



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Caracterización del desensamble de las uniones estrechas por la Proteína Secretada F (EspF) de *Escherichia coli* Enteropatógena en células epiteliales intestinales”

TESIS

Que presenta

César Romel Barrientos Maldonado

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Celular

Bajo la dirección del

Dr. Emiliano Fernando Navarro García

Y la asesoría de

Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya

Dr. Eugenio Frixione Garduño

Ciudad de México, México

Noviembre 2020

Agradecimientos

Para el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), el cual proporcionó la beca con No. de CVU 925091, que me permitió poder realizar este trabajo.

Para el Dr. Fernando Navarro, por haberme permitido realizar mi trabajo experimental en su laboratorio y bajo su tutela, así como por sus consejos que me sirvieron de guía en el sinuoso e interesante camino de la ciencia.

A mis compañeros, auxiliares y técnico de laboratorio, cuyos consejos y comentarios me ayudaron enormemente para el diseño experimental y discusión de resultados, además de haber producido un excelente ambiente de trabajo gracias a su compañerismo, amabilidad y disposición.

A mis familiares y amigos, por su apoyo incondicional.

Tabla de Contenido

Agradecimientos	I
Tabla de Contenido	II
Lista de Figuras	IV
Lista de Abreviaciones	V
Resumen	VII
Abstract	VIII
Introducción	1
Generalidades.....	1
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena.....	2
Sistema de Secreción Tipo 3.....	2
Uniones Estrechas (TJ).....	3
Alteraciones Causadas por EPEC sobre las TJ.....	5
Proteína F Secretada por <i>Escherichia coli</i>	5
Endocitosis Mediada por Clatrina (CME).....	7
Alteraciones de la Endocitosis Inducida por EPEC.....	9
Antecedentes Directos.....	10
Pitstop [®] 2.....	12
Planteamiento del Problema	13
Pregunta de Investigación	14
Hipótesis	14
Objetivos	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Particulares.....	14

Material y Métodos	15
Cultivo bacteriano	15
Infección celular	15
Cultivo celular	15
Inhibición de la endocitosis	16
Inmunofluorescencia y anticuerpos	16
Análisis de las imágenes y estadística	17
Resultados	18
La infección con EPEC WT induce la co-localización parcial de ZO-1 y clatrina	18
La endocitosis de ocludina durante la infección con EPEC WT se produce por una vía independiente de clatrina	23
Análisis cuantitativo de la co-localización de ZO-1 y ocludina con clatrina	25
Pitstop [®] 2 fue incapaz de impedir la relocalización de ZO-1 y Ocludina a tiempos tardíos.....	27
Discusión	32
Conclusiones y Perspectivas	40
Referencias	41

Lista de Figuras

Figura 1. Alteraciones de la proteína ZO-1 durante la infección de células CaCo-2-BBe1 por EPEC WT.....	20
Figura 2. Co-localización de ZO-1 con clatrina tras la infección de células CaCo-2-BBe1 por EPEC WT.....	21
Figura 3. Alteraciones de ocludina durante la infección de células CaCo-2-BBe1 por EPEC WT.	22
Figura 4. Distribución de ocludina y clatrina en la membrana durante la infección de células CaCo-2-BBe1 con EPEC WT.	24
Figura 5. Cuantificación de la co-localización de ocludina o ZO-1 con clatrina.....	26
Figura 6. Efectos de Pit-Stop 2 sobre la relocalización de ZO-1 durante la infección con EPEC WT.	28
Figura 7. Efectos de Pit-Stop 2 sobre la distribución de ocludina durante la infección con EPEC WT.	30
Figura 8. Cuantificación del número de vesículas por célula.....	31

Lista de Abreviaciones

Å	Angstrom
A/E	Adhesión y eliminación
aa	Aminoácidos
ATP	Adenosín Tri-Fosfato
Bfp	<i>Bundle forming pilus</i> (Pelo formador de haces)
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i> (Proteína 42 de control de la división celular)
COPII	<i>Coat complex protein II</i> (Proteína II del complejo de recubrimiento)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i> (Antígeno 1 de endosomas tempranos)
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EMC	Endocitosis mediada por clatrina
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
EPEC WT	Cepa de EPEC 2348/69
EscX ¹	<i>E. coli secretion apparatus component</i> (Componente del aparato de secreción de <i>E. coli</i>)
EspX ¹	<i>E. coli secreted protein</i> (Proteína secretada por <i>E. coli</i>)
F-BAR	FCH-Bin, Amphiphysin, Rvs
Guk	<i>Guanylate kinase-like domain</i> (Dominio parecido a Guanilato cinasa)
HeLa	Células de Henrietta Lacks
LEE	Locus de Eliminación del Enterocito
Map	<i>Mitochondrial-associated effector protein</i> (Proteína efectora asociada a la mitocondria)
MDC	Monodansil cadaverina
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i> (Células de riñón canino Madin-Darby)

¹ X = letra que corresponda al distintivo de cada proteína; p. ej. EspA, EspF, etc.

MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i> (Cinasa de la cabeza ligera de miosina)
NHE3	<i>Sodium-Hydrogen Exchanger 3</i> (Antiportador 3 Sodio-Hidrógeno)
NleA	<i>Non-LEE effector protein A</i> (Proteína efectora A no LEE)
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> (Proteína neural del Síndrome de Wiskott-Aldrich)
PDZ	Dominio PSD95, Dlg1, ZO-1
Rab11	<i>Rat brain Ras-related protein 11</i> (Proteína 11 relacionada a Ras de cerebro de ratón)
SGLT-1	<i>Sodium-Glucose linked transporter 1</i> (Simportador 1 Sodio-Glucosa)
SH3	<i>Src-homology 3 domain</i> (Dominio 3 de homología a Src)
SNX9	<i>Sorting nexin 9</i> (Nexina de clasificación 9)
T3SS	<i>Type 3 Secretion System</i> (Sistema de Secreción Tipo 3)
TER	Resistencia Eléctrica Trans-Epitelial
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i> (Receptor translocado de intimina)
TJ	<i>Tight junctions</i> (Uniones Estrechadas)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i> (Factor de necrosis tumoral)
TOCA-1	<i>Transducer of cdc42-dependent actin assembly</i> (Transductor del ensamblaje de actina dependiente de cdc42)
WT	<i>Wild type</i> (Cepa silvestre)
ZO-1	Proteína 1 de la Zonula Occludens

Resumen

Escherichia coli Enteropatógena (EPEC) es una de las principales causas de infecciones diarreicas. EPEC coloniza el intestino, formando estructuras llamadas pedestales que son ricos en actina. La patogénesis de EPEC está relacionada con su isla genómica de patogenicidad LEE. Esta isla codifica para el sistema de secreción tipo 3, el cual inyecta diversas proteínas efectoras a las células intestinales. Uno de estos efectores, EspF, es capaz de alterar las proteínas que forman las uniones estrechas (TJ) de las células epiteliales, favoreciendo la producción de diarrea. Además, se sabe que la infección por EPEC produce la endocitosis de claudina-1 y ocludina. A su vez, EPEC se ha visto relacionado con la alteración de proteínas de la endocitosis mediada por clatrina, como SNX9, dinamina y clatrina. En este trabajo nos enfocamos en investigar la vía endocítica que siguen las proteínas de las TJ durante la infección por la cepa de EPEC 2348/69 en la línea intestinal CaCo-2-BBe1. Utilizando microscopía confocal observamos que ZO-1 co-localiza con clatrina, a pesar de no ser una proteína transmembranal; indicando que está asociada por la cara citosólica de las vesículas, probablemente interaccionado con proteínas transmembranales de la vesícula. En cambio, clatrina solo co-localizó con ocludina en la membrana pero no en las vesículas cubiertas de clatrina. Estos resultados indican que la ocludina se endocita por una vía independiente de clatrina. Otras proteínas de la TJ, posiblemente claudina-1, se endocitan mediante vesículas recubiertas de clatrina. De manera interesante, cuando se usó un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina (Pit-Stop 2), ZO-1 y ocludina siguieron siendo desensambladas, lo que fundamenta que existen vías independientes de clatrina involucradas en las alteraciones de las TJ inducidas por EPEC. Nuestros resultados aportan nueva información acerca del efecto de la endocitosis de las proteínas de las TJ por vesículas recubiertas por clatrina durante la infección de células polarizadas por EPEC; sin embargo, se requerirán investigaciones posteriores para identificar las vías endocíticas completas de dichas proteínas.

Abstract

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the main causes of human diarrheal infections. EPEC colonizes the intestine, forming structures called pedestals, which are rich in actin. The pathogenesis of EPEC is related to its LEE pathogenicity genomic island. This island encodes for the type 3 secretion system, which injects various effector proteins into intestinal cells. One of these effectors, EspF, is capable of altering the proteins that form the tight junctions (TJ) of epithelial cells, favoring diarrhea. Furthermore, EPEC infection is known to induce claudin-1 and occludin endocytosis. In turn, EPEC has been associated with the alteration of clathrin-mediated endocytosis proteins such as SNX9, dynamin and clathrin. In this work we focus on investigating the endocytic pathway followed by TJ proteins during infection by EPEC strain 2348/69 in the intestinal line CaCo-2-BBe1. Using confocal microscopy, we observed that ZO-1 co-localizes with clathrin, despite not being a transmembrane protein; indicating that it is associated by the cytosolic face of the vesicles, probably interacting with transmembrane proteins of the vesicle. In contrast, clathrin only co-localized with occludin in the membrane but not in clathrin-coated vesicles. These results indicate that occludin is endocytosed by a clathrin-independent pathway. Other TJ proteins, like claudin-1, are possibly endocytosed by clathrin-coated vesicles. Interestingly, when an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis (Pit-Stop 2) was used, ZO-1 and occludin continued to be disassembled, which supports the existence of clathrin-independent pathways involved in EPEC-induced TJ alterations. Our results provide new information about the effect of endocytosis of TJ proteins by clathrin-coated vesicles during infection of polarized cells by EPEC; however, further investigations will be required to identify the complete endocytic pathways of the TJ proteins induced by EPEC.

Introducción

Generalidades

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad mundial (GBD Causes of Death Collaborators, 2018) y nacional (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018), siendo la segunda causa por enfermedad y superadas únicamente por las infecciones del tracto respiratorio (Liu et al., 2016; Secretaría de Salud, 2018). Tales padecimientos se encuentran en el quinto lugar de mortalidad (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2018; Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018), ocasionando más de 1.5 millones de muertes al año a nivel global (GBD Causes of Death Collaborators, 2018). La mayoría de estas muertes ocurre en pacientes pediátricos, específicamente en el grupo de 1-5 años de edad, en los que la mortalidad asciende del quinto al segundo lugar (Liu et al., 2016; Secretaría de Salud, 2018). Esto indica que, a pesar de los avances en la terapia de rehidratación oral y en el desarrollo de antibióticos, fallecen muchos de los pacientes que cursan con diarrea en ese grupo de edad.

Este tipo de padecimientos pueden ser ocasionados por diversas etiologías, que son clasificadas en infecciosas y no infecciosas, siendo más frecuentes las de causa infecciosa. En general, se ha atribuido a los agentes virales como la primera causa de diarrea infecciosa, especialmente en países desarrollados de Norte América y Europa (Kotloff, 2017). Sin embargo, en países en vías de desarrollo, como lo es nuestro país, las infecciones bacterianas representan uno de los principales agentes etiológicos de diarrea aguda (Cooke, 2010).

Entre las bacterias causantes de diarrea aguda, las cepas patógenas de *Escherichia coli* son las más frecuentes (Croxen et al., 2013; Ochoa & Contreras, 2011), dentro de las cuales se encuentran *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y enteropatógena (EPEC) (Kaper et al., 2004;

Navaneethan & Giannella, 2008). Esta última, fue la primera cepa patógena de *E. coli* en ser descubierta, siendo descrita en 1945 en el Reino Unido debido a que causó numerosos brotes de diarrea acuosa en niños menores de 5 años (Kaper et al., 2004).

***Escherichia coli* Enteropatógena**

La infección por EPEC se produce principalmente en el intestino delgado y se desarrolla en cuatro etapas: 1) una fase de adhesión superficial, mediada por un *pilus* de tipo IV llamado “*Pilus* formador de haces” o Bfp (*Bundle-Forming Pilus*) y, en menor medida, por los polímeros de la proteína EspA, que más tarde formarán la jeringa del sistema de secreción tipo 3 (T3SS); 2) el ensamblaje de la aguja molecular del T3SS y la “inyección” de proteínas efectoras al enterocito; 3) una adhesión mucho más fuerte, mediada por la unión de la intimina con su receptor, Tir, el cual es translocado a la célula por la misma bacteria; y por último, 4) la formación de pedestales, los cuales son protrusiones de la membrana ricas en actina, en donde la bacteria se encuentra adherida, seguido de la proliferación extracelular de EPEC para formar microcolonias (Clarke et al., 2003).

Sistema de Secreción Tipo 3

El sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) se conforma por diversas proteínas. La región intracelular de este sistema posee función de ATPasa, la cual se encarga de proporcionar la energía necesaria para transportar las proteínas efectoras. Este complejo se encuentra acoplado a un sistema de secretina en el periplasma bacteriano, que es creado por la homopolimerización de la proteína EscC. A su vez, EscC se continúa con un polímero de EscF que forma el cuerpo de la aguja, el cual constituye un conducto a través del cual pasarán los diversos efectores a la célula hospedera. Posteriormente, el conducto de EscF se alarga por la polimerización de la proteína EspA. Finalmente, se secretan proteínas efectoras a través del conducto. Las primeras en ser secretadas son las translocadoras EspB y EspD, que se acoplan a la

punta de la aguja y son las responsables de formar un poro en la membrana de la célula intestinal (Gaytán et al., 2016).

Este complejo sistema se encuentra codificado en una isla genómica de patogenicidad denominada *Locus de Eliminación del Enterocito* o LEE (Clarke et al., 2003), la cual codifica todos los componentes del T3SS, la intimina, a Tir, algunos de los efectores que serán translocados y las chaperonas necesarias para su correcto plegamiento (Gaytán et al., 2016). Por otro lado, EPEC también puede producir efectores codificados en otras áreas de su genoma distintos del LEE, a los cuales se les denomina No-LEE (Dean et al., 2005; Gaytán et al., 2016).

Uniones Estrechas (TJ)

Gracias a esta isla genómica de patogenicidad y al T3SS, EPEC es capaz de causar diversas alteraciones en la fisiología celular, siendo una de las más dañinas la producida sobre las uniones estrechas de las células epiteliales en la mucosa intestinal (McNamara et al., 2001). Las TJ se organizan en un anillo alrededor de la célula, conformado por proteínas transmembranales y citoplasmáticas que dividen a la membrana celular en dos dominios funcionalmente distintos: el apical y el basolateral. Además, también regulan la permeabilidad trans-epitelial a través de los espacios intercelulares por la denominada vía “paracelular” (González-Mariscal et al., 2008), permitiendo o impidiendo el paso de solutos a través del epitelio. Esta vía posee dos componentes: uno de “poro”, que deja pasar únicamente moléculas pequeñas y iones ($\sim 4-6 \text{ \AA}$) y uno de “fuga”, el cual es poco selectivo y deja pasar moléculas de gran tamaño ($\sim 60 \text{ \AA}$) (Shen et al., 2011).

