoplasmática de la célula hospedera, proteínas efectoras como EspF, EspG, EspZ, EspH, Map y Tir que es el receptor de intimina, así como proteínas chaperonas como CesD para EspB y EspD, CesF para EspF, y CesT para Tir (Gal-Mor y Finlay, 2006; Mills et al., 2008).

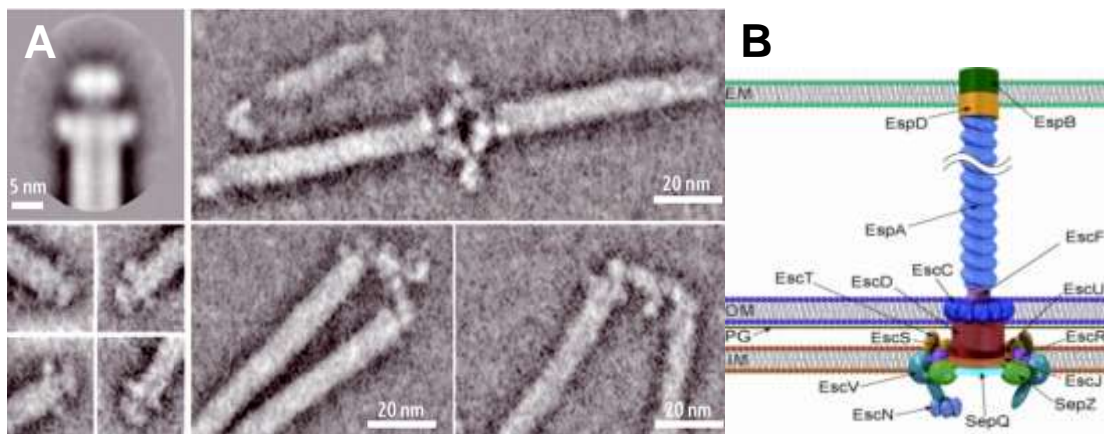


Figura 3. Sistema de secreción tipo III (SSTIII). (A) Fotografía de microscopía electrónica donde se muestra la jeringa molecular del sistema de secreción tipo III (Sekiya *et al.* 2001). (B) Modelo esquemático del sistema de secreción tipo III donde se muestran las proteínas que lo conforman (Pallen et al. 2005).

Las proteínas translocadoras EspA, EspD y EspB son esenciales para la estructuración del aparato translocador (Fig. 3B). EspA se acumula en el

citoplasma y es secretada a través de la membrana bacteriana formando apéndices filamentosos en la superficie de la bacteria.

EspB y EspD han sido relacionadas con YopB y YopD en *Yersinia*, las cuales tienen la habilidad de lisar eritrocitos, lo que sugiere que estas proteínas funcionan como componentes de la maquinaria del aparato tranlocador, formando un poro en la membrana. Por lo tanto, la homología de YopB y YopD con EspB y EspD sugiere que estas últimas pueden funcionar como translocadores de otras proteínas implicadas en la virulencia hacia la célula hospedera formando un poro en la membrana del enterocito insertándose en ésta (Wachter *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2003). También se ha comprobado que la transfección de EspB en células HeLa provoca cambios en la morfología celular y la reorganización de las fibras de estrés a tiempos muy largos, lo que sugiere que EspB puede también actuar como una citotoxina (Taylor *et al.*, 1999; Tacket *et al.*, 2000).

Dentro de las proteínas efectoras, se encuentra EspG, EspH, EspZ, Map, Tir y EspF. EspG está implicada en la formación de fibras de estrés de actina y en la destrucción de la red de microtúbulos debajo de donde la bacteria esta adherida, así como es capaz de interactuar con tubulina y estimular la deshabilitación de los microtúbulos. EspH localiza la membrana de la célula hospedera, donde modula la estructura del cito esqueleto de actina, aunque su función exacta no ha sido descrita. EspZ es el efector más recientemente identificado, pero su translocación no ha sido todavía atribuida a ninguna función. Map (mitochondrion-associated protein), tiene tres funciones distintas: la primera es interferir en la

habilidad de la célula para mantener el potencial de membrana de la mitocondria, desarrollando la formación de mitocondrias deformes, hinchadas y dañadas. La segunda función de Map es que, al inicio de la infección por EPEC, ésta es responsable de la formación de estructuras similares a filopodios en el sitio de infección de la bacteria, un proceso que depende de la pequeña proteína Cdc42. Y la tercera y última función es la de intervenir en la disrupción de la barrera intestinal y la alteración de las uniones estrechas, lo que es independiente del daño a las mitocondrias. EspF es una proteína efectora rica en prolina, la cual contiene tres prolinas repetidas en EPEC y cuatro en EHEC. Esta proteína ha mostrado un rol muy importante en la disrupción de la barrera intestinal, interviniendo en la pérdida de la resistencia transmembranal, en el incremento en la permeabilidad de la monocapa y por la redistribución de la proteína ocludina, la cual está asociada a las uniones estrechas (Garmendia *et al.*, 2005). Tir (Transmembrane intimin receptor) es translocada en la membrana de la célula hospedera, donde es fosforilada en dos residuos de serina (S434 y S463) y en el residuo 474 de tirosina, lo que provoca la inserción de esta en la membrana plasmática del enterocito, sirviendo como receptor para intimina y llevando a cabo la reestructuración de actina del citoesqueleto en la estructura tipo pedestal (McNamara *et al.*, 2001).

El tercer paso a seguir en la infección es la unión íntima y la formación de la estructura tipo pedestal (Fig. 2C). La característica principal de la infección por EPEC es su habilidad para unirse íntimamente a la superficie de la célula epitelial. Esta unión íntima requiere de intimina en la membrana externa de la bacteria y su

propio receptor bacteriano, Tir, el cual había sido catalogado como un receptor (Hp90) de la membrana celular del hospedero (Rosenshine *et al.*, 1996), hasta que Kenny (a) *et al.* en 1997 demuestra la presencia de Tir en células preinfectadas, y la ausencia de esta en células no infectadas.

La interacción Bacteria-Hospedero implica al gen *eae*, el cual codifica para intimina. El gen *eae* está localizado en LEE entre el gen *sep* y *espA*, aunque se han identificado 21 variantes de *eae* que codifican para 21 diferentes tipos y subtipos de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\mu R/\beta 2B$, $\delta/\beta 2O$, θ , $\gamma 1$, $\gamma 2$, ζ , $\epsilon 1$, $\lambda R/\epsilon 2$, δ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\eta 1$, $\kappa R/\eta 2$, ι , κB , λB , μB y ν) (Adu-Bobie *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2006). Intimina es una proteína externa de membrana de 94 kDa que es necesaria para la unión íntima de la bacteria con la célula epitelial (Donnenberg *et al.*, 1997).

Intimina es exportada por vías generales de secreción hacia el periplasma, donde se inserta en la parte externa de la membrana por mecanismos de autotransporte. Esta proteína tiene dos regiones funcionales: una región N-terminal que está muy bien conservada entre las cepas de EPEC y EHEC, la cual se inserta en la parte externa de la membrana formando una estructura de tipo β -barril. La segunda estructura funcional es la región correspondiente al C-terminal, la cual consta de 280 aminoácidos, y es variable, definiendo las diferencias entre intiminas. Este se extiende desde la bacteria e interactúa con algunos receptores en la membrana plasmática de la célula hospedera. Esta secuencia de 280 aminoácidos comprende tres dominios globulares: dos dominios tipo inmunoglobulina (Adu-Bobie *et al.*, 1998) y una región en el C-terminal con un dominio tipo lectina, de los cuales, los dos dominios tipo inmunoglobulina contiene los receptores de unión. La

interacción de intimina con la célula hospedera estimula la producción de procesos parecidos a los de las microvellosidades (Phillips *et al.*, 2000), así como influye en el tropismo de tejido intestinal, y recientemente se ha demostrado que intimina es esencial en el proceso de modificación de las uniones estrechas por EPEC (Garmendia *et al.*, 2005).

En el lugar de contacto con la célula epitelial, EPEC transloca Tir vía SSTIII en la membrana plasmática de la célula epitelial, en donde es fosforilada en la tirosina 474 y actúa como receptor para intimina (Kenny (b) *et al.* 1997; Kenny (c) *et al.*, 1999). Tir tiene dos dominios transmembranales y seis residuos de tirosina, todos localizados en el C-terminal. Un modelo de pasador ha sido propuesto para Tir cuando está insertado en la membrana del hospedero, donde Tir usa sus dos dominios transmembranales para atravesar la membrana del enterocito con sus regiones N- y C-terminal localizados en la membrana celular del hospedero, donde la región entre los dos dominios transmembranales forman una orquilla extracelular. La interacción Tir-intimina guía la unión íntima de EPEC a la célula epitelial, lo que provoca la formación del pedestal y la condensación de actina, lo que comprobó Kenny (a) *et al.* en 1997 utilizando una mutante EPEC Δtir , que previno la formación de lesiones A/E en células en cultivo.

Por otro lado, Tir no solo actúa como receptor para intimina. Otro de los papeles de Tir dentro de la infección por EPEC es la señalización dentro de la célula epitelial. El C-terminal de Tir, el cual es tirosín-fosforilado, queda expuesto hacia las proteínas del citoesqueleto, inicialmente uniéndose directamente con el

dominio SH2 del adaptador proteico Nck (Gruenheid *et al.*, 2001), y ésta a su vez, utiliza su dominio SH3 para unirse a WIP (WASP-interacting protein), la cual interactúa con las proteínas integrantes de la familia relacionada al Síndrome de Wiscott-Aldrich (WASP y N-WASP) distribuyéndose en la base del pedestal, las cuales a su vez activan el complejo Arp2/3 (actin-related protein 2/3) redistribuyéndolo a lo largo del pedestal, estimulando así, la formación de conglomerados de actina y la polimerización de la misma en filamentos que se organizan determinando el esfacelamiento de las microvellosidades y la formación de pedestales, los cuales mantienen a las bacterias adheridas y ligadas al citoesqueleto (Kaper *et al.*, 2004). En contraste, α -actina se une directamente al N-terminal de Tir en una forma independiente a la fosforilación del residuo 474 de tirosina, de esta manera, es observada justo debajo del lugar de unión íntima de EPEC con la célula epitelial (Goosney (a) *et al.*, 2000).

Efecto de la infección por EPEC en las uniones estrechas

La barrera intestinal está principalmente formada por epitelio. Las membranas de estas células epiteliales son las que constituyen principalmente esta barrera, debido a que son impermeables a solutos hidrofílicos excepto cuando el transporte específico es requerido. Como sea, el espacio entre células adyacentes, el espacio paracelular, no ayudaría a la barrera si no estuviera sellado por uniones intercelulares, por esto, las uniones estrechas son críticas para poder realizar esta función. Como paso límite en la velocidad del tránsito paracelular, la permeabilidad de las uniones estrechas define la totalidad de la función de esta barrera,

manteniendo así, un epitelio intestinal intacto. De otro modo, la barrera intestinal estaría severamente comprometida cuando las células epiteliales muriesen por causa de úlceras, lo que puede llevar a algún tipo de padecimiento gastrointestinal, aunque más allá de esto, el epitelio intestinal está programado genéticamente para recuperarse de este tipo de heridas y resellar la barrera en cuestión de minutos después del daño, y como se puede esperar, las uniones estrechas representan un paso crítico en este proceso (Turner, 2006).

Las uniones estrechas son estructuras proteicas macromoleculares localizadas en las regiones más apicales del complejo funcional en células tanto epiteliales como endoteliales. Estas uniones cercan límites de difusión de lípidos y proteínas integrales de membrana entre las membranas apicales y basolaterales, de esta manera, establecen en parte la polaridad celular. Además, las uniones estrechas están compuestas de hebras circunferenciales, continuas e interconectadas cerca del ápice de la membrana lateral, donde estas interactúan con las hebras de las células adyacentes, de tal manera que crean una barrera física que regula el transporte paracelular de agua, iones, solutos y células inmunes (Muza-Moons *et al.*, 2004; Turner, 2006).

Muchas proteínas están implicadas en la estructuración de las uniones estrechas, incluyendo a ocludina y a la familia de claudinas, las cuales han sido catalogadas como componentes esenciales para la función de las uniones estrechas. Ocludina es una proteína de 65 kDa, la cual fue la primera proteína integral de membrana que fue identificada como componente de las uniones estrechas. Esta consiste de

cuatro largas regiones transmembranales con un pequeño y citoplasmático N-terminal, así como de un largo C-terminal que es fosforilado en múltiples sitios el cual se extiende dentro del citoplasma celular. Esta proteína, aunque fue la primera en ser caracterizada como componente crucial en las uniones estrechas, también ha mostrado un papel crucial como componente de la barrera electrofisiológica en las células epiteliales (Muza-Moons *et al.*, 2004).

Las proteínas más recientemente caracterizadas como componentes en las uniones estrechas es la familia de las claudinas. Claudina es una proteína muy pequeña, de apenas 22 kDa, la cual, al igual que ocludina, tiene cuatro regiones muy largas y un N- y C-terminal citosólicos (Muza-Moons *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que un gran número de proteínas se asocian con el C-terminal citosólico de las proteínas transmembranales de las uniones estrechas, incluyendo a la familia de proteínas periféricas ZO (zonula occludens), de las cuales ZO-1 ha sido bien caracterizada como una estructura de unión entre el citoesqueleto y las uniones estrechas. Se ha demostrado que ZO-1 interactúa directamente con actina utilizando su C-terminal, de igual manera, otras proteínas ZO y claudina vía PDZ (protein domain of ZO) en el N-terminal, y ocludina vía un dominio parecido a guanililkinasa. Estas interacciones facilitan la comunicación de moléculas entre el citoesqueleto de la célula y el complejo de las uniones estrechas (Muza-Moons *et al.*, 2004). La función de las uniones estrechas ha comenzado a relacionarse con ciertas enfermedades como son la enfermedad de Crohn's (Söderholm *et al.*, 2002), colitis ulcerativa y algunas infecciones causadas por bacterias.

Dentro de las bacterias que alteran la función de la barrera que proveen las uniones estrechas se encuentra EPEC. Esta bacteria transloca ciertas proteínas efectoras vía SSTIII hacia la célula epitelial. Una de estas proteínas efectoras es EspF (EPEC secreted protein F). EspF es una proteína efectora rica en prolina, esta contiene tres prolinas repetidas en EPEC, cuatro en EHEC y cinco en *C. rodentium* (Garmendia *et al.*, 2005). Map y EspF están envueltos en la disrupción de las funciones de la barrera intestinal de manera independiente, aunque, los dos requieren de intimina en la superficie de la membrana de la célula epitelial para realizar esta función. Un estudio de Nagai *et al.* en 2005 demuestra ciertas funciones que se comparten entre Map y EspF. Como Map, EspF es dirigida hacia las mitocondrias de la célula hospedera vía su región N-terminal e interviene en la permeabilización de la membrana mitocondrial, de modo que esto induce la liberación de citocromo C el cual es una proteína toxica, así como el rompimiento de las caspasas 3 y 9, indicando que EspF juega un rol en la inducción de la muerte mitocondrial.

Adicionalmente, EspF parece intervenir en la inducción de muerte celular provocada por EPEC, aparentemente vía apoptosis (Crane *et al.*, 2001). De otro modo, a tiempos muy cortos pos-infección, EspF forma un complejo con citoqueratina 18 y el adaptador proteico 14-3-3 (isoforma zeta), un complejo que es desmantelado mas tarde. De este modo, la interacción que tiene EspF con estas proteínas demuestra el papel que tiene en la modulación de la arquitectura de la red de filamentos intermedios en células preinfectadas (Viswanathan *et al.*,

2004). Otra de las interacciones que tiene EspF con la célula epitelial fue determinada por Shaw *et al.* en 2005, quien realizó un estudio *in vitro* utilizando cultivos de células humanas, de tal manera se comprobó que EspF juega un rol directo en la reestructuración de las microvellosidades de las células epiteliales. EspF también ha mostrado un rol importante en la disrupción de la barrera intestinal, interviniendo en la pérdida de la resistencia transepitelial, por incrementar la permeabilidad de la monocapa de enterocitos y por la redistribución de la proteína asociada a las uniones estrechas ocludina (McNamara *et al.*, 2001).

Acción de EspF en las lesiones A/E

Aun que EPEC causa lesiones A/E vía SSTIII, no todas las proteínas efectoras que transloca hacia la célula epitelial son requeridas para realizar este tipo de lesiones, tal es el caso de EspF. Esto fue comprobado por McNamara *et al.* en 2001. Estos autores utilizaron dos cepas de EPEC para infectar células epiteliales T84, la cepa wild-type E2348/69 y la cepa UMD874 mutante en el gen *espF*, obteniendo como resultado que de 192 bacterias wild-type, 95 (45%) fueron capaces de producir lesiones A/E, y de 120 mutantes *espF*, 65 (53%) fueron también capaces de producir lesiones A/E. De tal manera que este resultado contrasta el hecho de que EspF no es esencial para producir lesiones A/E.

