

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

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“MECANISMO DE LA SECRECIÓN DE MUCINAS EN  
LAS CÉLULAS TIPO CALICIFORMES ESTIMULADAS  
POR LA PROTEASA PIC DE *E. coli*  
ENTEROAGREGATIVA”**

**TESIS**

que presenta

M. en C. FERNANDO FLORES SÁNCHEZ

Para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD  
DE BIOLOGÍA CELULAR

## **DIRECTOR DE TESIS**

### **DOCTOR EMILIANO FERNANDO NAVARRO GARCÍA**

Investigador titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

## **ASESORES**

### **DOCTORA GUADALUPE REYES CRUZ**

Investigadora titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

### **DOCTOR JOSÉ DE JESÚS SERRANO LUNA**

Investigador titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

### **DOCTOR RICARDO FÉLIX GRIJALVA**

Investigador titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

### **DOCTOR CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**

Profesor titular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT), al CINVESTAV y al estado mexicano por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A mi Familia por el apoyo brindado durante toda mi formación académica.

Al Dr. Fernando Navarra García por aceptarme en su laboratorio, por sus enseñanzas y guía a lo largo de proyecto de investigación.

A mis asesores el Dr. Leopoldo Flores, Dr. Ricardo Félix, Dra. Guadalupe Reyes y el Dr. Carlos García.

A las auxiliares de Investigación Lucia Chávez Dueñas y Jazmín Huerta Cantillo por su apoyo y asesoría en las diferentes técnicas empleadas en la realización experimental de este trabajo.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....	13
Autoagregación y adherencia de EAEC a la célula epitelial.....	15
Adherencia diferencial de EAEC a la célula epitelial .....	15
Inflamación .....	16
Elaboración y la secreción de toxinas .....	17
La proteína involucrada en la colonización intestinal .....	18
La hipersecreción de las mucinas durante la infección por EAEC.....	19
Las mucinas .....	20
Las células caliciformes .....	22
Receptores acoplados a proteínas G.....	25
Receptores purinérgicos .....	26
Receptores activados por proteasas.....	27
Receptores tipo tirosina cinasa.....	28

Regulación inmunológica de las células caliciformes.....	29
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>33</b>
Objetivos particulares .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
Cepas bacterianas .....	34
Cultivo celular.....	34
Purificación de Pic y PicS258I.....	34
Complementación de EAEC $\Delta$ <i>pic</i> .....	35
Ensayo de secreción de las mucinas .....	35
Cuantificación de las mucinas MUC5AC y MUC2 .....	36
Degradación de las mucinas MUC5AC y MUC2 .....	37
Obtención de la mucina MUC5AC secretada .....	39
Degradación de la mucina MU5AC secretada.....	39
Ensayos de Inmunofluorescencia.....	40
Viabilidad celular por MTT .....	41
Cuantificación de las interleucinas secretadas .....	41
Nivel de calcio intracelular .....	42
Activación de PKC $\delta$ .....	42
Precipitación de las proteínas por TCA.....	43
Ensayo de penetración de mucinas .....	44
Análisis estadístico.....	45

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
El ácido desoxicólico aumenta la secreción de las mucinas en las células LS174T..	46
La proteína Pic aumenta la secreción de las mucinas en las células LS174T y también la degrada usando su motivo serín-proteasa.....	48
Pic tiene una actividad dual es un secretagogo y una mucinasa, la última puede ocultar la actividad de secretagogo .....	49
Pic degrada a las mucinas humanas MUC2 y MUC5AC .....	56
Pic corta a la mucina MUC5AC en su extremo C-terminal.....	57
Pic no induce la secreción de las mucinas a través de la secreción de interleucinas	62
Pic aumenta la secreción de las mucinas a través del aumento del calcio intracelular .....	64
La secreción de las mucinas inducida por Pic es inhibida por el inhibidor de PLC y un quelante de calcio .....	65
Pic utiliza las mucinas secretadas como fuente de carbono .....	68
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>82</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Las mucinas están conformadas por repetidos en tándem (VNTR). .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 2. Los dominios de las mucinas secretadas MUC2, MUC5AC y de las mucinas asociadas a membrana MUC1 y MUC3. ....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3. El ácido desoxicólico aumenta la secreción de las mucinas MUC2 y MUC5AC. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 4. La proteína PicS258I aumenta la secreción de la mucina MUC5AC en las células LS174T. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5. La co-estimulación de Pic preincubada con PMSF o PicS258I más DCA aumentan de forma sinérgica la secreción de la mucina MUC5AC. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 6. Pic o PicS258I no afectan la viabilidad celular. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 7. La proteasa Pic estimula la secreción y degradación de la mucina MUC5AC en las células LS174T. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 8. Pic degrada a las mucinas MUC2 y MUC5AC. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 9. Pic degrada a la mucina MUC2 en el extremo amino terminal. ....</b>	<b>60</b>

<b>Figura 10. Pic corta a la mucina MUC5AC en su extremo C-terminal.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 11. La proteína Pic aumenta la secreción de la interleucina 8 en las células LS174T.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 12. Pic aumenta el calcio intracelular en las células LS174T. ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 13. Pic induce la activación de PKC<math>\delta</math> en las células LS174T.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 14. La inhibición de PLC bloquea la secreción de la mucina MUC5AC activada por Pic.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 15. EAEC y EAEC<math>\Delta</math><i>pic</i> utilizan las mucinas secretadas como fuente de carbono para favorecer su crecimiento.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 16. EAEC utiliza a Pic para atravesar la barrera de mucinas.....</b>	<b>75</b>

## **LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Biomoléculas que activan la secreción rápida de las mucinas en diferentes líneas celulares.....</b>	<b>31</b>
---	-----------

## ABREVIATURAS

<b>AAF</b>	Fimbria de Adherencia agregativa
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CK8</b>	Citoqueratina 8
<b>DCA</b>	Ácido desoxicólico
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTAF</b>	Diclorotriazinylamino fluoresceína conjugada a estreptavidina
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FITC</b>	Tetrahidrometil isotiocianato de fluoresceína
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección

<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PAR</b>	Receptores activados por proteasas
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora salina de fosfatos
<b>PBS-Teewn</b>	PBS con Tween20 al 0.05%
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>Pic</b>	Proteína involucrada en la colonización intestinal
<b>PK</b>	Proteinasa K
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PVDF</b>	Membrana de difluorido polivinilido P-inmobilon
<b>TLR</b>	Receptor tipo <i>Toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatógena

## RESUMEN

Una característica distintiva de la infección por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) es la formación de una biopelícula intestinal, que comprende una capa de moco con bacterias inmersas. EAEC y otros patotipos de *E. coli* secretan una proteína autotransportadora llamada Pic, la cual ha estado involucrada en dos fenotipos aparentemente contradictorios, como secretagogo de moco y como mucinasa. En este estudio, investigamos esta actividad dual de Pic, la capacidad de secretagogo de moco y la actividad mucinolítica, en células caliciformes humanas que secretan MUC2 y MUC5AC. Pic causó una hipersecreción de moco directamente por las células caliciformes, sin otras líneas celulares intestinales involucradas. Al mismo tiempo, Pic mostró una fuerte actividad proteolítica en las mucinas secretadas. Estas actividades fueron independientes ya que una mutación en el motivo serín-proteasa (PicS258I) abolió la degradación de la mucina, mientras mantenía intacta la actividad de secretagogo de mucinas. Además, las mucinas inducidas por ácido desoxicólico (DCA), un secretagogo conocido, se degradaron proteolíticamente cuando las células caliciformes se incubaron conjuntamente con Pic (DCA/Pic), mientras que la co-incubación DCA/PicS258I (una mutante en el sitio activo) causó un efecto sinérgico sobre la hipersecreción de moco. Pic fue más eficiente degradando MUC5AC que MUC2 pero no se detectó degradación con Pic inactivado en el sitio activo por mutación o inhibición farmacológica. Sorprendentemente, Pic cortó a la MUC5AC en el dominio C-terminal, dejando subproductos N-terminales, lo cual afecta la característica de las mucinas formadoras de gel. Interesantemente, Pic estimuló la rápida secreción de mucina en las células tipo caliciformes al activar la vía de calcio intracelular como resultado de la activación de la señal de transducción de PLC, lo cual conduce a la producción de DAG y liberación de IP<sub>3</sub>, un segundo mensajero de señalización de calcio. Así, la actividad dual de Pic, como secretagogo de moco y mucinasa, es relevante en el contexto de la generación de fuentes de carbono y la penetración de la capa de moco, lo que permite que EAEC tenga acceso a las células epiteliales.

## SUMMARY

A hallmark of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) infection is a formation of a intestinal biofilm, which comprises a mucus layer with immersed bacteria. Pic is an autotransporter protein secreted by EAEC, and other *E. coli* pathotypes, and have been involved in two apparently contradictories phenotypes, as mucus secretagogue and as mucinase. Here, we further investigated this Pic dual activity, mucus secretagogue capability and mucinolytic activity, on human goblet cells secreting MUC2 and MUC5AC. Pic induced mucus hypersecretion directly on the goblet cells, without other intestinal cell lines involved. At the same time, Pic displayed a strong proteolytic activity on the secreted mucins. These activities were independent since a mutation in the serine protease motif (PicS258I) abolished mucin degradation but not the activity as a mucus secretagogue. Furthermore, deoxycholic acid (DCA)-induced mucins were proteolytic degraded when goblet cells were DCA/Pic co-incubated, while DCA/PicS258I co-incubation induced a synergistic effect on mucus hypersecretion. Pic was more efficient degrading MUC5AC than MUC2 but no degradation was detected with active site-inactivated Pic by mutation or pharmacological inhibition. Remarkably, Pic cleaved MUC5AC in the C-terminal domain, leaving N-terminal subproducts. Astonishingly, Pic stimulates the rapid secretion of mucin on goblet-like cells by activating the intracellular calcium pathway resulting of the PLC signal transduction pathway producing DAG and IP<sub>3</sub>; this latter is a calcium signaling second messenger. Finally, as shown here, Pic dual activity, as mucus secretagogue and mucinase, are relevant in the context of carbon source and mucus layer penetration by EAEC for reaching the epithelial cells.

## INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte producida en niños menores de cinco años, ocasionando la muerte a 1.5 millones cada año (Black et al., 2010). Los principales agentes infecciosos asociados a la enfermedad diarreica son rotavirus y las cepas diarrogénicas de *Escherichia coli*. La bacteria *E. coli* es un anaerobio facultativo predominante de la microbiota colónica humana. Usualmente, *E. coli* permanece confinado al lumen intestinal; sin embargo, en hospederos debilitados e inmunodeprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son traspasadas, las cepas no patógenas de *E. coli* son capaces de causar infección (Nataro and Kaper, 1998). Sin embargo, también existen cepas de *E. coli* que pueden causar diarrea, estas cepas se denominan diarrogénicas y a través de la descripción de los diferentes mecanismos de virulencia, se han reportado seis categorías de *E. coli* diarrogénicas: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC).

### ***Escherichia coli* enteroagregativa**

La bacteria *E. coli* enteroagregativa (EAEC) es un grupo de bacterias diarrogénicas que se caracterizan por su singular manera de autoagregarse en forma de ladrillos apilados y de adherirse a la membrana de las células eucariotas (Nataro et al., 1987). La bacteria EAEC fue descrita por primera vez en 1987 a través de ensayos

de adherencia de bacterias sobre las células HEp-2, utilizando bacterias de muestras fecales provenientes de 154 niños con diarrea y 66 controles sanos en Santiago de Chile (Nataro et al., 1987). Esta bacteria enteropatógena se asocia frecuentemente con casos de diarrea persistente en niños de países en desarrollo e industrializados, así como con la diarrea del turista (Adachi et al., 2002). Dentro de las cepas de EAEC, la cepa silvestre 042 es considerada la de mayor potencial diarreogénico (Nataro et al., 1995). Los síntomas más frecuentes son la diarrea líquida acompañada de moco y en ocasiones sangre en las heces, dolor abdominal, náuseas con vómito frecuente y a veces fiebre. Aunque EAEC puede inducir diarrea de curso agudo, es más común que esté asociada a diarrea persistente (>14 días) (Huang et al., 2006). EAEC produce efectos citotóxicos como la vesiculación de las microvellosidades, apertura de las criptas e incremento en la extrusión de la célula epitelial (Harrington et al., 2005). Además, se ha identificado que la infección por EAEC induce secreción de moco hacia el lumen intestinal. Las bacterias EAEC se unen a las mucinas formando una capa densa de moco con bacterias inmersas, denominada *biofilm* (Hicks et al., 1996). La capacidad de EAEC de formar la biocapa probablemente está relacionado a la persistente colonización y a la diarrea.

La bacteria EAEC utiliza diferentes factores de virulencia durante la infección, estos factores son agrupados en tres principales mecanismos de patogénesis: 1) autoagregación bacteriana y adherencia a la membrana de la célula epitelial, 2) la elaboración y secreción de toxinas y 3) la hipersecreción de las mucinas y la formación de una biopelícula bacteria–moco (Harrington et al., 2006).

## **Autoagregación y adherencia de EAEC a la célula epitelial**

La bacteria de *E. coli* enteroagregativa EAEC se caracteriza por adherirse a las células HEp-2 en un patrón de adherencia agregativa, similar a ladrillos apilados sobre las células HEp-2, lo cual permite diferenciar a EAEC de otros patotipos de *E. coli* (Nataro et al., 1995).

Estudios con la cepa prototipo de EAEC revelaron que el fenotipo de adherencia agregativa (AA) está codificado en un plásmido de 65 MDa, denominado pAA (Vial et al., 1988). En este patotipo de EAEC la fimbria de adherencia agregativa (AFF) es la principal adhesina involucrada en la formación del *biofilm*, adherencia a las células intestinales y la respuesta inflamatoria. La estructura de AFFs está compuesta por una subunidad mayor (A) y una subunidad menor (B), la subunidad mayor en comparación con las diferentes variantes de AFFs comparten solo un 25% de identidad en la secuencia de aminoácidos sin embargo, todas las variantes de AFFs tienen una carga neta positiva. Hasta ahora se han reportado cinco variantes de la subunidad mayor de AFF: AggA (AAF/I), AafA (AAF/II), Agg3A (AAF/III) y Agg4A (AAF/IV) y agg5A (AAF/V) todas son reguladas por el activador transcripcional AggR situada en el plásmido de virulencia pAA de EAEC (Jonsson et al., 2017).

## **Adherencia diferencial de EAEC a la célula epitelial**

Estudios realizados en enteroides humanos en 2D han permitido conocer que EAEC se adhiere a las células epiteliales en 4 formas diferentes: típica (ladrillos apilados), la adherencia clásica, la cual tiene un arreglo en 2D y está formado por un grupo de

15 a 50 bacterias. En forma de hoja, en grupo de bacterias adheridas en forma de ladrillos apilados en largas hojas de más de 50 bacterias. Tipo malla, es una adherencia con un patrón de tipo malla y capaz de formar un grupo de 3 a 5 bacterias interconectadas a otro grupo de bacterias adheridas en forma de malla. Microcolonias, son un grupo mayor de 200 bacterias que tienen un arreglo en 3D y que forman una esfera (Rajan et al., 2018). EAEC se adhiere a los enteroides humanos derivados del duodeno, yeyuno, íleon y colon de las 4 diferentes maneras. Sin embargo, EAEC se adhiere de forma preferencial en forma típica en el íleon y se adhiere en malla en el colon. Mientras que la adherencia de EAEC en forma de microcolonias se encuentra predominantemente en el duodeno (Rajan et al., 2018).

La adhesión de la bacteria EAEC al epitelio intestinal esta mediada principalmente por la fimbria de adherencia agregativa (Nataro et al., 1992). La subunidad mayor de la fimbria AFF es capaz de unirse a diferentes proteínas que se encuentran en la superficie apical de la célula intestinal como son: fibronectina, laminina, citoquetatina 8 y la mucina transmembranal MUC1 (Boll et al., 2017).

## **Inflamación**

La heterogeneidad de las cepas de EAEC es la responsable de la complejidad en el estudio y la descripción de sus mecanismos de patogenicidad (Elias et al., 2002). Estudios en modelos animales y en cultivos primarios de la mucosa intestinal de humanos reportan que EAEC es capaz de adherirse al epitelio intestinal del yeyuno, íleon y el colon (Hicks et al., 1996). La infección por EAEC estimula la liberación de mediadores inflamatorios como IL-8, IL-1 $\beta$ , Interferón- $\gamma$ . El flagelo FliC es el principal

factor que promueve la secreción de la IL-8 en células Caco-2, la eliminación del gen *fliC* provoca disminución de la secreción de IL-8 durante la infección por EAEC (Steiner et al., 2000).