Dentro de las proteínas transmembranales las más importantes y mejor estudiadas son la familia de las claudinas y la ocludina. La familia de las claudinas está formada por alrededor de 24 proteínas cuya estructura básica se compone de cuatro pases transmembranales, con sus dos extremos en el lado intracelular y dos asas

extracelulares que conectan las regiones transmembranales (Marchiando et al., 2010). Estas proteínas son las responsables moleculares del componente de “poro” en la permeabilidad paracelular (Buckley & Turner, 2018).

La ocludina también posee cuatro pases transmembranales, con ambos extremos en el citoplasma y dos asas extracelulares. A pesar de la aparente similitud, la ocludina tiene poca homología con las claudinas (Tsukita & Furuse, 1998). Además, sus asas extracelulares son muy cortas, mientras que su extremo C-terminal es mucho más largo, lo que le permite asociarse con proteínas citoplasmáticas, como ZO-1, ZO-2 y ZO-3, las cuales se encuentran formando una placa de anclaje al citoesqueleto (Cummins, 2012). En esta misma región, la ocludina puede ser objeto de modificaciones post-traduccionales, principalmente de fosforilación (Dörfel & Huber, 2012; Raleigh et al., 2011). Debido a estas diferencias, la ocludina no es capaz de formar por sí sola una barrera epitelial, sino que modula la permeabilidad de los epitelios al aumentar el componente de “fuga” ante diversos estímulos, principalmente inflamatorios (Buckley & Turner, 2018).

Por otro lado, ZO-1 forma una placa intracelular en las uniones estrechas (Zihni et al., 2016). Posee una estructura modular, constituida por tres dominios PDZ, un dominio SH3, un dominio similar a guanilato-cinasa (Guk) y una región rica en prolinas cerca del C-terminal, dentro de la que se encuentra la región de unión al citoesqueleto de actina (González-Mariscal et al., 2000; Steinbacher et al., 2018). Se ha demostrado la unión de ZO-1 con las claudinas a través de su primer dominio PDZ (Itoh et al., 1999), a la ocludina (Furuse et al., 1994) y a las α -, β - y γ -cateninas (Rajasekaran et al., 1996), todas ellas mediante el dominio Guk (Steinbacher et al., 2018). Gracias a estas interacciones, ZO-1 ancla a las TJ al anillo de acto-miosina cortical (Van Itallie et al., 2009). ZO-1 también puede oligomerizar consigo misma, con ZO-2 y ZO-3. Estudios recientes indican que la gran cantidad de interacciones proteicas de ZO-1 le confieren la habilidad de formar una interfase líquido-líquido, tanto en el citoplasma como en

las TJ (Beutel et al., 2019). De hecho, dicha separación de fases es necesaria para la formación de las TJ y la incorporación de ZO-1 a la membrana (Schwayer et al., 2019).

Alteraciones Causadas por EPEC sobre las TJ

EPEC es capaz de alterar las uniones estrechas, tanto *in vitro* (Canil et al., 1993; Spitz et al., 1995) como *in vivo* (Shifflett et al., 2005; Zhang et al., 2010). Mediante microscopía confocal y microscopía electrónica por criofractura se ha demostrado la relocalización de diversas claudinas y de ocludina desde la membrana hacia el citoplasma, así como la formación de bandas desorganizadas de proteínas relocalizadas hacia la membrana basolateral (Muza-Moons et al., 2004). Estas observaciones se corresponden funcionalmente con la caída de la Resistencia Trans-Epitelial (TER) producida por EPEC y se cree que estos efectos contribuyen de manera importante a desencadenar la diarrea acuosa observada en los pacientes infectados con EPEC (Muza-Moons et al., 2004; Weflen et al., 2009).

Estas alteraciones han sido relacionadas con diversos efectores, dentro de los que encontramos a map, Nle A (un efector de tipo No-LEE) y a la “proteína F secretada por *E. coli*” o EspF. Este efector se ha visto particularmente involucrado en el desensamblaje de las uniones estrechas (Canil et al., 1993; McNamara et al., 2001). De hecho, en ensayos utilizando una cepa mutante en el gen de *espF*, así como la cepa complementada, se ha demostrado que esta proteína es la principal responsable de la disrupción y degradación de las proteínas de las uniones estrechas (Muza-Moons et al., 2004; Singh et al., 2018).

Proteína F Secretada por *Escherichia coli*

EspF es una proteína codificada en la isla LEE de todos los organismos que producen lesiones de adhesión y eliminación (A/E), tales como EPEC, EHEC y *Citrobacter rodentium* (Holmes et al., 2010). En el caso de EPEC cuenta con un total de 206 aa, encontrándose en sus primeros 73 aa señales de secreción, de localización mitocondrial y nucleolar. Después de estas secuencias sigue una región rica en prolina

de 47 aa, la cual se repite de manera idéntica en el resto de la secuencia de EspF, formando módulos de repetidos ricos en prolina (PRR) altamente conservados en las bacterias A/E (Alto et al., 2007). Dentro de cada uno de estos módulos se presentan diferentes motivos de unión a proteínas eucarióticas (Peralta-Ramírez et al., 2008). De hecho, la presencia de motivos de unión a dominios SH3 (que precisamente se une a secuencias ricas en prolina) fue lo que motivó el descubrimiento de esta proteína (McNamara & Donnerberg, 1998). Además, EspF también posee motivos de unión al dominio CRIB, responsable de la activación de N-WASP (Alto et al., 2007).

Esta característica tan particular de EspF es la responsable de su impacto en la fisiología celular. Al ser transportado al nucléolo, produce una redistribución de nucleolina hacia el citoplasma, lo que produce la detención en la síntesis de ribosomas, interrumpiendo con ello la síntesis proteica normal (Dean et al., 2010). Mientras que en la mitocondria induce la muerte celular y el desacoplamiento de la cadena de electrones, disminuyendo así la producción de ATP (Nagai et al., 2005).

Por otra parte, recientemente se comprobó que ZO-1 se localiza desde tiempos tempranos en el pedestal de actina inducido por EPEC, y que EspF es necesario para su maduración gracias al reclutamiento de ZO-1 y afadina (Ugalde-Silva & Navarro-García, 2019). Esto llevó a los autores a proponer un mecanismo en el que primero se recluta ZO-1 al pedestal, luego afadina comienza a enriquecerse hasta el punto que co-localiza con ZO-1 y, finalmente, conforme el pedestal aumenta de tamaño, ZO-1 permanece en la región del tallo del pedestal, mientras que afadina migra hacia la punta, perdiendo su co-localización e incrementando el tamaño de toda la estructura.

Finalmente, EspF también se ha relacionado con cambios en transportadores membranales, como la disminución del simportador sodio-glucosa (SGLT-1), del intercambiador sodio-hidrógeno (NHE3) y de las acuaporinas (Holmes et al., 2010). Los mecanismos que median estas alteraciones son desconocidos, aunque posiblemente también se relacionen con la capacidad de EspF de interactuar con proteínas de la célula hospedera, probablemente del citoesqueleto de actina.

Endocitosis Mediada por Clatrina (CME)

La endocitosis es el proceso mediante el cual la membrana plasmática adquiere curvatura, profundizándose como una bolsa hacia el interior de la célula, para finalmente desprenderse y formar una vesícula (Doherty & McMahon, 2009; Kaksonen & Roux, 2018). Mediante este mecanismo la célula es capaz de regular diferentes vías de señalización, sensar su entorno químico, adquirir nutrientes y mantener el recambio y la concentración de proteínas adecuada en la membrana plasmática (McMahon & Boucrot, 2011).

La primera molécula descubierta relacionada con la endocitosis fue la clatrina. Su identificación fue posible gracias a la estructura en forma de “canasto” que forma alrededor de la vesícula (Pearse, 1975). Sin embargo, ahora sabemos que la endocitosis mediada por clatrina es sólo una de las muchas variedades de endocitosis que puede llevar a cabo la célula. Dentro de las otras vías endocíticas se incluyen las dependientes de caveolina-1, dependientes de flotilina y la macropinocitosis (Doherty & McMahon, 2009).

La endocitosis mediada por clatrina (CME) se desarrolla en cinco pasos fundamentales: 1) iniciación, 2) reclutamiento del cargamento, 3) ensamblaje de la cubierta, 4) escisión de la membrana y 5) desnudamiento de la vesícula (McMahon & Boucrot, 2011). En cada uno de dichos pasos deben actuar un conjunto de proteínas con funciones específicas.

Durante la iniciación la molécula adaptadora AP-2 hace de intermediario entre la membrana y la clatrina, ya que la clatrina no posee dominios de unión ni al cargamento ni a la membrana (McMahon & Boucrot, 2011). Además, las proteínas con dominios F-BAR remodelan la membrana. Los dominios BAR poseen una estructura arqueada con cargas positivas en su lado cóncavo, lo que les permite unirse a las cargas negativas de la membrana y otorgarle curvatura (Kirchhausen et al., 2014;

Zhao et al., 2011). A la estructura en esta etapa se le denomina “fosita” o “*pit*”, en inglés.

Posteriormente, el cargo se acumula en las fositas gracias a la interacción de los extremos citoplasmáticos de las proteínas transmembranales, conocidas como receptoras del cargamento, con las moléculas adaptadoras. AP-2 así como otros adaptadores específicos para el cargo son los responsables de concentrar al cargo y al receptor cargo en las fositas (Kaksonen & Roux, 2018).

Conforme el cargamento se acumula, y posiblemente ayudado por proteínas deformadoras de la membrana, la fosita se hace cada vez más profunda. A su vez, AP-2 comienza a reclutar a la clatrina, la cual estabiliza la forma esférica de la vesícula (McMahon & Boucrot, 2011). La clatrina consta de un dominio WD40 en su extremo N-terminal, mediante el cual interacciona con AP-2 y con otras proteínas relacionadas con la endocitosis. Le sigue un brazo conformado por α -hélices apiladas en zigzag. Finalmente, en su extremo C-terminal, posee motivos de interacción consigo misma y con la proteína Hsc70, relacionada con el desnudamiento de la vesícula. Cada molécula de clatrina está formada por una cadena pesada y una cadena ligera. Las cadenas pesadas trimerizan mediante su extremo C-terminal para formar una estructura con tres brazos llamada “*triskelion*”, del griego, que significa “tres piernas”. Las cadenas ligeras se unen cerca del extremo C-terminal de cada brazo del triskelión, formando un hexámero de tres cadenas pesadas y tres ligeras (Kirchhausen et al., 2014). A su vez, cada triskelión se ensambla para formar un enrejado de estructuras hexagonales y pentagonales, similares a las observadas en un balón de *soccer*, las cuales recubren a la vesícula (Kaksonen & Roux, 2018).

En este punto, se empiezan a reclutar al cuello de la vesícula proteínas con dominios N-BAR, tales como SNX9 y anfifisina (McMahon & Boucrot, 2011). Los dominios N-BAR poseen una curvatura más pronunciada que los F-BAR, lo que produce que el cuello se estreche progresivamente. Esto facilita la unión de la dinamina, la cual es reclutada por las mismas proteínas N-BAR. La dinamina es una proteína con actividad

GTPasa y es la encargada de cerrar el cuello de la fositita para formar una vesícula. Cuando la vesícula queda libre en el citoplasma, la cubierta de clatrina es desensamblada por las proteínas Hsc70 y auxilina, para poder permitir la fusión de la vesícula con la membrana del organelo blanco (Kirchhausen et al., 2014).

El citoesqueleto de actina juega un papel importante en las etapas finales de la endocitosis, ya que se concentra en un extremo de la vesícula, formando *ruffles* o cometas, los cuales impulsan a la vesícula desde la membrana hacia el citoplasma (Collins et al., 2011). Este proceso está regulado por las proteínas N-WASP y Arp 2/3 (Kaksonen & Roux, 2018), las cuales son reclutadas a las vesículas por los dominios SH3 de proteínas F-BAR, como TOCA-1 (Derivery & Gautreau, 2010) y SNX9 (McMahon & Boucrot, 2011). De hecho, recientemente se describieron otras dos proteínas con dominios BAR involucradas en la endocitosis, FCHSD1 y 2. En su caso, el dominio BAR carece de curvatura, por lo que se une a las regiones planas de la membrana plasmática de la que proviene la vesícula naciente. Desde esas zonas, recluta a N-WASP para iniciar la polimerización de actina e impulsar a la vesícula hacia el interior de la célula (Almeida-Souza et al., 2018).

Alteraciones de la Endocitosis Inducida por EPEC

Se ha observado que EPEC puede alterar varias de las proteínas involucradas con la endocitosis. Por ejemplo, clatrina y dinamina se localizan en el pedestal durante la infección con EPEC. Además, ambas son necesarias para la formación y el crecimiento del pedestal (Unsworth et al., 2007; Veiga et al., 2007).

La proteína SNX9, que se encarga de estrechar el cuello de la vesícula previamente a su escisión de la membrana (Lundmark & Carlsson, 2009), también es alterada por EPEC. Mediante los motivos de unión a SH3, la proteína EspF interacciona con los dominios homónimos en SNX9. Por otro lado, EspF también posee motivos de unión de los dominios CRIB que activan a N-WASP, facilitando así la polimerización de filamentos de actina (Alto et al., 2007).

Interesantemente, EspF se encontró co-localizando transitoriamente con clatrina cuando es transfectada en células HeLa. Mientras que al co-transfectar a EspF junto con SNX9, se formaron estructuras tubulares originadas a partir de la invaginación de la membrana plasmática en las que ambas proteínas co-localizan. Estructuras tubulares similares, formadas por SNX9, también son observadas durante la infección con EPEC (Alto et al., 2007). La formación de dichas estructuras es impedida al tratar a las células con inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina, como clorpromazina y monodansil cadaverina (MDC) (Weflen et al., 2010). De hecho, al silenciar a SNX9 o N-WASP en células CaCo-2, se impide la re-localización de ZO-1 durante la infección con EPEC. Resultados similares son obtenidos al mutar los sitios de unión a SNX9 o N-WASP en EspF (Garber et al., 2018).

Antecedentes Directos

El mecanismo endocítico durante el recambio normal de las claudinas y ocludina es desconocido. Sin embargo, se sabe que pueden ser internalizadas al exponer a las células a diversos estímulos. Por ejemplo, la exposición a TNF- α activa la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK) e induce la endocitosis de ocludina mediada por caveolina (Marchiando, Shen, et al., 2010), mientras que en ensayos de *switch* de calcio se produce la endocitosis de las uniones estrechas (TJ) en vesículas recubiertas de clatrina (Ivanov et al., 2004). Hasta el momento, tampoco se han estudiado los mecanismos endocíticos que induce EPEC sobre las proteínas de las uniones estrechas.