Sin embargo, Peralta *et al.* en 2008 utilizó la línea celular RK13 (Rabbit kidney cells) y la cepa E22 de EPEC. Las células confluentes fueron infectadas durante 4 horas con E22 wild-type (wt), E22 + *pespF*, E22 Δ *espF* y E22 Δ *espF* + *pespF* para

después hacer estudios de inmunofluorescencia. La cepa E22 Δ *espF* formó pedestales considerablemente más pequeños comparados con la cepa E22wt. La cepa E22 Δ *espF* + *pespF*, complementada con el gen de EspF, recuperó la capacidad de hacer pedestales de tamaño similar a E22wt. La infección por la cepa E22 + *pespF*, la cual sobre expresa la proteína EspF, formó pedestales de tamaño considerablemente mayor con respecto a E22wt.

De esta manera se demostró que EspF no es esencial en la realización de la lesión A/E y en la formación del pedestal, sin embargo, sí participa en el crecimiento y la maduración de esta estructura.

EspF induce la pérdida de la resistencia eléctrica transepitelial

Una de las causas de diarrea producida por EPEC es la pérdida de la resistencia eléctrica transmembranal (RET). Esto fue comprobado por McNamara *et al.* en 2001. Su metodología fue infectar monocapas polarizadas de células T84 con cepas de EPEC, donde la cepa E2348/69 wild-type (E23wt) provocó una dramática pérdida de la RET de las células epiteliales, mientras que las células infectadas con la cepa mutante en *espF* UMD874 no mostraron una marcada pérdida en la RET. Esto fue contrastado por medio de la infección de células T84 con dos cepas mutantes, una cepa UMD874 mutante en el gen *escN* implicado en la realización del SSTIII, y una cepa mutante en el gen *espA*, de tal manera que las células T84 no mostraron una marcada pérdida en la RET, esto debido a que

sin *escN* ni *espA*, EspF no puede ser translocada en la célula epitelial, y por consecuencia, no puede alterar la RET.

Para comprobar que EspF participó en la pérdida de la RET, monocapas de células T84 fueron infectadas con E23wt y con UMD874, para posteriormente pasar un flujo de manitol a través de las monocapas. El manitol es un compuesto que se difunde exclusivamente por la vía paracelular, de tal manera que se puede medir el flujo de manitol con respecto a la pérdida de la RET provocada por la infección por EPEC. Las monocapas infectadas con E23wt mostraron un aumento en el flujo de manitol de casi el doble con respecto a las monocapas infectadas con UMD874.

El mismo resultado fue obtenido por Shifflett *et al.* en 2005 realizando ensayos *in vivo*. Como modelo experimental, fueron usados ratones C57BL/6J, los cuales fueron infectados con 2×10^8 bacterias de las cepas EPEC wild-type y EPEC Δ *espF*. Después de matar a los ratones un día después de la infección, se extrajeron secciones del íleon y colon, las cuales fueron montados en cámaras de Ussing midiendo sus parámetros electrofisiológico. Esto confirmó que EPEC wild-type redujo significativamente la RET del íleon y del colon. En contraste, las células infectadas con EPEC Δ *espF*, no mostraron la reducción de RET.

En otro trabajo que respalda esta hipótesis se utilizaron las líneas celulares RK13 (Rabbit kidney cells) y MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) en infección con la cepa E22. Las células confluentes fueron infectadas con E22 wild-type (wt), E22

+ *pespF*, *E22ΔespF*, *E22ΔespF + pespF*, y se midió la RET. A las 6 horas de infección por E22 wt, la monocapa tuvo una pérdida de un 60 % en la RET, en contraste, la cepa *E22ΔespF* presentó una pérdida de un 10% a 6 horas de infección. La cepa *E22ΔespF + pespF* presentó un comportamiento similar a la cepa wt, mientras que la cepa *E22 + pespF*, la cual sobre expresó EspF, tuvo una pérdida de hasta un 80% en la TER. Esto se realizó en las dos líneas celulares antes mencionadas obteniendo resultados similares (Peralta *et al.* 2008).

De este modo, se reafirma que EspF es una proteína efectora la cual interviene en la pérdida de la resistencia eléctrica transepitelial.

Redistribución de las proteínas asociadas a uniones estrechas provocada por EspF

Estudios recientes han demostrado que la arquitectura de las uniones estrechas sufre alteraciones debido a la infección por EPEC. Muza-Moons *et al.* en 2004 utilizó microscopia de inmunofluorescencia para comprobar esta acción sobre una monocapa confluyente de células T84, las cuales fueron infectadas con EPEC para posteriormente teñirlas con anticuerpos específicos para proteínas de uniones estrechas. Esto demostró que ocludina, claudina-1 y ZO-1 fueron detectadas en regiones discretas en la región apical de la membrana lateral de células no infectadas. Después de 6 horas de la infección, ocludina fue observada a lo largo de la membrana lateral, pero también fue detectada en el citoplasma. La distribución de claudina-1 fue similarmente alterada, pero en menor grado. Por

último, la localización de ZO-1 en la célula fue de igual manera afectada, pero menos dramáticamente que ocludina. Para reafirmar el resultado anterior, se utilizó una mutante EPEC Δ espF. Después de 6 horas de infección con EPEC Δ espF, las tres proteínas de uniones estrechas, ocludina, claudina-1 y ZO-1 fueron todavía situadas apicalmente como en células no infectadas.

En otro trabajo que apoya la redistribución de proteínas asociadas a uniones estrechas por acción de EspF se utilizaron monocapas de células RK13 en infección con EPEC (E22wt) y ensayos de inmunofluorescencia. La infección por E22wt provocó la redistribución de proteínas asociadas a uniones estrechas ZO1, ZO2, claudina1 y ocludina, las cuales fueron detectadas justo debajo de las bacterias, en la estructura tipo pedestal. Sin embargo, la infección por E22 Δ espF no provocó la redistribución de ZO1, ZO2, claudina 1 ni ocludina de las uniones estrechas hacia la estructura tipo pedestal (Peralta *et al.* 2008).

Para corroborar los resultados anteriores se utilizaron estudios de co-inmunoprecipitación y Western blot. Se infectaron monocapas confluentes de células RK13 con E22wt a diferentes tiempos (0, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 horas). Pasando estos tiempos, las células fueron lisadas y fraccionadas en proteínas citoplasmáticas y proteínas membranales. Se inmunoprecipitó EspF y las proteínas que interactuaron con ella en los diferentes tiempos de infección de las fracciones. Las muestras fueron corridas en SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa para estudios de Westerblot. En este análisis se detectó que EspF interactuó con ZO1 y ZO2, sin embargo, no se detectó

interacción con claudina 1 ni ocludina. También se detectó la interacción de EspF con N-WASP, Arp2/3, profilina y actina.

Los resultados de ambos grupos de trabajo proponen que EspF interviene en la redistribución de las proteínas ZO1, ZO2, claudina 1 y ocludina, de las uniones estrechas hacia la estructura tipo pedestal. Las proteínas ZO1 y ZO2 mostraron tener interacción con EspF en estudios de co-inmunoprecipitación y Western blot, mientras que claudina 1 y ocludina no mostraron la misma interacción. Sin embargo la distribución de claudina 1 y ocludina fueron afectadas de igual manera que ZO1 y ZO2.

EspF interacciona con proteínas relacionadas a mecanismos de endocitosis mediada por clatrina

La remodelación de la membrana durante fenómenos de endocitosis requiere la coordinación de algunos fosfolípidos, así como proteínas moduladoras del citoesqueleto de actina. Estudios recientes han demostrado que EspF interacciona con proteínas implicadas en la polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, como son N-WASP, Arp2/3 y profilina (Peralta *et al.* 2008), lo que sugiere que EspF modula el citoesqueleto de actina para llevar a cabo alguna acción desconocida hasta ahora. Relacionado a lo anterior, un estudio de Alto *et al.* en 2007 reporta la interacción de EspF con las proteínas SNX9 (sorting nexin 9) y N-WASP (neuronal Wiskott Aldrich syndrome proteína), proteínas implicadas en la endocitosis mediada por vesículas recubiertas por clatrina y en la

modulación del citoesqueleto de actina respectivamente. Este grupo de trabajo realizó búsquedas en base de datos donde comparó la secuencia de aminoácidos de ortólogos de EspF y de EspFu/TccP de EHEC. Estas búsquedas dieron como resultado la ubicación de dominios putativos de unión a SNX9 y a N-WASP en la secuencia de los ortólogos de EspF y EspFu/TccP.

Para comprobar la existencia de la interacción EspF-SNX9, los autores construyeron una proteína EspF recombinante unida a glutatión S transferasa (GST) para hacer ensayos de pull-down y Western blot. La interacción de GST-EspF y SNX9 fue detectada en el Western blot. Para reafirmar esta interacción, ellos utilizaron estudios de microscopía de fluorescencia, donde se utilizaron células HeLa las cuales expresaban o co-expresaban EspF unida a proteína verde fluorescente y SNX9 unida a mCherry. Las células que expresaban sólo SNX9 demostraron un patrón de distribución normal de SNX9, detectando a esta proteína en vesículas recubiertas por clatrina en la superficie de las células, así como acumulada en regiones perinucleares cerca del aparato de Golgi. La co-expresión de GFP-EspF y mCherry-SNX9 provocó la redistribución de SNX9 de las vesículas recubiertas por clatrina y regiones perinucleares a estructuras tubulares parecidas a gusanos las cuales fueron detectadas cerca de la periferia celular. EspF y SNX9 co-localizaron en estas estructuras tipo gusano, lo que sugiere que la redistribución de SNX9 está directamente asociada a la unión con EspF.

Para determinar la interacción de EspF con N-WASP, los autores realizaron estudios de co-inmunoprecipitación, Western blot y microscopia de fluorescencia. Se usaron células HEK293A las cuales expresaban o co-expresaban EspF unida a GFP y N-WASP unida a un motivo V5. Las células fueron lisadas y se co-inmunoprecipitó con anti-GFP. Las proteínas fueron corridas en un gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para estudios de Western blot, en donde se demostró la interacción de EspF con N-WASP. Para ver esta interacción *in vivo*, se utilizaron las células que co-expresaban GFP-EspF y V5-N-WASP. En las células que solo expresaban V5-N-WASP, N-WASP fue detectada sólo en el citoplasma, mientras que en las células que co-expresaban GFP-EspF y V5-N-WASP, N-WASP fue detectado en estructuras tubulares cerca de la membrana celular.

Las células que co-expresaban GFP-EspF y mCherry-SNX9 o GFP-EspF y V5-N-WASP fueron teñidas con faloidina acoplada a rodamina para detectar las fibras de actina. Esta última fue detectada en estructuras tubulares cerca de la membrana celular, las cuales co-localizaron con SNX9 o N-WASP en células que expresaban también GFP-EspF.

Ya que SNX9 y N-WASP han sido implicadas en fenómenos de endocitosis mediada por vesículas recubiertas por clatrina, la interacción de EspF con SNX9 y N-WASP propiciaba a que EspF podía estar induciendo la endocitosis de vesículas recubiertas por clatrina. Para comprobar esta hipótesis, ellos realizaron estudios de TIR-FM (Total internal reflection-fluorescence microscopy), una

técnica que permite visualizar proteínas acopladas a proteínas fluorescentes a 100 nm de la membrana celular. Se utilizaron células Swiss-3T3, las cuales co-expresaban EspF fusionada a GFP, así como también la cadena pesada de clatrina fusionada a Ds-Red, un marcador para las vesículas recubiertas por clatrina. Se tomaron varios videos de 10 a 12 minutos cada uno, donde se mostró la dinámica de EspF en las células vivas. EspF se fue acumulando poco a poco en parches justo en la superficie de la membrana celular. Interesantemente, EspF co-localizó parcialmente con clatrina en 357 de 388 eventos (92%) sin que se afectara la dinámica normal de clatrina dentro de la célula.

Todos estos datos demuestran que la infección de células epiteliales por EPEC induce la redistribución de las proteínas de las uniones estrechas, de la parte más apical de las células, a la estructura tipo pedestal, proceso que es dependiente de EspF. Este proceso implica el uso de un transporte vesicular, ya sea por vesículas recubiertas por clatrina o caveolina. Este cambio está correlacionado con el incremento de la permeabilidad paracelular y el descenso en la resistencia eléctrica transepitelial.

Justificación

EspF es una proteína secretada por *E. coli* enteropatógena (EPEC), la cual es una bacteria responsable de diarrea acuosa en niños. La proteína EspF es dependiente de las proteínas implicadas en la estructuración del sistema de secreción tipo III como son EspA, EspD y EspB, ya que sin esta estructura, EspF no puede ser translocada dentro de la célula epitelial. Esta proteína está involucrada en la disrupción de las funciones de la barrera intestinal, en la permeabilización de la membrana mitocondrial, así como también en la inducción de muerte celular provocada por vía apoptosis. Recientes estudios demuestran que EspF también está involucrada en la disrupción de las uniones estrechas, así como en la redistribución de las proteínas ocludina, claudina-1 y ZO-1, las cuales están involucradas en la estructuración de las uniones estrechas. Debido a que la interacción entre EspF y las proteínas asociadas a uniones estrechas no está totalmente definida, el estudio está enfocado a determinar la interacción de EspF con estas proteínas, así como conocer el mecanismo por el cual estas proteínas se redistribuyen en las células epiteliales.

Objetivos

Objetivo general

- Encontrar la vía por la que EspF de *E. coli* enteropatógena (EPEC) induce la endocitosis de las proteínas asociadas a uniones estrechas.

Objetivos Específicos

- Determinar si EspF interacciona con vesículas cubiertas de clatrina o caveolina para producir fenómenos de endocitosis.
- Determinar si la infección por EPEC induce la endocitosis de proteínas de las uniones estrechas (i.e. ocludina o claudina) mediada por clatrina.

Estrategia experimental

Cultivos celulares y bacterias

En este estudio se utilizó la línea celular RK13 (Rabbit Kidney Cells, CCL-37;ATCC), la cual fue crecida en una incubadora para células a 37°C con 5% de CO₂ utilizando medio mínimo esencial (MEM: GIBCO, 61100-053) enriquecido con 2 mM de L-glutamina, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO, 890-1840IL), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (GIBCO, 11140-050), 10% de suero fetal bovino (PAA, A15-751), 10,000 unidades/ml de penicilina (GIBCO, 15140-122) y 10,000 µg/ml estreptomina (GIBCO, 15140-122) para evitar contaminación. Las células fueron propagadas en cajas para cultivo celular de 100 mm² (Corning, 430167) después de haber sido despegadas con una solución conteniendo 0.25% de Tripsina (Sigma, T8642), 0.53 mM de EDTA y amortiguador salino de fosfatos (PBS; pH 7.4). Para ser usadas en los ensayos de infección, las células RK13 sub-confluentes fueron resuspendidas en la solución de Tripsina-EDTA y sembradas en placas de ocho pozos (LAB-TEK, 177402) o cajas para cultivo celular permitiendo un crecimiento del 95% de confluencia.

Se utilizaron las cepas EPEC E22 wild-type (E22wt) y la cepa EPECΔ*espF*. La cepa E22wt fue crecida en medio Luria-Bertani (LB) en una incubadora para bacterias (THELCO, QA3116) a 37°C toda la noche (16 horas). La cepa EPECΔ*espF* fue crecida en medio Luria-Bertani con 35 µg/ml de kanamicina (BRISTOL, 3503-33) (LBK) en una incubadora para bacterias a 37°C toda la noche

(16 horas). Después de este periodo de tiempo las cepas fueron usadas en los experimentos de infección.

Ensayo de infección

La infección por EPEC está asociada a la secreción de factores específicos los cuales son expresados cuando la bacteria alcanza la fase logarítmica de crecimiento en condiciones homologas a las encontradas en el intestino, como lo son el pH y la osmolaridad (Kenny *et al.*, 1997a; Rosenshine *et al.*, 1996). Estas condiciones las reúne el medio de cultivo celular.

Los cultivos bacterianos crecidos toda la noche en LB o LBK fueron diluidos (1:25) en MEM libre de suero fetal bovino y antibióticos e incubados a 37°C en agitación (180 × g) durante 1.5 horas para aumentar la población de bacterias. Después los cultivos fueron incubados 1.5 horas a 37°C en fase estática para inducir la secreción de factores de virulencia, esto para obtener una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.8 en la fase logarítmica de crecimiento con lo que se obtienen aproximadamente 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de los cultivos activados.

Las células RK13 fueron sembradas en placas de ocho pozos. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 95%, el medio fue aspirado y se adicionó MEM libre de suero fetal bovino y antibióticos para llevar a cabo la infección. Las células fueron infectadas con los cultivos bacterianos activados a una multiplicidad de

infección de 100 (MOI 100) y se mantuvieron así durante 1 hora en una incubadora (Barnstead International, MaxQ 4000) a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂. Después de esto, el medio fue aspirado y las bacterias no adheridas fueron removidas con un lavado suave usando medio libre de suplementos. La monocapa fue cubierta con medio, permitiendo que las bacterias adheridas infectaran las células durante los tiempos indicados.