## **Elaboración y la secreción de toxinas**

EAEC es capaz de secretar diferentes toxinas, la primera en ser descubierta fue la toxina estable al calor (EAST-1), la cual genera una respuesta secretora en los enterocitos a través de la activación de la adenilato ciclasa. Otro grupo de toxinas son las serín-proteasas de la familia de las autotransportadoras (SPATE), la toxina Pic (Proteína involucrada en la colonización intestinal) y Pet (toxina codificada en un plásmido). La toxina Pet es una serín-proteasa de 104 kDa perteneciente a la familia de las autotransportadoras (sistema de secreción tipo V). El gen *pet* se encuentra codificado en el plásmido de virulencia de 65 MDa (pAA), en el cual también se encuentran las fimbrias de adherencia agregativa (AAF). Una vez secretada, la toxina Pet es capaz de internalizarse a la célula eucarionte a través del receptor de citoqueratina 8 (CK8) mediante la endocitosis dependiente de clatrina. Posteriormente, la toxina Pet tiene un transporte retrogrado desde la membrana celular hasta el aparato de Golgi, para después alcanzar el retículo endoplasmático y finalmente Pet es translocada al citosol. En el citosol Pet es capaz de degradar a sus proteínas blanco, como la fodrina y provocar efectos citotóxicos como redondeamiento celular, desprendimiento celular del sustrato, contracción del citoesqueleto, la pérdida de las fibras de estrés y finalmente la muerte celular (Canizalez-Roman & Navarro-Garcia, 2003), Otra toxina de EAEC es la enterotoxina

I de *Shigella* (ShET1), la cual es codificada por *setAB* localizada en la cadena antisentido del gen de *pic* (Yamamoto & Echeverria, 1996).

## **La proteína involucrada en la colonización intestinal**

La proteína involucrada en la colonización (Pic) es la segunda serín-proteasa autotransportadora de *Enterobacteriaceae* (SPATE) de EAEC, el gen que codifica para la proteasa Pic se encuentra en el cromosoma de diferentes bacterias patógenas, tales como EAEC, *E. coli* uropatógena (UPEC), *Shigella flexneri* y *Citrobacter rodentium* (Henderson et al., 1999).

El análisis funcional de la proteína indica que la proteasa Pic brinda protección a las bacterias contra al suero (Henderson et al., 1999). Las bacterias tipo EAEC que tienen el gen *pic* son capaces de colonizar con un mayor número de bacterias el intestino delgado y grueso de los conejos en comparación con las bacterias que no tienen el gen *pic* y debido a esto se le nombró como proteína involucrada en la colonización intestinal (Harrington et al., 2009). Sin embargo, la proteasa Pic no ejerce un efecto citotóxico en las células epiteliales intestinales y no produce aumento en la secreción de iones en cámaras de Ussing (Navarro-Garcia et al., 1998).

La proteasa Pic es una proteína de alto peso molecular (109 kDa) y dentro de su secuencia tiene un motivo de serín-proteasa la cual es capaz de degradar distintos tipos de mucinas: mucina submaxilar bovina y mucina tipo II de estómago porcino (Gutierrez-Jimenez et al., 2008), también se ha reportado que la proteasa Pic puede degradar diferentes O-glicoproteínas que se encuentran en la membrana

de leucocitos humanos como: CD43, CD44, CD45, CD93, las cuales están involucradas en procesos celulares como la inflamación, la adhesión y migración celular (Ruiz-Pérez et al., 2011).

## **La hipersecreción de las mucinas durante la infección por EAEC**

La enfermedad diarreica producida por la infección con EAEC se caracteriza por la presencia de abundante moco en las evacuaciones (Okeke et al., 2003). Estudios en modelos animales y estudios *in vitro*, han demostrado que la infección por EAEC provoca una hipersecreción de mucinas en el epitelio intestinal. Adicionalmente, las bacterias del patotipo EAEC son embebidas en una biopelícula espesa de moco firmemente adherida a la superficie del epitelio intestinal (Hicks et al., 1996; Nataro & Kaper, 1998).

La hipersecreción de las mucinas es un mecanismo de virulencia característico de EAEC que ha sido poco estudiado, sin embargo, nuestro grupo de investigación ha reportado que el aumento en la secreción de moco en el intestino de la rata, durante la infección por EAEC, es principalmente inducido por la proteína Pic (Navarro-García et al., 2010). En ese reporte se demostró que la proteína Pic purificada es capaz de inducir la hipersecreción de mucinas en el íleon del intestino de la rata, en comparación con el control inoculado con PBS (Navarro-García et al., 2010). La clonación del gen *pic* en cepas de laboratorio, como HB101, también induce la hipersecreción de mucinas en el íleon del intestino de la rata; mientras que la eliminación del gen *pic* en diferentes bacterias diarrogénicas como EAEC, UPEC y *S. flexneri* provoca una disminución en la hipersecreción de las mucinas (Figura

2). Aunque las bacterias EAEC, UPEC y *S. flexneri* tienen diferentes componentes estructurales como la flagelina y el LPS que pueden inducir la secreción rápida de mucinas (Yu et al., 2012). La proteína Pic es la principal proteína que induce la secreción rápida de mucinas durante la infección *in vivo* (Navarro-García et al., 2010).

## **Las mucinas**

La familia de las mucinas es un grupo de 21 proteínas que se caracterizan por tener un gran número de repetidos ricos en prolinas, serinas y treoninas (dominio PTS), estos repetidos son altamente O-glicosilados (Kufe, 2009). Las mucinas contienen múltiples dominios como los dominios D, regiones ricas en cisteína, dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Kufe, 2009)

Las mucinas se expresan en diferentes tipos de células que se encuentran en contacto con ambientes ásperos, por ejemplo, las células gástricas, las células del tracto respiratorio, las células intestinales etc., en este ambiente adverso las mucinas tienen un papel importante en la homeostasis y en la sobrevivencia de las células epiteliales (Hollingsworth & Swanson, 2004). La composición química de las mucinas y la formación de estructuras de alto orden tienen como función principal formar una barrera física en contra de los microorganismos y materiales insolubles. Las mucinas se clasifican en dos grupos: las mucinas de membrana y las mucinas secretadas. Las mucinas de membrana (MUC1, 3, 4, 12, 13, 16, 17) son proteínas que contienen múltiples dominios, entre ellos, dominios homólogos a EGF. La liberación de la mucina de membrana al medio extracelular, provoca que la mucina

actúe como ligando en los receptores de la familia de EGF y regular procesos como la inflamación, proliferación, diferenciación y motilidad celular (Hollingsworth & Swanson, 2004). Dentro del grupo de las mucinas secretadas se encuentran las mucinas MUC2, MUC5AC, MUC5 y MUC6, las cuales son capaces de polimerizar y formar estructuras de orden superior como los geles. La expresión de las mucinas que se secretan es tejido específico, en el intestino delgado y grueso se expresa principalmente la mucina MUC2 (McGuckin et al., 2011) en cambio, en las vías respiratorias y en el estómago se expresa y se secreta principalmente la mucina MUC5AC.

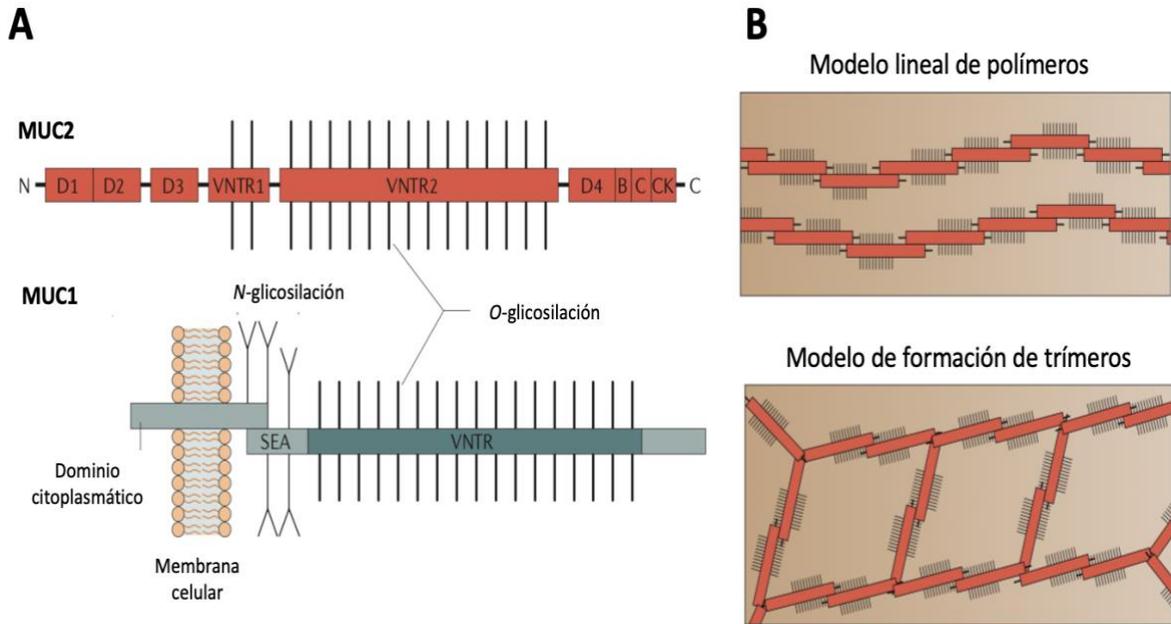
La mucina MUC2 es el mayor componente del moco secretado en el intestino delgado y grueso. La mucina MUC2 está constituida por diferentes dominios: la parte central de la proteína tiene un número variable de repetidos en tándem (VNTR) que son altamente *O*-glicosilados. En los extremos carboxilo y amino-terminal de la mucina se ubican los dominios ricos en cisteínas denominados dominios D y otros dominios ricos en cisteínas (Figura 1 y 2). Las mucinas forman homooligómeros a través de la formación de puentes disulfuro entre los dominios D. Los dominios D son nombrados así, debido a su homología con los dominios de dimerización del factor von Willebrand. El dominio D4 ubicado en el carboxilo-terminal de la mucina MUC2 permite la formación de dímeros unidos por puentes disulfuro (Figura 1B) (Lidell et al., 2003), mientras que, los dominios D (D1-D3) del amino-terminal forman trímeros que también están unidos por puentes disulfuro (Figura 1B) (Godl et al., 2002). La *N*-glicosilación y la dimerización en el carboxilo-terminal de las mucinas ocurre en el retículo endoplasmático. En el aparato de Golgi ocurren los procesos

de O-glicosilación, la formación de los trímeros en el N-terminal y ahí las mucinas son empacadas en los gránulos y preparadas para la secreción.

La superficie apical de las células epiteliales de las mucosas está comúnmente cubierta por microvellosidades y un complejo glicocálix que contienen una alta cantidad de mucinas asociadas a membrana. Las mucinas de membrana contienen una gran cantidad de repetidos en tándem que son altamente glicosilados. Durante la biosíntesis, las mucinas de membrana son cortadas en su dominio de proteólisis y unidas de forma no covalente mediante los dominios SEA (Figura 2) (Hollingsworth & Swanson, 2004). Las mucinas asociadas a membrana se mantienen unidas a las células a través de un dominio transmembranal. Tienen un dominio citoplasmático corto que puede interactuar con elementos citoplasmáticos como proteínas adaptadoras o proteínas que participan en la transducción de señales.

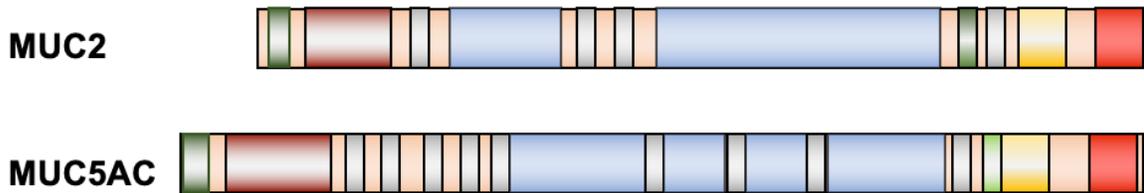
## **Las células caliciformes**

Las células caliciformes son células especializadas encargadas de secretar mucinas a través de dos procesos celulares: la **secreción constitutiva** y la **secreción regulada o rápida**. En la secreción constitutiva la célula secreta mucinas al medio de forma lenta y continua, para este proceso no se necesita de un estímulo, mientras que en la secreción regulada, los compuestos denominados secretagogos activan la secreción acelerada de los depósitos de vesículas que contienen mucinas a través de la activación un receptor de membrana (Davis & Dickey, 2008; Deplancke & Gaskins, 2001).



**Figura 1. Las mucinas están conformadas por repetidos en tándem (VNTR). Los repetidos VNTR se encuentran en la parte central de la proteína y son altamente O-glicosilados, los dominios D ubicados en el extremo C-terminal y N-terminal de la mucina MUC2 están involucrados en la homooligomerización. Los modelos de la oligomerización de la mucina MUC2 (B). La formación dímeros depende de la formación de enlaces disulfuro del dominio D4 del extremo C-terminal. La formación de trímeros de la mucina MUC2 ocurre entre los dominios D los extremos N-terminal. Figura modificada de (McGuckin et al., 2011).**

## Mucinas secretadas



## Mucinas asociadas a membrana

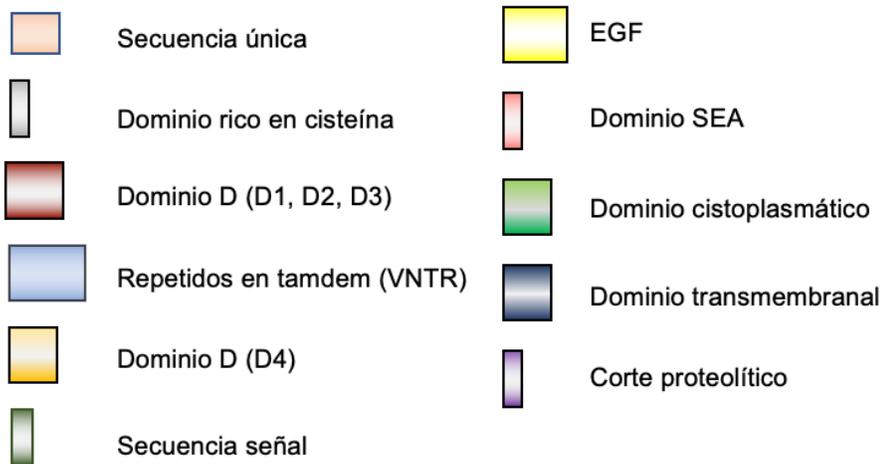
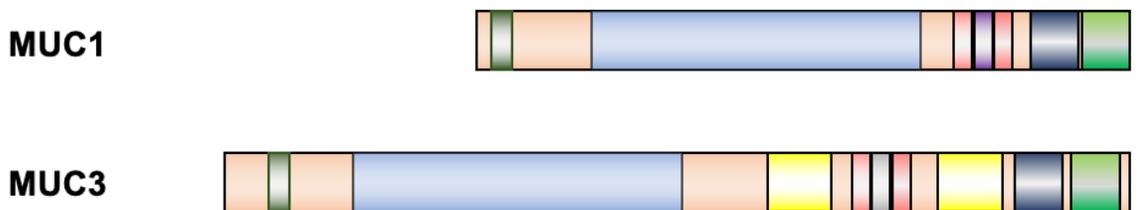


Figura 2. Los dominios de las mucinas secretadas MUC2, MUC5AC y de las mucinas asociadas a membrana MUC1 y MUC3.. Figura modificada de (Hollingsworth & Swanson, 2004).

Sin embargo, las células del sistema inmune también pueden regular la síntesis y la secreción de las mucinas en las células caliciformes.

La secreción rápida de las mucinas puede ser activada a través del aumento del calcio intracelular utilizando compuestos como el ionóforo de calcio, ionomicina, la cual es capaz de inducir la secreción de las mucinas en células caliciformes intestinales. La activación de la proteína cinasa C (PKC) a través de la utilización del éster de forbol (PMA) también provoca un aumento en la secreción de mucinas en las células caliciformes intestinales (Davis & Dickey, 2008).

El aumento en el calcio intracelular y la activación de la PKC son capaces de aumentar la secreción de mucinas en las células caliciformes porque son capaces de activar directamente la maquinaria de exocitosis, la cual es necesaria para activar la secreción rápida de las mucinas. Hasta ahora se ha reportado que existen dos grandes familias de receptores asociados a la secreción regulada de mucinas: los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y los receptores acoplados a tirosina cinasa, sin embargo, cualquier otro receptor que sea capaz de aumentar el calcio intracelular o activar a PKC son capaces de aumentar la secreción de mucinas.

## **Receptores acoplados a proteínas G**

Los receptores tipo GPCR están divididos en dos subfamilias que son los receptores purinérgicos (P2Y2) y los receptores activados por proteasas (PAR) (Fields & Burnstock, 2006; Kim & Lee, 1991).