Una vez que las proteínas de las uniones estrechas son internalizadas, deben continuar una ruta de reciclamiento o de degradación. En el caso de las claudinas, son redirigidas hacia la membrana mediante la vía de reciclaje lento (Dukes et al., 2011), mientras que la ocludina, en su mayoría, es degradada en los lisosomas y sintetizada *de novo* (Fletcher et al., 2014). La transfección del gen *espF* en células MDCK produce la disminución de claudina-1, claudina-4, ocludina y ZO-1 por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (Singh et al., 2018). No obstante, se

desconoce si estos efectos son similares durante la infección por EPEC, así como la ruta endocítica que lleva a la disminución de dichas proteínas.

EPEC también modifica la polaridad celular, produciendo la endocitosis del complejo crumbs3 y cambiando la localización de la Na⁺/K⁺ ATPasa (Tapia et al., 2017b, 2017a). Igualmente, EPEC altera el tráfico endosomal normal, cambiando la ruta de la transferrina de un reciclaje lento, mediado por Rab11, a un reciclaje rápido, caracterizado por vesículas EEA1 positivas (Kassa et al., 2019). Por lo que resultaría interesante estudiar si estos efectos son similares en el caso de las proteínas de las uniones estrechas.

Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado, mediante el análisis en un software de motivos lineales eucarióticos, que EspF también posee motivos de unión a dominios PDZ de clase III y motivos de unión a dominios SH3; dominios encargados de las interacciones proteína-proteína en las TJ y del citoesqueleto de actina, respectivamente. De hecho, durante la infección en células epiteliales, EspF se puede unir tanto al complejo Arp 2/3 y a la profilina, como a ZO-1 (Peralta-Ramírez et al., 2008).

Aunado a esto, en experimentos recientes de nuestro grupo de trabajo se observó que al inhibir las vesículas recubiertas de caveolina utilizando Filipina III o al inhibir la macropinocitosis con el fármaco amilorida, no se prevenía la caída de la TER inducida por la infección con EPEC. En cambio, cuando se utilizaron inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina (EMC), como la monodansil-cadaverina (MDC) o la molécula Pitstop[®] 2 la disminución de la TER inducida por EPEC es detenida (González-Lugo, no publicado).

Pitstop[®] 2

A pesar de que tanto la MDC como el Pitstop 2 pudieron impedir la caída de la TER, la amplitud de la disminución fue muy diferente para ambos compuestos. Mientras que con la MDC se logró una inhibición parcial en la pérdida de la TER, los resultados con Pitstop 2 fueron contundentes, manteniendo una TER prácticamente idéntica a las células sin infectar, incluso con la dosis más baja utilizada.

La diferencia tan contrastante entre ambos inhibidores probablemente se deba a su mecanismo de acción. Por un lado, la MDC impide la incorporación de los trisqueliones a la vesícula naciente, pero el resto de las vesículas pueden continuar la endocitosis de manera normal. En cambio, Pitstop 2 fue diseñado para interferir con la unión de la molécula adaptadora AP-2 con la clatrina, impidiendo la endocitosis en todas sus etapas; es decir, “congelando” la endocitosis en cualquier momento de su desarrollo (Von Kleist et al., 2011).

Planteamiento del Problema

Las infecciones por cepas patógenas de *E. coli*, especialmente EPEC, producen enfermedades diarreicas que pueden llegar a ser graves e incluso mortales, especialmente en niños menores de 5 años. Esta bacteria es muy prevalente en nuestro entorno, así como en otros países en vías de desarrollo, por lo que continuar la investigación en torno a sus mecanismos de patogenicidad resulta fundamental para poder entender el proceso de salud-enfermedad con el fin de combatirlo.

Dentro de los mecanismos productores de diarrea, la alteración de las TJ juega un papel esencial. Cuando dichas estructuras se ven afectadas, el epitelio intestinal pierde su capacidad de regular la entrada y salida de iones y otros solutos, además de su capacidad de barrera frente a la invasión de microorganismos intestinales.

Uno de los principales efectores de EPEC que altera las TJ es EspF, produciendo el desplazamiento de las proteínas de las uniones estrechas, así como su endocitosis y posterior degradación. Los mecanismos que EspF utiliza para producir tales alteraciones son conocidos solamente de manera parcial. Posee la peculiar característica de unirse a una miríada de dominios eucarióticos en proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, con las uniones estrechas y la CME, entre otras; además de modificar el tráfico vesicular normal.

El principal mecanismo de alteración de las TJ es la endocitosis de sus proteínas transmembranales. Debido a la estrecha relación que tiene EspF con las proteínas de la CME, sería interesante estudiar si alguno de estos mecanismos está relacionado con el desensablaje de las TJ. Por este motivo, nos planteamos analizar la vía endocítica que induce la cepa de EPEC 2348/69 sobre las TJ en una línea intestinal, así como su destino una vez que han sido endocitadas.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el mecanismo mediante el cual EspF induce la disrupción de las uniones estrechas durante una infección en células intestinales por EPEC?

Hipótesis

EspF interactúa con proteínas de la endocitosis mediada por clatrina y/o de las uniones estrechas, lo que produce su internalización y posterior degradación lisosomal.

Objetivos

Objetivo General

Identificar si el mecanismo de endocitosis está relacionado con la disrupción de las uniones estrechas inducida por EspF durante la infección de EPEC en la línea celular CaCo-2-BBe1.

Objetivos Particulares

- Identificar cuál vía endocítica induce EPEC sobre las uniones estrechas.
- Identificar las proteínas con las que interacciona EspF en las vesículas endocíticas de las uniones estrechas mediante el uso de la molécula Pitstop 2[®].
- Determinar el orden de interacción de EspF con las proteínas de las uniones estrechas y/o de la vía endocítica.
- Reconocer el destino de las proteínas de las uniones estrechas en la vía de degradación y/o reciclamiento endosomal.
- Determinar las alteraciones de las uniones estrechas inducidas por las variantes LB15 y BA320 de EspF.

Material y Métodos

Cultivo bacteriano

Todas las cepas bacterianas fueron mantenidas en medio LB-agar al 1.5% por un máximo de 2 semanas, después de ese tiempo se descongeló la cepa fresca en medio sólido. Para realizar las infecciones, se sembró cada cepa en medio LB líquido en tubos de ensayo, tomando una asada de una colonia única del medio sólido. Posteriormente, se dejaron crecer toda la noche (*overnight*) de 16-18 h a 37 °C en cultivo estático.

Infección celular

En todos los procedimientos para realizar las infecciones se utilizó DMEM sin suplementos. Previo a la infección, las células se lavaron dos veces con DMEM y posteriormente se incubaron por 2 h a 37 °C y 5% de CO₂. Una vez terminada la incubación *overnight*, las bacterias se activaron para aumentar la expresión del T3SS por 2 h con una dilución 1:20 de medio DMEM a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) y se ajustó el volumen de bacterias de acuerdo a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias/célula. En seguida, se añadió el cultivo bacteriano a la monocapa celular y se mantuvieron en DMEM sin suplementos, a 37 °C y 5% de CO₂ por el resto del tiempo de infección. Se realizaron cinéticas de infección de 30, 45 y 60 minutos, midiendo nuevamente la DO en cada tiempo para ajustar el crecimiento bacteriano a una misma MOI.

Cultivo celular

Se utilizaron células CaCo-2-BBe1, las cuales se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ en cajas de cultivo Corning® con DMEM suplementado con 10% SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, 5 mM L-glutamina, penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Se realizó cambio de medio cada tercer día. Se realizaron pases celulares con las

células en sub-confluencia (80%) utilizando tripsina 0.25%. Para los procedimientos experimentales se sembraron células a una densidad de $5-6 \times 10^4$ células/cm² y se mantuvieron hasta su diferenciación espontánea (10-14 días de cultivo), valorada visualmente por la presencia de domos en la monocapa.

Inhibición de la endocitosis

Pit-Stop 2 fue utilizado a una concentración de 12 μ M diluido en DMEM con HEPES pH 7.4, sin suplementos. Todas las condiciones, independientemente del tiempo de infección, fueron incubadas en un total de 60 min con el inhibidor Pit-Stop 2 a 37 °C y 5% de CO₂. Para detener los procesos endocíticos, se incubaron a las células con Pit-Stop 2 durante 5 minutos previos a realizar la infección. Posteriormente, se mantuvieron con el Pit-Stop 2 por el resto del tiempo de infección para evitar la pérdida del efecto.

Inmunofluorescencia y anticuerpos

Se sembraron células CaCo-2-BBe1 en portaobjetos LabTek[®] de 8 pozos, se mantuvieron hasta la diferenciación y se infectaron como se describió previamente. Una vez terminado el tiempo de infección se retiró todo el medio de cultivo y las células fueron fijadas y permeabilizadas. Para mantener las proteínas de las uniones estrechas, las células se fijaron y permeabilizaron con PFA al 1% por 15 min, seguido de una mezcla de metanol y acetona a una relación 1:1 por 5 min a -20°C. Posteriormente, se bloqueó con una solución de BSA al 1% por 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron *overnight* de 12-14 h a 4 °C y los secundarios se incubaron por 1 h a temperatura ambiente, ambos en agitación suave. Al terminar la incubación se dejaron secar las preparaciones por 1 h, se montaron con Vectashield[®] y se sellaron con esmalte de uñas.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-ZO-1 policlonal (Invitrogen, en conejo, 61-7300), anti-Clatrina x22 monoclonal (Invitrogen, en ratón, MA1-065),

anti-Clatrina policlonal (Santa-Cruz, en cabra, sc-6579) y anti-Ocludina monoclonal (Invitrogen, en ratón, 33-1500). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón Cy5 (Jackson, en burro, 715-175-150), anti-conejo Cy5 (Jackson, en burro, 711-175-152) y anti-cabra FITC (Jackson, en burro, 705-095-003). Las preparaciones fueron contra-teñidas con faloidina rodaminada para detectar la F-actina y DAPI para detectar el DNA en los núcleos.

Análisis de las imágenes y estadística

Las laminillas fueron analizadas usando el microscopio confocal TCS SP8 (Leica Microsystems) y el software de Leica LAS AF Lite. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron exportadas en formato TIFF en una resolución de 1024x1024 píxeles con el fin de analizarlas mediante el software ImageJ (Rasband, 1997; Schneider et al., 2012). Para la obtención de las gráficas de intensidad lineal, se dibujó una línea recta sobre el objeto a analizar y se utilizó la herramienta *RGB Profile Plot*.

Para el análisis de la co-localización, las imágenes se transformaron al formato RGB y se separaron los canales rojo y verde. Posteriormente, se segmentaron aplicando el filtro *Threshold* al canal verde (clatrina). La imagen binaria resultante se utilizó para seleccionar los puntos fluorescentes (vesículas putativas) y eliminar el fondo. La selección se guardó como región de interés (ROI) y se utilizó para la cuantificación de la co-localización. Las gráficas de dispersión y los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante la herramienta *Colocalization Finder* usando las ROI's previamente seleccionadas. Para el análisis basado en objetos, se utilizó la herramienta *JCoP* (Bolte & Cordelières, 2006; Cordelières & Bolte, 2008).

El análisis estadístico de los coeficientes de Pearson y la cantidad de vesículas co-localizando fue realizado mediante el software SigmaPlot 12.0. Se utilizó la prueba *t-student* no pareada, tomando como estadísticamente significativos valores por debajo de 0.05.

Resultados

La infección con EPEC WT induce la co-localización parcial de ZO-1 y clatrina

Uno de nuestros principales objetivos era poder estudiar el comportamiento de las uniones estrechas (TJ) en las etapas iniciales de su desensamblaje durante la infección por EPEC. Como abordaje inicial, estudiamos la vía endocítica de las proteínas de las uniones estrechas. Sin embargo, estos cambios son muy sutiles en tiempos tempranos, además de que los mecanismos de endocitosis suelen ocurrir en el transcurso de segundos/minutos. Para visualizar el proceso con mayor precisión, decidimos utilizar una alta cantidad de bacterias en relación con el número de células (MOI 100), las cuales fueron teñidas mediante inmunofluorescencia y analizadas mediante microscopía confocal a los 30, 45 y 60 min de infección por EPEC WT. Mediante esta estrategia conseguimos intensificar las alteraciones inducidas durante la infección y, en consecuencia, aumentar la probabilidad de observar la endocitosis en el momento exacto en el que se está llevando a cabo.

La primera de las proteínas de las TJ analizadas fue ZO-1, para lo cual infectamos células CaCo-2-BBe1 con EPEC WT a diferentes tiempos y las analizamos por inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-ZO-1 y anti-clatrina, seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a Cy-5 (rojo) y fluoresceína (verde), respectivamente. En las células sin infectar podemos observar la distribución normal de ZO-1 en la región apical de la membrana plasmática. ZO-1 se detectó por una señal fluorescente fuerte, compacta y uniforme, la cual delimitó nítidamente a las células, formando el patrón clásico de malla de gallinero de esta proteína (**Fig. 1A**).

Durante la infección con EPEC WT se produjo una disminución de la localización de ZO-1 en la membrana, manifestado por una señal débil e irregular. Los sitios en donde la señal disminuía se alternaban con otros en donde la señal se

engrosaba (**Fig. 1C**). En ciertas regiones la señal de ZO-1 se desprendía de la membrana hacia el citoplasma, formando haces de aspecto tortuoso. Estas alteraciones ocurrieron desde los 30 min de infección y fueron mucho más intensas a los 60 min (**Fig. 1D**). En algunas células se formaron puntos fluorescentes intracelulares de entre 200-400 nm de diámetro, los que podían permanecer unidos a la membrana por filamentos delgados o encontrarse como estructuras independientes, tanto en regiones centrales del citoplasma como en estrecha cercanía con la membrana plasmática.

Las observaciones anteriores indican que las TJ están siendo alteradas por EPEC WT. Para determinar la relación entre el desensamble de ZO-1 y la endocitosis de las proteínas de las TJ, analizamos la señal de las cadenas pesadas de clatrina de manera conjunta con ZO-1.

Sorprendentemente, desde los 30 min de infección pudimos observar co-localización de la señal de clatrina y de ZO-1, aunque ésta se limitó a la membrana celular (**Fig. 1B, flechas blancas**). En algunas células ZO-1 se desprendió de la membrana, formando cúmulos citoplasmáticos intensos, los cuales también co-localizaron parcialmente con la clatrina (**Fig. 1B, flecha azul**).

En las células infectadas por 45 min se detectó un aumento en el tamaño de las vesículas recubiertas por clatrina. No obstante, la frecuencia de co-localización fue baja (**Fig. 1C**). En cambio, a los 60 min de infección la cantidad de vesículas endocíticas disminuyó considerablemente; sin embargo, hubo un aumento en la intensidad y proporción de puntos fluorescentes co-localizando con ZO-1, principalmente en el citoplasma (**Fig. 1D**).