Inmunofluorescencia

Para determinar la interacción de EspF con proteínas asociadas a uniones estrechas (PAUE) y la redistribución de estas por vesículas recubiertas por clatrina, nosotros realizamos estudios de Inmunofluorescencia. Las células RK13 se pasaron a placas de 8 pozos con medio MEM y se dejaron en incubación hasta lograr una confluencia de 95%. Ya listas las placas con células, se inoculó una alícuota de una cepa bacteriana activada en MEM en cada uno de los pozos respectivamente. Finalmente se dejaron en infección durante tres tiempos diferentes (1, 2, y 3 horas).

Pasados cada uno de los tiempos, la placa con células se dejó reposar por 5 minutos en hielo para detener el tráfico vesicular y la posible endocitosis de PAUE por el estrés debido al procesamiento de las células. Transcurrido este tiempo, se agregó a cada uno de los pozos 120 µl de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, 15710) al 3.7% y se dejaron reposar durante 20 min. Posteriormente se lavaron los pozos con PBS frío siete veces para eliminar el formaldehído de la

muestra. Ya lavadas las células, estas fueron permeabilizadas utilizando 120 μ l/pozo de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 6517) al 0.1% durante 10 minutos. Finalmente, los sitios no específicos de unión fueron bloqueados utilizando 120 μ l de albúmina bovina (Research Organics, Inc, 1329A) al 1% (todos los reactivos anteriores fueron diluidos en PBS).

Las células fueron incubadas durante 3 hora a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti-EspF hecho en ratón (un regalo de Michael Donnenberg, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Maryland, Baltimore, E. U. A.) a una dilución 1:50, anticuerpos policlonales anti-occludina hecho en conejo (Invitrogen, 71-1500) a una dilución 1:30, anti-claudina-1 hecho en conejo (Zymed Laboratories, Inc, 51-9000) a una dilución 1:20 y anti-clatrina hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, sc-6579) a una dilución 1:200. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS frío siete veces para eliminar los anticuerpos que no se unieron. Posteriormente las células fueron incubadas 1 hora con anticuerpos secundarios acoplados a rodamina (TRITC), cianina (Cy5), fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) y 30 minutos con faloidina acoplada a rodamina 1:120 (Invitrogen, Inc, R415) para teñir las fibras del citoesqueleto de actina. Posteriormente las células fueron lavadas de nuevo 7 veces con PBS frío y secadas en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 1 hora.

Las muestras fueron montadas con vectashield (Vector Laboratories, Inc, H1000) y analizadas en un microscopio confocal invertido Leica TCS-P2 usando un objetivo

apocromático 100 × de inmersión en aceite. Se hicieron de 10 a 18 secciones consecutivas por muestra en el plano del eje Z. Los fluoróforos acoplados a los anticuerpos secundarios o a faloidina fueron excitados a diferentes longitudes de onda: rodamina a 560 nm, cianina a 650 nm y fluoresceína a 495 nm. Las imágenes obtenidas fueron agrupadas, proyectadas con el software Leica Lite. Para determinar los patrones de co-localización entre proteínas, las imágenes fueron procesadas utilizando el software libre ImageJ 1.6.0_12, el cual nos proporcionó datos de coeficiente de correlación de Pearson (r). Estos datos fueron procesados y graficados utilizando en software SigmaPlot 8.0.

Fraccionamiento celular

Monocapas confluentes de células RK13 fueron infectadas con la cepa E22wt o con la cepa EPEC Δ *espF* (MOI 100) por 1, 2, y 3 horas. Las monocapas infectadas y no infectadas fueron lavadas con PBS frío, y las células fueron removidas con una espátula de plástico y lisadas mediante la incubación con amortiguador RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0.5% de desoxicolato de sodio, ortovanadato de sodio 1 mM, fenilmetilsulfonil fluorido 1 mM e inhibidores de proteasas) por 30 minutos a 4°C. El extracto celular fue centrifugado a 12209 × *g* por 15 minutos y el sobrenadante conteniendo los componentes citoplasmáticos solubles fue removido y almacenado en hielo. Subsecuentemente, la pastilla celular fue lavada con PBS frío durante tres veces, y fue resuspendida en amortiguador (HEPES 5 mM, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 5 mM, ditiotreititol 5 mM y NaCl 150 mM, a pH7.5) y

centrifugada de nuevo a $12209 \times g$ 15 minutos. La fracción membranal soluble en CHAPS fue removida y almacenada en hielo.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Esta técnica se realizó en una microplaca de cultivo de 96 pozos. Lo primero que obtuvimos fue una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en amortiguador de fosfatos salinos (PBS), esta curva se realizó para cada lote de reactivo de Bradford. Para realizar la curva se colocaron en el primer pozo $10 \mu\text{l}$ de BSA y $310 \mu\text{l}$ de PBS para tener un volumen final de $320 \mu\text{l}$. A partir de los pozos (2 al 6) se colocaron $160 \mu\text{l}$ de PBS y se realizaron diluciones dobles seriadas a partir del primer pozo hasta el sexto pozo, teniendo un volumen final de $160 \mu\text{l}$ en cada uno de los 6 pozos con una concentración de: 5, 2.5, 1.25, 0.312 y $0.156 \mu\text{g}$ de BSA. El séptimo pozo fue utilizado como blanco al cual sólo se agregó $160 \mu\text{l}$ de PBS. Todo esto se realizó por triplicado. A cada pozo se le agregaron $40 \mu\text{l}$ de solución de Bradford 5x (azul de Coomassie G-250, etanol absoluto, ácido ortofosfórico 85% y agua) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Entonces, se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas de ELISA (BioRad Laboratories, Richmond, CA, modelo 550), con los datos que obtuvimos construimos una gráfica estándar de absorbancia-concentración mediante regresión lineal, así como una hoja de cálculo electrónico en el software Excel Microsoft®.

Para determinar la concentración de proteína de las muestras problema, se colocaron de 3 ó $6 \mu\text{l}$ de las fracciones celulares y se llevaron a un volumen final

de 160 μ l de PBS, se adicionaron 40 μ l del reactivo de Bradford 5x y se determinó la lectura como se describió anteriormente. Esta lectura fue procesada con nuestra curva estándar, por medio de la hoja de cálculo, para finalmente obtener la concentración real de nuestra muestra (Bradford, 1976).

Inmunoprecipitación

La interacción de EspF con clatrina y PAUE no ha sido totalmente descrita. Nosotros utilizamos estudios de inmunoprecipitación para determinar si EspF interactúa directamente con clatrina y PAUE. Según la cuantificación en μ g de proteína con el método de Bradford, se utilizaron de manera igualitaria 300 μ g de todas las muestras del fraccionamiento celular (fracción citoplasmática y fracción membranal) y 6 μ g de anticuerpo anti-clatrina hecho en cabra para el ensayo de inmunoprecipitación. Las fracciones se dejaron en interacción con el anticuerpo anti-clatrina toda la noche en agitación suave a 4°C. Posterior a este tiempo, se agregaron a cada una de las muestras 30 μ l de proteína A acoplada a perlas de agarosa (Roche, 11134515001) y se dejaron en interacción durante 3 horas a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 12209 \times g durante un minuto a 4°C en una centrifuga (Hettich, Zentrifugen, modelo Universal 32R) para precipitar el complejo proteína-anticuerpo-agarosa. Las perlas fueron lavadas con 1 ml de amortiguador RIPA y centrifugadas a 12209 \times g durante 1 minuto a 4°C, repitiendo este paso dos veces más. Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de muestra con 5% de β -mercaptoetanol y calentadas a ebullición durante 10 minutos para posteriormente ser utilizadas para análisis de SDS-PAGE o Western blot.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con SDS (en condiciones reductoras). A las proteínas se les agregó amortiguador de muestra con 5% de β -mercaptoetanol y se calentaron a ebullición durante 10 minutos. Las muestras fueron corridas a voltaje constante, el cual inició a 100V para atravesar el gel concentrador durante 10 min y posteriormente aumentamos a 120V durante 1.5 horas para separar a las proteínas. Después de la electroforesis, los geles fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa para su análisis por Western-blot o fueron teñidos con colorante de Fairbanks durante 10 minutos. Al término de la tinción, se retiró el colorante y los geles fueron lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, posteriormente se destiñeron con una solución de metanol, ácido acético y agua hasta que se observaron claramente a las banda de proteínas (Laemmli, 1970).

Western-blots

Las proteínas corridas en SDS-PAGE al 12% fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (BioRad Laboratories, 1620115) de la siguiente manera. En la cámara de transferencia se puso en contacto la membrana de nitrocelulosa con el gel de poliacrilamida y las proteínas fueron transferidas durante 90 minutos a 300 mA a 4°C. Las membranas se retiraron de la cámara y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora en 5% de leche descremada disuelta en PBS con Tween 100 (0.1%) (PBS-T). Posteriormente se agregó el primer anticuerpo diluido en PBS-T con 5% de leche descremada y se incubó a 4°C toda

la noche. Al finalizar, la membrana fue lavada con PBS-T durante 5 ciclos de 20 minutos y se le agregó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido en PBS-T con 5% de leche descremada, el cual fue incubado a temperatura ambiente durante 2 horas. Al término, la membrana fue lavada como se mencionó anteriormente. La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el reactivo ECL (Amersham Bioscience, RPN2190.) y poniendo en contacto a la membrana tratada con ECL con películas Biomax (Kodak, 6040331) durante el tiempo requerido, el revelado se llevó a cabo con revelador (Kodak, 1900943) y fijador (Kodak, 1901859) en condiciones ausentes de luz blanca. Las bandas obtenidas fueron sometidas a estudios de densitometría usando el software libre ImageJ 1.6.0_12. Los datos obtenidos fueron procesados y graficados usando el software SigmaPlot 8.0.

Resultados

Translocación de EspF de EPEC E22wt en células RK13

Para conocer el patrón de translocación de EspF por las cepas EPECwt y EPECΔespF en células RK13, nosotros utilizamos monocapas confluentes no infectadas (cero horas) e infectadas (1, 2 y 3 horas). Las monocapas fueron lavadas con PBS y lisadas con amortiguador RIPA para posteriormente realizar la extracción proteica. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa para utilizarlas en estudios de Westernblot.

EspF fue detectada utilizando anticuerpo primario anti-EspF hecho en ratón y anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Se utilizó como control de carga la detección actina, mediante el uso de un anticuerpo primario anti-actina hecho en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano.

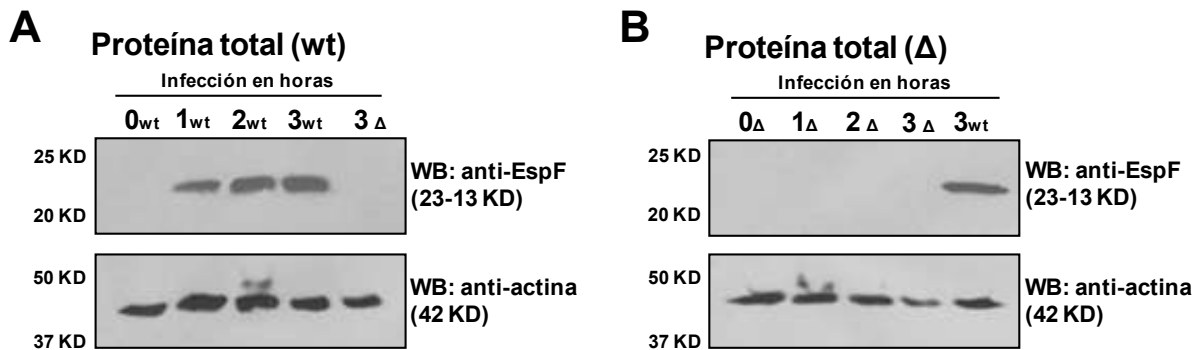


Figura 4. Presencia y ausencia de EspF en células RK13 infectadas con EPEC wt y EPECΔespF respectivamente. Monocapas de células RK13 fueron infectadas con EPECwt y EPECΔespF (MOI=100) a los tiempos indicados. Las células fueron lavadas con PBS y lisadas con amortiguador RIPA para posteriormente llevar a cabo la extracción proteica. Las proteínas fueron separadas por medio de SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa para ser sometidas a estudios de Western blot utilizando anticuerpos anti-EspF y anti-actina (control de carga). (A) Western blot correspondiente a las monocapas infectadas con EPECwt a los tiempos indicados. Se uso como control negativo (3 Δ) una muestra proveniente de las monocapas infectadas durante tres horas con EPECΔespF (B) Westernblot correspondiente a las monocapas infectadas con EPECΔespF a los tiempos indicados. Se uso como control positivo (3wt) una muestra proveniente de las monocapas infectadas con EPECwt.

tiempos indicados. Se uso como control positivo una muestra proveniente de las monocapas infectadas con EPECwt.

En las muestras provenientes de las monocapas infectadas con EPECwt, EspF fue detectada a una hora de infección, con un aumento progresivo en su concentración conforme el tiempo de infección aumentaba (Fig. 4 A). De manera contraria, EspF no fue detectada en las muestras provenientes de las monocapas infectadas con EPEC Δ espF en ningún tiempo de infección (Fig. 4 B). Estos datos muestran tanto la viabilidad del anticuerpo anti-EspF como la capacidad de EPECwt y EPEC Δ espF de translocar o no EspF en las células RK13.

EspF no interacciona con clatrina en ensayos de inmunofluorescencia

Para conocer si EspF interacciona con clatrina en ensayos de infección *in vitro*, nosotros usamos monocapas de células RK13 sin infectar (cero horas) e infectadas (1, 2 y 3 horas) con EPECwt. Pasados estos tiempos, las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunoteñidas. EspF fue detectada utilizando un anticuerpo anti-EspF hecho en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a TRITC. Clatrina fue detectada utilizando un anticuerpo primario anti-clatrina hecho en cabra y un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a FITC. Posteriormente las muestras fueron montadas para realizar las secciones en el plano del eje Z en el microscopio confocal.

En monocapas no infectadas no se detectó EspF dentro de las células (Fig. 5 A-D). En monocapas infectadas con EPECwt durante 1 hora, EspF fue detectada en pequeñas cantidades dentro de las células epiteliales (Fig. 5 E-H). Conforme fue aumentando el tiempo de infección a dos (Fig. 5 I-L) y tres horas (Fig. 5 M-O) se detectó EspF en mayores cantidades dentro del

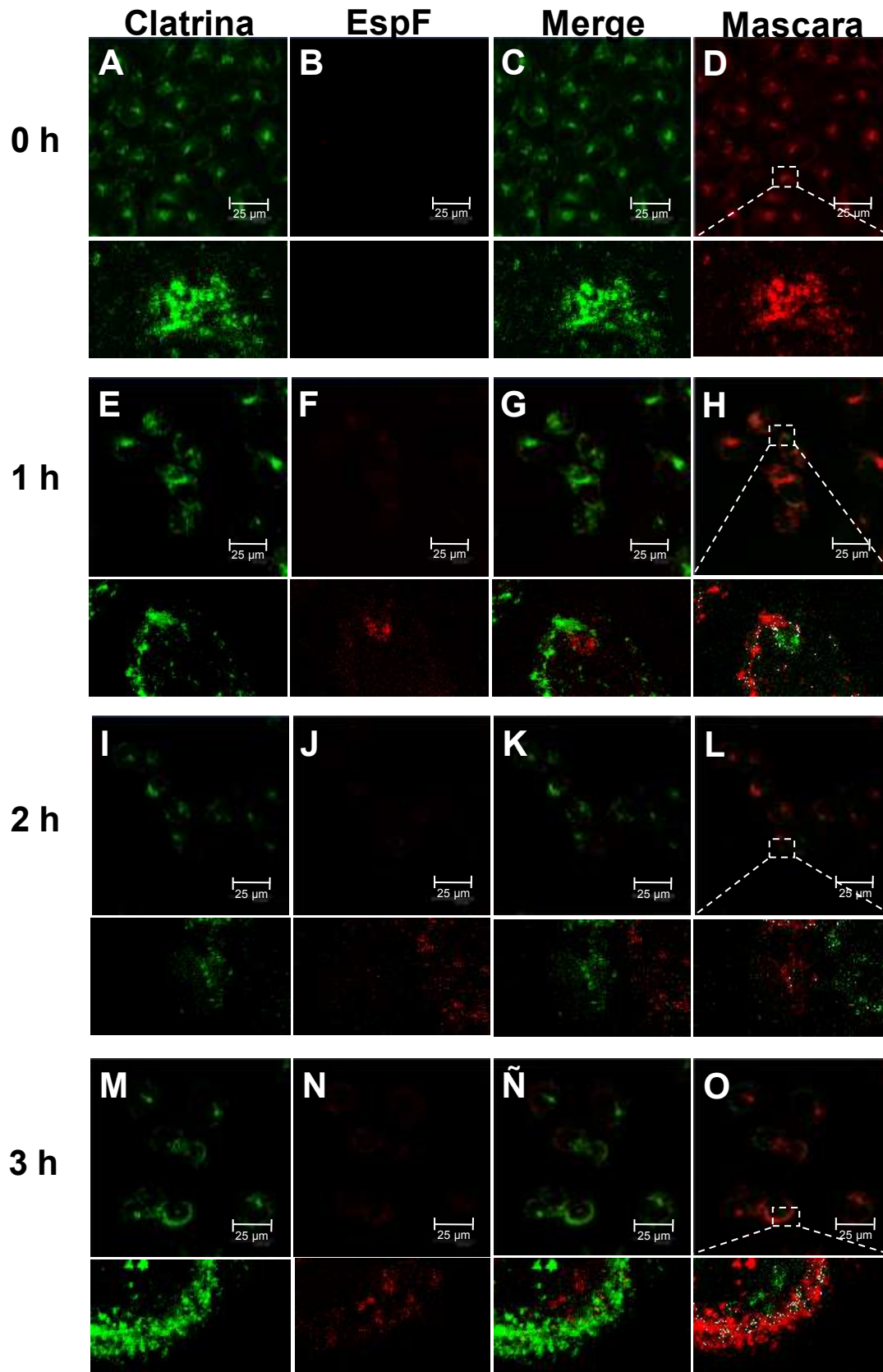


Figura 5. EspF de EPEC y clatrina no interaccionan durante la infección en células RK13. Monocapas de células RK13 fueron infectadas con EPECwt (MOI=100) a los tiempos indicados. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunoteñidas con anti-clatrina y anti-EspF. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal, y las imágenes fueron procesadas y analizadas con los software Leica Lite e ImageJ 1.6.0_12 respectivamente. (A-D) Células sin infección. (E-H) Células infectadas durante una hora. (I-L) Células infectadas durante dos horas. (M-O) Células infectadas durante tres horas. (D, H, L y O) Mascaras de detección de co-localización obtenidas con el software ImageJ. Debajo de cada imagen se encuentra el aumento de un campo determinado de las células.

citoplasma de las células hospederas. Sin embargo, en ninguno de los tiempos de infección fue detectada co-localización entre EspF y clatrina, lo que indica que EspF podría estar interviniendo indirectamente en procesos relacionados a endocitosis mediada por vesículas recubiertas por clatrina sin realizar ninguna interacción con ella.