## Receptores purinérgicos

Los receptores purinérgicos son receptores que tienen 7 pasos transmembranales asociados a proteínas G o canales iónicos, estos receptores están clasificados en tres grupos P2X, P2Y y A<sub>2</sub> (Fields & Burnstock, 2006). Los receptores P2X (P2X<sub>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sub> y P2XM) son receptores acoplados a canales iónicos que son activados por ATP, pirimidinas, purinas y UDP, mientras que los receptores P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14</sub>) son receptores acoplados a proteínas G y tienen como ligando ATP, ADP y UTP, UDP. Finalmente, los receptores tipo A (A<sub>1, A2A, A2B</sub> y A<sub>3</sub>) son receptores GPCR y tienen como ligando a la adenosina (Harden et al., 1995).

Los diferentes tipos de receptores purinérgicos regulan una variedad de procesos fisiológicos como: la contracción y la relajación del músculo liso vascular, la liberación de sustancias vaso relajantes en las células epiteliales, la despolarización rápida del sistema nervioso central, la liberación de neurotransmisores en las neuronas, la modulación de la respuesta inmune, la regulación de la secreción de mucinas, entre otros (Harden et al., 1995). Existen 20 tipos de receptores purinérgicos; sin embargo, solamente la activación de los receptores P2Y está asociado al proceso de la secreción rápida de las mucinas en las células caliciformes de las vías respiratorias (Oliveira-Giacomelli et al., 2018).

La vía de señalización mediada por los receptores P2Y ha sido ampliamente estudiada en las células humanas de las vías respiratorias (Abdullah et al., 1997; Chen et al., 2001; Kim & Lee, 1991). Los receptores P2Y son receptores caracterizados por ser activados a través de la unión con los nucleótidos ATP y UTP, la unión del ATP y/o UTP al receptor P2Y provoca la activación de la GTPasa

$G\alpha_q$ , la subunidad  $G\alpha_q$  interacciona y activa directamente a la fosfolipasa C (PLC) (Figura 3) (Harden et al., 1995). La PLC activa directamente a la proteína cinasa C (PKC) y también genera segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ), los cuales promueven la liberación de calcio intracelular de los reservorios de la célula (Choi et al., 2005). La liberación del  $Ca^{2+}$  intracelular es requerido para la secreción regulada de las mucinas (Davis & Dickey, 2008). El calcio juega un papel importante en la exocitosis regulada, controlando procesos como el desensamble de los filamentos de actina cercanos a la membrana plasmática, el direccionamiento de la vesícula y la fusión de la vesícula en la membrana plasmática (Martin, 2002).

## **Receptores activados por proteasas**

Los receptores activados por proteasas (PAR) son receptores con siete pasas transmembranales acoplados a proteínas G, estos receptores son activados por proteasas que realizan un corte proteolítico del extremo N-terminal extracelular. Hasta ahora se ha reportado 4 tipos de receptores tipo PAR 1-4, los cuales, se expresan en una gran variedad de tejidos. El receptor PAR-2 se encuentra altamente expresado en el sistema gastrointestinal, en células del sistema inmune y también se ha verificado que se expresa en las líneas células HT29-CI.16E. En el intestino la activación de los receptores tipo PAR-2 induce la secreción de iones y de prostaglandinas. Recientemente se ha reportado que la activación de los receptores PAR-2 también está asociada a la secreción rápida de mucinas en las

células tipo caliciformes intestinales y de vías respiratorias (Jarry et al., 2007; Liu et al., 2013).

La vía de señalización mediada por los receptores tipo PAR2 se inicia con la activación de las GTPasas  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_i$  o  $G\alpha_{12/13}$  (vía clásica) (Figura 4) (Rothmeier & Ruf, 2012) o la señalización puede ser independiente de las proteínas G (vía no clásica). La vía no clásica no está asociada a la secreción rápida de mucinas e incluye el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina, sin embargo, la vía clásica está asociada a la secreción rápida de las mucinas e inicia con la activación de la GTPasa  $G\alpha_{q/11}$  y posteriormente la activación de la PLC, lo que genera la producción de segundos mensajeros como el  $IP_3$  y el DAG que inducen la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular (Liu et al., 2013).

## **Receptores tipo tirosina cinasa**

Los receptores tipo tirosina cinasa (RTK) es una gran familia compuesta por 58 miembros, estos receptores tienen ligandos de cadenas polipeptídicas como factores de crecimiento, citocinas y hormonas. Los receptores RTK controlan procesos celulares como la proliferación celular, la sobrevivencia y la diferenciación celular. La unión del ligando específico para los receptores tipo RTKs involucra la activación de la GTPasa Ras y la activación río abajo de las MAPK cinasas que activan a factores de transcripción como NF- $\kappa$ B causando un aumento en la expresión y en la síntesis de las mucinas (Takeyama et al., 1999). Aunque inicialmente se pensaba que la activación a EGF estaba asociada únicamente al aumento en la expresión de las mucinas, hay reportes que señalan que la activación del receptor de EGF (RTK)

también está asociado a la secreción rápida de las mucinas (Abdullah & Davis, 2007; Jarry et al., 2007; Takeyama et al., 1999; Yu et al., 2012). Por ejemplo, la flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* induce la secreción rápida de mucinas en las células bronquiales 16HBE, a través de la transactivación del receptor de EGF vía TLR5 (Yu et al., 2012). La activación del receptor EGF en las células caliciformes de la conjuntiva provoca el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de  $\text{PLC}\gamma$ , son factores importantes que activan la secreción rápida de mucinas en las células caliciformes (Hodges et al., 2012).

## **Regulación inmunológica de las células caliciformes**

La secreción rápida de las mucinas en las células caliciformes es regulada por la unión de los secretagogos a los receptores de membrana, sin embargo, las células del sistema inmune también regulan la síntesis y la secreción de las mucinas en las células caliciformes a través de la secreción de citocinas, especies reactivas del oxígeno o proteasas como la elastasa (Tabla 1).

Diversas citocinas pro-inflamatorias estimulan la síntesis y la secreción rápida de las mucinas en las células tipo caliciformes (Deplancke & Gaskins, 2001). La interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), IL-6 y TNF- $\alpha$  inducen la secreción rápida de las mucinas en las células tipo caliciformes, además, las interleucinas TNF- $\alpha$  e IL-6 también aumentan la expresión de MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6 en las células de adenocarcinoma de colon LS180T (Enss et al., 2000). El estrés oxidativo, el cual está presente en diferentes enfermedades inflamatorias e infecciones también

provoca un aumento en la síntesis y secreción de mucinas en las células caliciformes (Shao & Nadel, 2005).

Las vías de señalización importantes para la secreción rápida de las mucinas durante el estímulo de las diferentes citocinas pro-inflamatorias no están descritas. Se desconoce si las vías de señalización clásicas de los receptores de las respectivas citocinas son importantes para la activación de la secreción rápida de las mucinas o si es a través de la transactivación de los receptores de EGFR o P2Y.

**Tabla 1.** Biomoléculas que activan la secreción rápida de las mucinas en diferentes líneas celulares.

<b>Biomoléculas</b>	<b>Células</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencias</b>
IL-1 $\beta$	LS180T	Aumento en la secreción de mucinas	(Enss et al., 2000)
IL-6	LS180T	Aumento en la secreción de mucinas	(Enss et al., 2000)
IL-13	LS174T	Aumento en la secreción de mucinas Aumento en la transcripción	(Iwashita et al., 2003)
TGF- $\alpha$	16-HBE	Aumento en la secreción de mucinas	(Yu et al., 2012)
TNF- $\alpha$	Cultivo primario, HT29 MTX, LS180T	Aumento en la secreción de mucinas Aumento en la transcripción	(Levine et al., 1995; Smirnova et al., 2000)
Elastasa	NHBE	Aumento en la secreción de mucinas	(Park et al., 2005)
Activación de metaloproteasas TACE	16HBE	Aumento en la secreción de mucinas	(Yu et al., 2012)
Óxido nítrico (Estrés oxidativo)	GPTE (epitelio traqueal de cerdo) NCI-H292	Aumento en la secreción de mucinas Aumento en la transcripción	(Takeyama et al., 2000)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por la bacteria EAEC provoca una diarrea líquida acompañada de moco, en ocasiones con sangre en las heces, dolor abdominal, náuseas con vómito y fiebre. En comparación con las otras cepas diarrogénicas de *E. coli*, EAEC se caracteriza por formar una biopelícula compuesta por una capa de moco y EAEC adherida firmemente a esta capa, además de inducir una hipersecreción de mucinas en el lumen intestinal.

Nuestro grupo de investigación ha reportado que el aumento en la hipersecreción de mucinas en el intestino de la rata durante la infección por EAEC es principalmente inducido por la proteína Pic (Navarro-García et al., 2010). Sin embargo, hasta ahora se desconoce el mecanismo molecular de la secreción rápida de las mucinas en las células caliciformes activado por la proteasa Pic. El propósito de este trabajo es investigar el mecanismo de la secreción de mucinas en las células tipo caliciformes durante la incubación con la proteasa Pic. Pensamos que la proteasa Pic activa la secreción de mucinas directamente en las células caliciformes o indirectamente a través de la secreción de interleucinas de otras células intestinales (regulación inmunológica).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el mecanismo molecular de la secreción rápida de las mucinas en las células tipo caliciformes activado por la proteasa Pic de *E. coli* enteroagregativa.

### **Objetivos particulares**

**1. Determinar si la proteasa Pic aumenta la secreción de la mucina MUC5AC en las células tipo caliciformes LS174T.**

1.1 Determinar si la proteasa Pic degrada a las mucinas MUC2 y MUC5AC

**2. Determinar cuál es vía de señalización en la secreción de mucinas regulada por la proteasa Pic.**

2.1 Determinar si la proteasa Pic aumenta el calcio intracelular en las células LS174T.

2.2 Determinar si la inhibición de la fosfolipasa C es importante para la secreción de mucinas en las células LS174T activada por proteasa Pic.

2.3 Determinar si la proteína cinasa C (PKC) es importante para la secreción de mucinas en las células LS174T durante la incubación con la proteasa Pic.

**3. Determinar si EAEC utiliza a Pic para atravesar una capa de mucina.**

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cepas bacterianas

La cepa EAEC O44:H18 fue originalmente aislada de un niño con diarrea en Lima Perú (Nataro et al., 1995). EAEC $\Delta$ *pic*, EAEC*PicS258A* (Harrinton et al., 2009), EAEC $\Delta$ *pic/pPic* (en este estudio), EAEC $\Delta$ *pic/pTrcHis2B* (en este estudio), HB101/*pPic* (Gutierrez-Jimenez et al., 2008) y HB101/*pPicS258I* (Navarro-García et al., 2010) fueron crecidas en medio LB toda la noche a 37°C, cuando fue necesario se agregó ampicilina (50 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) o tetraciclina (15 µg/ml).

## Cultivo celular

Las células LS174T (ATCC® CL-188™) fueron cultivadas en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Biowest, Nuaille, France) y 1% de aminoácidos no esenciales, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 µg/ml) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

## Purificación de *Pic* y *PicS258I*

Las proteínas *Pic* y *PicS258I* fueron purificadas como se reportó anteriormente (Navarro Garcia et al., 2010). Brevemente, las clonas mínimas HB101/*pPic* y HB101/*pPicS258I* fueron cultivadas en medio LB con 15 µg/ml de tetraciclina, durante 16 h en agitación. Posteriormente, las bacterias fueron centrifugadas a

2,240 × *g* durante 20 min, el sobrenadante fue concentrado de 150-200 veces en un filtro *Amicon* de 100,000 MWCO (Millipore, Billerica, MA).

## **Complementación de EAEC $\Delta$ *pic***

El gen de *pic* fue amplificado del ADN genómico de las bacterias prototipo de EAEC utilizando los siguientes oligos Fw 5'- CCG CTC GAG CAT GAA TAA AGT TTA TTC TCT TAA ATA TTG CC -3' y Rv 5'- CCG GAA TTC TCA GAA CAT ATA CCG GAA ATT CGC GTT -3'. El producto de PCR de 4110 pb fue purificado utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemania). El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Xho1* y *EcoR1* y fue clonado en el vector inducible pTrcHis2B (Thermo Fisher Scientific, IL). Para la complementación de la bacteria, EAEC $\Delta$ *pic* fue transformada con el plásmido pTrcHis2B/*pic*, generando la bacteria EAEC $\Delta$ *pic/pPic*; para los experimentos, la expresión de Pic fue inducida con 1 mM de IPTG.

## **Ensayo de secreción de las mucinas**

Las células LS174T (80,000/pozo) fueron cultivadas en una placa de 48 pozos durante 72 h, hasta llegar a confluencia. Antes de los experimentos, las células fueron ayunadas durante 17 h con medio DMEM sin suero y antibióticos, posteriormente las células fueron lavadas 5 veces con 500  $\mu$ l de medio DMEM sin suero y antibióticos. Después, las células fueron incubadas con 350  $\mu$ l de medio DMEM sin suero ni antibióticos conteniendo los diferentes tratamientos: Pic,

PicS258I o el ácido desoxicólico (DCA) e incubados por 4 h a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 110 × *g* durante 10 min.

## **Cuantificación de las mucinas MUC5AC y MUC2**

La secreción de la mucina MUC5AC fue cuantificada utilizando la técnica de ELISA. El sobrenadante (50 µl) diluidos en 150 µl de *buffer* de unión (0.125 M de NaHCO<sub>3</sub> y 0.125 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.5) fue fijado en las placas de ELISA (Corning, NY) a 4°C durante 16 h. La placa fue lavada 3 veces con PBS Tween al 0.05% y bloqueada con BSA al 3% durante 2 h a temperatura ambiente. La placa fue lavada 3 veces con PBS Tween e incubada con 120 µl/pozo del anticuerpo monoclonal anti-MUC5AC 45M1 a 37°C durante 5 h (1:200, Thermo Fisher Scientific, IL). Para la cuantificación de la mucina MUC2 la placa fue incubada con 120 µl /pozo del anticuerpo anti-MUC2 Ccp58 (1:100, Thermo Fisher Scientific, IL) durante 6 h a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron 7 veces con PBS Tween e incubada durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP (1:5000, Invitrogen, OR). Finalmente, la placa fueron lavadas 7 veces con PBS Tween. El color de la reacción fue revelada con 10 mg de OPD (*o-Phenylenediamine dihydrochloride*) (Sigma-Aldrich, MO) diluido en 25 ml de *buffer* de revelado (0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.025 M de ácido cítrico, 0.05 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4), después de 15 min la reacción fue detenida con 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. La densidad óptica fue leída a 490 nm en un lector de ELISA. (iMark Microplate Reader, Biorad Labs, CA).

## Degradación de las mucinas MUC5AC y MUC2

Para determinar si Pic degrada a las mucinas MUC2 y MUC5AC, primero las mucinas fueron obtenidas de las células LS174T. Las células fueron cultivadas en placas de 90 mm (Corning, New York) en medio DMEM con 10% de suero hasta llegar a confluencia. Después, las células se lavaron con 5 ml PBS a 37°C y las células fueron despegadas de forma mecánica, utilizando 1 ml de PBS con inhibidores de proteasa, *Complete* 1x (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Posteriormente, las células fueron lisadas mediante 2 ciclos de congelación y descongelación a 4°C. El lisado fue centrifugado a  $21,690 \times g$  a 4°C durante 10 min y se recuperó la fracción soluble del lisado. Para remover el *Complete* del lisado, la muestra fue dializada con PBS durante 4 h a 4°C en una membrana de diálisis de 12-14 MWCO (Thermo Fisher Scientific, IL).

Para realizar los ensayos de degradación de la mucina MUC5AC o MUC2 se utilizaron 20 µg de la fracción soluble del lisado y fue incubada con 2 µg de Pic, PicS258I o Pic inactivada con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) o 1 µg de la Proteinasa K (PK) a 37°C durante 2 h pH 7.2 y en un volumen de reacción de 50 µl. Para la detección de la mucina MUC2, las muestras fueron desnaturalizadas con *buffer Laemmli* con β-mercaptoetanol (BME), mientras que para la detección de la mucina MUC5AC se utilizó el *buffer Laemmli* sin BME. Las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE utilizando geles compuestos por el gel separador al 4% y con un gel resolutivo al 5%, el gel completo fue transferido a membranas de PVDF de 0.45 µm.

Adicionalmente, las mucinas fueron separadas en geles de SDS-agarosa utilizando la metodología previamente descrita (Warren, Krzesinski, & Greaser, 2003). Brevemente, un tapón de 1 cm de poliacrilamida al 12% fue colocado utilizando unos vidrios de 10 x 8 cm. Después de la polimerización se colocó una solución de agarosa al 1% preparado en el *buffer* de corrida (50 mM Tris, 384 mM glicina y 0.1% de SDS) con 30% de glicerol. Las muestras fueron migradas a 13 mA durante 1.5 h. Finalmente las muestras fueron transferidas en membranas de 0.45  $\mu$ m PVDF (Thermo Fisher Scientific, IL) a 320 mA, 4°C durante 2 h.