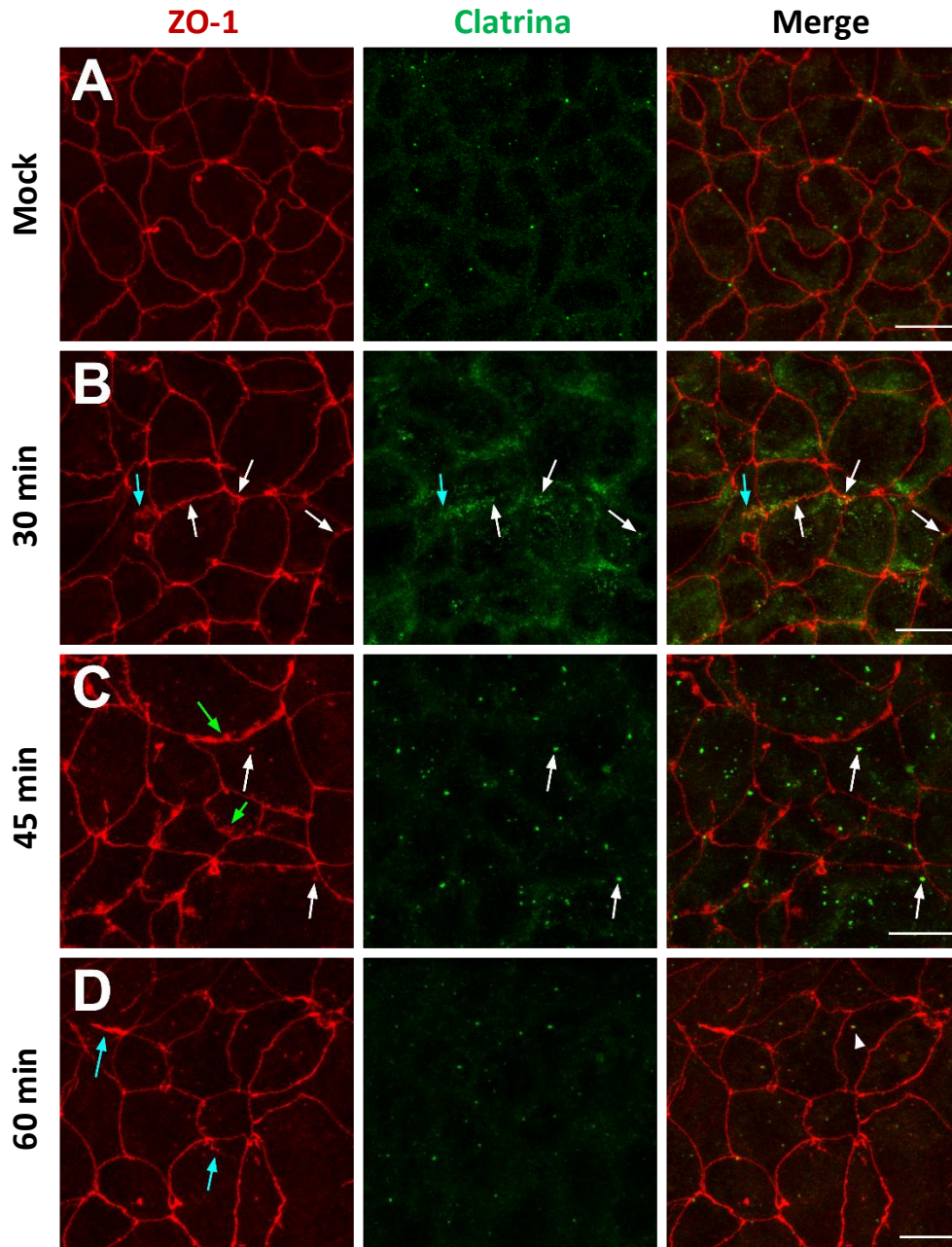


Figura 1. Alteraciones de la proteína ZO-1 durante la infección de células CaCo-2-BBe1 por EPEC WT. Las células se infectaron por 30, 45 y 60 min, se fijaron con PFA 1% y una mezcla de metanol/acetona para preservar las TJ. Posteriormente, se marcaron con anti-ZO-1 (rojo) y anti-Clatrina (verde). **A)** Células sin infectar (Mock). **B)** Células infectadas durante 30 min. Las flechas blancas señalan los sitios en donde la señal de clatrina co-localizó con la de ZO-1 a nivel membranal. La flecha azul muestra un gran cúmulo citoplasmático de ZO-1 co-localizando con la clatrina. **C)** Células infectadas durante 45 min. Las flechas verdes señalan zonas en donde la señal de ZO-1 se engrosó, las flechas blancas indican los sitios donde ZO-1 y clatrina se encuentran muy cerca. **D)** Células infectadas durante 60 min. Las flechas azules muestran los sitios donde ZO-1 se está desprendiendo de la membrana, la punta de flecha señala la co-localización de ZO-1 y clatrina en posibles vesículas. La barra indica 15 μ m.

En un inicio, estos resultados parecieron contradictorios, ya que señalaban que ZO-1 se encontraba en las mismas estructuras que las moléculas de clatrina a los 60 min de infección, pero no a los 45 min. Sin embargo, un análisis más detallado y a mayor aumento de las imágenes obtenidas a los 45 min mostró que, a pesar de no haber co-localización entre ZO-1 y clatrina, la señal de ZO-1 seguía un patrón de distribución muy similar al de la clatrina (**Fig. 2A**). Al cuantificar la intensidad de fluorescencia, identificamos que la intensidad de clatrina (verde) fue casi el doble de la de ZO-1 (rojo), lo que impidió su co-localización (**Fig. 2C**). En cambio, después de 60 min de infección clatrina y ZO-1 se encontraron co-localizando (**Fig. 2B**). En concordancia, la intensidad de la señal de clatrina (verde), disminuyó a valores muy similares a los de ZO-1 (rojo) (**Fig. 2C**).

En resumen, a los 45 min de infección, ZO-1 y clatrina únicamente co-ocurrieron en las mismas regiones, mientras que a los 60 min de infección se encontraron co-localizando.

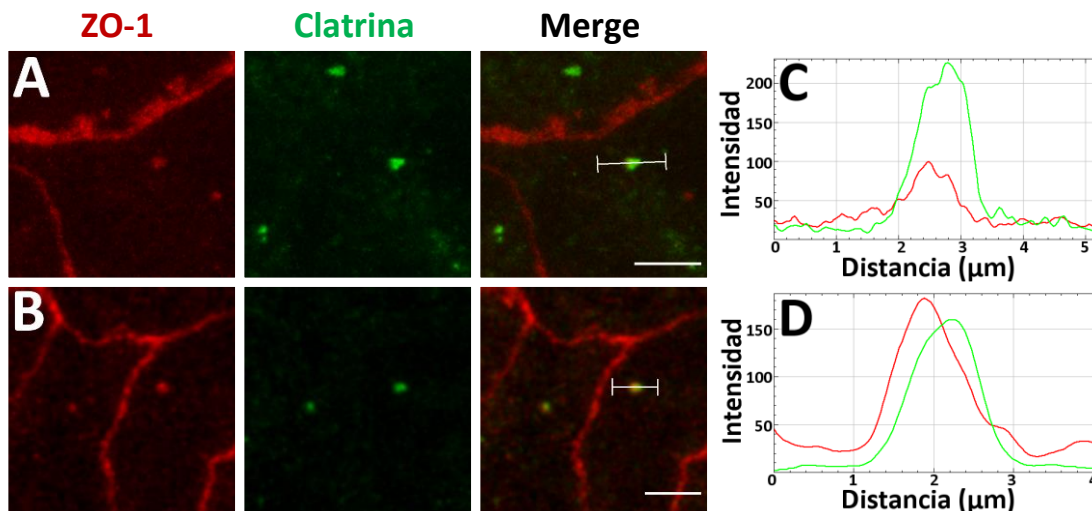


Figura 2. Co-localización de ZO-1 con clatrina tras la infección de células CaCo-2-BBe1 por EPEC WT. Las imágenes mostradas en la Figura 1 fueron analizadas a mayor aumento. **A)** Células infectadas durante 45 min. Se observan tres posibles vesículas recubiertas de clatrina co-ocurriendo con ZO-1. A la derecha se observa otra vesícula positiva para ZO-1 pero sin señal de clatrina. **B)** Células infectadas durante 60 min. Se muestran dos sitios en donde la señal de clatrina co-localiza con la de ZO-1 en posibles vesículas recubiertas. **C)** y **D)** Utilizando el software ImageJ, se cuantificó la intensidad de fluorescencia a lo largo de las líneas que aparecen en los paneles de la izquierda. Los resultados se graficaron de acuerdo a la intensidad de los pixeles. Barra indica 5 μm .

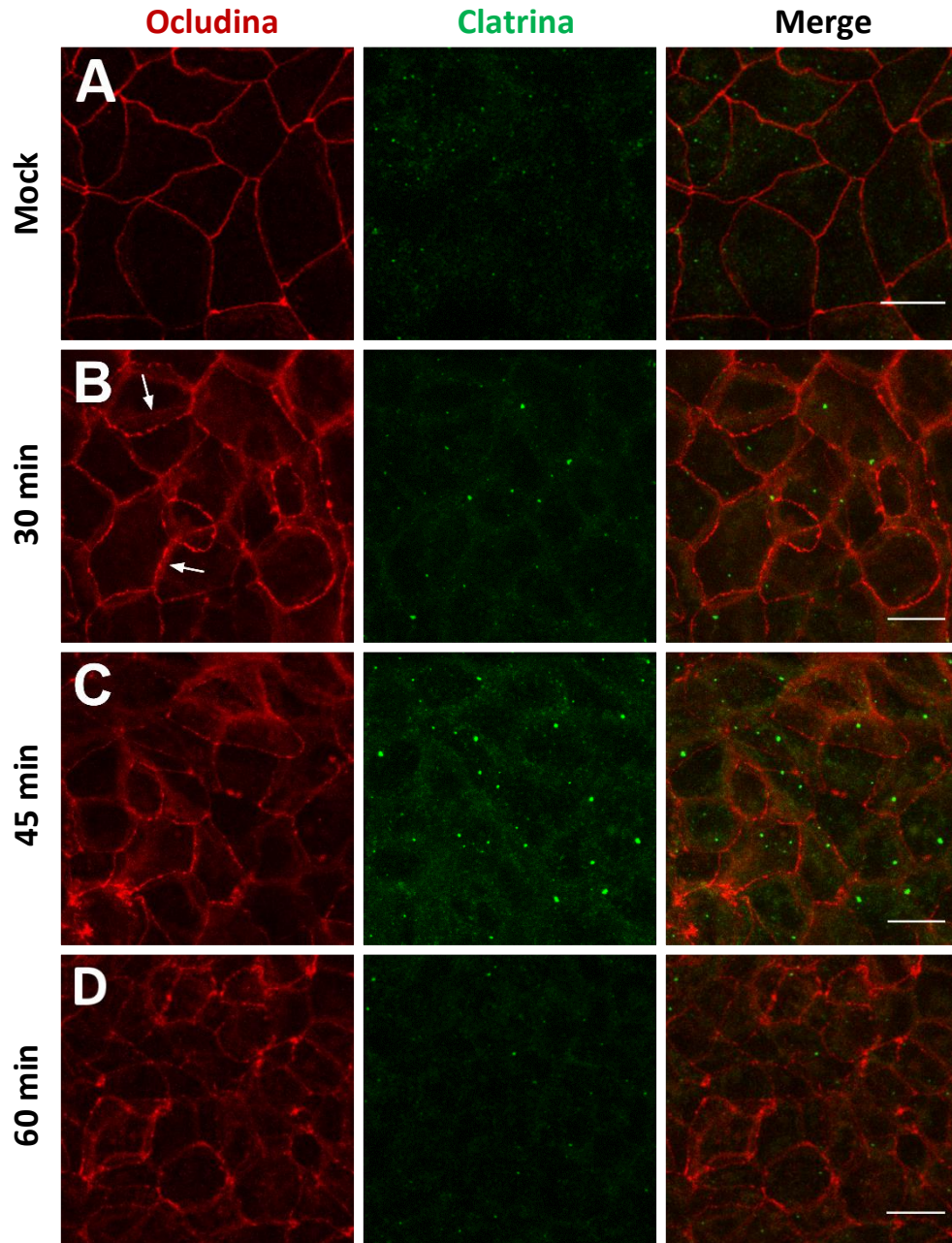


Figura 3. Alteraciones de ocludina durante la infección de células CaCo-2-BBe1 por EPEC WT.

Las células fueron infectadas y fijadas como se indica en la **Figura 1**. Se realizó el marcaje con anticuerpos anti-Ocludina (rojo) y anti-Clatrina (verde). **A)** Células sin infectar (Mock), nótese la ausencia de sombras fluorescentes, lo que indica que la mayoría de ocludina se encuentra asociada a las TJ. **B)** Células infectadas durante 30 min, las flechas señalan la ocludina redistribuida a la membrana basolateral que, al no ser totalmente paralela con la membrana apical, produce una sombra fluorescente. **C)** Células infectadas durante 45 min, se observa mayor relocalización hacia la membrana basolateral. **D)** Células infectadas durante 60 min, la señal de ocludina en la membrana apical es muy débil, habiendo sido relocalizada hacia el citoplasma o la membrana basolateral. La barra indica 15 μm .

La endocitosis de ocludina durante la infección con EPEC WT se produce por una vía independiente de clatrina

Los resultados que obtuvimos con ZO-1 sugieren que alguna de las proteínas transmembranales de las TJ está siendo endocitada mediante vesículas recubiertas de clatrina. La ocludina y la familia de las claudinas son los dos principales grupos de proteínas transmembranales asociadas a las TJ, por lo que decidimos comenzar analizando la vía endocítica de la ocludina. Para determinar si la ocludina es endocitada en vesículas recubiertas de clatrina realizamos el marcaje conjunto de ocludina y clatrina por inmunofluorescencia.

De manera similar a ZO-1, la señal de ocludina en las células sin infectar se caracterizó por una señal intensa, de bordes gruesos y nítidos (**Fig. 3A**). En contraste, las células infectadas se caracterizaron por interrupciones en la señal de ocludina a lo largo de la membrana plasmática, formando una línea discontinua que delimitaba a las células (**Fig. 3B-D**). Estos eventos sugieren que la ocludina está siendo endocitada.

Además, también pudimos detectar la relocalización de la ocludina hacia las regiones basolaterales de la membrana plasmática, efecto que en las imágenes sobrepuestas (*merge*) se observa como una sombra de aspecto semilunar que se sobrelapa con la señal de la membrana apical, la cual es mucho más intensa y definida (**Fig. 3B, flechas**). Hacia los 60 min, la señal de ocludina en la membrana apical era débil y delgada, habiéndose relocalizado en su mayoría hacia el citoplasma o la membrana basolateral.

Los puntos fluorescentes observados en el citoplasma, que se corresponden con vesículas putativas, fueron mucho más intensos que los detectados con ZO-1. A pesar de esto, en ninguna de las imágenes se observó la señal de clatrina co-localizando con ocludina en el citoplasma. En cambio, la señal de clatrina asociada a la membrana podía co-localizar de manera parcial con la ocludina (**Fig. 4A y 4E**). Sin embargo, a medida que se formaba la vesícula y ésta era estrangulada del resto de la

membrana, la co-localización se perdía (**Fig. 4B-C y 4F-G**). Aún más, las vesículas recubiertas de clatrina podían seguirse formando aún en ausencia de ocludina, en los sitios donde a señal de ocludina había sido interrumpida (**Fig. 4D y 4H**). En concordancia, las gráficas de intensidad muestran que las curvas de clatrina y ocludina se van separando (**Fig. 4E-H**). Además, la señal de clatrina fue ligeramente más débil que la de ocludina durante su co-localización en la membrana (**Fig. 4E**) y aumentó en etapas posteriores hasta superar la intensidad de ocludina (**Fig. 4H**).