La infección de células RK13 por EPECwt induce la endocitosis de ocludina mediada por vesículas recubiertas por clatrina en ensayos de inmunofluorescencia

Para determinar si la infección de EPECwt induce la redistribución de la proteína de uniones estrechas ocludina mediante la endocitosis de vesículas recubiertas por clatrina, nosotros utilizamos estudios de inmunofluorescencia. Se usaron monocapas al 95% de confluencia de células RK13 no infectadas (0 horas) e infectadas durante diferentes tiempos (1, 2 y 3 horas) con EPECwt. Las células fueron fijadas, permeabilizadas, teñidas e inmunoteñidas. El citoesqueleto de actina fue teñido utilizando rodamina acoplada a TRITC. Ocludina fue detectada utilizando un anticuerpo anti-occludina hecho en conejo y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a TRITC; cabe mencionar que por la naturaleza policlonal del anticuerpo anti-occludina, este reconoció inespecíficamente el núcleo de las células RK13. Clatrina fue detectada utilizando un anticuerpo anti-clatrina hecho en cabra y un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a Cy5. Posteriormente las muestras fueron montadas para ser observadas en el microscopio confocal.

En monocapas no infectadas (cero horas), ocludina se detectó intacta en la región correspondiente a las uniones estrechas (Fig. 6 A). Por su intervención en el transporte

de otras proteínas del lugar de síntesis a otros lugares de la célula, las vesículas de clatrina se detectaron en mayor cantidad en regiones perinucleares, probablemente en aparato de Golgi, y en menor cantidad en regiones citoplasmáticas cercanas a la periferia de la célula (Fig. 6 B). El citoesqueleto de actina fue observado intacto, con sus características fibras de estrés, además de que el patrón de distribución del citoplasma fue extendido y relajado (Fig. 6C). Interesantemente, se detectó poca actividad de las vesículas de clatrina en las uniones estrechas, además de que la mayoría de las vesículas detectadas en esta área no co-localizaron con ocludina, ni en las uniones estrechas, ni en el citoplasma (Fig. 6 D y E). Este dato probablemente indica que en las células no infectadas, no hay una intervención activa de clatrina en el transporte o endocitosis de ocludina.

En las monocapas infectadas durante una hora, ocludina aun se mantuvo en el área correspondiente a las uniones estrechas, sin embargo, se detectaron pequeños puntos de ocludina en regiones citoplasmáticas cercanas a la periferia de la célula (Fig. 6 F). Clatrina tuvo mayor actividad en regiones cercanas a la periferia de la membrana celular y en el área correspondiente a las uniones estrechas, sin embargo, se siguió detectando en mayor concentración en regiones perinucleares (Fig. 6 G). El citoesqueleto de actina se detectó casi íntegro, sin embargo se detectaron pequeños cúmulos de actina en la parte apical de la célula, lo que indica la formación de pedestales inmaduros y el inicio de la lesión A/E (Fig. 6 H). Cabe mencionar que se detectó un aumento en la cantidad de vesículas que co-localizaron con ocludina en las regiones cercanas a la periferia de la membrana celular, lo que indica que a una hora

de infección se comienza a dar el fenómeno de endocitosis de ocludina mediada por vesículas de clatrina (Fig. 6 I y J).

A dos horas de infección, ocludina se detectó difusa en las uniones estrechas y se comenzó a ver en grandes cantidades en el citoplasma (Fig. 6 K). A este tiempo también se comenzó a detectar mayor cantidad de vesículas recubiertas de clatrina dispersas en regiones cercanas a la periferia de la membrana (Fig. 6 L). En relación al citoesqueleto de actina, este se comenzó a ver afectado por causa de la lesión A/E, ya que las fibras de estrés se presentaron difusas y dañadas con respecto a las células no infectadas, además de que se detectó en la zona apical de las células mayor cantidad de pedestales de mayor tamaño con respecto a los pedestales en células infectadas por una hora (Fig. 6 M). La interacción entre ocludina y clatrina aumentó considerablemente en regiones cercanas a la periferia de la membrana, lo que involucra a clatrina en la endocitosis y el transporte de ocludina durante la infección por EPECwt (Fig. 6 N y Ñ).

En las células infectadas durante tres horas, ocludina prácticamente desapareció de la región correspondiente a las uniones estrechas y fue detectada totalmente dispersa en el citoplasma (Fig. 6 O). En cuanto a clatrina, esta se detectó distribuida en todo el citoplasma de la célula (Fig. 6 P). Durante este tiempo se detectó la presencia de pedestales de actina más grandes con respecto a los demás tiempos de infección.

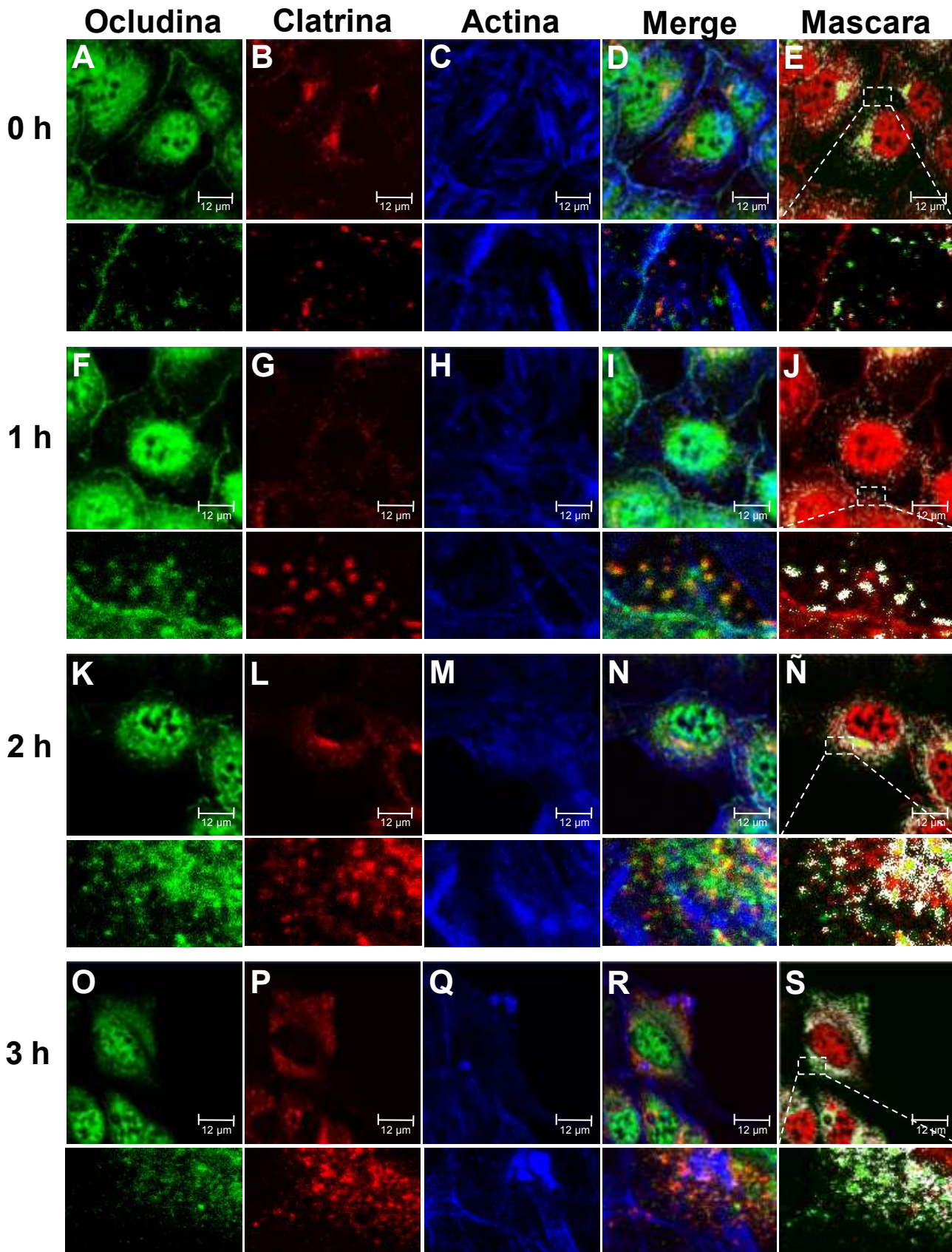


Figura 6. La infección de células RK13 por EPECwt induce el aumento en la endocitosis mediada por clatrina de la proteína ocludina. Monocapas de células RK13 fueron infectadas a los tiempos indicados con EPECwt (MOI=100). Las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunoteñidas con anti-occludina y anti-clatrina, y teñidas con faloidina acoplada a rodamina. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal y las imágenes fueron procesadas con los software Leica Lite e ImageJ 1.6.0_12. Cada imagen tiene debajo el aumento correspondiente a un campo determinado de la célula. (A-E) Células sin infección. (F-J) Células infectadas durante una hora. (K-N) Células infectadas durante dos horas. (O-S) Células infectadas durante tres horas. (E, J, N y S) Mascaras de co-localización realizadas en el software ImageJ 1.6.0_12.

El citoesqueleto de actina se detectó completamente afectado ya que mostró fibras de estrés difusas y dañadas por efecto de la lesión A/E (Fig. 6 Q). La interacción entre ocludina y clatrina fue evidente en el citoplasma. Ocludina se detectó completamente internalizada en vesículas recubiertas por clatrina, sin embargo, la cantidad de vesículas de clatrina que no co-localizaron con ocludina en el citoplasma era mayor con respecto a las células infectadas durante dos horas, lo que podría indicar que durante este tiempo se está llevando a cabo la redistribución de ocludina mediada por clatrina de la región de las uniones estrechas a la estructura tipo pedestal (Fig. 6 R y S).

En la Figura 7. el curso temporal de la infección fue correlacionado con el aumento y

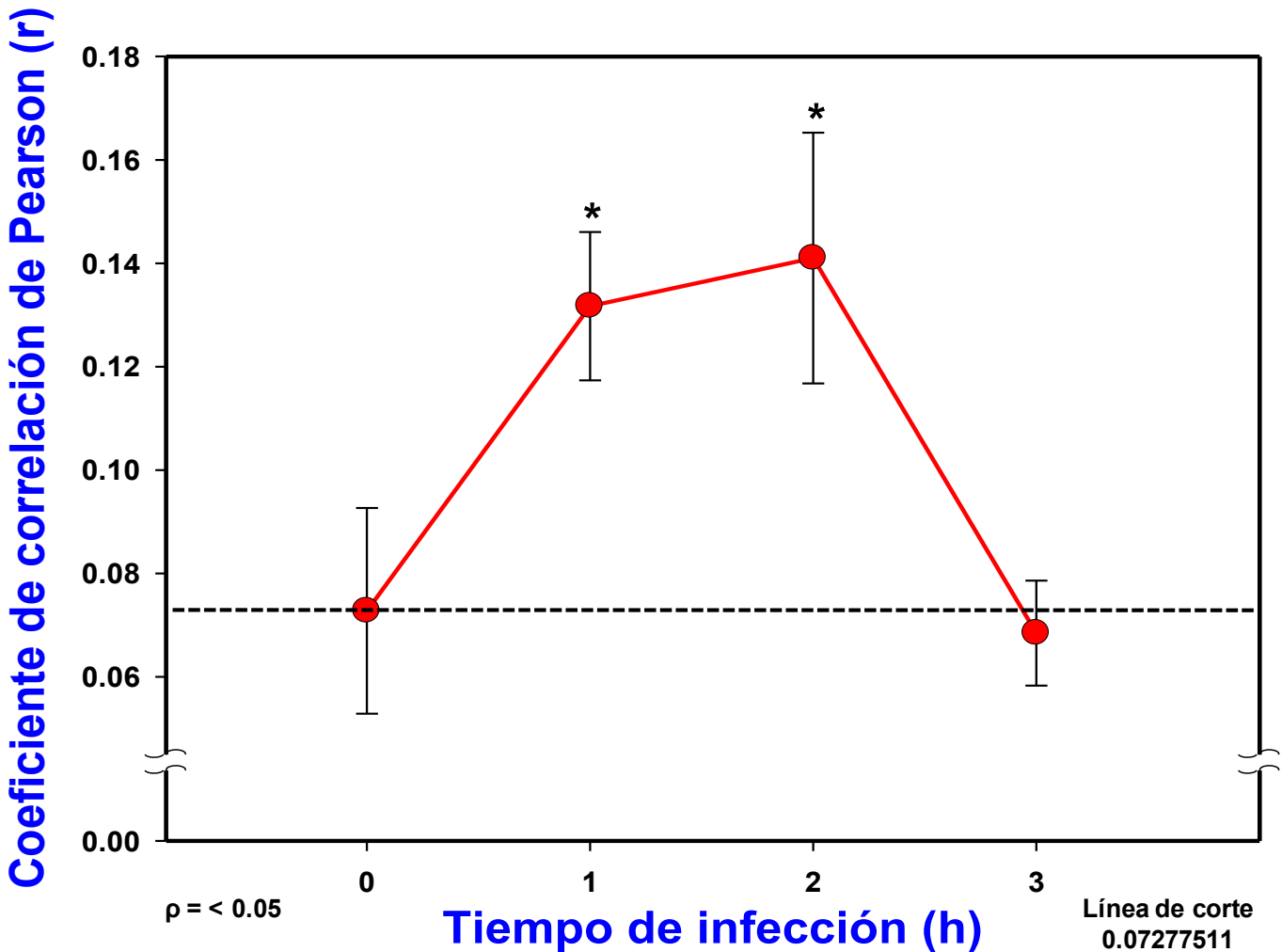


Figura 7. La infección de células RK13 por EPECwt induce el aumento en la interacción entre vesículas recubiertas por clatrina y la proteína de uniones estrechas ocludina en ensayos de inmunofluorescencia. Monocapas confluentes de células RK13 fueron infectadas con EPECwt durante los tiempos indicados en la grafica. El curso temporal de la infección fue correlacionado con el aumento de vesículas de clatrina conteniendo ocludina. Los datos fueron obtenidos usando el software ImageJ versión Java 1.6.0_12. Las barras de error representan la desviación estándar de cinco imágenes tomadas por tiempo de infección. La línea de corte delimita la interacción basal de las dos proteínas. Los datos fueron procesados y graficados en hoja de cálculo usando el software SigmaPlot. ANOVA * $p < 0.05$.

disminución de las vesículas recubiertas por clatrina que co-localizaron con ocludina. Se detectó una interacción basal entre ocludina y clatrina en las monocapas no infectadas. La relación entre estas dos variables aumentó considerablemente a una hora de infección, aumentando un poco más a dos horas de infección, disminuyendo considerablemente a las tres horas de infección. Estos datos sugieren que la infección por E22 induce la endocitosis de ocludina mediado por vesículas recubiertas por clatrina, así como un transporte con un curso temporal, iniciando en las uniones estrechas, y posiblemente finalizando en las estructuras tipo pedestal.