Las membranas fueron bloqueadas durante 2 h a temperatura ambiente con leche semidescremada al 5%. Para la detección de MUC2, la membrana fue incubada toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-MUC2 Ccp58 (1:500, Thermo Fisher Scientific, IL) o con el anticuerpo policlonal H-300 (1:1000, Santa Cruz, CA). Para la detección de MUC5AC la membrana fue incubada toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-MUC5AC 45M1 (1:500, Thermo Fisher Scientific, IL) o el anticuerpo policlonal anti-MUC5AC H-160 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA). Posteriormente, las membranas fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween e incubadas durante 1 h con el anticuerpo anti-ratón o anti-conejo respectivamente (1:10000, Invitrogen, Eugene, OR o 1:20000 Novex, San Diego, CA). Las membranas fueron lavadas 9 veces y reveladas con el substrato de *Immobilon Western Chemiluminescent HRP* (Millipore, Billerica, MA) en el equipo *Odyssey Fc imaging system* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

## **Obtención de la mucina MUC5AC secretada**

Las células LS174T fueron cultivadas en placas de 90 mm hasta confluencia y posteriormente ayunadas con 12 ml de DMEM sin suero y antibióticos a 37°C durante 17 h. Posteriormente, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 110 × *g* a 4°C durante 10 min. El sobrenadante (15 ml) fue usado para concentrarlo de 150 a 200 veces empleando los filtros *Amicon* de 100,000 MWCO (Millipore, Billerica, MA). La mucina fue cuantificada utilizando la técnica de Bradford y almacenada a -70°C para su posterior uso.

## **Degradación de la mucina MU5AC secretada**

Para realizar los ensayos de degradación de la mucina MUC5AC secretada, Se utilizaron 0.5 µg de mucinas secretadas, las cuales fueron incubadas con 2 µg de Pic, Pic inactivada con PMSF, PicS258I o 1 µg de Proteinasa K a 37°C, pH 7.2 durante 2 h y en un volumen de final de 50 µl. Posteriormente, las muestras fueron fijadas en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm mediante *Dot-blot* utilizando *Bio-Dot* (Bio-Dot apparatus, Biorad, CA). Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en PBS-Tween durante 2 h a 37°C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-MUC5AC 45M1 (1:500) durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas 7 veces con 15 ml de PBS-Tween, cada lavado tuvo una duración de 10 min. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-ratón HRP (1:10,000, Invitrogen, OR) durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las membranas fueron lavadas otras 7 veces con PBS-Tween. Finalmente, las membranas fueron reveladas con el sustrato *de Immobilon Western*

*Chemiluminescent HRP* (Millipore, Billerica, MA) en el equipo *Odyssey Fc imaging system* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

## **Ensayos de Inmunofluorescencia**

Las células LS174T (60,000) fueron cultivadas en un Lab-Tek de 8 pozos (Thermo Fisher Scientific, NY) a 37°C durante 48 h y en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Después, las células fueron ayunadas durante 2 h con medio DMEM sin suero, sin antibióticos. Las células fueron lavadas dos veces con 300 µl de medio DMEM sin suero. Posteriormente, las células fueron incubadas con 5 µg/ml de Pic, Pic inactivada con PMSF, PicS258I o con 0.125 mM de DCA respectivamente, a 37°C durante 4 h. Una vez terminada la incubación, el medio de cultivo fue removido y las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente. Las células no fueron permeabilizadas y se bloquearon con BSA al 3% durante 30 min. Las células fueron incubadas con 120 µl del anticuerpo primario anti-MUC5AC 45M1 (1:100) a 37°C durante 3 h. Luego, las células fueron lavadas 7 veces con PBS e incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a biotina (1:800, Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA). Las células fueron lavadas 7 veces con PBS y fueron incubadas durante 1 h con 100 µl de PBS que contenía: faloidina rodaminada (1:80, Molecular Probes-Invitrogen, CA), *dichlorotriazinylamino fluorescein (DTAF)- conjugated streptavidin* (1/800, Jackson immunoresearch, CA) y TO-PRO-3 (1/400, Molecular Probes-Invitrogen, CA). Posteriormente, las células fueron lavadas 7 veces y la laminilla fue montada utilizando *Vetashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finalmente,

las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

### **Viabilidad celular por MTT**

Para determinar si Pic afecta la viabilidad de células LS174T, se realizó el ensayo de viabilidad por MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Las células LS174T (25,000) fueron cultivadas en placas de 96 pozos durante 72 h hasta llegar a confluencia. Las células fueron ayunadas durante 17 h con DMEM sin suero, posteriormente, las células fueron estimuladas con 5 µg/ml de Pic o PicS258I o DCA (0.125 mM) durante 4 h a 37°C. Luego, las células fueron incubadas con 0.5 mg/ml de MTT en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 min. Las células fueron lavadas con DMEM sin suero y después fueron lisadas añadiendo 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras fueron leídas a una densidad óptica de 630 nm en un lector de ELISA iMark Microplate Reader.

### **Cuantificación de las interleucinas secretadas**

Para determinar si Pic aumenta la secreción de IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 o IL-10 en las células LS174T. Las interleucinas secretadas por el estímulo de Pic fueron cuantificadas utilizando la metodología previamente descrita (Sanchez-Villamil et al., 2016). Las células LS174T (500,000) fueron cultivadas en cajas de 30 mm (Corning, New York) a 37°C durante 48 h. Las células fueron ayunadas durante 17 h en DMEM sin suero y posteriormente incubadas con 5 µg/ml de Pic, PicS258I o 2 µM de PMA a 37°C durante 4 h. Una vez concluida la incubación, el sobrenadante

fue recuperado y utilizado para cuantificar a las interleucinas usando el *kit Human inflammatory cytokines CBA* (BD Biosciences, CA). Los datos fueron adquiridos en un citómetro de flujo BD FACS Fortessa.

### **Nivel de calcio intracelular**

Para determinar si Pic aumenta la concentración de calcio intracelular utilizamos una metodología previamente descrita (Yang et al., 2005). Las células LS174T fueron cultivadas (60,000) en un Lab-Tek de 8 pozos (Thermo Fisher Scientific, NY) a 37°C durante 48 h y en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron ayunadas durante 2 h con DMEM sin suero y posteriormente cargadas con 2 µM Fluo-4AM (Invitrogen, Eugene, OR) en *buffer Ringer* (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.3) a 37°C durante 45 min. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido de las células. Las células fueron incubadas con medio DMEM sin suero durante 30 min. Las células fueron incubadas con 5 µg/ml de Pic, Pic S258I o 0.125 mM de DCA a 37°C durante 4 h. Las células fueron teñidas con DAPI (Sigma-Aldrich, MO). Finalmente las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

### **Activación de PKCδ**

Para determinar si Pic activa a PKCδ, las células LS174T fueron cultivadas (500,000) en unas placas de 30 mm (Jet Biofil, Guangzhou, China) a 37°C durante 48 h. Antes del experimento, las células fueron ayunadas durante 19 h con medio

DMEM sin suero. Las células fueron lavadas 2 veces con medio DMEM sin suero. Las células fueron incubadas con 5 µg/ml de Pic, PicS258I o 2 µM forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a diferentes tiempos. Para la inhibición de PLC, las células fueron previamente incubadas durante 45 min con 20 µM del inhibidor U-73122 (Sigma-Aldrich, MO). Después de la interacción, las células fueron lavadas con PBS a 37°C y posteriormente lisadas con un *buffer* de lisis NP40 (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP40 1%, NaF 2 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM) y *Complete* 1 X. Los lisados fueron centrifugados a 14,000 × *g* durante 10 min y posteriormente la fracción soluble del lisado fue recuperada. Los lisados celulares fueron cuantificados con la técnica de *Bradford*. Los lisados (20 µg) fueron desnaturalizados con *Buffer Leammli* con BME. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE para ser analizadas por *Western blot*, utilizando un anticuerpo contra PKCδ-total (1:3000, sc-8402) y contra p-PKCδ (1:3000, sc-374613, Santa Cruz Biotechnology, CA).

### **Precipitación de las proteínas por TCA**

Las diferentes bacterias de EAEC fueron crecidas a 37°C durante 16 h en medio LB con agitación, usando los diferentes antibióticos según correspondía. Las bacterias fueron centrifugadas a 4000 × *g* durante 10 min a 4°C. Para precipitar las proteínas, los sobrenadantes (1.6 ml) fueron incubados con el ácido tricloroacético (0.4 ml) al 100% a 4°C durante 2 h. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 × *g* durante 10 min y las pastillas fueron lavadas con acetona a 4°C (2 ml). La acetona fue evaporada de la pastilla a temperatura ambiente, las pastillas fueron resuspendidas en Tris base pH8 (25 µl). Después, las muestras fueron centrifugadas a 14000 × *g*

a 4°C durante 8 min. El sobrenadante fue recuperado y analizado mediante *Western blot*.

## **Ensayo de penetración de mucinas**

Para determinar si la bacteria EAEC utiliza a Pic para atravesar la barrera de las mucinas, se realizó una metodología previamente descrita (Hayashi et al., 2013), con algunas modificaciones. La cámara de mucinas fue preparada colocando 200 µl de mucinas secretadas por las células LS174T a una concentración de 0.025 µg/µl en un *transwell* de 12 mm de diámetro y con un poro de 3 µm (Corning, New York). Los *transwells* fueron montados en placas de 24 pozos y en la cámara inferior se colocó 1200 µl de LB. Las bacterias EAEC, EAEC $\Delta$ *pic*, EAEC $\Delta$ *pic/pPic*, EAEC $\Delta$ *pic/pTrcHis2B*, EAEC*PicS258A*, fueron cultivadas en medio LB con los respectivos antibióticos a 37°C durante 16 h y sin agitación. Posteriormente, las diferentes cepas de EAEC ( $20 \times 10^6$ ) fueron inoculadas en cada uno de los *transwell* que contenían las mucinas secretadas. Los *transwells* fueron incubados a 37°C durante 2 h. Posteriormente, los *transwells* fueron removidos y el medio LB de la cámara inferior fue recuperado. El medio recuperado fue plaqueado en las placas de agar de LB y las placas de LB fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Finalmente, el número de bacterias formadoras de colonias (UFCs) que atravesaron la barrera de mucinas fueron cuantificadas.

## **Análisis estadístico**

Los datos son mostrados como una media  $\pm$  SEM, las comparaciones entre los diferentes grupos se realizó utilizando la prueba de *t* de Student. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad 8 (La Jolla, CA) y una  $p < 0.05$  fue considerada como una diferencia estadísticamente significativa.

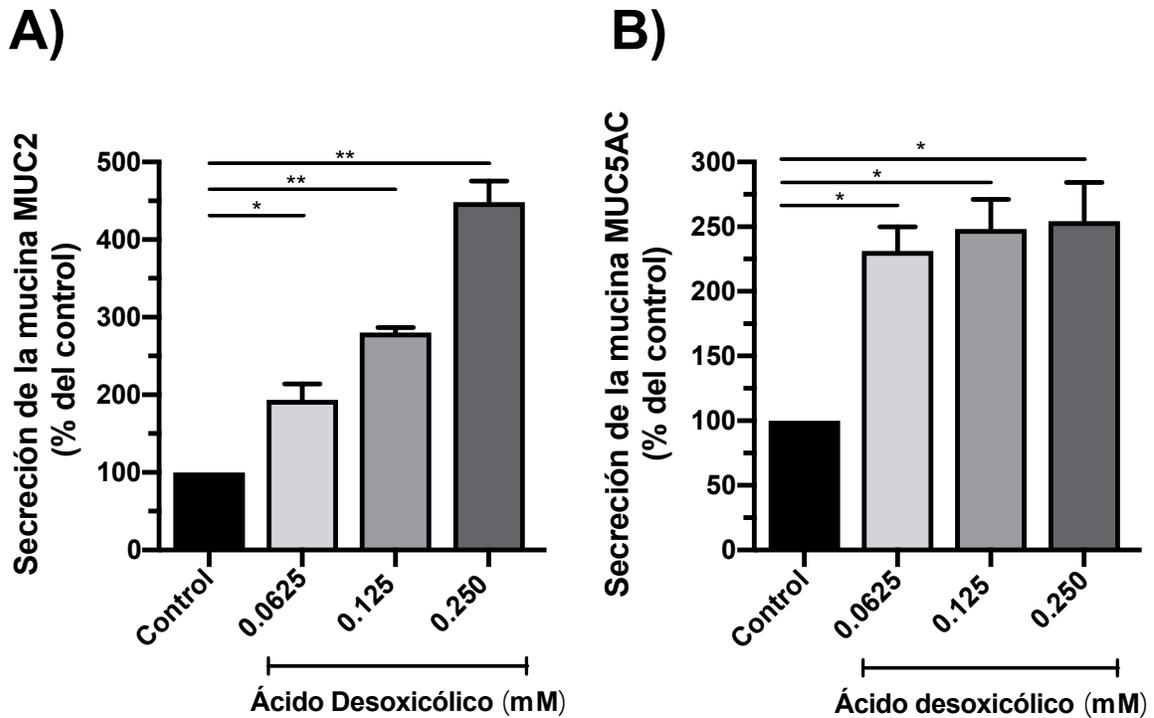
## RESULTADOS

### **El ácido desoxicólico aumenta la secreción de las mucinas en las células LS174T**

Con la finalidad de evaluar la hipersecreción de las mucinas en las células LS174T primeramente utilizamos un secretagogo ampliamente reportado como el ácido desoxicólico (DCA) (Klinkspoor et al., 1999). Para llevar a cabo este objetivo, las células LS174T fueron incubadas durante 4 h con el ácido desoxicólico (DCA) a diferentes concentraciones (0.0625, 0.125, 0.25 mM). El sobrenadante de las células tratadas fue recuperado y la concentración de las mucinas MUC2 y MUC5AC fue determinado utilizando la técnica de ELISA, usando anticuerpos específicos contra MUC2 y MUC5AC. Como control de secreción basal utilizamos el sobrenadante de las células LS174T sin tratamiento.

La secreción basal de las células no tratadas fueron consideradas como una secreción del 100%. Encontramos que el ácido desoxicólico aumentó a nivel similar la secreción de las mucinas MUC5AC usando diferentes concentraciones de DCA en las células LS174T; a 0.062 mM fue de 231%, a 0.125 mM fue de 248% y a 0.25 mM fue de 254% (Figura 3B). El ácido desoxicólico también aumentó la secreción de la mucina MUC2, sin embargo, la secreción de la mucina MUC2 fue dependiente de la concentración de DCA. Se observó una secreción de la mucina MUC2 de 448% a una concentración de 0.125 mM, 280% a 0.125 mM y 193% a 0.0625 mM de DCA, con respecto al control, secreción basal (Figura 3A). Estos datos muestran

que las células tipo caliciforme (LS174T) incrementan la secreción de mucinas componentes del moco ante el estímulo de un secretagogo (DCA) conocido.



**Figura 3. El ácido desoxicólico aumenta la secreción de las mucinas MUC2 y MUC5AC.** Las células LS174T fueron cultivadas hasta confluencia y posteriormente incubadas con el ácido desoxicólico a diferentes concentraciones a 37°C durante 4 h. Después de la incubación el sobrenadante fue recuperado y la secreción de las mucinas fue medida por la técnica de ELISA utilizando un anticuerpo anti-MUC5AC o anti-MUC2 y el respectivo anticuerpo secundario anti-isotipo-HRP. Todos los datos muestran la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de *t* de Student \* $p$  <0.05%, \*\* $p$  <0.001%.

## **La proteína Pic aumenta la secreción de las mucinas en las células LS174T y también la degrada usando su motivo serín-proteasa**

Para determinar si la proteína Pic aumenta la secreción de mucinas directamente sobre las células LS174T, incubamos a las células LS174T durante 4 h con la proteína Pic a diferentes concentraciones (0.75, 1.5, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ), posteriormente recuperamos el sobrenadante y determinamos la concentración de la mucina MUC5AC con la técnica de ELISA usando anticuerpos anti-MUC5AC. Como control positivo estimulamos a las células LS174T con el secretagogo, el ácido desoxicólico (0.125 mM) y como control de secreción basal utilizamos el sobrenadante de las células LS174T sin estimular.