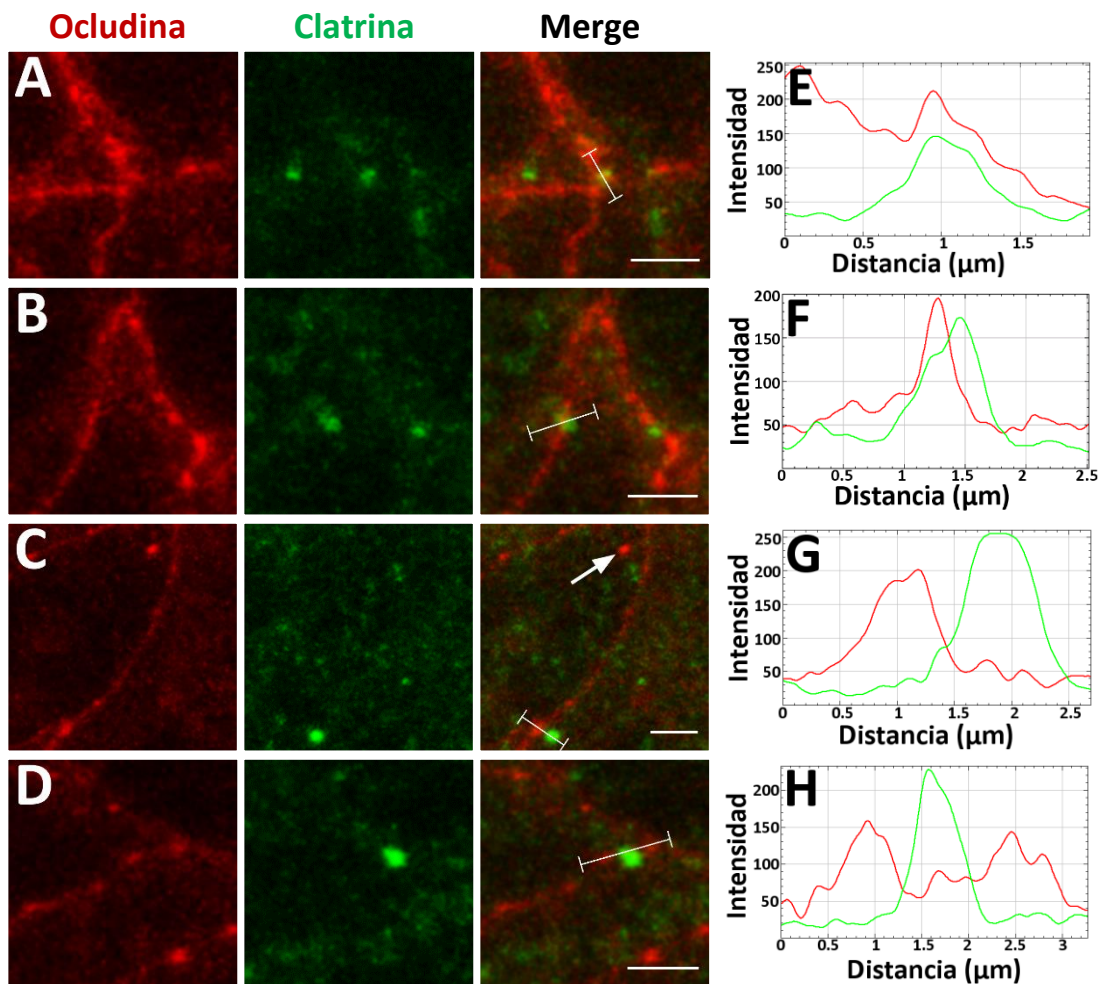


Figura 4. Distribución de ocludina y clatrina en la membrana durante la infección de células CaCo-2-BBe1 con EPEC WT. Las imágenes de la **Figura 3** se analizaron a mayor aumento. **A)** Células infectadas durante 30 min. La señal de clatrina se concentra en la membrana, donde co-localiza parcialmente con ocludina. **B)** Células infectadas durante 45 min. Conforme la señal de clatrina se desprende de la membrana, la co-localización se mantiene en la membrana, pero en el resto de la vesícula hay ausencia de ocludina. **C)** Células infectadas durante 60 min. Las vesículas recién estranguladas tampoco poseen señal de ocludina, la flecha muestra una vesícula positiva para ocludina, pero negativa para clatrina. **D)** Células infectadas durante 45 min. Concentración de clatrina en las zonas de la membrana desprovistas de ocludina. **E) – H)** Gráficas de intensidad producidas al analizar las imágenes de los paneles **A) – D)** mediante el software ImageJ. La barra indica 5 μm .

Estos resultados indican que la endocitosis de la ocludina y la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina carecen de correlación temporal y espacial, representando procesos independientes.

Análisis cuantitativo de la co-localización de ZO-1 y ocludina con clatrina

Para darle mayor soporte a nuestras observaciones, cuantificamos la co-localización de ZO-1 u ocludina con clatrina. Con este fin, utilizamos como primera metodología el coeficiente de correlación de Pearson. Para ello, organizamos los píxeles en un gráfico de dispersión de acuerdo a la correlación de sus intensidades (**Fig. 5A y 5B**) y calculamos el grado con el que la gráfica se ajustó a una línea recta mediante regresión lineal. Entre más cercana a una línea recta sea la distribución de los píxeles, más cercano a 1 será el valor del coeficiente de correlación y mayor el grado de co-localización. Valores iguales a 1 traducen una co-localización perfecta (Dunn et al., 2011). Utilizando esta metodología, encontramos que los píxeles de ocludina (rojo) y clatrina (verde) se distribuyen a lo largo de los ejes de la gráfica (**Fig. 5A**). En concordancia, los coeficientes de correlación para esas gráficas fueron inferiores a 0.15 (**Fig. 5C**). En contraste, los píxeles de ZO-1 se concentraron alrededor de una diagonal en el centro del gráfico, produciendo un mejor ajuste a una recta (**Fig. 5B**) y valores intermedios en el coeficiente de Pearson, alrededor de 0.5 (**Fig. 5C**). Este patrón es característico de una co-localización parcial (Bolte & Cordelières, 2006).

El coeficiente de correlación de Pearson es muy útil como aproximación inicial de la co-localización. Sin embargo, es muy sensible a las variaciones en la intensidad de fluorescencia y a la fluorescencia de fondo, dificultando la diferenciación de señales con co-localización parcial de aquellas que no co-localizan. Por este motivo, los valores en rangos intermedios requieren la confirmación de la co-localización mediante otros métodos (Bolte & Cordelières, 2006).

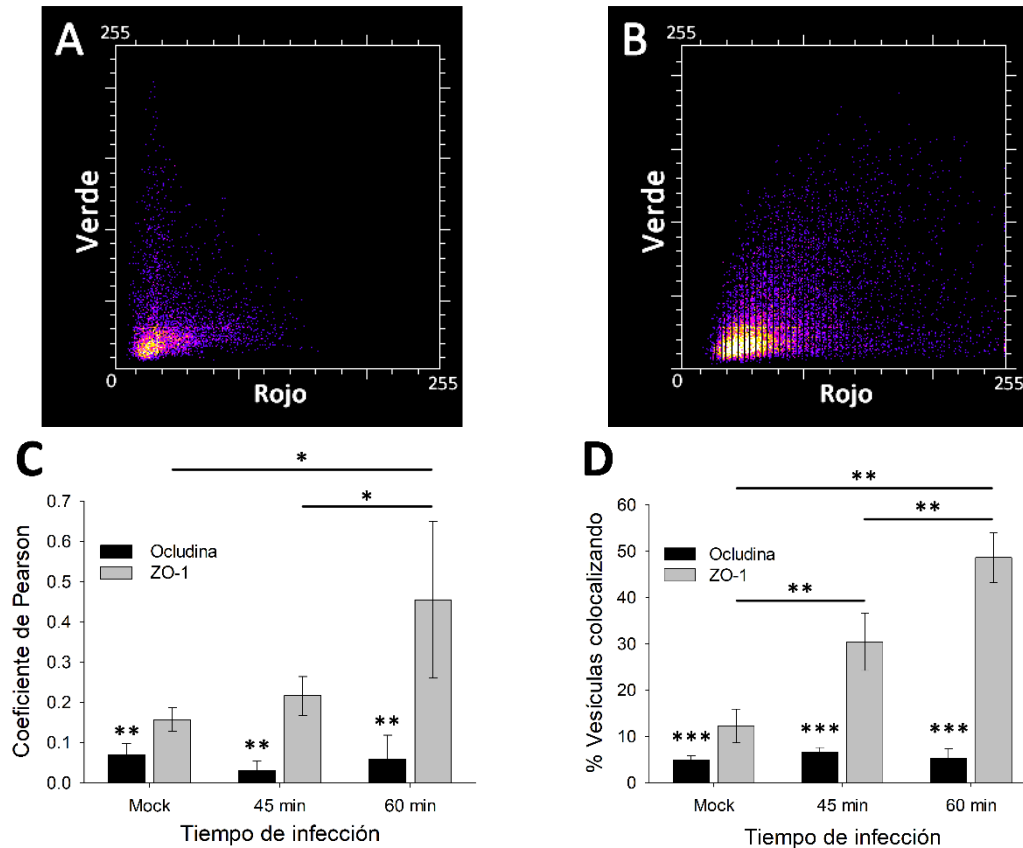


Figura 5. Cuantificación de la co-localización de ocludina o ZO-1 con clatrina.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron segmentadas para seleccionar las vesículas putativas recubiertas de clatrina y realizar el análisis. **A)** y **B)** Imágenes representativas de los gráficos de dispersión obtenidos a los 60 min de infección. **A)** Distribución perpendicular de los pixeles de ocludina (rojo) y clatrina (verde), indicando ausencia de correlación. **B)** Distribución difusa sobre una diagonal de los pixeles de ZO-1 (rojo) y clatrina (verde), lo que indica co-localización parcial. **C)** Gráfica de los coeficientes de correlación de Pearson para ocludina y ZO-1. No se encontró diferencia significativa entre la condición sin infectar y 45 min de infección. **D)** Gráfica del porcentaje de vesículas de clatrina co-localizando con ZO-1 u ocludina utilizando el análisis basado en objetos. A los 45 min de infección hubo un 20% más de vesículas de clatrina co-localizando con ZO-1 que en las células sin infectar, cifra que aumentó al 50% a los 60 min de infección. Los asteriscos sobre las barras de ocludina indican la diferencia entre ocludina y ZO-1 en los respectivos tiempos de infección. El análisis se realizó en al menos cuatro campos distintos de cada una de las condiciones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para confirmar que ZO-1 y clatrina poseían una co-localización parcial, utilizamos una segunda metodología, denominada “análisis basado en objetos”. Este tipo de análisis cuantifica co-ocurrencia, lo que resulta adecuado para procesos biológicos que no siguen un patrón de correlación lineal (Bolte & Cordelières, 2006). En este caso, las imágenes se segmentaron para seleccionar los puntos de la señal de clatrina, que corresponden a vesículas putativas. Luego se cuantificó la proporción de los puntos que también fueron positivos para ocludina o ZO-1. Nuestros resultados

revelaron un aumento de la co-ocurrencia de ZO-1 con clatrina de casi el 20% a los 45 min de infección, asociación que aumentó a más del doble (50%) a los 60 min. En contraste, la tasa de co-ocurrencia para la ocludina se mantuvo en niveles debajo del 10% para todas las condiciones probadas (**Fig. 5D**).

En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia objetiva de que ZO-1 co-localiza con las vesículas recubiertas de clatrina desde los 45 min de infección con EPEC WT, la cual se vuelve más intensa a los 60 min.

Pitstop[®] 2 fue incapaz de impedir la relocalización de ZO-1 y Ocludina a tiempos tardíos

La molécula Pitstop 2 es un potente inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina y puede detener la endocitosis en cualquiera de sus etapas (Von Kleist et al., 2011). Previamente, nuestro grupo de trabajo encontró que utilizando Pitstop 2 se impedía la caída de la resistencia trans-epitelial y la relocalización de claudina-1 tras una infección con EPEC WT (González-Lugo, no publicado).

Por ese motivo, decidimos utilizar la molécula Pitstop 2 para evaluar las alteraciones inducidas sobre ZO-1 y ocludina durante la infección con EPEC WT. Para dicho propósito, incubamos a las células con este inhibidor por 5 min previos a comenzar la infección y durante 1 h en total, independientemente del tiempo de infección. Esta estrategia nos permitió separar los efectos provocados por EPEC WT de algún tipo de toxicidad inducido por la incubación prolongada con el inhibidor. Al finalizar el tiempo de infección las células fueron fijadas y teñidas de la misma manera que en los experimentos previos.