Clatrina interacciona con ocludina y no con EspF en ensayos de inmunoprecipitación

Para corroborar la interacción de ocludina con clatrina durante la infección por EPECwt, nosotros realizamos estudios de inmunoprecipitación. Nosotros usamos monocapas de células RK13 no infectadas (cero horas) e infectadas (1, 2 y 3 horas) con EPECwt. Las células fueron lisadas con amortiguador RIPA y centrifugadas para obtener la fracción citoplasmática. Las pastillas fueron resuspendidas en amortiguador conteniendo CHAPS y centrifugadas para obtener la fracción membranal. Las proteínas de las fracciones fueron separadas a ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo primario anti-clatrina hecho en cabra y proteína A acoplada a agarosa. Los inmunoprecipitados fueron separados por medio de SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser sometidos a estudios de Western blot.

En estos estudios ocludina fue detectada utilizando un anticuerpo primario anti-occludina hecho en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano.

Las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-clatrina fueron detectadas utilizando un anticuerpo primario anti-clatrina hecho en cabra y un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a peroxidasa de rábano. Las bandas obtenidas de cada una de las fracciones fueron sometidas a análisis densitométricos utilizando el software libre ImageJ 1.6.0_12. Las bandas correspondientes a las cadenas ligeras del anticuerpo fueron utilizadas para ajustar los datos y ser graficados utilizando hojas de cálculo del software SigmaPlot 8.0. Simultáneamente, se quiso detectar si existía alguna interacción entre EspF y clatrina. Para esto se utilizó un anticuerpo primario anti-EspF hecho en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano.

La interacción basal entre ocludina y clatrina en el citoplasma fue detectada a cero horas de infección. Se vio un pequeño aumento en la interacción entre estas dos proteínas a una hora de infección. Interesantemente, a dos horas de infección, la interacción aumentó considerablemente con respecto a las muestras obtenidas a cero y una hora de infección. La interacción detectada a tres horas fue muy parecida a las muestras obtenidas a dos horas de infección (Fig. 8 A y B).

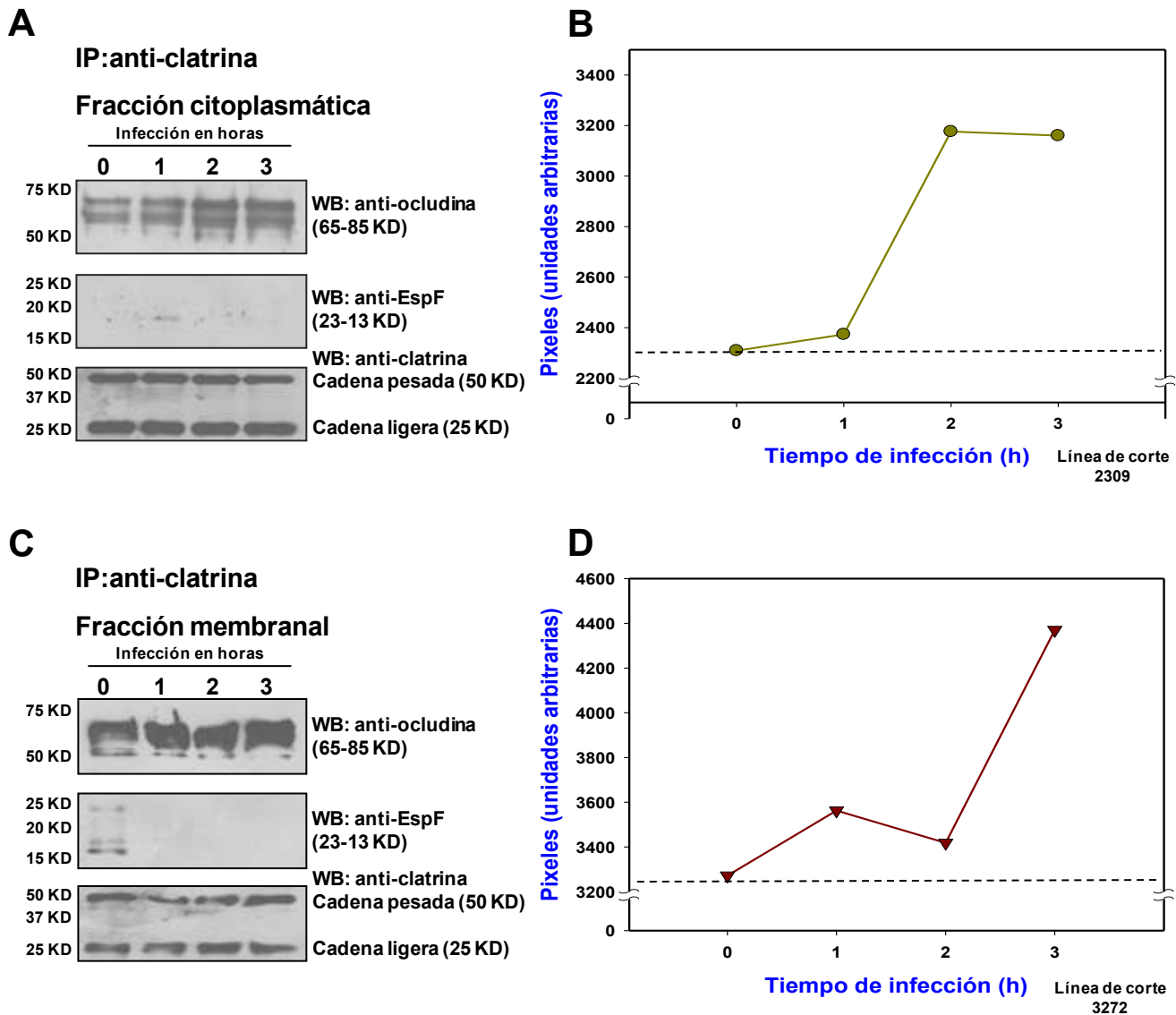


Figura 8. Interacción de ocludina con clatrina en células RK13 en infección con EPECwt. Monocapas de Células RK13 fueron infectadas con EPECwt a los tiempos indicados. Las células fueron lisadas con amortiguador RIPA, y los lisados fueron centrifugados hasta obtener la fracción citoplasmática. Las pastillas fueron resuspendidas en amortiguados conteniendo CHAPS y centrifugadas para obtener la fracción membranal. Las fracciones fueron sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-clatrina. Los inmunoprecipitados fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser sometidas a estudios de Western blot usando anticuerpos anti-occludina, anti-EspF y anti-clatrina. Las bandas correspondientes a ocludina fueron sometidas a análisis de densitometría y los datos fueron ajustados con los datos de las cadenas ligeras del anticuerpo usado para inmunoprecipitar. Los datos de densitometría fueron obtenidos con el software ImageJ 1.6.0_12. (A) Western blot correspondiente a la fracción membranal. (B) Gráfica de los datos de densitometría correspondiente al Western blot de la fracción membranal medidos en píxeles (unidades arbitrarias). (C) Western blot correspondiente a la fracción citoplasmática. (D) Gráfica de los datos de densitometría correspondientes al Western blot de la fracción citoplasmática medidos en píxeles (unidades arbitrarias). Las líneas de corte indican la interacción basal entre las dos proteínas.

Las líneas de corte indican la interacción basal entre las dos proteínas.

De igual manera, ocludina y clatrina interaccionaron de manera basal en la membrana a cero horas de infección. A una hora de infección, se detectó un pequeño aumento en esta interacción, para disminuir a dos horas, casi al nivel de la interacción basal. Sin embargo, a tres horas de infección, se detectó un aumento considerablemente mayor

con respecto a los demás tiempos (Fig. 8 C y D). Cabe mencionar que EspF no fue detectada en interacción con clatrina en ningún tiempo de infección en las dos fracciones.

Para ser comparados, los datos densitométricos obtenidos de las dos fracciones fueron graficados conjuntamente (Fig. 9 A). Utilizando un software de diseño, se realizaron dibujos interpretativos de los posibles eventos que involucran a clatrina en la

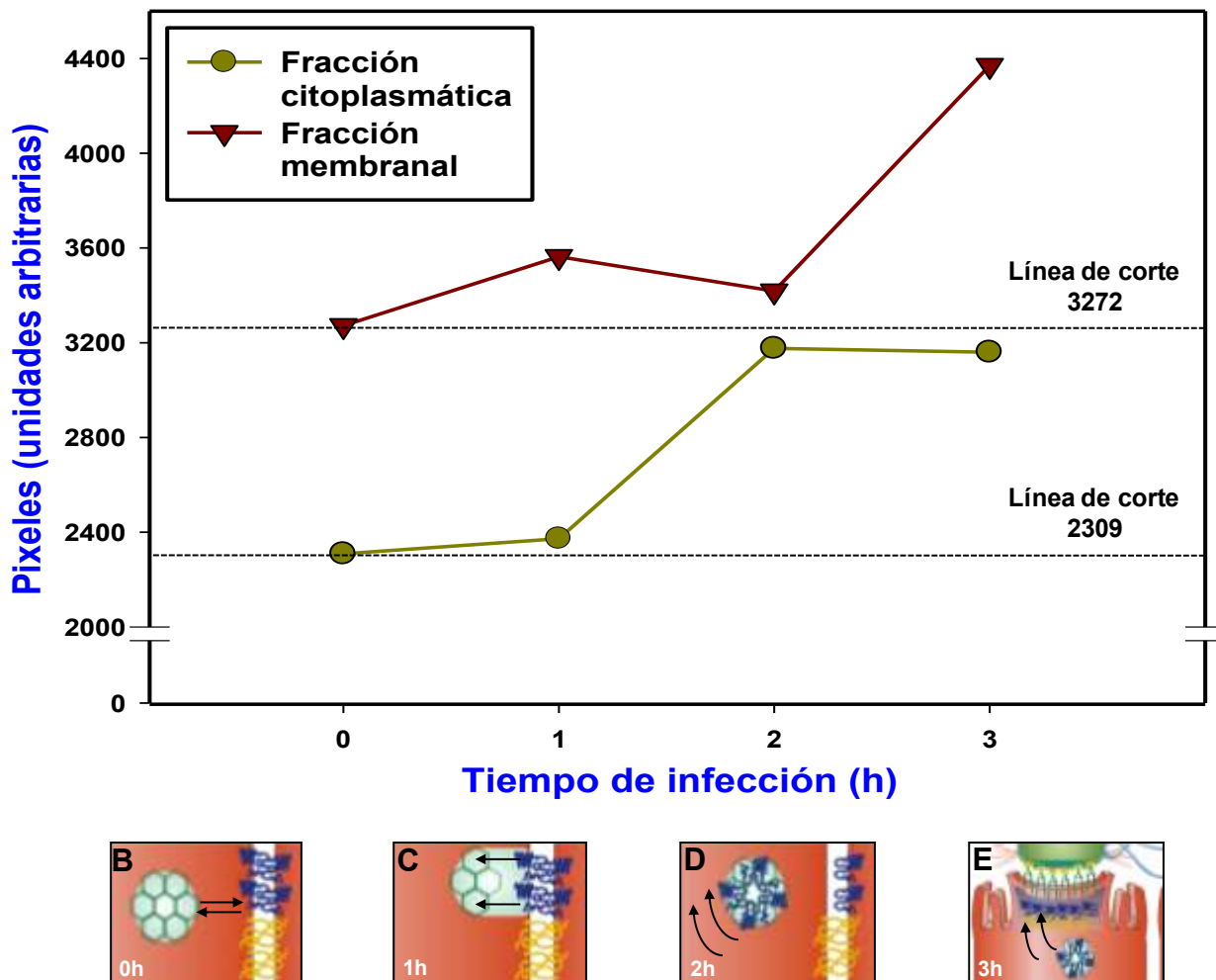


Figura 9. Comparación de las cinéticas de interacción entre ocludina y clatrina en las fracciones celulares. (A) Gráfica comparativa de las cinéticas de interacción en membrana (línea azul claro) y citoplasma (línea azul oscuro) entre ocludina y clatrina en los tiempos indicados en la gráfica. Los posibles eventos en cada tiempo están representados por un dibujo debajo de cada tiempo, donde a tiempo cero de infección, existen vesículas recubiertas por clatrina que no contienen en su interior ocludina (B). La interacción de ocludina y clatrina en la membrana aumenta un poco a 1 h de infección, de igual manera que en el citoplasma (C). Esta interacción disminuye en la membrana para aumentar en el citoplasma a 2 h de infección, lo que indica el desprendimiento total en la membrana de las vesículas maduras transportando ocludina en su interior, para pasar al citoplasma (D). A 3h de infección la interacción se mantiene en el citoplasma, sin embargo, aumenta progresivamente en la membrana, lo que indica la unión a la membrana de las vesículas conteniendo ocludina, posiblemente en la región donde se encuentra el pedestal (E).

endocitosis y transporte de ocludina, los cuales podrían estar sucediendo a lo largo de la infección por EPECwt.

En el tiempo cero de infección se describe una interacción basal entre ocludina y clatrina dada por el transporte vesicular retrógrado y anterogrado de ocludina (Fig. 9 B). Durante las etapas de infección, se describe después de una hora, un aumento en membrana de vesículas tempranas conteniendo ocludina en su interior (Fig. 9 C), lo que lleva a la endocitosis completa de ocludina de las uniones estrechas (Fig. 9 D), y su transporte a la estructura tipo pedestal. (Fig. 9 E).

Estos datos indican que la infección por E22wt induce un aumento en la endocitosis vesicular de ocludina mediado por clatrina, y proponen un fenómeno de transporte de las uniones estrechas, al pedestal.

La cepa EPEC Δ espF no induce la endocitosis de ocludina mediada por clatrina en ensayos de inmunofluorescencia

Los datos anteriores indicaron que la infección de células RK13 por EPECwt induce un aumento elevado en la endocitosis de ocludina vía vesículas recubiertas por clatrina a una hora de infección, para decaer dramáticamente a tres horas de infección. Sin embargo, hasta esta parte de la tesis, EspF no ha sido involucrada en este proceso.

Para determinar si EspF está interviniendo indirectamente en la endocitosis vesicular de ocludina mediada por clatrina, nosotros utilizamos estudios de inmunofluorescencia. Utilizamos monocapas al 95% de confluencia de células RK13 no infectadas (tiempo cero de infección) e infectadas durante diferentes tiempos (1, 2 y 3 horas) con

EPEC Δ espF. Las células fueron fijadas, permeabilizadas, teñidas e inmunoteñidas. El citoesqueleto de actina fue teñido utilizando rodamina acoplada a TRITC. Ocludina fue detectada utilizando un anticuerpo anti-occludina hecho en conejo y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a TRITC. Clatrina fue detectada utilizando un anticuerpo anti-clatrina hecho en cabra y un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a Cy5. Posteriormente las muestras fueron montadas para ser observadas en el microscopio confocal.

Las monocapas no infectadas mostraron la mayor concentración de ocludina restringida a las uniones estrechas, y una interacción basal entre ocludina y clatrina fue detectada, sin embargo, esta interacción fue ubicada en regiones perinucleares, posiblemente en aparato de Golgi. Sin embargo, se detectaron vesículas que no contenían en su interior ocludina, posiblemente involucradas en el transporte de otras proteínas. La ubicación de clatrina fue casi restringida a regiones perinucleares ya que casi no se detectaron vesículas en regiones citoplasmáticas cercanas a la periferia de la membrana. Cabe mencionar que el citoesqueleto de actina se detectó intacto, con sus características fibras de estrés (Fig. 10 A-E).

Interesantemente, esta dinámica de clatrina durante la infección por EPEC Δ espF se mantuvo casi constante a una hora de infección. Ocludina fue detectada en su mayoría en la región correspondiente a las uniones estrechas, lo que indica que estas seguían intactas. El citoesqueleto de actina se detectó casi integro, sin embargo, se vieron pequeños cúmulos de actina correspondientes a pedestales en desarrollo (Fig. 10 F-J).

A dos horas de infección, se detectó un aumento en la interacción entre ocludina y clatrina, sin embargo, la mayor concentración de ocludina siguió restringida a las uniones estrechas. En este punto de la infección, se comenzó a detectar el deterioro del citoesqueleto de actina y una cantidad mayor de pedestales (Fig. 10 K-Ñ).

Las células infectadas durante tres horas aun mostraron la mayor concentración de ocludina en el área de las uniones estrechas. Sin embargo, la interacción entre ocludina y clatrina fue similar a las células infectadas durante dos horas. En cuanto al citoesqueleto de actina, las fibras de estrés se muestran dañadas por la infección, además de que se detectó mayor cantidad de pedestales (Fig. 10 O-S), los cuales son más pequeños con respecto a las células infectadas por tres horas con EPECwt (Fig. 6 O-S).