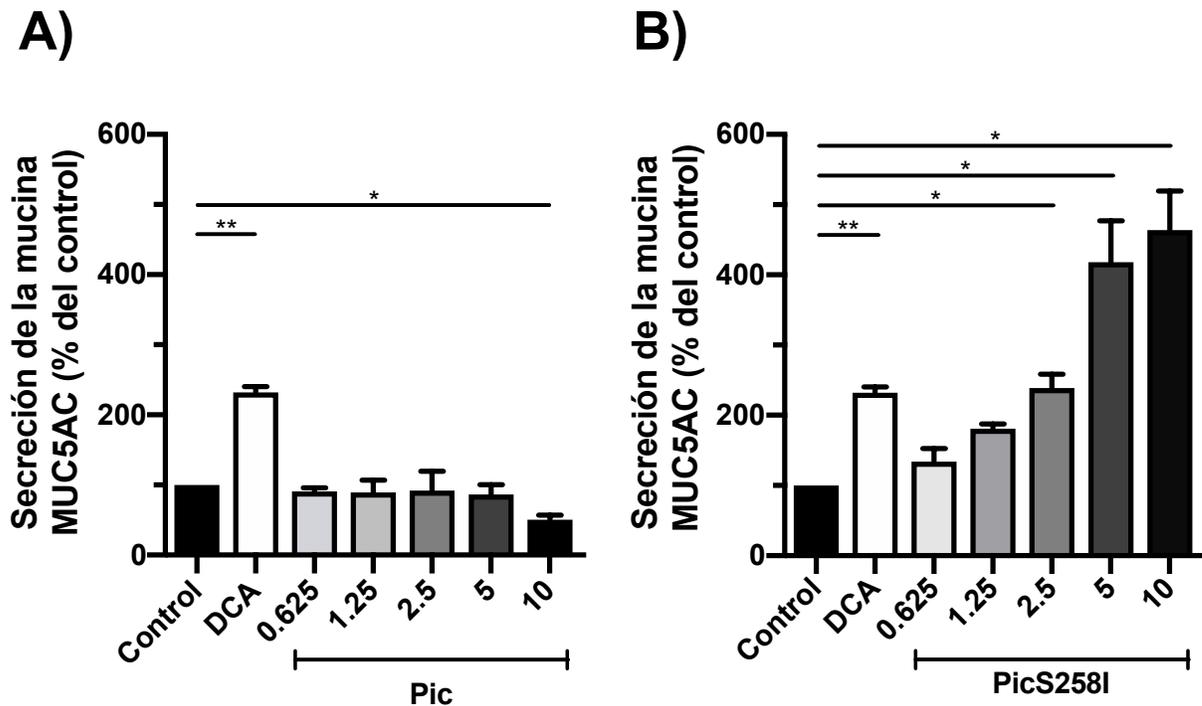
Cuando estimulamos las células LS174T con Pic nativa no pudimos observar un aumento en la secreción de la mucina MUC5AC a ninguna de las concentraciones probadas, en comparación con el control de secreción basal (Figura 3A). Mientras que el secretagogo, el ácido desoxicólico, si causó un aumento en la secreción de la mucina MUC5AC en alrededor de 132% arriba del control de secreción basal (Figura 4A). En estudios previos, mostramos que Pic purificada es capaz de aumentar la secreción de mucinas en secciones de intestino delgado de íleon de la rata (Navarro-García et al., 2010). Debido a que no pudimos observar un aumento en la secreción de mucinas, nosotros pensamos que pudieran estar ocurriendo dos opciones: que Pic no aumenta la secreción de las mucinas directamente sobre las células caliciformes o que Pic estuviera degradando la mucina humana que se está secretando. Para explorar estas posibilidades las

células LS174T fueron incubadas con una mutante de Pic en el motivo de serín-proteasa (PicS258I) y medimos la secreción de la mucina MUC5AC. Sorprendentemente la mutante en el motivo de serín-proteasa de Pic (PicS258I) a 2.5 µg/ml causó un fuerte incremento en la secreción de la mucina MUC5AC (Figura 3B), produciendo un aumento en la secreción de la mucina MUC5AC de un 239%, mientras que, a concentraciones mayores, de 5 y 10 µg/ml, provocaron un aumento de más de 4 veces la secreción de la mucina MUC5AC (418% y 463%, respectivamente) en comparación con la secreción basal (Figura 4B). Con estos resultados sugieren fuertemente que Pic induce la secreción de mucinas directamente sobre las células caliciformes y además es capaz de degradar la mucina MUC5AC que se está secretando.

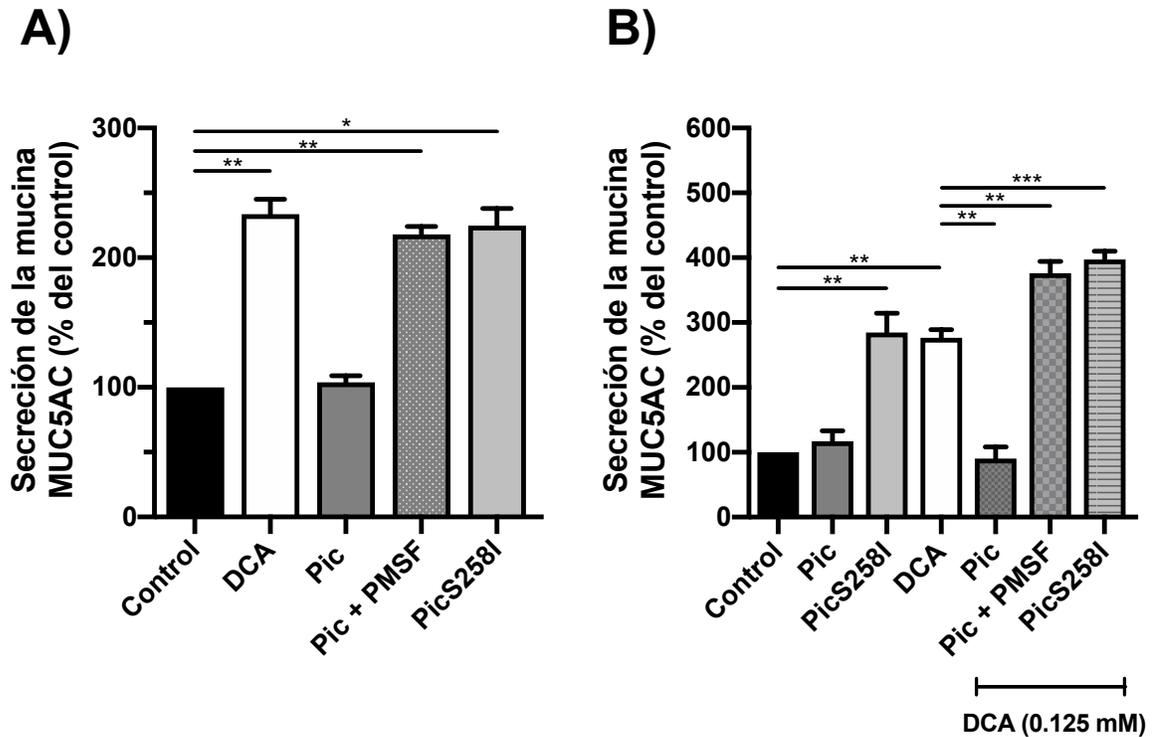
### **Pic tiene una actividad dual es un secretagogo y una mucinasa, la última puede ocultar la actividad de secretagogo**

Con la finalidad de determinar el papel del motivo de serín-proteasa de Pic en la hipersecreción de las mucinas, las células LS174T fueron incubadas con 2 µg/ml de Pic, Pic previamente inactivado con PMSF, un inhibidor irreversible de las serín-proteasas o Pic mutante en el motivo de serín-proteasa (Figura 5A). Como control positivo se utilizó DCA (0.125 mM) y el sobrenadante de las células sin tratamiento fueron usados como la secreción basal. El tratamiento de Pic preincubada con PMSF (2 µg/ml) incremento dos veces la secreción de la mucina MUC5AC (218%) comparada con la secreción basal (100%). El incremento en la secreción de las mucinas utilizando Pic preincubada con PMSF fue similar a la secreción obtenida

con la incubación de Pic mutante en el motivo serín-proteasa PicS258I (224%). De forma contraria Pic nativa, no mostró un incremento en la secreción de la mucina MUC5AC y los niveles de secreción de la mucina MUC5AC fueron similares con el control basal (Figura 5A).



**Figura 4. La proteína PicS258I aumenta la secreción de la mucina MUC5AC en las células LS174T.** Las células LS174T fueron cultivadas hasta la confluencia y posteriormente incubadas con la proteína Pic o PicS258I desde una concentración de 0.75  $\mu\text{g/ml}$  hasta 10  $\mu\text{g/ml}$  a 37°C durante 4 h. Como control positivo se utilizó el DCA (0.125 mM). Después de la incubación el sobrenadante fue recuperado y la secreción de las mucinas fue medida por la técnica de ELISA utilizando un anticuerpo anti-MUC5AC y el respectivo anticuerpo secundario anti-isotipo HRP. Todos los datos muestran la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de *t* de Student. \* $p < 0.05\%$ , \*\* $p < 0.001\%$ .



**Figura 5. La co-estimulación de Pic preincubada con PMSF o PicS258I más DCA aumentan de forma sinérgica la secreción de la mucina MUC5AC.** Las células LS174T fueron cultivadas hasta confluencia y posteriormente co-estimuladas con DCA más Pic o DCA más PicS258I o el tratamiento de DCA más Pic-PMSF a 37°C durante 4 h. Las células también fueron incubadas solamente con la proteína Pic o PicS258I o DCA. Finalmente, recuperamos el sobrenadante y medimos la mucina MUC5AC secretada con la técnica de ELISA utilizando un anticuerpo anti-MUC5AC y el respectivo anticuerpo secundario anti-isotipo HRP. Todos los datos muestran la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de *t* de Student, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

Nuestros datos sugieren fuertemente que Pic tiene una actividad dual incrementando la secreción de las mucinas y después degradándola, por lo decidimos determinar de forma clara este efecto dual de Pic. Para llevar a cabo esto, las células LS174T fueron co-estimuladas con DCA (0.125 mM) más Pic nativa (2  $\mu$ g/ml) o DCA más PicS258I o DCA más Pic preincubada con PMSF.

Adicionalmente, para efecto de comparación las células LS174T fueron incubadas únicamente con Pic nativa o PicS258I; el DCA fue utilizado como control positivo (Figura 4B). Después de 4 h de tratamiento, los sobrenadantes de las células fueron recuperados y la secreción de la mucina MUC5AC fue analizada mediante la técnica de ELISA. La co-estimulación con DCA y Pic nativa no mostró un incremento en la secreción de la mucina MUC5AC y los niveles de secreción de MUC5AC fueron similares al control basal. En contraste, la estimulación con solamente el DCA aumentó la secreción de la mucina MUC5AC alrededor de dos veces (276%) en comparación con la secreción basal. Mientras que, únicamente Pic nativa no mostró un incremento en la secreción de la mucina MUC5AC y los niveles de secreción fueron similares a la co-estimulación con DCA y Pic nativa (Figura 5B).

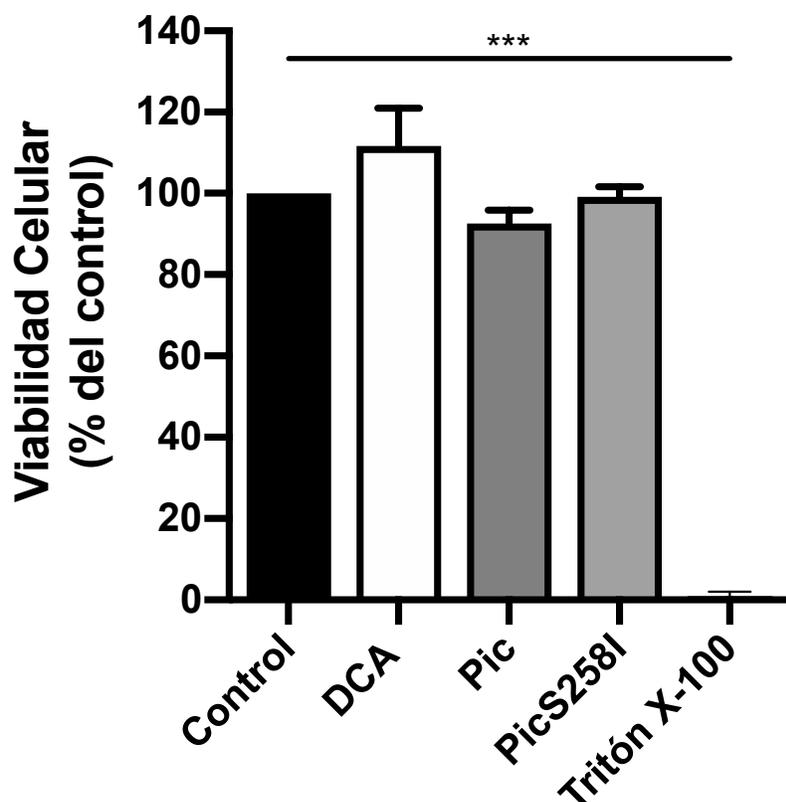
Interesantemente, la co-estimulación con DCA y Pic preincubada con PMSF causó un incremento de alrededor de 4 veces la secreción de la mucina MUC5AC (376%), la cual fue más alta que la secreción inducida por el DCA solo (276%). De forma similar, las células LS174T co-estimuladas con DCA y PicS258I fueron capaces de incrementar 4 veces la secreción de la mucina MUC5AC (397%), la cual fue más alta que la secreción inducida por PicS258I sola (284%) (Figura 5B), indicando un efecto sinérgico inducido por DCA y Pic inactivado en su motivo de serín-proteasa o a través de una inhibición farmacológica.

La actividad proteolítica de motivo de serín-proteasa pudiera estar afectando la viabilidad de las células LS174T, por lo que evaluamos la viabilidad celular utilizando (MTT) después del tratamiento con DCA, Pic o PicS258I. Las células sin tratamiento fueron tomadas como el control negativo, mientras que el

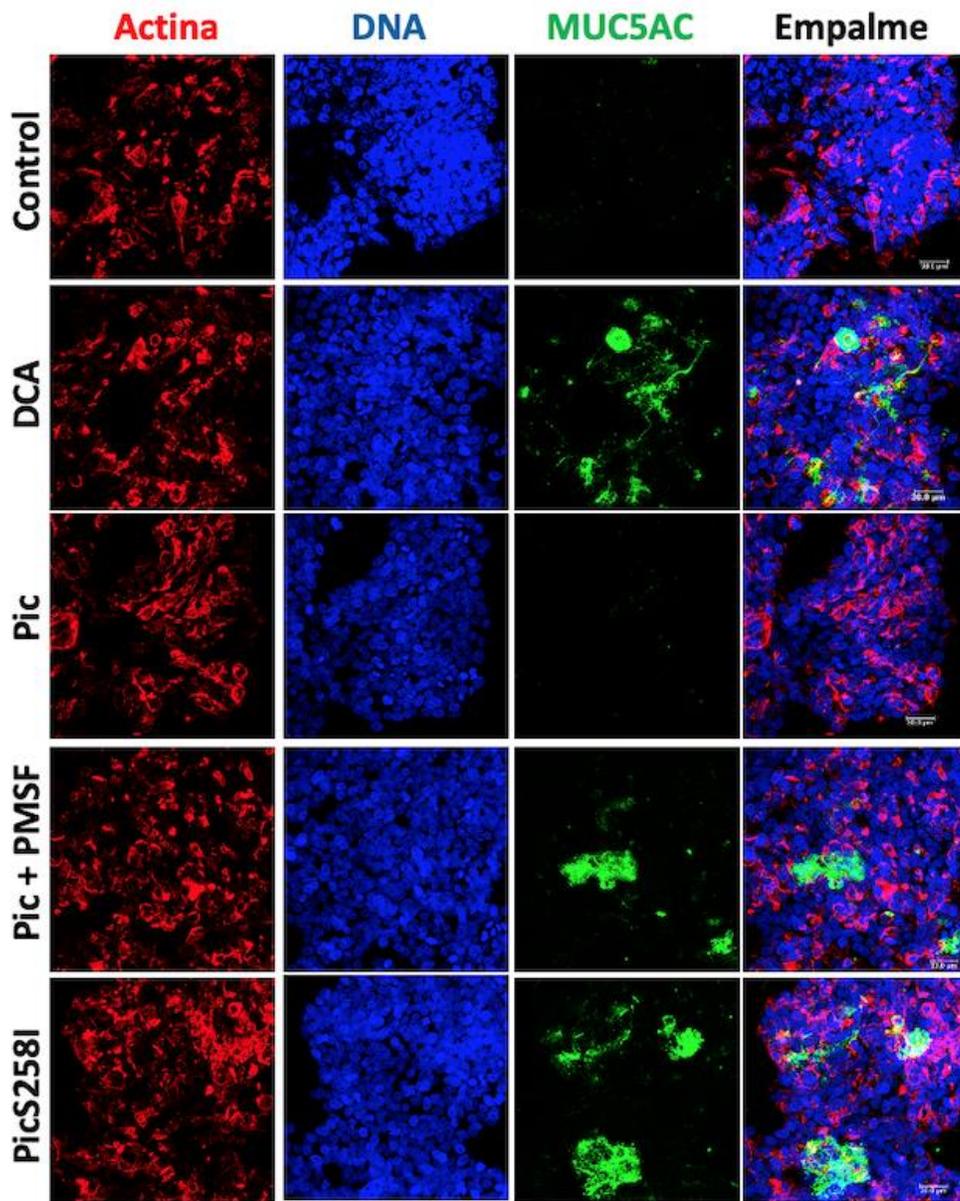
Tritón X-100 fue utilizado como control positivo. Ninguno de los tratamientos con Pic, PicS258I o DCA afectaron la viabilidad de las células LS174T, excepto por el Tritón X-100, el cual si afectó la viabilidad celular (Figura 6).