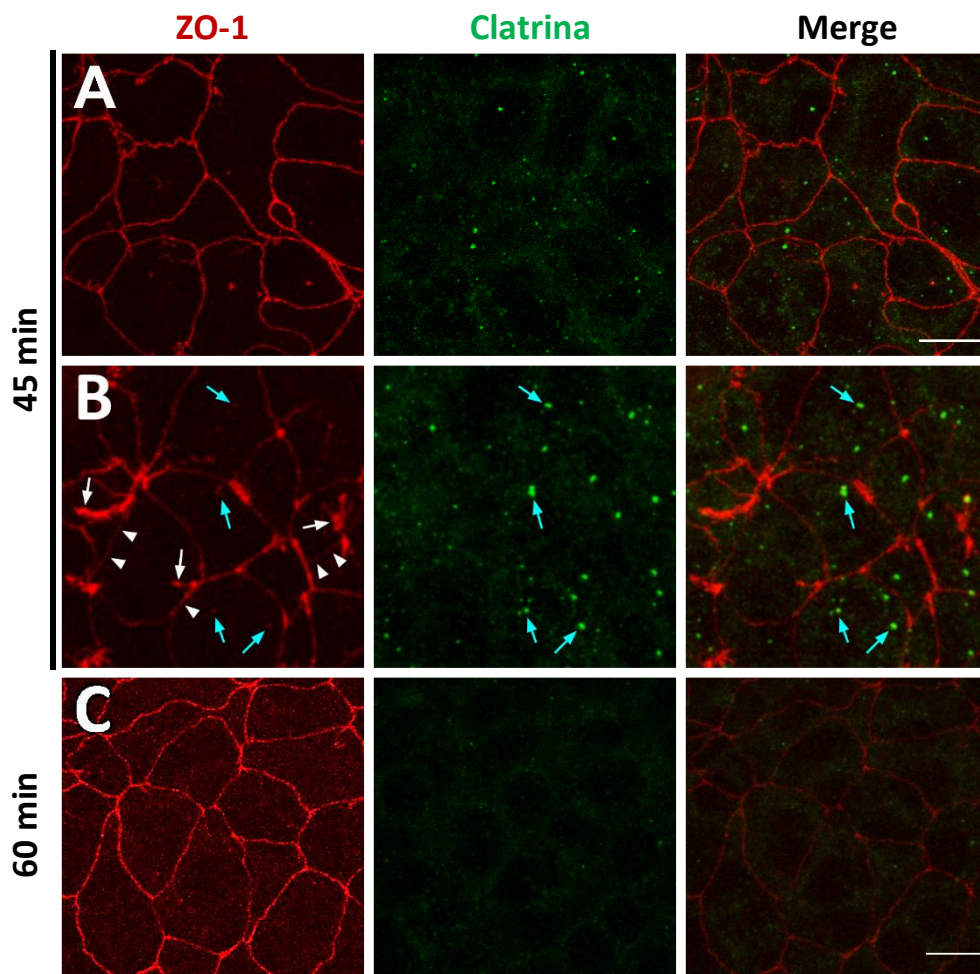


Figura 6. Efectos de Pitstop 2 sobre la relocalización de ZO-1 durante la infección con EPEC WT. Las células fueron incubadas 5 min previos a la infección con el inhibidor Pitstop 2, posteriormente se infectaron con EPEC WT y se mantuvieron con el mismo medio por el resto del experimento. Al terminar el tiempo de infección se fijaron y analizaron mediante inmunofluorescencia. **A)** Células infectadas durante 45 min con EPEC WT. Se observan pocos haces laterales y la intensidad de ZO-1 es muy similar a las células mock (**compárese con Fig. 1A**). **B)** Un campo diferente de células infectadas durante 45 min con EPEC WT. Las flechas blancas indican los gruesos haces laterales de ZO-1 desprendiéndose de la membrana, la cual quedó desprovista de ZO-1 (puntas de flecha). Las flechas azules indican la co-ocurrencia de ZO-1 con clatrina. **C)** Células infectadas durante 60 min. La señal de ZO-1 fue mínima y la cantidad de vesículas disminuyó considerablemente. La barra indica 15 μ m.

Cuando se marcó ZO-1 en las células que fueron incubadas con Pitstop 2 pudimos observar que en algunos campos a los 45 min de infección, las células mantuvieron una señal intensa de ZO-1 en la membrana y pocos haces laterales, muy parecido a la de la condición sin infectar (**Fig. 6A, compárese con la Fig. 1A**). Mientras que en otros campos al mismo tiempo de infección, la señal de ZO-1 aumentó de espesor e intensidad en la membrana y se desprendía en forma de gruesos haces

laterales, mucho más gruesos e intensos que en las células sin Pitstop 2 (**compárese Fig. 6B con 1C**), dejando como remanente una señal débil y delgada en la membrana. Además, ZO-1 y clatrina mantuvieron su co-ocurrencia en el citoplasma (**Fig. 6B**). Finalmente, a los 60 min de infección la señal de ZO-1 en las TJ fue muy débil y los gruesos haces laterales estaban prácticamente ausentes. En contraste, en las células infectadas durante 60 min pero sin Pitstop 2, aún se podían observar haces de ZO-1 desprendiéndose de la membrana. Además, había mayor concentración de ZO-1 en las TJ en comparación con las células tratadas con Pitstop 2 (**Compárese Fig. 6C con 1D**).

En el caso de ocludina, a los 30 min las alteraciones fueron similares a las células infectadas con EPEC WT y sin Pitstop 2, con una señal discontinua en la membrana y parte de la ocludina redistribuyéndose hacia la membrana basolateral (**Fig. 7A, compárese con la Fig. 3B**). A los 45 min, la señal de ocludina no presentaba discontinuidades en la membrana, a diferencia de las células no tratadas con Pitstop 2 (**compárese Fig. 7B con 3C**). Esto es sugerente de ausencia de endocitosis. A su vez, observamos una disminución en la intensidad de la señal a nivel de las TJ y un aumento en la membrana basolateral (**Fig. 7B**). Hacia los 60 min la señal de ocludina se encontraba mayormente en la membrana basolateral y la señal en las TJ había desaparecido casi por completo. La intensidad de ocludina también disminuyó considerablemente en comparación con las células sin Pitstop 2 a los mismos tiempos de infección (**Fig. 7C, compárese con la Fig. 3D**), quizás debido a que se encuentra dispersa en toda la membrana y eso hace su señal más difusa.

Estos hallazgos sugieren que a los 45 min de infección, Pitstop 2 ha inhibido la endocitosis de ocludina. No obstante, la ocludina aún es capaz de relocarse hacia la membrana basolateral, fuera de las TJ.

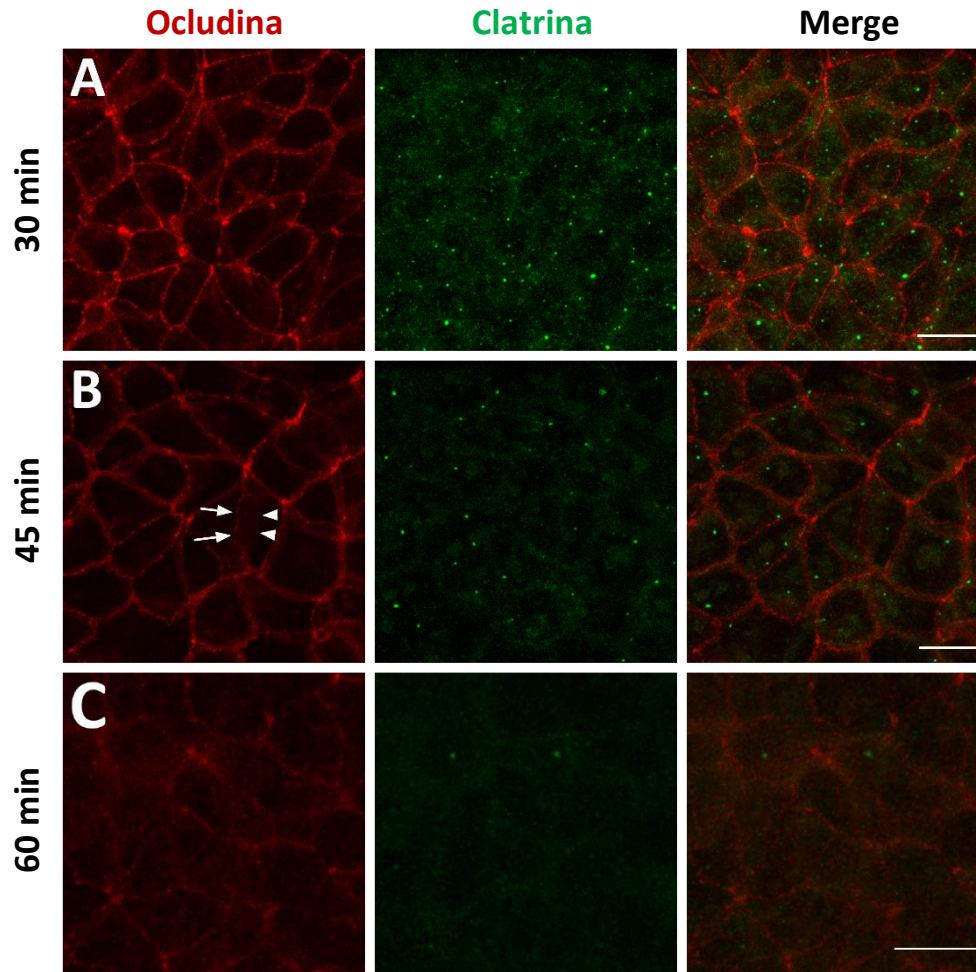


Figura 7. Efectos de Pitstop 2 sobre la distribución de ocludina durante la infección con EPEC WT. Las células fueron tratadas al igual que en el experimento anterior, pero utilizando un anticuerpo anti-Occludina. **A)** Células infectadas por 30 min. Se observa un patrón similar al de la infección sin Pitstop 2 (**Fig. 3B**). **B)** Células infectadas por 45 min. La ocludina se distribuyó principalmente hacia la membrana basolateral (puntas de flecha), adelgazando la señal de las TJ (flechas). **C)** Células infectadas por 60 min. La señal de ocludina es muy difusa y casi imperceptible en las TJ. La mayoría de la señal de clatrina también se perdió. La barra indica 15 μm .

Para poder comprender mejor los efectos de Pitstop 2 sobre las células, también cuantificamos las vesículas putativas de clatrina en cada una de las condiciones. Como se aprecia en las **Figuras 6 y 7**, la señal de clatrina disminuyó conforme aumentó el tiempo de infección. A los 30 min, la cantidad de vesículas endocíticas fue muy alta, superando incluso a la condición sin infectar (**compárese Fig. 7A con 3A**). Sin embargo, conforme avanzó el tiempo de infección, el número de vesículas disminuyó progresivamente, hasta ser casi indetectables a los 60 min de infección (**Fig. 7C y 6C**).

De manera interesante, en las células que no fueron incubadas con Pitstop 2 la cantidad de vesículas fue alternante. A los 30 min de infección, la cantidad de vesículas fue ligeramente menor que en las células sin infectar, mientras que este valor aumentó a los 45 min y volvió a disminuir drásticamente a los 60 min (**Fig. 8**). Esto parece indicar que EPEC WT induce ráfagas de endocitosis en las células, más que producir su aumento continuo.

En conjunto, estos resultados demuestran que, a pesar de que Pitstop 2 es un potente inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina, es incapaz de impedir el desensamblaje de las TJ durante la infección con EPEC WT.

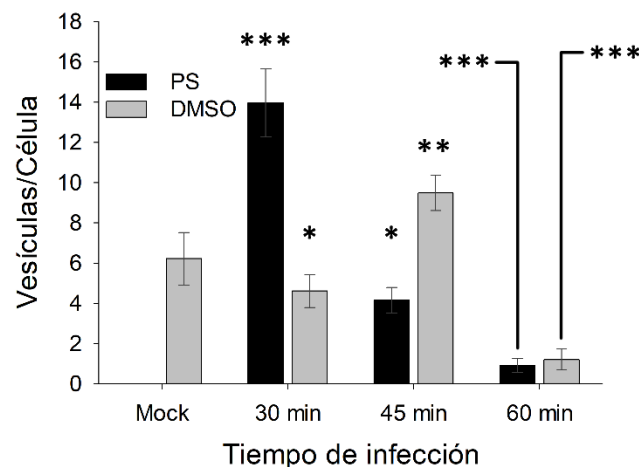


Figura 8. Cuantificación del número de vesículas por célula.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal se segmentaron para seleccionar los puntos fluorescentes de clatrina, correspondientes a vesículas putativas. Posteriormente, se cuantificaron utilizando el software ImageJ. Los asteriscos indican la diferencia estadística con respecto a la condición sin infectar. También hubo diferencia significativa $p < 0.001$ entre los 30, 45 y 60 min, tanto para la condición con Pitstop 2 como para los grupos no tratados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Discusión

En este estudio demostramos que durante la infección por EPEC WT, la proteína ZO-1 es relocalizada hacia el citoplasma asociada a las vesículas recubiertas por clatrina, proceso que presenta características muy peculiares. A los 45 min de infección la co-localización fue mínima, mientras que a los 60 min hubo un aumento considerable. Este fenómeno pareciera contradictorio si suponemos que ZO-1 es endocitada directamente por vesículas recubiertas de clatrina, ya que esperaríamos tener señales intensas tanto de clatrina como de ZO-1 y, a medida que avanza el tiempo, la señal debería irse atenuando por el desnudamiento de la vesícula, así como la degradación de ZO-1 o su distribución hacia otros compartimentos. Sin embargo, debemos recordar que ZO-1 no es una proteína transmembranal y, por lo tanto, la endocitosis no forma parte de su mecanismo de recambio normal (Beutel et al., 2019; Shen et al., 2008; Yu et al., 2010). En cambio, se ha reportado (Shen et al., 2008) que ZO-1 se moviliza entre dos pozas: 1) asociada a las TJ en la membrana apical y 2) una poza intracelular, que se encuentra libre en el citoplasma. Entonces, al ser una proteína citoplasmática, ZO-1 no forma parte integral de la vesícula endocítica, sino que se asocia fuertemente con las proteínas transmembranales cuando son endocitadas (Chalmers & Whitley, 2012). Lo más probable es que ZO-1 acompañe a la vesícula endocítica durante su trayecto, manteniéndose unida a una proteína de membrana. En este aspecto, se ha demostrado que durante la exposición a bajas concentraciones de calcio, el complejo de las TJ es endocitado en su totalidad; es decir, claudina, ocludina y ZO-1 se encuentran co-localizando (Ivanov et al., 2004). Este tipo de endocitosis conjunta no se ha observado bajo otros estímulos (Hopkins et al., 2003; Marchiando, Shen, et al., 2010; Rao et al., 2002), pero indica que la asociación de ZO-1 con las vesículas endocíticas es factible. De hecho, nuestras imágenes de microscopía confocal sugieren que ZO-1 está literalmente siendo arrancado del resto de la unión estrecha para recubrir a la vesícula durante su internalización. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que las vesículas

putativas de ZO-1, observadas como puntos de fluorescencia intracelulares, poseen una intensidad débil y difusa, en contraposición a la señal de clatrina u ocludina, que es mucho más nítida y brillante (ver gráficas de intensidad en **Fig. 2 y 4**). Esto sugiere que la ocludina y la clatrina se encuentran altamente compactadas en las vesículas, mientras que ZO-1 se encuentra más dispersa o en menor cantidad en la parte exterior de la vesícula. La combinación de estos factores posiblemente sea la causante de que a los 45 min únicamente puedan co-ocurrir las señales de ZO-1 y de clatrina. De hecho, como se observa en la **Figura 2C**, la intensidad en el canal verde (clatrina) es prácticamente del doble de la del canal rojo (ZO-1). Lo que concuerda con la alta compactación de la clatrina al formar los triskeliones que recubren a la vesícula (Kirchhausen et al., 2014). Por otro lado, la señal de ZO-1 es mucho más débil, pues no se encuentra en las mismas concentraciones ni tan compactada como cuando se localiza en las TJ.

En cambio, a los 60 min la co-localización de ZO-1 y clatrina fue mucho más intensa, debido principalmente a que la intensidad de la señal de clatrina se redujo a niveles similares a los de ZO-1 (**Fig. 2D**). Esta reducción de intensidad se puede explicar por el hecho de que las vesículas endocíticas deben desnudarse de su proteína de recubrimiento (i.e. clatrina) antes de poderse fusionar con los endosomas tempranos o encaminarse hacia cualquier otra vía de tráfico intracelular. En correspondencia, resulta comprensible que a los 45 min de infección podamos observar una alta densidad de vesículas de clatrina, las cuales fueron inducidas por la infección por EPEC WT y, a medida que avanza el tiempo de infección, las vesículas sigan su curso natural, desnudándose de la clatrina y disminuyendo su señal fluorescente hacia los 60 min de infección (**Fig. 1, 3 y 8**).