Para dar representatividad al estudio, se tomaron cinco imágenes por cada uno de los tiempos de infección. En cada una de las imágenes se midió la co-localización entre ocludina y clatrina utilizando el software libre ImageJ 1.6.0_12. Mediante el software SigmaPlot se determinó el promedio y la desviación estándar de los datos por cada uno de los tiempos para posteriormente ser graficados.

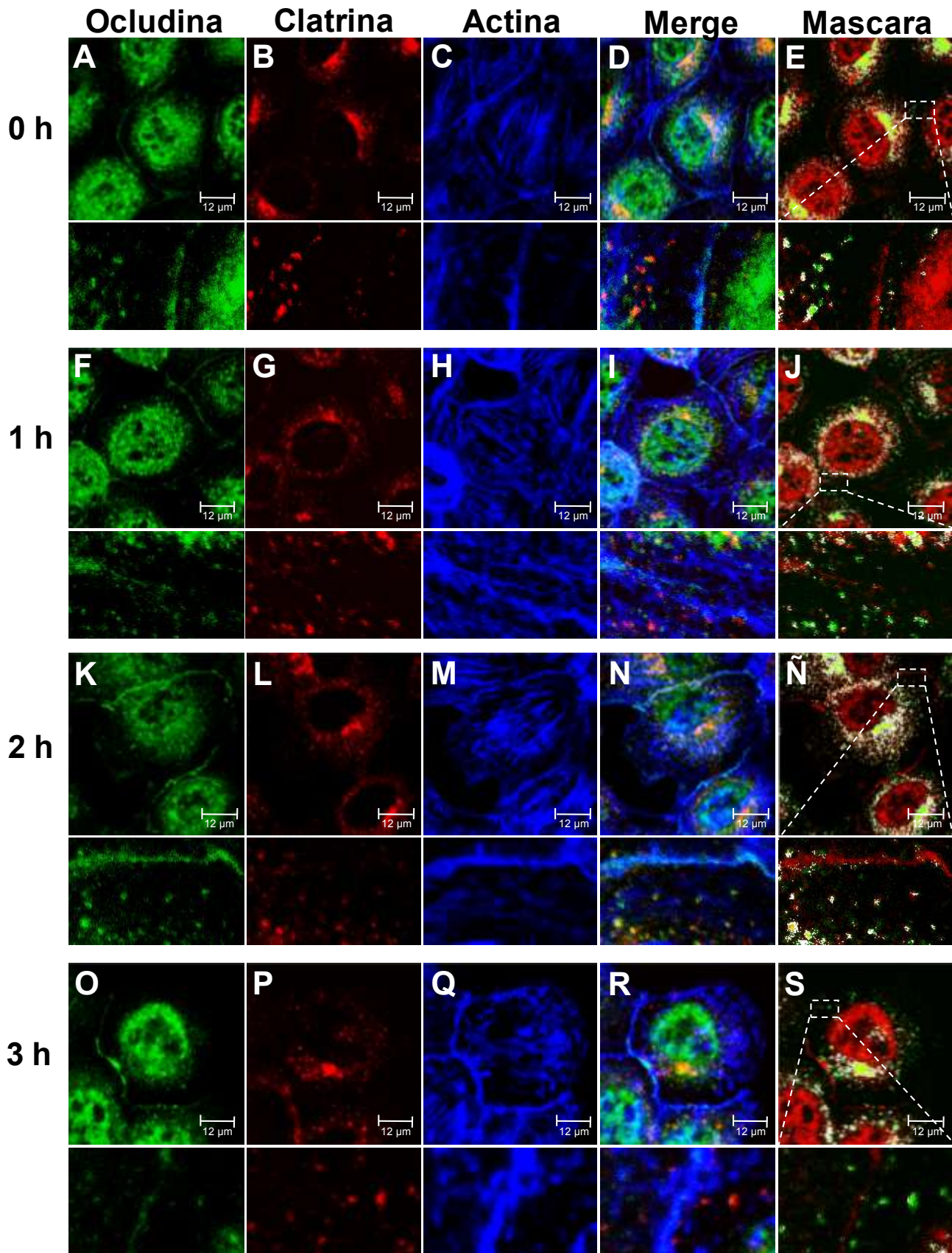


Figura 10. La infección de células RK13 por EPECΔespF no induce el aumento en la endocitosis de ocludina mediada por clatrina. Monocapas de células RK13 fueron infectadas a los tiempos indicados con EPECΔespF (MOI=100). Las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunoteñidas con anti-occludina y anti-clatrina, y teñidas con faloidina acoplada a rodamina. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal y las imágenes fueron procesadas con los software Leica Lite e ImageJ 1.6.0_12. Cada imagen tiene abajo el aumento correspondiente a un campo determinado de la célula. (A-E) Células sin infección. (F-J) Células infectadas durante una hora. (K-Ñ) Células infectadas durante dos horas. (O-S) Células infectadas durante tres horas. (E, J, Ñ y S) Mascaras de co-localización realizadas en el software ImageJ 1.6.0_12.

La Figura 11 muestra el curso temporal de la infección correlacionado con el aumento de las vesículas recubiertas por clatrina que co-localizaron con ocludina. Una interacción basal entre ocludina y clatrina fue detectada en las monocapas no infectadas. A una hora de infección, la interacción entre estas dos proteínas fue similar a la interacción basal, esta interacción aumentó a las dos horas, aun cuando fue menor al aumento observado con la cepa wild type, y se mantuvo constante a las tres horas. Estos datos sugieren que EspF juega un papel relevante en inducir la endocitosis de proteínas de uniones estrechas importantes para la maduración de los pedestales de actina.

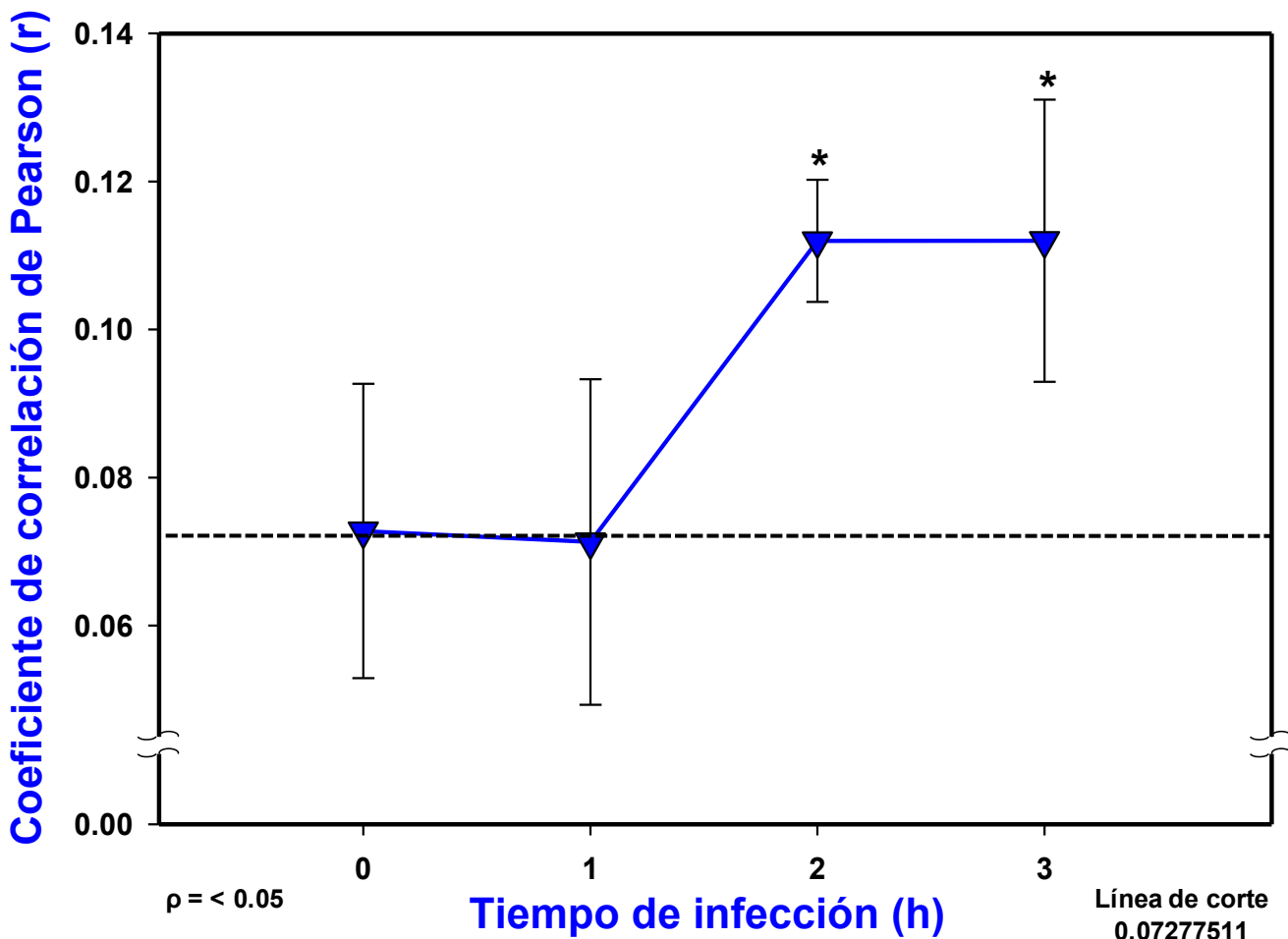


Figura 11. La infección de células RK13 por EPECΔespF induce un mal funcionamiento en la interacción entre ocludina y clatrina. Monocapas confluentes de células RK13 fueron infectadas con EPECΔespF durante los tiempos indicados en la grafica. El curso temporal de la infección fue correlacionado con el aumento de vesículas de clatrina conteniendo ocludina. Los datos fueron obtenidos usando el software ImageJ versión Java 1.6.0_12. Las barras de error representan la desviación estándar de cinco imágenes tomadas por tiempo de infección. La línea de corte indica la interacción basal entre las dos proteínas. Los datos fueron procesados y graficados en hoja de cálculo usando el software SigmaPlot 8.0. ANOVA * $\rho = >0.05$.

Las cinéticas (valor en coeficiente de correlación de Pearson) de las células en infección con las dos cepas (la wild type y la mutante en *espF*) fueron graficados conjuntamente (Fig. 12). Las diferencias en el comportamiento en cada una de las cinéticas son notables. En las cinética correspondiente a la cepa EPECwt, se muestra un comportamiento parecido a una campana de gauss, donde hubo una interacción basal en el tiempo cero de infección, la cual aumentó a una la hora y se mantuvo así hasta las dos horas, para decaer dramáticamente casi a niveles basales a las tres horas de infección.

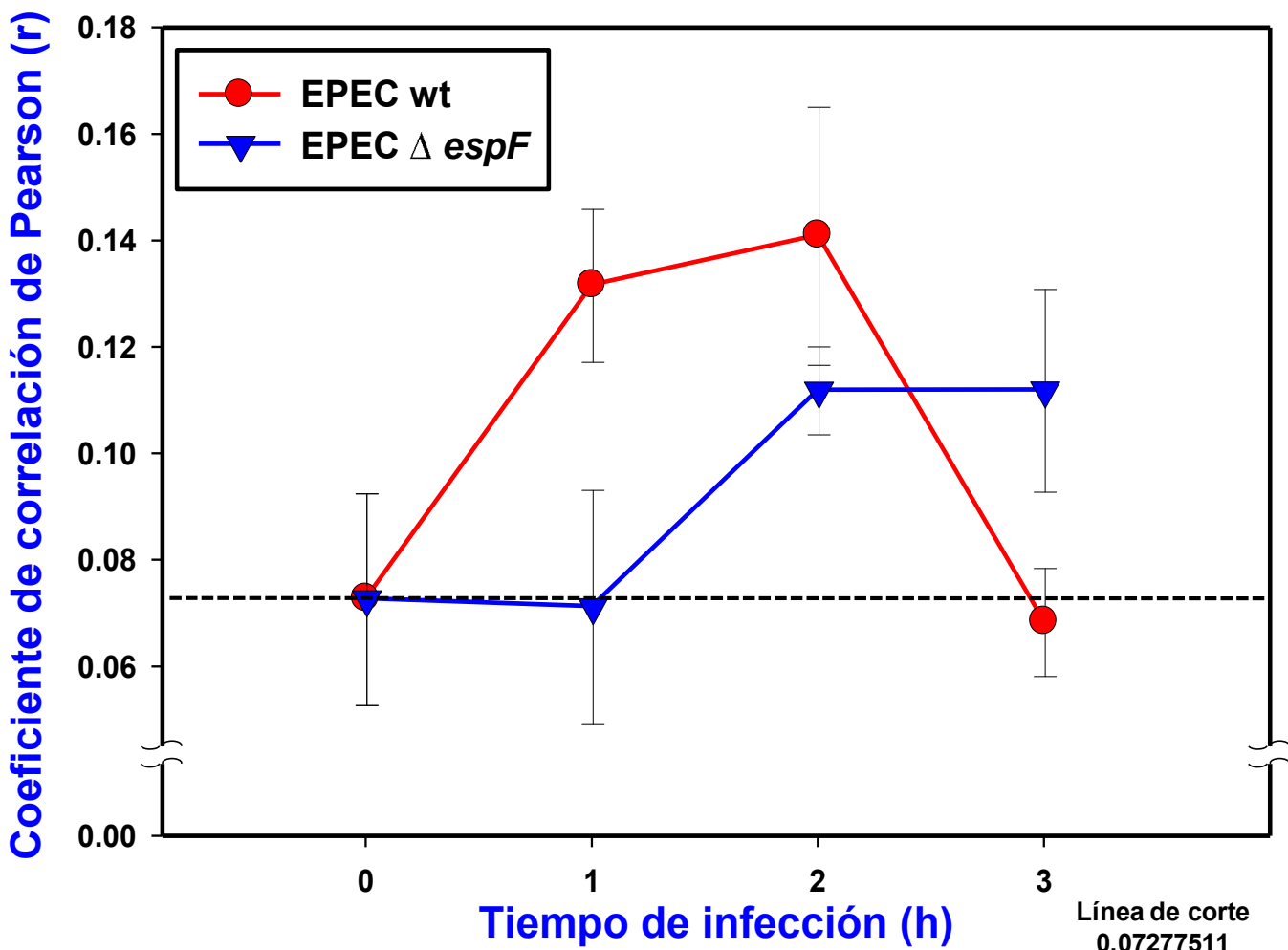


Figura 12. El aumento a tiempos cortos en la interacción entre ocludina y clatrina depende de la translocación de EspF en las células. Los datos obtenidos (r) mediante el software ImageJ versión Java 1.6.0_12 de la interacción entre ocludina y clatrina fueron graficados. La línea roja representa las células infectadas con EPECwt, mientras que la línea azul representa las células infectadas con EPEC Δ *espF*. Las barras de error representan la desviación estándar de cinco imágenes tomadas por tiempo de infección. La línea de corte indica la interacción basal entre las dos proteínas. Los datos fueron procesados y graficados en hoja de cálculo usando el software SigmaPlot 8.0.

procesados y graficados en hoja de cálculo usando el software SigmaPlot 8.0.

A diferencia cepa wt, la cinética de la cepa EPEC Δ espF mostró un retraso en el aumento en la interacción de ocludina y clatrina, detectándose este comportamiento hasta las dos horas y manteniéndose durante tres horas de infección. Este posible retraso podría ser debido a que la cepa EPEC Δ espF es mutante solo en el gen *espF* y no en los demás efectores bacterianos los cuales siguen afectando la fisiología natural de la célula. Cabe mencionar que varios de los efectores translocados interaccionan con la maquinaria de polimerización de actina, lo que induce el deterioro de las uniones estrechas y la posible endocitosis de las proteínas que las integran, ya que estas estructuras son dependientes de la integridad del citoesqueleto de actina.

Discusión

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es una de las causas frecuentes de diarrea que afecta principalmente a niños de países en vías de desarrollo como el nuestro (Clarke *et al.*, 2003; Flisser *et al.*, 2002; Kap er *et al.*, 2004). Un evento trascendental en la infección es que la bacteria transloca, mediante el sistema de secreción tipo III (SSTIII), proteínas efectoras al citosol. La función de cada una de estas proteínas efectoras puede variar; sin embargo, generalmente alteran de alguna manera funciones importantes a nivel intracelular (Kenny and Finlay, 1995; Donnenberg *et al.*, 1997).

Una de las proteínas efectoras translocada mediante el SSTIII es EspF. En nuestro laboratorio se ha demostrado que EspF juega un rol importante en la destrucción de la barrera intestinal, interviniendo en la pérdida de la resistencia transepitelial, por

incrementar la permeabilidad de la monocapa y por la redistribución de las proteínas asociadas a las uniones estrechas, ocludina, claudina 1, ZO1 y ZO2 (McNamara *et al.*, 2001; Peralta *et al.*, 2008).