Con la finalidad de caracterizar la degradación de las mucinas humanas secretadas por las células tipo caliciformes, utilizamos las células LS174T para determinar la degradación de las mucinas MUC2 y MUC5AC por Pic. Primeramente, visualizamos mediante microscopía confocal la secreción y degradación de la mucina MUC5AC por Pic. Para esto, las células LS174T fueron estimuladas durante 4 h con Pic nativa, Pic preincubada con PMSF o PicS258I. El secretagogo DCA fue utilizado como control positivo y las células sin tratamiento fueron tomadas como el control negativo (Figura 7). Después de la estimulación las células LS174T fueron fijadas pero no permeabilizadas para poder observar únicamente las mucinas que son secretadas e inmunomarcadas con anticuerpo anti-MUC5AC seguida por el marcaje con un anticuerpo secundario acoplado fluoresceína (verde). Para identificar a las células, usamos faloidina-rodaminada para detectar la F-actina y TO-PRO-3 para detectar el ADN nuclear. Debido a que las células no están permeabilizadas fue posible inmunodetectar pequeñas trazas de la mucina MUC5AC en las células sin tratamiento, mientras que en las células LS174T tratadas con el secretagogo DCA es posible observar la secreción de la mucina MUC5AC. Como esperábamos en las células LS174T tratadas con Pic nativa, no fue posible detectar a la mucina MUC5AC, debido a que una vez que es secretada también es degradada por Pic. Cuando realizamos el bloqueo del motivo de serín-proteasa por el inhibidor específico PMSF o a través del uso de la mutante del motivo de serín-proteasa de Pic, la degradación de las mucinas fue inhibida y por ello el

anticuerpo anti-MUC5AC es capaz de detectar la secreción de las mucinas en las células caliciformes (Figura 7).



**Figura 6. Pic o PicS258I no afectan la viabilidad celular.** Las células LS174T fueron cultivadas a 37°C durante 72 h hasta confluencia. Las células LS174T fueron incubadas con 5 µg/ml de Pic, PicS258I o 0.125mM de DCA a 37°C durante 4 h. Después, las células fueron incubadas con 0.5 mg/ml de MTT, disuelto en medio DMEM con 10% de SFB, a 37°C durante 30 min. Después las células fueron lavadas y lisadas añadiendo DMSO (dimetilsulfóxido). Las muestras fueron leídas a una densidad óptica de 630 nm en un lector *iMark Microplate*. Todos los datos muestran la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de *t* de Student, \* $p < 0.05$ %, \*\* $p < 0.001$ %.



**Figura 7. La proteasa Pic estimula la secreción y degradación de la mucina MUC5AC en las células LS174T.** Las células LS174T fueron incubadas con 5 µg de Pic, Pic tratada con PMSF o PicS258I a 37°C durante 4 h. El DCA a 0.125 mM fue usado como control positivo. Las células fueron fijadas y no fueron permeabilizadas. Las mucinas secretadas fueron inmunodetectadas con anticuerpos anti-MUC5AC y anticuerpos secundarios acoplados a biotina seguida de estreptavidina marcada con fluoresceína (verde). La actina fue teñida con faloidina-rodamina (rojo) y el ADN con TO-PRO-3 (azul).

## **Pic degrada a las mucinas humanas MUC2 y MUC5AC**

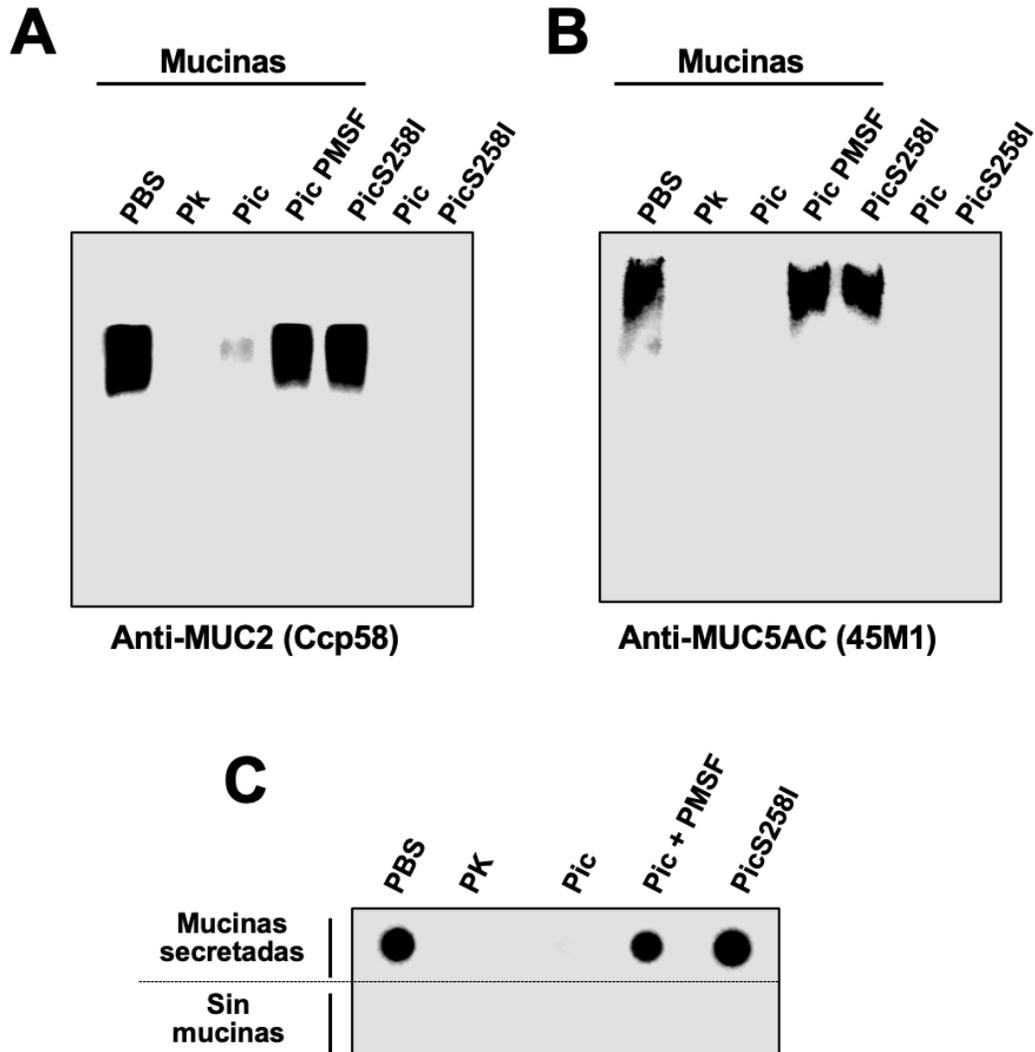
Para caracterizar la degradación de las mucinas humanas secretadas por las células tipo caliciformes, utilizamos células LS174T para determinar la degradación de MUC5AC y MUC2 por la proteína Pic. Los lisados de las células LS174T fueron incubados con Pic o Pic pre tratada con PMSF o con Pic mutante en el sitio catalítico, PicS258I, como control negativo se incubó con PBS y como control positivo se utilizó la Proteinasa K (PK). Después de la incubación a diferentes tiempos las muestras fueron migradas en geles de SDS-agarosa y analizadas mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos anti-MUC2 Ccp58 o H-300 (Figura 8A y 9) o el anticuerpo anti-MUC5AC (45M1) (Figura 8B). Las mucinas MUC2 y MUC5AC se pudieron inmunodetectar en las muestras tratadas con PBS. Cuando incubamos a las mucinas provenientes de las células LS174T con la proteasa Pic, no fuimos capaces de observar la inmunodetección de las mucinas MUC2 y MUC5AC, tampoco pudimos observar la inmunodetección de las mucinas MUC2 y MUC5AC cuando utilizamos la proteinasa K, la cual fue usada como control positivo. Estos datos muestran que tanto Pic como la proteinasa K son capaces de degradar ambas mucinas. En contraste, cuando utilizamos Pic inactivada en el sitio catalítico o pretratada con el PMSF no pudimos observar la degradación de las mucinas MUC2 y MUC5AC, ya que las bandas de ambas mucinas permanecen como el control negativo (Figura 8A, 8B).

Para verificar si Pic es capaz de degradar a las mucinas secretadas provenientes de las células LS174T, las mucinas secretadas fueron incubadas con Pic, Pic pretratada con PMSF o PicS258I. Las muestras se fijaron en una membrana

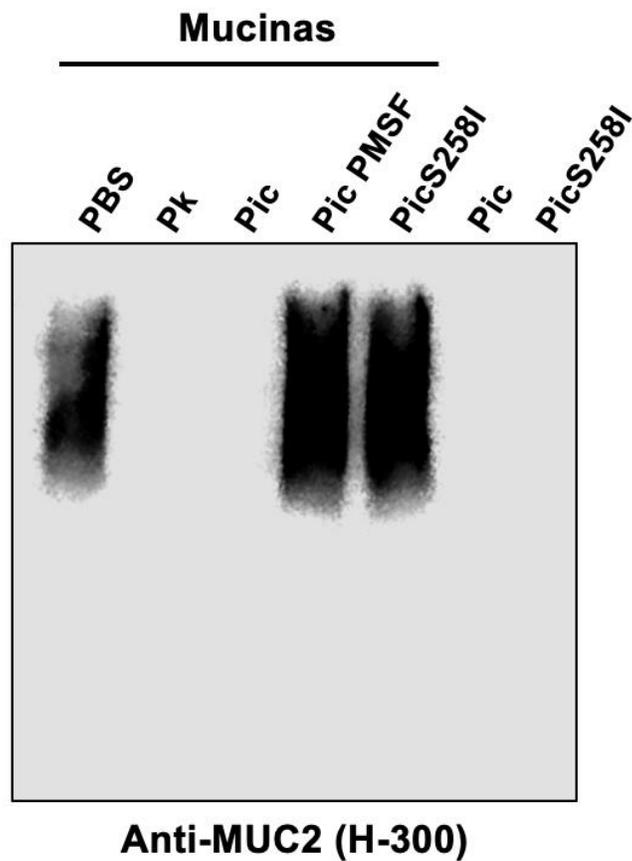
de nitrocelulosa mediante *Dot-blot* y la mucina MUC5AC fue inmunodetectada usando el anticuerpo anti-MUC5AC (45M1). La mucina MUC5AC secretada fue inmunodetectada en la condición sin tratamiento (Figura 8C). En contraste, cuando las mucinas secretadas fueron incubadas con Pic, no pudimos inmunodetectar la mucina MUC5AC, tampoco pudimos inmunodetectar las mucinas secretadas incubadas con la proteinasa K. Sin embargo, cuando incubamos a las mucinas secretadas con Pic pretratada con PMSF o PicS258I, MUC5AC fue claramente inmunodetectada ya que no ocurrió la degradación de la mucina MUC5AC. Estos datos indican que Pic es una proteasa que puede degradar a las mucinas que son secretadas de las células caliciformes y este proceso depende del motivo de serín-proteasa.

### **Pic corta a la mucina MUC5AC en su extremo C-terminal**

Para determinar la cinética degradación de las mucinas a través del tiempo y la inmunodetección de los subproductos de degradación de las mucinas causada por Pic. Las mucinas provenientes de los lisados de las células LS174T fueron incubadas a diferentes tiempos (0,5 10, 15, 20 min) con Pic o PicS258I y posteriormente inmunodetectamos a las mucinas MUC2 y MUC5AC mediante *Western blot* (Figura 10A, 10B). En los lisados de las células LS174T la mucina MUC2 es aparentemente más abundante que la mucina MUC5AC. La proteasa Pic es capaz de degradar a la mucina MUC2 a partir de los 20 min, mientras que la degradación de la mucina MUC5AC ocurre a tiempos tempranos a partir de los 5 min.

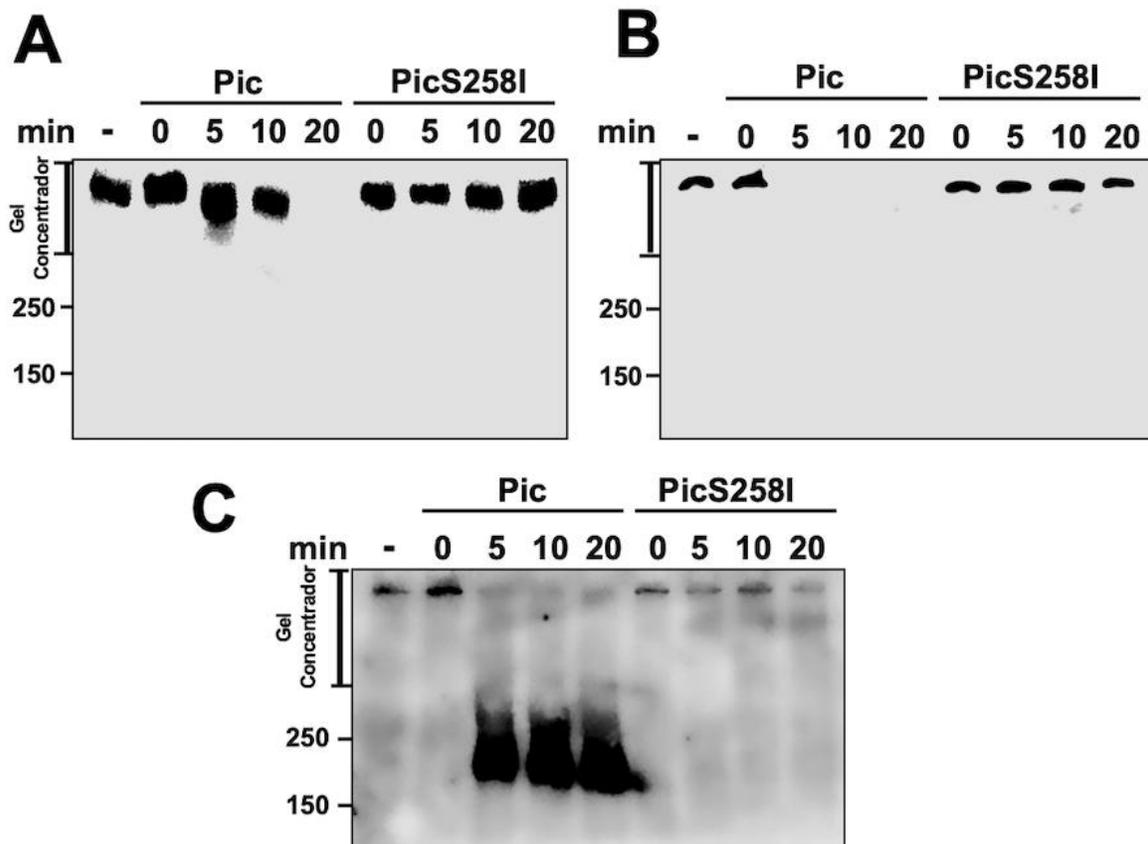


**Figura 8. Pic degrada a las mucinas MUC2 y MUC5AC.** Pic pero no Pic mutante en el motivo de serín-proteasa degrada a las mucinas MUC2 (A) y MUC5AC (B). Los lisados de las células LS174T fueron incubados con 2  $\mu\text{g/ml}$  de Pic, Pic preincubada con PMSF o PicS258I a 37°C durante 2 h. Las proteínas de las preparaciones fueron separadas en geles de SDS-Agarosa y analizadas mediante *Western-blot* utilizando un anticuerpo anti-MUC2 Ccp58 o el anticuerpo anti-MUC5AC 45M1; las muestras tratadas con PBS fueron usadas como control negativo, mientras que la proteinasa K fue usada como control positivo. Pic degrada las mucinas secretadas (C). Las mucinas secretadas por las células LS174T fueron incubadas con 2  $\mu\text{g/ml}$  de Pic, Pic preincubada con PMSF o PicS258I durante 2h a 37°C. Las muestras fueron goteadas en una membrana de nitrocelulosa y analizadas mediante *Dot-Blot* utilizando el anticuerpo anti-MUC5AC (45M1).