En resumen, la relación entre ZO-1 y clatrina no es lineal, ya que la cantidad de ZO-1 asociada a las vesículas no depende directamente de la de clatrina, sino que depende de las claudinas y la ocludina. Además, la proporción ZO-1/clatrina se ve modificada en el tiempo, conforme la vesícula se desnuda. Esto se refleja en la

cuantificación de la co-localización, con coeficientes de Pearson muy bajos a tiempos tempranos, pero en rangos intermedios a mayor tiempo de infección.

En contraste, el análisis de co-ocurrencia basado en objetos sugería que la asociación de ZO-1 con las vesículas sucedía incluso desde tiempos tempranos y aumentaba en el tiempo. Posiblemente debido a la alta intensidad de clatrina en comparación con la de ZO-1 fue imposible observar su co-localización (**Fig. 2C**). A mayor tiempo de infección la intensidad y el número de vesículas de clatrina disminuyeron, lo que facilitó la detección de la co-localización.

Es interesante que también observamos algunos puntos fluorescentes de ZO-1 que carecían de la señal de clatrina. Esto podría tener dos explicaciones: 1) que esa vesícula ya haya sido desnudada por completo de clatrina, motivo por el cual no se observa señal o 2) que el cargamento de la vesícula sea ocludina, la cual posiblemente posee un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina y, por lo tanto, nunca estuvo asociada a la clatrina. Con los datos actuales es imposible determinar cuál de las dos posibilidades es la correcta, pero resulta atractivo pensar que dichas vesículas fueron producidas por la endocitosis de la ocludina, que sí es capaz de unirse a ZO-1, pero cuya vía es independiente de clatrina. Por otro lado, las alteraciones morfológicas de ZO-1 fueron muy distintas a las observadas con ocludina, lo cual probablemente también se deba a su condición citoplásmica. En ese aspecto, un trabajo reciente (Beutel et al., 2019) demuestra que las interacciones de ZO-1 consigo misma, con el citoesqueleto y con el resto de las proteínas de las TJ, forma una interfase líquido-líquido, lo que hace a las TJ un dominio espacialmente independiente del resto del citoplasma y de la membrana gracias a la separación de fases. Además, reportan que un exceso de ZO-1 resulta en una separación de ZO-1 de su localización membranal, formando haces que se extendían lateralmente y cúmulos citoplasmáticos de proteína en la membrana. Esos resultados son muy similares a los observados en el presente trabajo; sin embargo, los autores de ese trabajo los observaron en un modelo en el que el aumento de ZO-1 a nivel membranal fue

inducido por la expresión de una mutante fosfo-inactiva. A su vez, esto produjo una saturación de la capacidad membranal de contener ZO-1, por lo que el exceso se liberaba hacia el citoplasma. Se sabe que ZO-1 es estabilizado en la membrana por claudina, ocludina y el citoesqueleto de actina (Furuse et al., 1994; Itoh et al., 1999; Van Itallie et al., 2009). En nuestro caso, EPEC induce la endocitosis de claudinas y ocludina (McNamara et al., 2001; Muza-Moons et al., 2004); además, EPEC es capaz de alterar el citoesqueleto de actomiosina (Swimm et al., 2004; Yuhan et al., 1997). En otras palabras, EPEC produce una disminución de los sitios de unión a ZO-1 en la membrana. Al haber menos proteínas a las cuales unirse, se produciría una condición similar a la observada previamente (Beutel et al., 2019), en la que el exceso de ZO-1 se desprende de la membrana manteniendo su interfase líquido-líquido y formando haces laterales. De hecho, se sabe que en el embrión de pez-cebra, ZO-1 forma cúmulos citoplasmáticos con separación de fases durante la formación de las TJ y que el sitio de unión a actina es esencial para la incorporación del ZO-1 citoplasmático a las TJ (Schwayer et al., 2019). Además, la regulación fina de la tensión del citoesqueleto de actomiosina determina la estabilidad y permeabilidad de las TJ (Belardi et al., 2020; Cunningham & Turner, 2012). Así pues, EPEC produce notables alteraciones del citoesqueleto de actina, por lo que este podría ser otro mecanismo importante para la separación de ZO-1 mediante haces laterales.

El reporte mencionado (Beutel et al., 2019) también aporta información valiosa para poder explicar por qué no se observa un aumento citoplasmático de la fluorescencia de ZO-1, como sí se observa con ocludina y las claudinas, tras la disrupción de las TJ inducida por EPEC WT y otros estímulos (Marchiando, Shen, et al., 2010; Shen & Turner, 2005). De acuerdo con este modelo, los cúmulos de ZO-1 mantienen la interfase líquido-líquido aún en el citoplasma, motivo por el que observamos los haces de proteína desprendiéndose de la membrana.

En el caso de ocludina pudimos observar dos alteraciones diferentes: 1) la relocalización hacia la membrana basolateral y 2) la endocitosis de la proteína. No

logramos identificar alguna secuencia temporal entre ambos eventos, por lo que posiblemente ocurran de manera simultánea una vez que las TJ comienzan a desensamblarse. De hecho, se sabe que la ocludina es móvil a lo largo de la membrana, pudiendo alternar entre la membrana apical y la basolateral mientras no se encuentre asociada a otra proteína (Shen et al., 2011). Una vez que la ocludina se asocia con alguna claudina, el contacto es estabilizado por ZO-1 y queda fijo a las TJ en la membrana apical (Raleigh et al., 2011). Es por eso que la relocalización hacia la membrana basolateral ocasionó el adelgazamiento de la señal de ocludina en la membrana apical, hasta casi desaparecer hacia los 60 min de infección.

Previamente, ya se había caracterizado la endocitosis de la ocludina utilizando microscopía *in vivo*, en un modelo de *switch* de calcio (Shen & Turner, 2005) y tras el estímulo con TNF- α (Marchiando, Shen, et al., 2010). En dichos trabajos se describieron tres fases principales: 1) el enriquecimiento de la proteína en una región de la membrana, observado como “protrusiones” en la membrana; 2) posteriormente dichas protrusiones se invaginaron y se redondearon y 3) separación de la señal del resto de la membrana para formar la vesícula endocítica, dejando un espacio vacío en la membrana; es decir, formando líneas discontinuas. En nuestro modelo de células fijadas también pudimos detectar cada una de esas fases, lo que implica que la ocludina está siendo endocitada. A pesar de esto, la señal de ocludina sólo presentó co-localización con clatrina a nivel membranal, mientras que ninguna de las vesículas en el citoplasma se encontró co-localizando ni co-ocurriendo con ocludina. Esto sugiere que su endocitosis es independiente de clatrina. Nuestros resultados fueron similares tanto durante la formación de la vesícula (**Fig. 4B y 4F**), como cuando ya se había desprendido de la membrana (**Fig. 4C y 4G**). Los eventos de co-localización membranal fueron esporádicos y se observaron principalmente a tiempos tempranos (30 y 45 min). Los resultados anteriores concuerdan con otros reportes en los que el TNF- α (Marchiando, Shen, et al., 2010), la despolimerización del citoesqueleto de actina (Shen & Turner, 2005) y la toxina CNF-1 de *E. coli* (Hopkins et al., 2003) inducen la endocitosis de ocludina mediante vesículas recubiertas de caveolina. Dada la gran

variedad de estímulos que promueven esta vía endocítica, es probable que la infección por EPEC también induzca la endocitosis de ocludina por este mecanismo.

Dado que la ocludina se encuentra exclusivamente en la membrana apical, asociada a las TJ, la podemos considerar como un marcador de TJ (Tsukita & Furuse, 1998). Por lo tanto, la co-localización de ocludina y clatrina en la membrana es altamente indicativa de que existen procesos endocíticos dependientes de clatrina produciéndose en las TJ durante la infección con EPEC WT. Las TJ están conformadas por diversas proteínas y la presencia de clatrina sugiere que al menos una de ellas sigue esta vía endocítica. De hecho, hay reportes que muestran que la claudina-2 es endocitada mediante vesículas recubiertas de clatrina tras un estímulo con EGF (Ikari et al., 2011). Por otro lado, el virus de la hepatitis C induce la endocitosis mediada por clatrina de la claudina-1 (Farquhar et al., 2012). A su vez, esto concuerda con que Pitstop 2 impida la relocalización de claudina-1 durante la infección con EPEC WT (González-Lugo, no publicado). La endocitosis de claudina-1 mediante clatrina explicaría por qué la ocludina co-localiza con clatrina únicamente a nivel membranal, y conforme la vesícula se va formando y claudina-1 se separa de la ocludina y del resto de las TJ, se pierde la co-localización (**Fig. 4C y 4G**). Aún más, después de que la ocludina ya había sido endocitada, podían seguirse formando vesículas recubiertas de clatrina en las zonas desprovistas de ocludina (**Fig. 4D y 4H**), lo que sustenta la hipótesis de que cada proteína de las TJ es endocitada por vías distintas.

Cabe destacar que las imágenes de la **Figura 4** se obtuvieron de campos y células distintas, ya que se trata de células fijadas. Por consiguiente, a pesar de que parecen tratarse de eventos secuenciales a través del tiempo, no podemos tener total certeza de que ocurre de esta manera hasta observar los procesos directamente mediante microscopía *in vivo*.

Sorprendentemente, cuando utilizamos Pitstop 2 los resultados mostraron patrones notablemente distintos. En algunos campos ZO-1 parecía conservar su morfología normal a los 45 min, mientras que en otros las alteraciones fueron más

intensas que en las células sin Pitstop 2. Posiblemente esto se deba a que 45 min es un tiempo intermedio, por lo que encontramos alteraciones combinadas, tanto de los 30 min como de los 60 min. De acuerdo con esta hipótesis, a los 30 min la señal de ZO-1 se mantendría similar a la condición sin infectar. Ya que ZO-1 se une fuertemente con las claudinas, la permanencia de ZO-1 en la membrana sería estabilizada por claudina-1 gracias a que su endocitosis estaría siendo inhibida por el Pitstop 2 (González-Lugo, no publicado).

Se sabe que ZO-1 es capaz de unirse tanto a las claudinas como a la ocludina mediante su dominio PDZ-1 (Itoh et al., 1999) y los dominios U5-GuK (Furuse et al., 1994), respectivamente. Además, dicha interacción es necesaria para la localización de ZO-1 en la membrana en células L transfectadas con claudina-1 o claudina-2 (Itoh et al., 1999); sin embargo, cuando se realiza el silenciamiento de ocludina (Saitou et al., 1998; Van Itallie et al., 2010) o alguna claudina (Cording et al., 2013; Weber et al., 2015) en células polarizadas, la distribución de ZO-1 permanece inalterada. De hecho, se suele requerir la alteración de al menos dos proteínas diferentes para poder relocalizar a ZO-1 hacia el citoplasma (Spadaro et al., 2017). Esto es gracias a que la estructura modular de ZO-1 le permite unirse a muchas otras proteínas de las uniones adherentes, las TJ y del citoesqueleto, las cuales estabilizan su asociación a las TJ (González-Mariscal et al., 2000; Steinbacher et al., 2018; Van Itallie & Anderson, 2014).

A diferencia de lo que ocurre con la claudina-1, en este trabajo demostramos que Pit-Stop 2 no puede impedir la relocalización de ocludina. En este aspecto, nuestras observaciones utilizando Pit-Stop 2 parecen indicar que la redistribución inicial de ocludina no es suficiente, por sí sola, para alterar a ZO-1. Posiblemente debido a que la claudina-1 y/o las otras proteínas que están interaccionando mantengan unido a ZO-1 a las TJ. Conforme avanza al tiempo de infección, EPEC WT continúa dañando proteínas del citoesqueleto y de las TJ, así como la fisiología celular en general. Los efectos de estas alteraciones podrían ser sumatorios hasta un punto

en el que la presencia sustancial de ZO-1 en la membrana se volviera insostenible, desprendiéndose entonces súbitamente y en gran cantidad. El resultado serían los gruesos haces laterales que observamos a los 45 min de infección. En contraposición, en las células infectadas pero sin Pit-Stop 2, la redistribución de ZO-1 se produce de manera gradual, por lo que observamos haces laterales desde tiempos tempranos pero de menor tamaño.

Finalmente, los ensayos utilizando Pitstop 2 resaltan su capacidad de inhibir la endocitosis en cualquier fase. Debido a ello, todas las vesículas formándose en un momento dado quedan secuestradas en la membrana, simulando un aumento en el número de vesículas a los 30 min. Conforme avanzó el tiempo de infección, el número de vesículas detectadas disminuyó considerablemente (**Fig. 8**). Ya que el tiempo de incubación con Pitstop 2 fue el mismo en todas las condiciones (1 h), posiblemente la infección con EPEC WT tenga un efecto sinérgico con Pitstop 2 en la disminución de las vesículas observadas. De hecho, se sabe que la clatrina se encuentra y es necesaria para la formación del pedestal durante la infección con EPEC WT (Veiga et al., 2007). Es posible que EPEC WT utilice y/o degrade la clatrina secuestrada en las vesículas paralizadas por Pitstop 2, lo que explicaría la disminución casi completa de la señal de clatrina conforme avanza el tiempo de infección, a pesar de que el tiempo de exposición a Pitstop 2 fue el mismo.

Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo aportamos información acerca del desensamble de las TJ durante la infección con EPEC WT. Demostramos además que la ocludina posee una vía endocítica independiente de clatrina, aunque su relación con caveolina-1 durante la infección con EPEC WT aún debe ser confirmada. Adicionalmente, los resultados utilizando Pitstop 2 confirmaron nuestros análisis de co-localización. No obstante, Pitstop 2 fue incapaz de impedir la re-localización de ZO-1 y ocludina, lo que sugiere que existen otros mecanismos por los cuales EPEC WT es capaz de modificar las TJ, aunque la confirmación de esta hipótesis requerirá investigación posterior.

Los últimos años han observado un gran avance en el entendimiento de los mecanismos patógenos de EPEC WT; sin embargo, aún falta camino por recorrer. En el futuro se deberá detallar la vía endocítica de la ocludina, en particular si es dependiente de caveolina-1. Además, se deberá identificar la vía de tráfico vesicular completa, si las proteínas una vez endocitadas pueden ser recicladas o si, por el contrario, siguen una vía de degradación. También sería interesante abordar los cambios que produce EPEC en la interfase líquido-líquido de ZO-1 en las TJ y especialmente si éstas se deben a modificaciones post-traduccionales, como cambios en su fosforilación. Se sabe que no sólo ZO-1, sino que también ocludina debe estar fosforilada durante su localización en las TJ, por lo que valdría la pena estudiar si EPEC WT puede alterar ese estado y si dichas alteraciones son dependientes de la proteína efectora EspF.