En este trabajo encontramos que la proteína EspF induce la endocitosis de la proteína de uniones estrechas ocludina, un proceso que es mediado por vesículas recubiertas de clatrina. Sin embargo, demostramos que EspF no interacciona directamente con ninguna de las proteínas antes mencionadas, lo que podría indicar que el proceso de endocitosis de ocludina es indirectamente dependiente de la translocación de EspF.

EspF no interacciona con clatrina directamente

Los patógenos microbianos explotan procesos normales de las células hospederas para crear nichos especializados, los cuales proveen una mayor probabilidad de sobrevivencia para ellos. Algunos de estos patógenos fabrican proteínas efectoras que son capaces de imitar algunas proteínas de la maquinaria del citoesqueleto de actina de las células hospederas, de tal manera que realizan una gran variedad de funciones, dentro de las cuales incluyen la motilidad basada en actina, la invasión celular y el tráfico intracelular a través de vías de endocitosis (Gruenheid y Finlay, 2003).

Una de las proteínas esenciales en la regulación del citoesqueleto de actina es N-WASP (Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein), la cual es una proteína eucarionte que provoca el enraizamiento y ensamblaje de los filamentos de actina a través de la activación directa del complejo proteico Arp2/3. Estudios recientes han indicado que N-

WASP está íntimamente asociada como mecanismos de endocitosis (Kaksonen *et al.*, 2006), un proceso celular que interviene en la absorción de componentes extracelulares incluyendo patógenos microbianos (Veiga and Cossart, 2006). Todas las células eucariotas han demostrado por lo menos dos vías de endocitosis: las vías dependientes de clatrina y las vías independientes de clatrina. La formación de vesículas recubiertas por clatrina ocurre a través de la interacción de proteínas citoplasmáticas con componentes de la membrana. La remodelación de la membrana durante la endocitosis requiere de la interacción coordinada de varios tipos de fosfolípidos y de proteínas de unión a actina. Un ejemplo de estas proteínas es SNX9 (sorting nexin 9), la cual es reclutada en vesículas recubiertas por clatrina en estados tardíos en la formación de la vesícula (Lundmark, 2004).

Dentro de las proteínas efectoras bacterianas que interaccionan con la maquinaria del citoesqueleto de actina se encuentra EspF. Se ha reportado que EspF coordina la remodelación de la membrana eucarionte y la polimerización de F-actina durante la infección por EPEC. EspF se une a los dominios SH3 de SNX9 induciendo la remodelación de la membrana, un fenotipo que está funcionalmente relacionado con la polimerización de actina dependiente de la interacción con N-WASP (Peralta *et al.*, 2008). Se ha demostrado también que EspF interacciona dinámicamente con vesículas recubiertas por clatrina en estudios de fluorescencia en células vivas (Alto *et al.*, 2007). La dinámica coordinada de estas tres interacciones propone que EspF induce la formación de vesículas utilizando esta vía de endocitosis.

Aunque se ha reportado anteriormente que existe la interacción entre EspF y clatrina en células vivas, en este trabajo encontramos que EspF no interacciona con clatrina en

células infectadas por EPEC. La contradicción en los resultados obtenidos podría deberse al tipo de experimentos realizados por los distintos grupos de trabajo, así como por las distintas líneas celulares y las cepas utilizadas en los experimentos. Sin embargo, la interacción que tiene EspF con las proteínas SNX9 y N-WASP propone que esta proteína bacteriana puede estar sirviendo como conector de las dos vías celulares, comunicando la vía relacionada a la polimerización de actina por medio de la interacción con N-WASP, con la vía de endocitosis mediada por clatrina por medio de la interacción con SNX9, de esta manera induciendo la endocitosis independiente de la interacción directa de EspF con clatrina (Alto *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2008).

El uso de bases de datos ha demostrado que ortólogos de EspF han sido encontrados en un grupo de patógenos A/E, dentro de los que se encuentran EPEC, EHEC y *Citrobacter rodentium*. EspF está compuesta de secuencias de péptidos repetidos de 47 aminoácidos ricos en prolina, los cuales se repiten varias veces a lo largo de la secuencia de EspF. Aunque los péptidos varían entre los ortólogos de EspF en los patógenos A/E, no existe ningún caso donde los péptidos se encuentren en una sola copia. Además, EHEC O157:H7 posee otra proteína con péptidos ricos en prolina llamada EspFu/TccP, la cual comparte un 35% de homología con EspF (Alto *et al.*, 2007).

El alineamiento de las secuencias de los ortólogos de EspF y EspFu ha revelado que estas proteínas comparten dominios muy conservados de unión a SNX9 y N-WASP (Alto *et al.*, 2007). La región que interactúa con N-WASP es un motivo de 17 aminoácidos que se encuentra en cada uno de los péptidos ricos en prolina. Este

motivo compite con el motivo WCA, el cual está involucrado en la autoinhibición de N-WASP en el proceso de polimerización de actina, de tal manera que actúa como un activador de N-WASP para llevar a cabo la polimerización de actina en el pedestal. Dentro del motivo de 17 aminoácidos de EspFu, se detectaron una valina y dos leucinas, 3 aminoácidos hidrofóbicos cruciales en la interacción con el motivo de autoinhibición GBD de N-WASP (Sallee *et al.*, 2008).

Un alineamiento de las secuencias de los ortólogos de EspF y EspFu realizado por nuestro grupo de trabajo (Dato no mostrado) reveló que EspF de EPEC contiene dentro de sus repetidos ricos en prolina un motivo de 17 aminoácidos similar al que utiliza EspFu para eliminar la autoinhibición de N-WASP, con una diferencia en un cambio sinónimo de una valina por una leucina. Este dato indica que EspF podría utilizar ese motivo de 17 aminoácidos para interactuar con N-WASP y romper su autoinhibición. Esta interacción, aunada con la interacción que tiene EspF con SNX9 indica de qué manera EspF podría estar interviniendo en la endocitosis mediada por clatrina uniéndose a los dominios SH3 de SNX9 y al dominio CRIB de N-WASP.

EspF induce la redistribución de ocludina mediante vesículas recubiertas por clatrina

EPEC es un patógeno que produce diarrea en países en vías de desarrollo. Es una bacteria Gram-negativa que estimula la formación de lesiones A/E para promover la colonización del intestino, provocando daño en el epitelio induciendo de esta manera diarrea acuosa (Kaper *et al.*, 2004). Para llevar a cabo este proceso, EPEC transloca

proteínas efectoras dentro de la célula epitelial vía sistema de secreción tipo III (Garmendia *et al.*, 2005). Una de estas proteínas efectoras es EspF, la cual ha mostrado un papel principal en la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) y en el deterioro de las uniones estrechas del epitelio intestinal (Shifflett *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2008).

Como evidencia de que EPEC rompe la arquitectura de las uniones estrechas, se ha reportado que la infección por esta bacteria provoca varios efectos fisiológicos en la arquitectura de monocapas confluentes de células epiteliales, algunos de estos efectos son la pérdida en las interacciones proteína-proteína en las uniones estrechas, la redistribución de las proteínas de uniones estrechas, así como la aparición de uniones estrechas aberrantes en la membrana lateral de células epiteliales (Muza-Moons *et al.*, 2004). Aunque el mecanismo por el cual EspF perturba las funciones de la barrera intestinal *in vitro* no ha sido definido, es bien sabido que las cepas deficientes en el gen *espF* no provocan los efectos fisiológicos antes mencionados, lo que indica una dependencia de EPEC a EspF para realizar dichos procesos (Peralta *et al.*, 2008).

Una de las características principales de la infección por EPEC es la redistribución de las proteínas de uniones estrechas ocludina y claudina-1. Estas proteínas son internalizadas y redistribuidas de la región correspondiente a las uniones estrechas hacia la estructura tipo pedestal, lo que provoca una pérdida en la TER, así como la aparición de uniones estrechas aberrantes. Varios grupos de trabajo han reportado que este proceso es dependiente del gen *espF*, ya que el uso de mutantes isogénicas en este gen no producen dicho proceso (Garmendia *et al.*, 2005; Muza-Moons *et al.*, 2004; Shifflett *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2008).

Ocludina es una de las proteínas afectadas por la infección de EPEC. Esta es una proteína transmembranal que está compuesta de cuatro dominios transmembranales con dos dominios extracelulares en forma de pasador. El primer pasador tiene la característica principal de contener un 60% de residuos de glicina y tirosina. Esta proteína es un componente integral del complejo proteico de las uniones estrechas que regulan la integridad epitelial y la función de la barrera paracelular (Tsukita *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 2005; Benítez *et al.*, 2007; Niessen, 2007; Brandner, 2009). Al ser una proteína transmembranal, ocludina requiere de un medio de transporte vesicular para ser trasladada del aparato de Golgi a la región correspondiente a las uniones estrechas. Se ha descrito que la especificidad en el transporte de ocludina de su lugar de síntesis y maduración al complejo multiproteico de las uniones estrechas, está relacionado con su dominio C-terminal, sin embargo, este mecanismo no ha sido totalmente descrito (Matter and Balda, 1998; Subramanian *et al.*, 2007).

A pesar de que las uniones estrechas están organizadas complejamente, estas no son estructuras estáticas, por lo cual pueden desensamblarse y reorganizarse rápidamente en respuesta a varios estímulos extracelulares. La internalización de las proteínas de uniones estrechas es un mecanismo común para la regulación de la adhesión célula-célula, lo que permite remodelar las uniones intracelulares. Uno de los mecanismos que ha sido involucrado en varias líneas celulares para la internalización de las proteínas de uniones estrechas es la endocitosis constitutiva. La internalización (endocitosis) de las proteínas de uniones estrechas, ocludina y claudina, es también inducida por varios estímulos patofisiológicos, los cuales incluyen citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo, así como productos bacterianos (Ivanov *et al.*, 2004).

En la actualidad el mecanismo por el cual son endocitadas algunas de las proteínas de uniones estrechas incluyendo a ocludina, ha sido pobremente descrito. Varios estudios examinando las vías de internalización de esta proteína en diferentes líneas celulares han sugerido la participación de la endocitosis mediada por clatrina (Ivanov *et al.*, 2004; Morimoto *et al.*, 2005), así como la vía mediada por caveolina (Akhtar and Hotchin 2001; Shen and Turner, 2005).

La internalización y redistribución de la proteína ocludina por la infección por EPEC dependiente de EspF es un proceso reportado por varios grupos de trabajo, sin embargo la vía por la cual esta proteína es endocitada no ha sido descrita aun. En este estudio proponemos que la proteína ocludina es endocitada por la vía mediada por vesículas recubiertas por clatrina. Para tomar en cuenta este criterio, nos basamos en la interacción reportada por Alto *et al.* en 2007 entre EspF de EPEC y clatrina.

Nosotros realizamos estudios de inmunofluorescencia, en los cuales se detectó una interacción basal entre ocludina y clatrina en células no infectadas, probablemente en el aparato de Golgi debido al transporte anterógrado que conlleva al procesamiento, transporte y reciclado de ocludina (Ivanov *et al.*, 2004; Morimoto *et al.*, 2005). Las células infectadas por una y dos horas mostraron un aumento en la interacción entre ocludina y clatrina en la región correspondiente a las uniones estrechas y en el citoplasma, lo que refuerza la hipótesis acerca de la internalización y redistribución de ocludina causada por la infección por EPEC (Garmendia *et al.*, 2005; Muza-Moons *et al.*, 2004; Shifflett *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2008). Sin embargo se detectó una

disminución en la interacción entre estas dos proteínas en el citoplasma y en las uniones estrechas a tres horas de infección. Esta cinética de infección podría estar indicando un posible fenómeno de transporte de ocludina mediado por clatrina, el cual podría iniciar en las uniones estrechas, pasando por el citoplasma, y finalizando en la estructura tipo pedestal. Este fenómeno de transporte fue propuesto por Peralta *et al.* 2008, donde se reporta la internalización de ocludina, para posteriormente ubicarla en la estructura tipo pedestal, justo abajo de las bacterias. Sin embargo, no se relacionó en el trabajo antes citado a clatrina como medio de transporte de ocludina.

Para reforzar la hipótesis acerca del transporte de ocludina mediado por clatrina, realizamos estudios de fraccionamiento celular, inmunoprecipitación y Western blot. Los resultados del Western blot mostraron un aumento en la interacción entre ocludina y clatrina en la fracción citoplasmática a dos horas de infección, indicando de esta manera la internalización de ocludina mediada por clatrina a dos horas de infección. Los experimentos realizados con la fracción membranal indicaron un aumento en la interacción entre ocludina y clatrina a una hora de infección indicando un aumento en la interacción de clatrina en la membrana en la región correspondiente a las uniones estrechas. Esta interacción disminuyó a dos horas de infección, indicando un desprendimiento de las vesículas en la membrana de la región de las uniones estrechas, dato que concuerda con el aumento en la interacción ocludina-clatrina en el citoplasma a las dos horas de infección. A las tres horas de infección, se detectó en la membrana un aumento bastante considerable en la interacción entre estas dos proteínas con respecto a los demás tiempos. Este dato podría indicar un mecanismo de transporte de ocludina mediado por clatrina a la membrana a las tres horas de

infección, posiblemente al pedestal. Estos datos reafirman lo propuesto por Peralta *et al.* 2008, donde se propone la internalización de ocludina, y el transporte pasando por el citoplasma, y finalizando en los pedestales.

EspF ha sido involucrada en la redistribución de ocludina por varios grupos de trabajo (Garmendia *et al.*, 2005; Muza-Moons *et al.*, 2004; Shifflett *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2008). Para relacionar a EspF en este trabajo, nosotros infectamos células RK13 con una mutante isogénica en el gen *espF* (EPEC Δ *espF*), para posteriormente realizar estudios de inmunofluorescencia. Como en las células infectadas con EPEC wild-type, en el caso de la mutante en *espF* se detectó una interacción basal entre ocludina y clatrina. Sin embargo, esta interacción no aumentó a la hora de infección, lo que sugiere la intervención de EspF en este proceso. A las dos y tres horas de infección fue detectado un aumento en la interacción proteína-proteína con respecto a las células no infectadas, sin embargo este no fue igual al causado por la cepa wild type. El aumento en esta interacción podría ser consecuencia de varios factores no relacionados a EspF. El deterioro de las uniones estrechas y el redondeamiento de la célula pueden ser debidos al estrés provocado por aumento en la acidez del medio, así como los efectos que provocan las demás proteínas bacterianas dentro de la célula, en su mayoría efectores que interactúan con la maquinaria del citoesqueleto de actina.

Cabe mencionar que la integridad de las uniones estrechas es dependiente del buen funcionamiento del citoesqueleto de actina. Las proteínas ZO-1 y ocludina se unen directamente a los filamentos de actina, por lo tanto, el efecto que tiene la despolimerización de actina en la integridad de las uniones estrechas es un efecto

secundario causado por la pérdida en la interacción entre las proteínas de ambas estructuras (Fanning *et al.*, 2002; Ivanov *et al.* 2005; Musch *et al.*, 2005). Los monómeros de actina pueden ser secuestrados utilizando drogas como Latrunculina A, de tal manera que el citoesqueleto sea aberrante, provocando la endocitosis de las proteínas de uniones estrechas y el deterioro de estas misma (Shen and Turner, 2005).

Se ha demostrado que EspF interacciona directamente con actina, pero hasta ahora no se reportado si esta proteína bacteriana produce la polimerización o despolimerización de los filamentos de actina. Otra de las interacciones reportadas que tiene EspF con proteínas eucariontes es la que lleva a cabo con la proteína ZO-1, la cual es una proteína que contiene dominios PDZ los cuales le proveen la capacidad de conectar al citoesqueleto de actina con el complejo de uniones estrechas. Es importante recalcar que la infección de células epiteliales con EPEC produce la redistribución de la proteína ZO-1 de la región correspondiente a las uniones estrechas a la estructura tipo pedestal, lo que podría provocar en primera instancia, la pérdida en la comunicación entre el citoesqueleto de actina y las uniones estrechas, provocando como consecuencia, la endocitosis de las proteínas transmembranales de uniones estrechas (Peralta *et al.*, 2008).

Todos los resultados obtenidos en esta tesis apoyan el mecanismo por el cual EPEC induce la endocitosis y redistribución al pedestal de las proteínas de uniones estrechas. Existen otros mecanismos de endocitosis, sin embargo, en este estudio nos enfocamos en la endocitosis mediada por clatrina.

Aunque se requiera de la realización de mas controles, el uso de otras líneas celulares, así como de otras cepas bacterianas para poder generalizar este fenómeno, esta investigación abre un camino importante con respecto a la interacción y manipulación que realizan los factores de virulencia bacterianos con las proteínas eucariontes, así como los efectos fisiológicos que estas proteínas bacterianas producen en la célula eucarionte para poder llevar a cabo la colonización de otros nichos.