**Figura 9. Pic degrada a la mucina MUC2 en el extremo amino terminal.** Pic pero no Pic mutante en el motivo de serín-proteasa degrada a las mucina MUC2. Los lisados de las células LS174T fueron incubados con 2  $\mu\text{g/ml}$  de Pic, Pic preincubada con PMSF o PicS258I a 37°C durante 2 h. Las proteínas de las preparaciones fueron separadas en geles de SDS-Agarosa y analizadas mediante *Western-blot* utilizando un anticuerpo policlonal anti-MUC2 (H-300).

Interesantemente, durante la cinética de degradación no observamos productos de degradación, indicando que la degradación es muy rápida o que los epítomos que reconocen estos anticuerpos son los primeros en ser degradados por Pic. Para explorar esta última posibilidad utilizamos otro anticuerpo, anti-MUC5AC H-160, el cual es un policlonal y reconoce el extremo N-terminal de la molécula MUC5AC en los aminoácidos del 1214 al 1373, mientras que el anticuerpo anti-MUC5AC 45M1 utilizado anteriormente reconoce un epítomo ubicado en el extremo C-terminal de la mucina MUC5AC (4627-4731 aa). La membrana utilizada en la Figura 10B fue desnudada y después incubada con el anticuerpo anti-MUC5AC H-160 que reconoce el extremo N-terminal, como esperábamos, desde los primeros 5 min de incubación pudimos observar una gran banda de un peso entre 250 a 150 kDa, la cual está ubicada en el gel separador y que corresponde a los fragmentos de degradación de la mucina MUC5AC generados por Pic (Figura 10C). Por otra parte, la incubación con la proteína Pic mutante en el sitio catalítico, PicS258I no formó fragmentos de degradación de la mucina MUC5AC a ninguno de los tiempos probados. Estos datos muestran claramente que Pic tiene una fuerte y eficiente actividad proteolítica sobre las mucinas humanas secretadas por las células caliciformes a través de su motivo de serín-proteasa y su sitio de corte proteolítico se localiza en el dominio C-terminal.

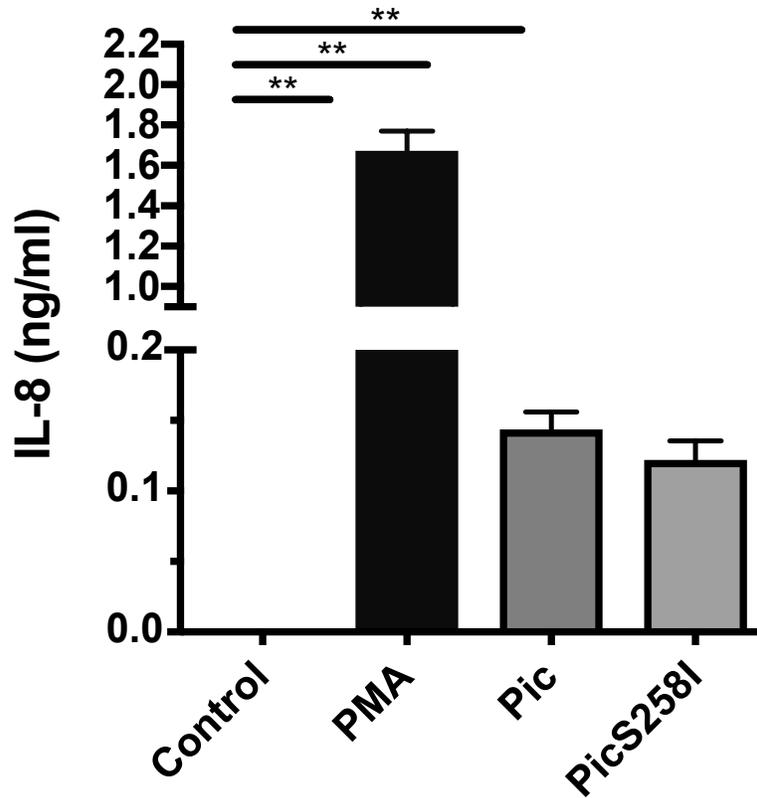


**Figura 10. Pic corta a la mucina MUC5AC en su extremo C-terminal.** (A,B) Pic degrada más eficiente a MUC5AC que a MUC2. La fracción soluble de los lisados de las células LS174T fueron incubados con 2 µg/ml de Pic (A) o PicS258I (B) a diferentes tiempos. La degradación de las mucinas fue analizada por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-MUC2 Ccp58 o anti-MUC5AC 45M1. La detección de subproductos derivados de la degradación de la mucina MUC5AC (C). La degradación de la mucina MUC5AC fue analizada mediante *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-MUC5AC H-160 que reconoce el dominio N-terminal (1214-1373 aa), mientras que, el anticuerpo anti-MUC5AC 45M1 reconoce el dominio C-terminal (4627-4731 aa).

## **Pic no induce la secreción de las mucinas a través de la secreción de interleucinas**

Se ha reportado que las interleucinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-13 son capaces de aumentar la secreción de mucinas en las células caliciformes (Iwashita et al., 2006). Para determinar si Pic estimula la secreción de estas interleucinas, las cuales aumentarían la secreción de mucinas, incubamos a las células LS174T con Pic o PicS258I durante 4 h posteriormente, recuperamos el sobrenadante y cuantificamos las interleucinas utilizando el kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA)* que detecta las interleucinas pro inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 IL-12p70 y TNF- $\alpha$ .

Las proteínas Pic y PicS258I no aumentaron la secreción de las interleucinas que están involucradas en la secreción de mucinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  o de las otras interleucinas probadas excepto por la interleucina IL-8 (Figura 11). Pic y PICS258I aumentaron levemente la secreción de IL-8 (0.5 ng/ml) en comparación con el control positivo PMA el cual estimuló la secreción de IL-8 en 1.8 ng/ml. Estos resultados sugieren fuertemente que Pic no aumenta la secreción de mucinas a través de la secreción de interleucinas.



**Figura 11. La proteína Pic aumenta la secreción de la interleucina 8 en las células LS174T.** Las células LS174T fueron incubadas con la proteína Pic o PicS258I o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) durante 4 h. Después del estímulo, el sobrenadante de las células se recuperó y las citocinas IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  fueron cuantificadas con el *kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA)*. Todos los datos muestran la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de *t* de Student, \*\* $p < 0.001\%$ .

## **Pic aumenta la secreción de las mucinas a través del aumento del calcio intracelular**

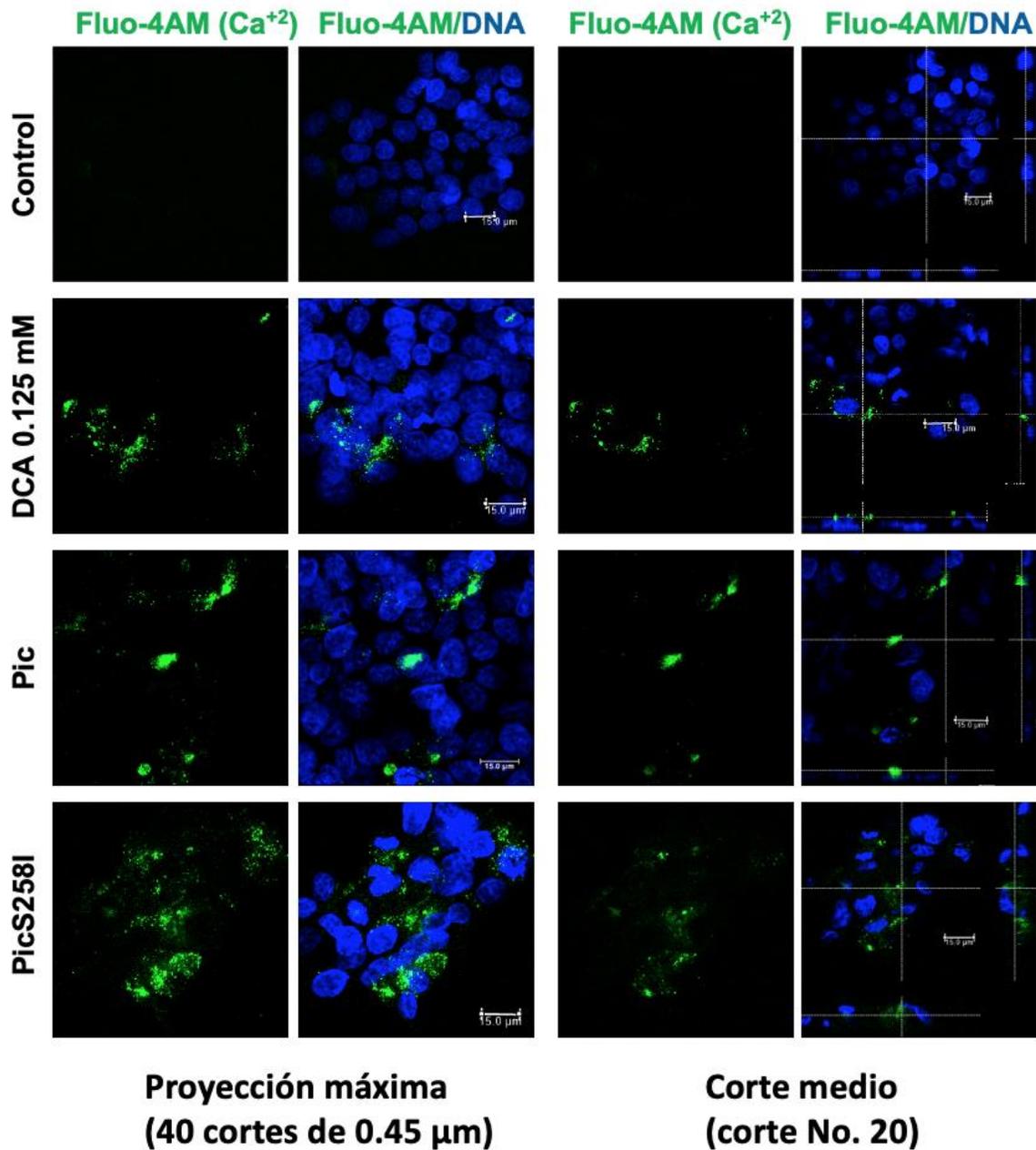
Para explorar el posible mecanismo de hipersecreción de moco inducida por Pic, primero exploramos un segundo mensajero importante que participa en la secreción rápida de las mucinas en las células caliciformes, el calcio intracelular. El aumento del calcio intracelular provoca la secreción de mucinas en las células caliciformes (Davis & Dickey, 2008). Para explorar si Pic aumenta la secreción de mucinas a través del aumento del calcio intracelular decidimos incubar las células LS174T con el indicador de calcio Fluo-4AM (verde) y posteriormente la incubamos con Pic o PicS258I; como control positivo utilizamos el secretagogo DCA. Las células tratadas fueron fijadas y los núcleos fueron teñidos para microscopía confocal. Las proteínas Pic y PicS258I aumentaron el calcio intracelular en comparación con las células no tratadas. El secretagogo DCA, usado como control positivo, también aumentó el calcio intracelular (Figura 12).

Dado que la hipersecreción de mucinas por la proteína Pic se produjo por la vía de calcio intracelular que podría ser inducida por  $IP_3$  río arriba, exploramos aún más esa ruta, al detectar la activación de PKC, que está río abajo de DAG; tanto DAG como  $IP_3$  son mensajeros después de la actividad del PLC. Para explorar si Pic está activando la PKC $\delta$  en las células LS174T, decidimos incubar las células con Pic o PicS258I durante diferentes tiempos (0, 5, 10, 20 min); el éster de forbol PMA fue usado como un control negativo. Los lisados de las células tratadas fueron analizados por *Western blot* usando anti-PKC $\delta$  y anti-p-PKC $\delta$ . Tanto Pic como PicS258I fueron capaces de inducir la activación de PKC $\delta$  al aumentar la

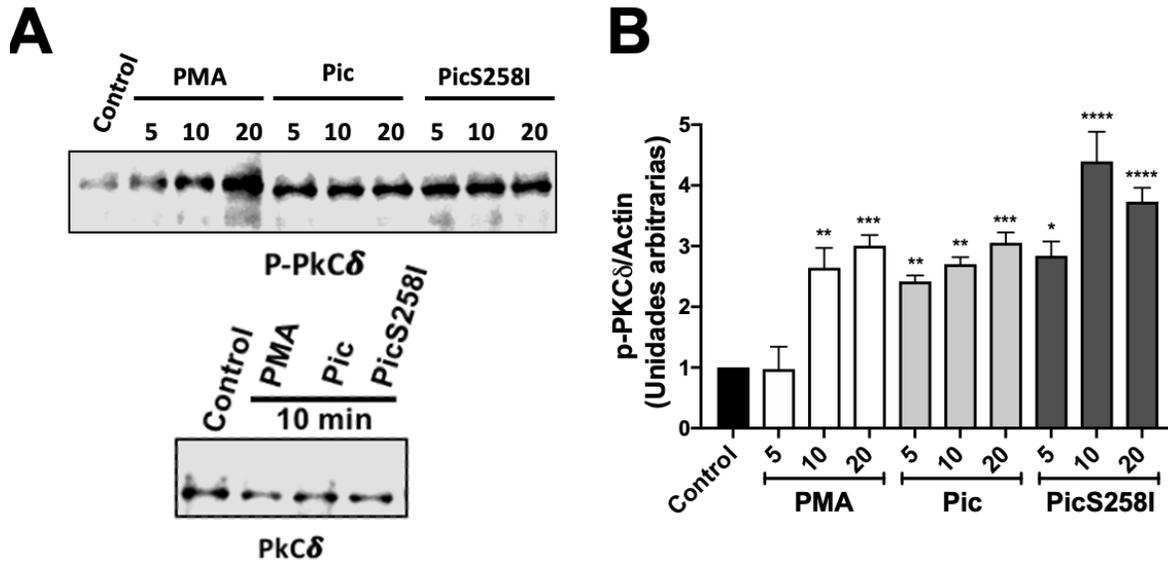
fosforilación de PKC $\delta$  desde los 5 minutos de tratamiento y este aumento también se detectó a los 10 y 20 minutos de tratamiento (Figura 13). A diferencia de PMA que fue capaz de aumentar la fosforilación de PKC $\delta$  de una manera dependiente del tiempo; alcanzando una activación similar a Pic a los 10 min pero una activación más alta a los 20 min. Mientras que la cantidad total de proteína PKC $\delta$  se mantuvo similar en todos los tratamientos (Figura 13).

### **La secreción de las mucinas inducida por Pic es inhibida por el inhibidor de PLC y un quelante de calcio**

Analizamos también el papel de la fosfolipasa C (PLC), la cual produce los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG, en la secreción de mucina MUC5AC, utilizando el inhibidor de la fosfolipasa C (U-73122). Para inhibir la secreción de las mucinas inducidas por Pic, las células LS174T fueron preincubadas durante 45 min con o sin el inhibidor de PLC y después incubadas con PicS258I durante 4 h a 37°C. La secreción de la mucina MUC5AC fue detectada en los sobrenadantes mediante *Dot-blot* utilizando el anticuerpo anti-MUC5AC 45M1 (Figura 13A). El secretagogo DCA que fue utilizado como control positivo y PicS258I incrementaron la secreción de la mucina MUC5AC, la cual fue detectada como una fuerte señal circular, mientras que las células que fueron tratadas con el inhibidor U-73122 hubo una disminución en la secreción de la mucina MUC5AC estimulada por PicS258I (Figura 13A panel izquierdo).



**Figura 12. Pic aumenta el calcio intracelular en las células LS174T.** Las células LS174T fueron incubadas durante 45 min con el indicador de calcio Fluo-4-AM. El indicador de calcio fue desesterificado con medio DMEM sin suero. Las células cargadas fueron incubadas con Pic, PicS258I o DCA a 37°C durante 4 h. Las células fueron fijadas y los núcleos fueron teñidos con TO-PRO-3 (azul). Los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular (verde) fueron detectados en las células LS174T a través de ensayos de microscopía confocal.



**Figura 13. Pic induce la activación de PKC $\delta$  en las células LS174T.** Las células LS174T fueron incubadas con 5  $\mu$ g/ml de Pic, PicS258I o 2  $\mu$ M PMA por diferentes tiempos. Para determinar la activación de PKC $\delta$ , los lisados celulares fueron analizados por *Western blot* a diferentes tiempos (5, 10, 20 min) utilizando el anticuerpo anti-p-PKC $\delta$  o el anticuerpo anti-PKC $\delta$ -total (A). Cuantificación de la activación de PKC (B). Todos los datos muestran la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de ANOVA de una vía con una prueba de Dunnet's *post hoc*, \*  $p < 0.05\%$ , \*\*  $p < 0.01\%$ , \*\*\*  $p < 0.001\%$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001\%$ .