Referencias

- Almeida-Souza, L., Frank, R. A. W., García-Nafría, J., Colussi, A., Gunawardana, N., Johnson, C. M., Yu, M., Howard, G., Andrews, B., Vallis, Y., & McMahon, H. T. (2018). A Flat BAR Protein Promotes Actin Polymerization at the Base of Clathrin-Coated Pits. *Cell*, *174*(2), 325-337.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.020>
- 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., & Dixon, J. E. (2007). The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *Journal of Cell Biology*, *178*(7), 1265–1278. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705021>
- Belardi, B., Hamkins-Indik, T., Harris, A. R., Kim, J., Xu, K., & Fletcher, D. A. (2020). A Weak Link with Actin Organizes Tight Junctions to Control Epithelial Permeability. *Developmental Cell*, 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.022>
- Beutel, O., Maraschini, R., Pombo-García, K., Martin-Lemaitre, C., & Honigsmann, A. (2019). Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions. *Cell*, *179*(4), 923-936.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.011>
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, *224*(3), 213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Buckley, A., & Turner, J. R. (2018). Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029314>
- Canil, C., Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., & Finlay, B. B. (1993). Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial

- electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infection and Immunity*, 61(7), 2755–2762. <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2755-2762.1993>
- Chalmers, A. D., & Whitley, P. (2012). Continuous endocytic recycling of tight junction proteins: How and why? *Essays in Biochemistry*, 53(1), 41–54. <https://doi.org/10.1042/BSE0530041>
- Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. E., & Williams, P. H. (2003). Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 365–378. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.365-378.2003>
- Collins, A., Warrington, A., Taylor, K. A., & Svitkina, T. (2011). Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology*, 21(14), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.048>
- Cooke, M. L. (2010). Causes and management of diarrhoea in children in a clinical setting. *South African Journal of Clinical Nutrition*, 23(1 SUPPL.), 42–46. <https://doi.org/10.1080/16070658.2010.11734269>
- Cordelières, F. P., & Bolte, S. (2008). JACoP v2.0 : improving the user experience with co-localization studies. *ImageJ User & Developer Conference*, 174–181.
- Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J. K., Milatz, S., Günzel, D., Wolburg, H., Piontek, J., Huber, O., & Blasig, I. E. (2013). In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *Journal of Cell Science*, 126(2), 554–564. <https://doi.org/10.1242/jcs.114306>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

- Cummins, P. M. (2012). Occludin: One Protein, Many Forms. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 242–250. <https://doi.org/10.1128/mcb.06029-11>
- Cunningham, K. E., & Turner, J. R. (2012). Myosin light chain kinase: Pulling the strings of epithelial tight junction function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), 34–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06526.x>
- Dean, P., Maresca, M., & Kenny, B. (2005). EPEC's weapons of mass subversion. *Current Opinion in Microbiology*, 8(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.010>
- Dean, P., Scott, J. A., Knox, A. A., Quitard, S., Watkins, N. J., & Kenny, B. (2010). The enteropathogenic *E. coli* effector EspF targets and disrupts the nucleolus by a process regulated by mitochondrial dysfunction. *PLoS Pathogens*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000961>
- Derivery, E., & Gautreau, A. (2010). Generation of branched actin networks: Assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays*, 32(2), 119–131. <https://doi.org/10.1002/bies.200900123>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Dörfel, M. J., & Huber, O. (2012). Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/807356>
- Dukes, J. D., Fish, L., Richardson, J. D., Blaikley, E., Burns, S., Caunt, C. J., Chalmers, A. D., & Whitley, P. (2011). Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(17), 3192–3205. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0343>

- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(4), 723–742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
- Farquhar, M. J., Hu, K., Harris, H. J., Davis, C., Brimacombe, C. L., Fletcher, S. J., Baumert, T. F., Rappoport, J. Z., Balfe, P., & McKeating, J. A. (2012). Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *Journal of Virology*, 86(8), 4305–4316. <https://doi.org/10.1128/jvi.06996-11>
- Fletcher, S. J., Iqbal, M., Jabbari, S., Stekel, D., & Rappoport, J. Z. (2014). Analysis of occludin trafficking, demonstrating continuous endocytosis, degradation, recycling and biosynthetic secretory trafficking. *PLoS ONE*, 9(11), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111176>
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 127(6), 1617–1626. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1617>
- Garber, J. J., Mallick, E. M., Scanlon, K. M., Turner, J. R., Donnenberg, M. S., Leong, J. M., & Snapper, S. B. (2018). Attaching-and-Effacing Pathogens Exploit Junction Regulatory Activities of N-WASP and SNX9 to Disrupt the Intestinal Barrier. *Cmgh*, 5(3), 273–288. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.015>
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., & González-Pedrajo, B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(OCT), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00129>
- GBD Causes of Death Collaborators. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The*

Lancet, 392(10159), 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)

González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Ávila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11(4), 315–324. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0178>

González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 729–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>

Holmes, A., Mühlen, S., Roe, A. J., & Dean, P. (2010). The EspF effector, a bacterial pathogen's swiss army knife. *Infection and Immunity*, 78(11), 4445–4453. <https://doi.org/10.1128/IAI.00635-10>

Hopkins, A. M., Walsh, S. V., Verkade, P., Boquet, P., & Nusrat, A. (2003). Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *Journal of Cell Science*, 116(4), 725–742. <https://doi.org/10.1242/jcs.00300>

Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K., & Sugatani, J. (2011). Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *Journal of Cellular Physiology*, 226(9), 2448–2456. <https://doi.org/10.1002/jcp.22590>

Institute for Health Metrics and Evaluation. (2018). Findings from the Global Burden of Disease Study 2017. In *The Lancet*. http://www.healthdata.org/sites/default/files/files/policy_report/2019/GBD_2017_Booklet.pdf

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). Características De Las Defunciones Registradas En México Durante 2017. *Comunicado De Prensa Núm.*

525/18, 1–60. <https://www.inegi.org.mx/>

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *Journal of Cell Biology*, *147*(6), 1351–1363. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>

Ivanov, A. I., Nusrat, A., & 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*, *15*(1), 176–188. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0319>

Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Kassa, E. G., Zlotkin-Rivkin, E., Friedman, G., Ramachandran, R. P., Melamed-Book, N., Weiss, A. M., Belenky, M., Reichmann, D., Breuer, W., Pal, R. R., Rosenshine, I., Lapierre, L. A., Goldenring, J. R., & Aroeti, B. (2019). Enteropathogenic *Escherichia coli* remodels host endosomes to promote endocytic turnover and breakdown of surface polarity. In *PLoS Pathogens* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007851>

Kirchhausen, T., Owen, D., & Harrison, S. C. (2014). Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(5), a016725–a016725. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016725>

Kotloff, K. L. (2017). The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatric Clinics of North America*, *64*(4), 799–814.

<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.006>

Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Lawn, J. E., Cousens, S., Mathers, C., & Black, R. E. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet*, *388*(10063), 3027–3035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)

Lundmark, R., & Carlsson, S. R. (2009). SNX9 - A prelude to vesicle release. *Journal of Cell Science*, *122*(1), 5–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.037135>

Marchiando, A. M., Graham, W. V., & Turner, J. R. (2010). Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *5*, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092135>

Marchiando, A. M., Shen, L., Vallen Graham, W., Weber, C. R., Schwarz, B. T., Austin, J. R., Raleigh, D. R., Guan, Y., Watson, A. J. M., Montrose, M. H., & Turner, J. R. (2010). Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *Journal of Cell Biology*, *189*(1), 111–126. <https://doi.org/10.1083/jcb.200902153>

McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(8), 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>

McNamara, B. P., & Sonnenberg, M. S. (1998). A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiology Letters*, *166*(1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00313-9)

McNamara, B. P., Koutsouris, A., O'Connell, C. B., Nougayréde, J. P., Sonnenberg, M. S., & Hecht, G. (2001). Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *Journal of Clinical*

Investigation, 107(5), 621–629. <https://doi.org/10.1172/JCI11138>

Muza-Moons, M. M., Schneeberger, E. E., & Hecht, G. A. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 6(8), 783–793. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00404.x>

Nagai, T., Abe, A., & Sasakawa, C. (2005). Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: Critical role of the 16th leucine residue in EspF. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2998–3011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411550200>

Navaneethan, U., & Giannella, R. A. (2008). Mechanisms of infectious diarrhea. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 5(11), 637–647. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1264>

Ochoa, T. J., & Contreras, C. A. (2011). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 478–483. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b>

Pearse, B. M. F. (1975). Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *Journal of Molecular Biology*, 97(1), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80024-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80024-6)

Peralta-Ramírez, J., Hernandez, M., Manning-Cela, R., Luna-Muñoz, J., Garcia-Tovar, C., Nougayréde, J. P., Oswald, E., & Navarro-Garcia, F. (2008). EspF interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability. *Infection and Immunity*, 76(9), 3854–3868. <https://doi.org/10.1128/IAI.00072-08>

Rajasekaran, A. K., Hojo, M., Huima, T., & Rodriguez-Boulan, E. (1996). Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 132(3), 451–463.

<https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.451>

Raleigh, D. R., Boe, D. M., Yu, D., Weber, C. R., Marchiando, A. M., Bradford, E. M., Wang, Y., Wu, L., Schneeberger, E. E., Shen, L., & Turner, J. R. (2011). Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *Journal of Cell Biology*, *193*(3), 565–582. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010065>

Rao, R. K., Basuroy, S., Rao, V. U., Karnaky, K. J., & Gupta, A. (2002). E-cadherin – β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Society*, *481*, 471–481.

Rasband, W. S. (1997). *ImageJ*. National Institutes of Health. <https://imagej.nih.gov/ij/>

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *Journal of Cell Biology*, *141*(2), 397–408. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.397>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Schwayer, C., Shamipour, S., Pranjic-Ferscha, K., Schauer, A., Balda, M., Tada, M., Matter, K., & Heisenberg, C. P. (2019). Mechanosensation of Tight Junctions Depends on ZO-1 Phase Separation and Flow. *Cell*, *179*(4), 937-952.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.006>

Secretaría de Salud. (2018). *Veinte Principales causas de enfermedad Nacional*. 2018. http://187.191.75.115/anuario/2018/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf

- Shen, L., & Turner, J. R. (2005). Actin Depolymerization Disrupts Tight Junctions via Caveolae-mediated Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(9), 3919–3936. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1089>
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., & Turner, J. R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: A dynamic duo. *Annual Review of Physiology*, *73*, 283–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142150>
- Shen, L., Weber, C. R., & Turner, J. R. (2008). The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *Journal of Cell Biology*, *181*(4), 683–695. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711165>
- Shifflett, D. E., Clayburgh, D. R., Koutsouris, A., Turner, J. R., & Hecht, G. A. (2005). Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Laboratory Investigation*, *85*(10), 1308–1324. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700330>
- Singh, A. P., Sharma, S., Pagarware, K., Siraji, R. A., Ansari, I., Mandal, A., Walling, P., & Aijaz, S. (2018). Enteropathogenic *E. coli* effectors EspF and Map independently disrupt tight junctions through distinct mechanisms involving transcriptional and post-transcriptional regulation. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22017-1>
- Spadaro, D., Le, S., Laroche, T., Mean, I., Jond, L., Yan, J., & Citi, S. (2017). Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors. *Current Biology*, *27*(24), 3783-3795.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.014>
- Spitz, J., Yuhan, R., Koutsouris, A., Blatt, C., Alverdy, J., & Hecht, G. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *268*(2), 31-2).

<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.2.g374>

- Steinbacher, T., Kummer, D., & Ebnet, K. (2018). Junctional adhesion molecule-A: functional diversity through molecular promiscuity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(8), 1393–1409. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2729-0>
- Swimm, A., Bommarius, B., Li, Y., Cheng, D., Reeves, P., Sherman, M., Veach, D., Bornmann, W., & Kalman, D. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* Use Redundant Tyrosine Kinases to Form Actin Pedestals. *Molecular Biology of the Cell*, 15(8), 3520–3529. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0093>
- Tapia, R., Kralicek, S. E., & Hecht, G. A. (2017a). EPEC effector EspF promotes Crumbs3 endocytosis and disrupts epithelial cell polarity. *Cellular Microbiology*, 19(11), 1–14. <https://doi.org/10.1111/cmi.12757>
- Tapia, R., Kralicek, S. E., & Hecht, G. A. (2017b). Modulation of epithelial cell polarity by bacterial pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1405(1), 16–24. <https://doi.org/10.1111/nyas.13388>
- Tsukita, S., & Furuse, M. (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: From occludin to claudin. *Genes to Cells*, 3(9), 569–573. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00212.x>
- Ugalde-Silva, P., Gonzalez-Lugo, O., & Navarro-Garcia, F. (2016). Tight junction disruption induced by type 3 secretion system effectors injected by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00087>
- Ugalde-Silva, P., & Navarro-Garcia, F. (2019). Coordinated transient interaction of ZO-1 and afadin is required for pedestal maturation induced by EspF from enteropathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 8(12), 1–29. <https://doi.org/10.1002/mbo3.931>

- Unsworth, K. E., Mazurkiewicz, P., Senf, F., Zettl, M., McNiven, M., Way, M., & Holden, D. W. (2007). Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cellular Microbiology*, *9*(2), 438–449. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00801.x>
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *36*, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.011>
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Bridges, A., & Anderson, J. M. (2009). ZO-1 Stabilizes the Tight Junction Solute Barrier through Coupling to the Perijunctional Cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(17), 3930–3940. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0320>
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Holmes, J., & Anderson, J. M. (2010). Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *Journal of Cell Science*, *123*(16), 2844–2852. <https://doi.org/10.1242/jcs.065581>
- Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A. E., Enninga, J., Pizarro-Cerdá, J., Finlay, B. B., Kirchhausen, T., & Cossart, P. (2007). Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection. *Cell Host and Microbe*, *2*(5), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.001>
- Von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M. J., MacGregor, K. A., Tomlin, N., Pechstein, A., Chau, N., Chircop, M., Sakoff, J., Von Kries, J. P., Saenger, W., Kräusslich, H. G., Shupliakov, O., Robinson, P. J., McCluskey, A., & Haucke, V. (2011). Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, *146*(3), 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.025>
- Weber, C. R., Liang, G. H., Wang, Y., Das, S., Shen, L., Yu, A. S. L., Nelson, D. J., & Turner, J. R. (2015). Claudin-2-dependent paracellular channels are dynamically gated.

ELife, 4(NOVEMBER2015), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.09906>

- Weflen, A. W., Alto, N. M., & Hecht, G. A. (2009). Tight junctions and enteropathogenic *E. coli*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04060.x>
- Weflen, A. W., Alto, N. M., Viswanathan, V. K., & Hecht, G. (2010). *E. coli* secreted protein F promotes EPEC invasion of intestinal epithelial cells via an SNX9-dependent mechanism. *Cellular Microbiology*, 12(7), 919–929. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01440.x>
- Yu, D., Marchiando, A. M., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Wang, Y., Shen, L., & Turner, J. R. (2010). MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8237–8241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908869107>
- Yuhan, R., Koutsouris, A., Savkovic, S., & Hecht, G. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 113(6), 1873–1882. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70006-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70006-4)
- Zhang, Q., Li, Q., Wang, C., Liu, X., Li, N., & Li, J. (2010). Enteropathogenic *Escherichia coli* changes distribution of occludin and ZO-1 in tight junction membrane microdomains in vivo. *Microbial Pathogenesis*, 48(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.10.002>
- Zhao, H., Pykäläinen, A., & Lappalainen, P. (2011). I-BAR domain proteins: Linking actin and plasma membrane dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.005>

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>