Conclusiones

1. EspF no interacciona con clatrina para provocar la endocitosis de ocludina por esta vía.
2. La infección de células RK13 por EPECwt induce un aumento en la interacción entre ocludina y clatrina.
3. El patrón de interacción de ocludina y clatrina en células infectadas por EPECwt propone un fenómeno de endocitosis vinculado a un fenómeno de transporte específico mediado por clatrina.
4. EspF induce indirectamente la endocitosis de ocludina mediante vesículas de clatrina.

Perspectivas

1. Estandarizar las condiciones de infección en otras líneas celulares para poder generalizar los fenómenos propuestos.
2. Llevar a cabo experimentos para encontrar qué otras vías de endocitosis podrían estar interviniendo en la endocitosis de las ocludina en células infectadas por EPECwt.
3. Determinar el patrón de endocitosis de otras proteínas de uniones estrechas (claudina-1, ZO1 y ZO2) en células infectadas con EPECwt.
4. Demostrar sí EspF tiene la capacidad para nuclear actina, y con esto relacionarlo a fenómenos de endocitosis.

Abreviaturas

Å	Armostrong
µg	Microgramos
µl	Microlitros
A/E	Adhesión y eliminación de microvellosidades
Arp2/3	Proteína relacionada com actina 2/3
BFP	Pilus formador de penachos
BSA	Albúmina Sérina Bovina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Cy5	Cianina
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherente difusa
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	Factor de adhesión codificado en plasmido
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Esc	Proteínas de secreción de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Esp	Proteínas secretadas por EPEC

ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FITC	Tetrahidrometil isotiacianato de fluoresceína
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutathion S transferasa
h	Hora
HEPES	Ácido 4-(hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico)
HRP	Peroxidasa de rábano
IP	Inmunoprecipitación
Kb	Kilo bases
kDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
LBK	LB con kanamicina
LEE	Locus de eliminación del enterocito
Map	Proteína asociada a mitocondria
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells
MEM	Medio de cultivo Eagle
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de la infección
NaCl	Cloruro de sodio
Nck	Proteína adaptadora tirosincinasa
nm	Nanómetros
NP-40	Nonidet-p40

N-WASP	Proteína neuronal del síndrome de Wiskott Aldrich
°C	Grados centígrados
OMS	Organización mundial de la salud
PAGE	Gel de poliacrilamida
PAUE	Proteínas asociadas a uniones estrechas
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	PBS con Tween 20
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
RIPA	Amortiguador para ensayos de inmunoprecipitación
RK13	Rabbit kidney cells
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNX9	Sorting nexin 9
SSTIII	Sistema de secreción tipo III
TEMED	N, N',N',N'-tetrametil-etilen-diamina
Tir	Receptor translocado para intimina
TIR-FM	Total internal reflection-fluorescence microscopy
TRITC	Tetrametilrodamina isotiocianato
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltio
Wt	Wild type o cepa tipo salvaje

Bibliografía

1. Adu-Bobie, J., Trabulsi, L. R., Carneiro-Sampaio, M. M. S., Dougan, O., and Frankel, G. 1998. **Identification of Immunodominant Regions within the C-Terminal Cell Binding Domain of Intimin α and Intimin β from Enteropathogenic *Escherichia coli*.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 66, No. 12. pp. 5643–5649.
2. Akhtar N., and Hotchin, N. A. 2001. **RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin.** *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 12. pp. 847–862.
3. Alper, J., 2003. **Data gaps need bridging to assess infectious gastrointestinal diseases.** *ASM News*. 69:65-68.
4. Alto, N. M., Weflen, A. W., Rardin, M. J., Yarar, D., Lazar, C. S., Tonikian, R., Koller, A., Taylor, S. S., Boone, C., Sidhu, S. S., Schmid, S. L., Hecht, G. A., and Dixon, J. E. 2007. **The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways.** *Nature. Journal of cell biology*. *Nature. The Journal of Cell Biology*. Vol. 178, No. 7. pp. 1265-1278.
5. Benítez D. F., Cabrera, A. R., Maldonado, C. F., Shoshani, L., Cereijido, M., and Contreras, R. G. 2007. **Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor.** *AJP. Renal Physiology*. Vol. 292. pp. 828–836.
6. Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Mora, A., Alonso, M. P., Varela, G., Gadea, M. P., Schelotto, F., González, E. A. and Blanco, J. 2006.

- Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (mB and jR/b2B).** Printed in Great Britain. *Journal of Medical Microbiology*. No. 55. pp. 1165-1174.
7. Brandner, J. M. 2009. **Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 72. pp. 289–294.
 8. Celli, J., Deng, W., and Finlay, B. B. 2000. **Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside.** Blackwell Science Ltd. *Cellular Microbiology*. 2(1), pp. 1-9.
 9. Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. E., and Williams, P. H. 2003. **Virulence of Enteropathogenic Escherichia coli, a Global Pathogen.** American Society for Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 16, No. 3. pp. 365–378.
 10. Cornelis, G. R. 2006. **The type III secretion injectisome.** *Nature Reviews. Microbiology*. Vol. 4. pp. 811-825.
 11. Crane, J. K., McNamara, B. P., and Donnenberg, M. S. 2001. **Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic Escherichia coli.** Blackwell Publishing Ltd. *Cellular Microbiology*. Vol. 3, No. 4. pp. 197-211.
 12. Crepin, V. F., Shaw, R., Abe, C. M., Knutton, S., and Frankel, G. 2005. **Polarity of Enteropathogenic Escherichia coli EspA Filament Assembly and Protein Secretion.** , American Society for

- MicrMyspace.comobiology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 187, No. 8. pp. 2881–2889.
13. Cunningham, M. W., and Fujinami, R. S. 2000. **Effects of microbes on the immune system**. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins. pp. 171-194.
 14. Daniell, S. J., Kocsis, E., Morris, E., Knutton, S., Booy, F. P., and Frankel, G. 2003. **3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli***. Blackwell Publishing Ltd. *Molecular Microbiology*. Vol. 49, No. 2. pp. 301-308.
 15. Dean, P., Maresca, M., Schuller, S., Phillips, A. D., and Kenny, B. 2006. **Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins**. PNAS. Vol. 103, No. 6. pp. 1876-1881.
 16. Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., and Finlay, B. B. 1997. **Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells**. *Trends Microbiol.* 5:109–114.
 17. Fanning, A. S., Ma, T. Y., and Anderson, J. M. 2002. **Isolation and functional characterization of the actin-binding region in the tight junction protein ZO-1**. The FASEB Journal. Vol. 16. pp. 1835-1837.
 18. Finlay, B. B., Rosenshine, I., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. 1992. **Cytoskeletal Composition of Attaching and Effacing Lesions Associated with Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence to HeLa Cells**. American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 60, No. 6. pp. 2541-2543.

19. Gal-Mor, O., and Finlay, B. B. 2006. **Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence.** Blackwell Publishing Ltd. *Cellular Microbiology*. Vol. 8, No. 11. pp. 1707-1719.
20. Garmendia, J., Frankel, G., and Crepin, V. F. 2005. **Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 73, No. 5. pp. 2573–2585.
21. Goosney, D. L., DeVinney, R., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Strynadka, N. C., and Finlay, B. B. 2000. **Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin.** Elsevier Science Ltd. *Current Biology*. Vol. 10, No. 12. pp. 735–738.
22. Goosney, D. L., Gruenheid, S., and Finlay, B. B. 2000. **Gut feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host.** *Cell Dev. Biol.* 16:173–89.
23. Gruenheid, S., and Finlay, B. B. 2003. **Microbial pathogenesis and cytoskeletal function.** Nature. Insight Reviews. Vol. 422. pp. 775-781.
24. Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G. D., Pawson, T., and Finlay, B. B. 2001. **Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells.** Macmillan Magazines Ltd. *Nature Cell Biology*. Vol. 3. pp. 856-858.
25. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. 1997. **Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution.** Blackwell Science Ltd. *Molecular Microbiology*. Vol. 23, No. 6. pp. 1089-1097.

26. Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J. B., Dougan, G., and Phillips A. D. 1998. **Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 66, No. 4. pp. 1570–1578.
27. Hueck, C. J. 1998. **Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants.** American Society for Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 62, No. 2. pp. 379–433.
28. Hwang, J., Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C. Y., and Schoolnik, G. K. 2003. **Structural and Topographical Studies of the Type IV Bundle-Forming Pilus Assembly Complex of Enteropathogenic *Escherichia coli*.** American Society for Microbiology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 185, No. 22. pp. 6695–6701.
29. Ivanov A. I., Nusrat, A., and Parkos, C. A. 2004. **Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment.** *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 15. pp. 176–188.
30. Ivanov, A. I., Hunt, D., Utech, M., Nusrat, A., and Parkos, C. A. 2005. **Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex.** *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 16. pp. 2636–2650.
31. Kaksonen, M., Toret C. P., and Drubin D. G. 2006. **Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 7. pp. 404–414.

32. Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L. T. 2004. **Pathogenic *Escherichia coli***. Nature Reviews. *Microbiology*. Vol. 2. pp. 123-140.
33. Kenny, B. 1999. **Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications.** Blackwell Science. *Molecular Microbiology*. Vol. 31, No. 4. pp. 1229-1241.
34. Kenny, B., and Finlay, B. B. 1997. **Intimin-Dependent Binding of Enteropathogenic *Escherichia coli* to Host Cells Triggers Novel Signaling Events, Including Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C- γ 1.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 65, No. 7. pp. 2528–2536.
35. Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., and Finlay, B. B. 1997. **Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells.** Cell Press. *Cell*. Vol. 91. pp. 511–520.
36. Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G. 1998. **A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells.** Oxford University Press. *The EMBO Journal*. Vol.17 No.8. pp. 2166–2176.
37. Kuhnert, P., Boerlin, P., and Frey, J. 2000. **Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and the environment.** *FEMS microbial. Rev.* 24:107-17.

38. Lai, L. C., Wainwright, L. A., Stone, K. D., and Donnenberg, M. S. 1997. **A Third Secreted Protein that is Encoded by the Enteropathogenic Escherichia coli Pathogenicity Island is Required for Transduction of Signals and for Attaching and Effacing Activities in Host Cells.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 65. No. 6. pp. 2211-2217.
39. Lundmark, R. 2004. **Sorting Nexin 9 in Clathrin-mediated Endocytosis.** Sweden at Solfjäders Offset AB Umeå. Department of Medical Biochemistry and Biophysics.
40. Lundmark, R., and S.R. Carlsson. 2003. **Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components.** *J. Biol. Chem.* 278:46772–46781.
41. McNamara, B. P., Koutsouris, A., O'Connell, C. B., Nougayrède, J., Donnenberg, M. S., and Hecht, G. 2001. **Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function.** *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 107, No. 5. pp. 621-629.
42. Mills, E., Baruch, K., Charpentier, X., Kobi, S., and Rosenshine, I. 2008. **Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli.** Elsevier Inc. *Cell Host and Microbe*. No. 3. pp. 104-113.
43. Morimoto, S., Nishimura, N., Terai, T., Manabe, S., Yamamoto Y., Shinahara, W., Miyake, H., Tashiro, S., Shimada, M., and Sasaki, T. 2005. **Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of**

- occludin to the cell surface.** Journal of biological chemistry. Vol. 280. No. 3. pp. 2220–2228.
44. Mühldorfer, I., and Hacker, J. 1994. **Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence.** Academic Press. *Microbial Pathogenesis.* Germany. 16:171-181.
45. Musch, M. W., Walsh-Reitz, M. M., and Chang, E. B. 2006. **Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption.** AJP. Gastrointestinal and Liver Physiology. Vol. 290. pp. 222–231.
46. Muza-Moons, M. M., Schneeberger, E. E., and Hecht, G. A. 2004. **Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells.** Blackwell Publishing Ltd. *Cellular Microbiology.* Vol. 6, No. 8. pp. 783-793.
47. Nagai, T., Abe, A., and Sasakawa, C. 2005. **Targeting of Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to Host Mitochondria Is Essential for Bacterial Pathogenesis.** The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 280, No. 4. pp. 2998–3011.
48. Nataro, J. P., and Koper, J. B. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** American Society of Microbiology. *Clinical Microbiology. Reviews.* 11:142-201.
49. Niessen, C. M. 2007. **Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function.** Journal of Investigative Dermatology. Vol. 127. pp. 2525–2532.

50. Peralta, R. J., Hernández, J. M., Manning C. R., Luna, M. J., García, T. C., Nougayréde, J. P., Oswald, E., and Navarro, G. F. 2008. **EspF interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability.** American Society for Microbiology. Infection and Immunity. Vol. 76, No. 9. pp. 3854-3868.
51. Phillips, A. D., Giron, J., Hicks, S., Dougan, G. and Frankel, G. 2000. **Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface.** Printed in Great Britain. *Microbiology*. Vol. 146. pp. 1333–1344.
52. Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D. J., Mills, S. D., and Finlay, B. B. 1996. **A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation.** *EMBO. J* 15: 2613-2624.
53. Sallee, N. A., Rivera, G. M., Dueber J. E., Vasilescu, D., Mullins, R. D., Mayer, B. J., and Lim, W. A. **The pathogen protein EspFU hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency.** *Nature. Letters*. Vol. 454. pp. 1005-1009.
54. Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamanoi, K., Sasakawai, C., and Abe, A. 2001. **Supramolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure.** *PNAS*. Vol. 98. No. 20. pp. 11638-11643.
55. Shaw, R. K, Cleary, J., Murphy, M. S., Frankel, G., and Knutton, S. 2005. **Interaction of Enteropathogenic *Escherichia coli* with Human**

- Intestinal Mucosa: Role of Effector Proteins in Brush Border Remodeling and Formation of Attaching and Effacing Lesions.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity*. Vol. 73, No. 2. pp. 1243–1251.
56. Shen, L., and Turner, J. R. 2005. **Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis.** *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 16. pp. 3919–3936.
57. Shifflett, D. E., Clayburgh, D. R., Koutsouris, A., Turner, J. R., and Hecht, G. A. 2005. **Enteropathogenic E. coli disrupts tight junction barrier function and structure in vivo.** *Laboratory Investigation*. Vol. 85. pp. 1308-1324.
58. Simon, G. L., and Gorbach, S. L. 1986. **The human intestinal microflora.** *Digestive Disease and Sciences*. Vol. 31, No. 9. pp. 147-162.
59. Söderholm, J. D., Olaison, G., Peterson, K. H., Franzén, L. E., Lindmark, T., Wirén, M., Tagesson, C., and Sjö Dahl, R. 2002. **Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease.** *Inflammation and Inflammatory Bowel Disease*. Vol. 50. pp. 307-313.
60. Sohel, I., Puente, J. L., Ramer, S. W., Bieber, D., Wu, C. Y., and Schoolnik, G. K., 1996. **Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a Gene Cluster Coding for Bundle-Forming Pilus Morphogenesis.** American Society for Microbiology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178, No. 9. pp. 2613–2628.

61. Subramanian, V. S., Marchant, J. S., Ye, D., Ma, T. Y., and Said, H. M. **Tight junction targeting and intracellular trafficking of occludin in polarized epithelial cells.** *AJP. Cell Physiology.* Vol. 293. pp. 1717–1726.
62. Tacket, C. O., Sztein, M. B., Losonsky, G., Abe A., Finlay, B. B., Mcnamara, B. P., Fantry, G. T., James, S. P., Nataro, J. P., Levine, M. M., And Donnenberg, M. S. 2000. **Role of EspB in Experimental Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity.* Vol. 68, No. 6. pp. 3689–3695.
63. Taylor, K. A., Luther, P. W., And Donnenberg, M. S. 1999. **Expression of the EspB Protein of Enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa Cells Affects Stress Fibers and Cellular Morphology.** American Society for Microbiology. *Infection and Immunity.* Vol. 67, No. 1. pp. 120–125.
64. Touze, T., Hayward, R. D., Eswaran, J., Leong, J. M., and Koronakis, V. 2004. **Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor.** Blackwell Publishing *Mol. Microbiol.* Vol. 51. pp. 73–87.
65. Turner, J. R. 2006. **Molecular basis of epithelial barrier regulation from basic mechanisms to clinical application.** American Society for Investigative Pathology. *The American Journal of Pathology.* Vol. 169, No. 6. pp. 1901-1909.

66. Veiga, E., and Cossart, P. 2006. **The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization.** Trends in Cell Biology. Special issue: Membrane Dynamics. Vol. 16, No. 10. pp. 499-504.
67. Viswanathan, V. K., Lukic, S., Koutsouris, A., Miao, R., Muza, M. M., and Hecht, G. 2004. **Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection.** Blackwell Publishing Ltd. *Cellular Microbiology*. Vol. 6, No. 10. pp. 987-997.
68. Wachter, C., Beinke, C., Mattes, M., and Schmidt, M. A. 1999. **Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*.** Blackwell Science Ltd. *Molecular Microbiology*. Vol. 31, No. 6. pp. 1695-1707.
69. Yarar, D., C.M. Waterman-Storer, and S.L. Schmid. 2007. **SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis.** *Dev. Cell*. 13:43–56.