Como la activación de PLC resulta en el incremento de calcio intracelular lo que provoca el aumento en la secreción de las mucinas. Decidimos usar un agente quelante de calcio, BAPTA-AM, para bloquear el aumento de calcio intracelular. Las células fueron tratadas como se mencionó arriba, pero en esta ocasión las células se preincubaron con BAPTA-AM (Figura 14A panel derecho). Cuando se quela el calcio intracelular, con el inhibidor BAPTA-AM durante la estimulación con PicS258I, observamos una disminución de la secreción de la mucina MUC5AC, mientras que las células tratadas solo con PicS258I si pudimos detectar un aumento de la

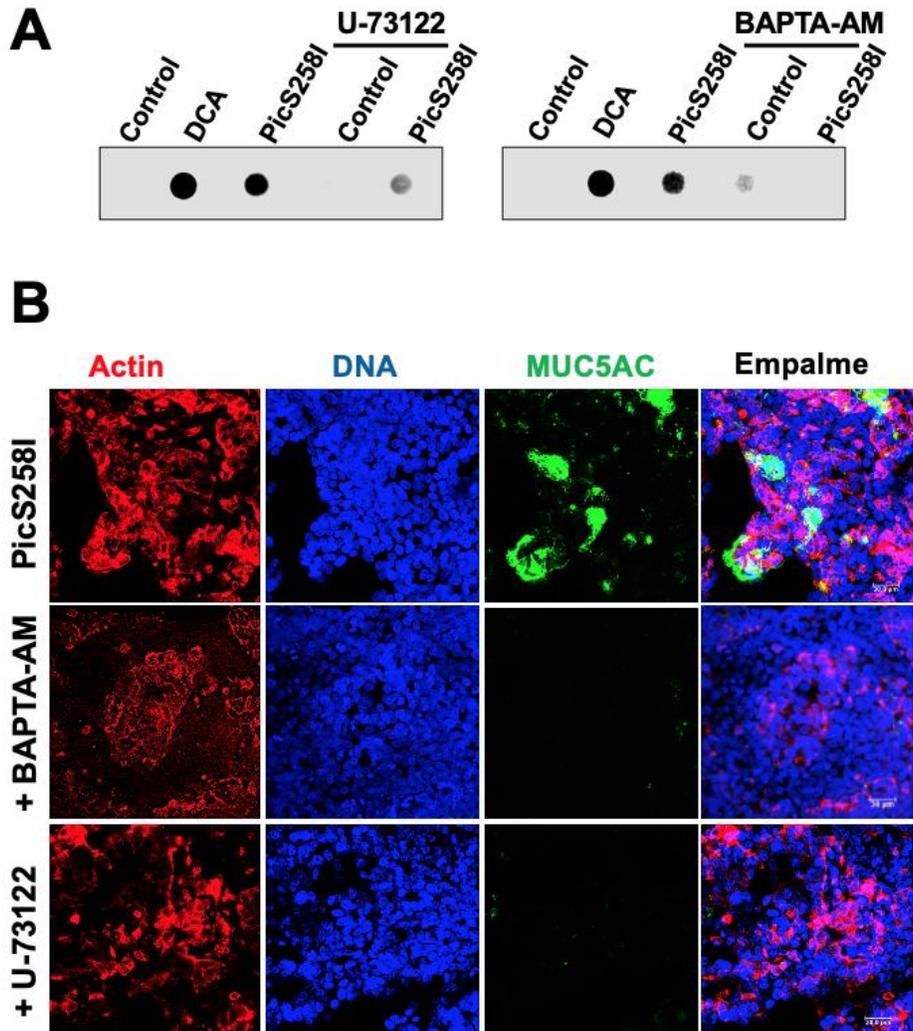
secreción de la mucina MUC5AC, en comparación con las células no tratadas o solo tratadas con BAPTA-AM, sin PicS258I (Figura 14A panel derecho).

Para confirmar estos resultados analizamos la inhibición de la secreción de la mucina MUC5AC en presencia del inhibidor PLC y del quelador de calcio BAPTA-AM, a través de microscopía confocal. Los experimentos fueron similares a los ensayos *Dot-blot*, pero en las células, en lugar de los sobrenadantes se analizaron por inmunotinción de MUC5AC. Como esperábamos el análisis por microscopía confocal mostraron que PicS258I es capaz de aumentar la secreción de la mucina MUC5AC (verde) en las células LS174T (núcleos en azul y actina en roja). Interesantemente, el inhibidor de PLC, U-73122 o el quelante de calcio, BAPTA-AM inhibieron la secreción de la mucina MUC5AC inducida por PicS258I, y no se detectó ninguna señal verde anti-MUC5AC en estas células tratadas. Estos resultados fueron similares en las células no tratadas donde tampoco se inmunodetectó a la mucina MUC5AC (Figura 14B).

### **Pic utiliza las mucinas secretadas como fuente de carbono**

Para comprender mejor la actividad dual de Pic durante la infección por EAEC, primero investigamos el papel de la secreción de moco inducida por Pic y la disponibilidad de moco en el crecimiento de EAEC incubando EAEC con medios condicionados de células LS174T tratadas con Pic (mucinas degradadas) versus células LS174T tratadas con PicS258I (mucinas sin degradar). También tratamos a las bacterias EAEC con medio proveniente de las células LS174T que tenían una secreción basal de mucinas (secreción basal). La bacteria EAEC creció mejor en

los medios condicionados que provenían de las células incubadas con Pic o PicS258I (Figura 14A), que en el medio proveniente de las células LS174T sin tratamiento que tuvieron una secreción basal de mucinas.



**Figura 14. La inhibición de PLC bloquea la secreción de la mucina MUC5AC activada por Pic.** La Inhibición de la secreción de la mucina MUC5AC utilizando el inhibidor U-73122, o el quelador de calcio, BAPTA-AM (A). Las células LS174T fueron incubadas con el inhibidor U-73122 o BAPTA-AM durante 30 min y después incubadas con 5 µg/ml de Pic o PicS258I durante 4 h. Los sobrenadantes de las células tratadas fueron analizadas por *Dot-blot* utilizando el anticuerpo anti-MUC5AC seguido por el anticuerpo secundario acoplado a HRP. Detección de la inhibición de U-73122 y BAPTA-AM por microscopía confocal (B).

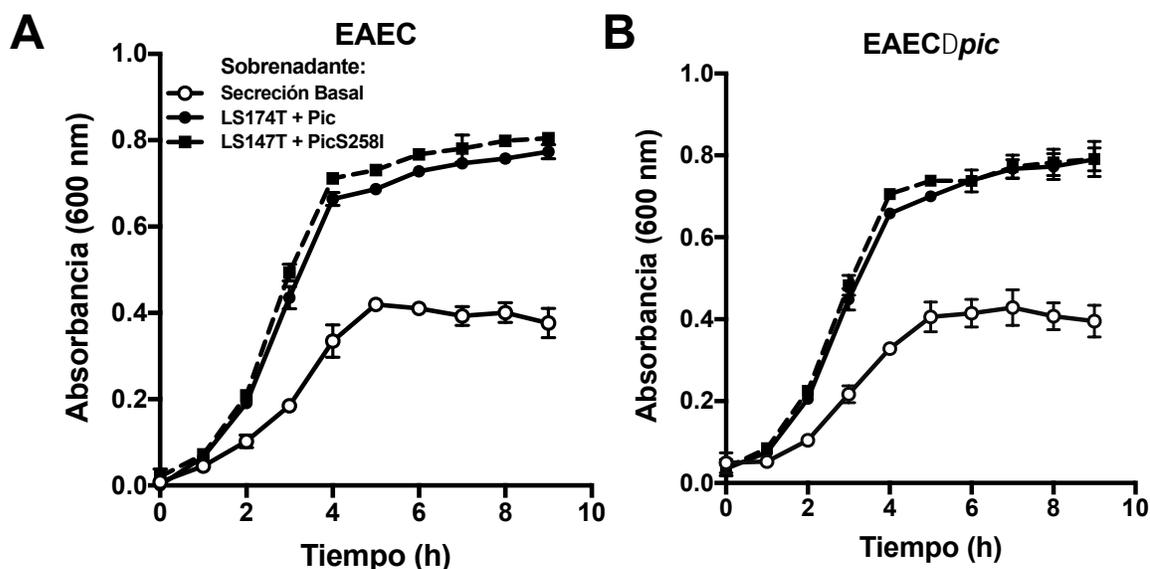
Las células LS174T fueron analizadas mediante microscopía confocal inmunodetectando con el anticuerpo anti-MUC5AC seguido por un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (verde). Las células fueron teñidas con faloidina rodaminada para visualizar la actina y el TO-PRO-3 para los núcleos.

Inesperadamente no hubo diferencia significativa entre el crecimiento de EAEC en un medio proveniente de las células LS174T tratadas con Pic o PicS258I, sugiriendo que EAEC es capaz de usar las mucinas degradadas o sin degradar como fuente de carbono (Figura 15A). Para corroborar estos resultados, realizamos experimentos similares, pero ahora se cultivó una mutante isogénica en *pic* (EAEC $\Delta$ *pic*) en los medios condicionados mencionados anteriormente. EAEC $\Delta$ *pic* creció de manera muy similar al EAEC de tipo salvaje en medios acondicionados de células LS174T tratadas con Pic o PicS258I (Figura 15B). El crecimiento en los medios que contienen mucinas inducidos por Pic o PicS258I fue significativamente mejor, que en los medios que contienen una secreción basal de estas mucinas.

## **EAEC utiliza a Pic para degradar a las mucinas y atravesar la barrera de moco**

Para conocer si Pic es utilizada por EAEC para atravesar la capa de mucinas *in vitro*, utilizamos las diferentes cepas de EAEC, EAEC $\Delta$ *pic*, EAEC $\Delta$ *pic*/pPic, EAEC $\Delta$ *pic*/pTrcHis2B (el vector vacío) o la mutante en el motivo de serín-proteasa de Pic en el cromosoma (EAEPicS258A). Antes de estos experimentos, evaluamos la capacidad de las variantes de EAEC de producir y secretar Pic al

sobrenadante y además la capacidad de estas proteínas de degradar a las mucinas secretadas.



**Figura 15. EAEC y EAEC $\Delta$ pic utilizan las mucinas secretadas como fuente de carbono para favorecer su crecimiento.** Curva de crecimiento de EAEC (A) y EAEC $\Delta$ pic (B) utilizando el medio condicionado proveniente de las células LS174T. Los sobrenadantes (medio condicionado) provenientes de las células LS174T sin tratamiento o provenientes de las células LS174T que fueron estimuladas con 5  $\mu$ g/ml de Pic o PicS258I (LS174T+ Pic y LS174T + PicS258I respectivamente) a 37°C durante 4 h, fueron utilizados para crecer a las bacterias EAEC y EAEC $\Delta$ pic en una cinética de 8 h.

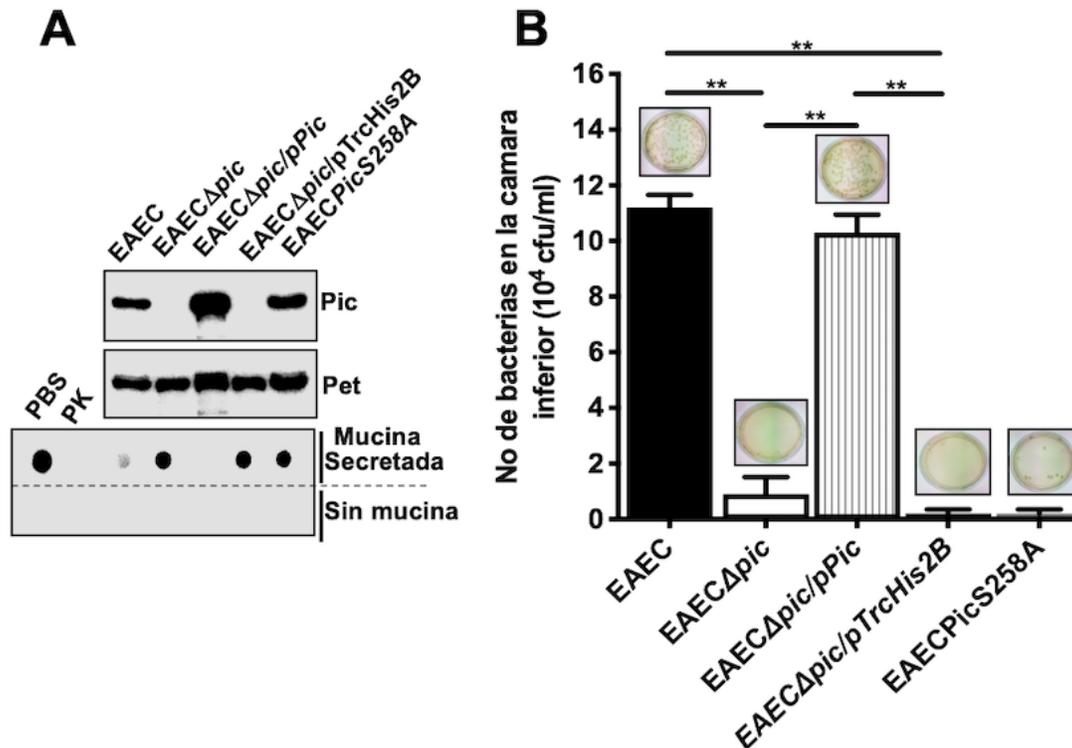
Los sobrenadantes de las variantes EAEC se precipitaron con 20% de TCA y fueron analizadas mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-Pic y un anticuerpo anti-Pet como control (Figura 16, panel superior). Como esperábamos todas las variantes de EAEC secretaron la proteína Pet, mientras que la proteína Pic solo fue detectada en los sobrenadantes de las bacterias EAEC, EAEC $\Delta$ pic/pPic

o EAEC $\text{PicS258A}$ , mientras que, Pic no fue inmunodetectada en los sobrenadantes de las bacterias EAEC $\Delta\text{pic}$  o EAEC $\Delta\text{pic}/\text{pTrcHis2B}$ .

Una vez que inmunodetectamos la secreción de Pic en las diferentes cepas de EAEC, evaluamos la capacidad de sus sobrenadantes de degradar a las mucinas secretadas. La incubación de los sobrenadantes concentrados de las variantes de EAEC, con mucinas secretadas por las células LS174T, mostró que las proteínas secretadas por EAEC y EAEC $\Delta\text{pic}/\text{pPic}$  pudieron degradar a la MUC5AC, como se detectó mediante *Dot-blot* usando anticuerpos anti-MUC5AC; similar a los tratados con Proteinasa K utilizada como control (Figura 16A, panel inferior). Sin embargo, la proteína Pic secretada por EAEC $\text{PicS258A}$  no pudo degradar MUC5AC (similar al PBS que se usó como control), así como aquellas cepas incapaces de secretar Pic; EAEC $\Delta\text{pic}$  y EAEC $\Delta\text{pic}/\text{pTrcHis2B}$ .

Una vez que se probó la capacidad de cada variante EAEC para degradar MUC5AC, todas se usaron para experimentos de penetración de la capa de moco. Para esto, las mucinas secretadas de las células LS174T se colocaron en la cámara superior de un *Transwell*, mientras que en la cámara inferior se colocó medio LB. Posteriormente,  $20 \times 10^6$  UFC de las diferentes variantes de EAEC fueron colocadas en la cámara superior del *Transwell*. Después de 2 h de incubación a 37°C, el *Transwell* se removió, el medio LB fue recuperado y utilizado para cuantificar las bacterias que atravesaron la capa de mucinas. La bacteria EAEC fue capaz de atravesar de manera eficiente la capa de mucinas ( $1.1 \times 10^5$  UFC) comparado con la mutante isogénica en el gen de *pic*, EAEC $\Delta\text{pic}$ , ( $1 \times 10^4$  UFC) (Figura 16B). En contraste, que EAEC $\text{PicS258A}$ , una cepa que produce Pic mutante en el motivo de serín-proteasa, fue incapaz de atravesar la capa de mucinas, mostrando niveles

similares con la mutante isogénica de *pic*, EAEC $\Delta$ *pic*. Como esperábamos la EAEC mutante en el gen de *pic* complementada con el gen de *pic*, EAEC $\Delta$ *pic*/pPic, también fue capaz de atravesar la capa de mucinas, en niveles similares a la cepa nativa de EAEC, mientras que, la mutante isogénica de *pic* transformada con el vector vacío, EAEC $\Delta$ *pic*/pTrcHis2B, no fue capaz de atravesar la capa de mucinas (Figura 16B). Todos estos datos muestran que Pic es relevante como una serín-proteasa para la degradación del moco con el fin de penetrar en la capa de moco, en lugar de la degradación del moco para usarse como fuentes de carbono, ya que EAEC usa la hipersecreción de moco como fuentes de carbono independientemente si las mucinas son o no degradadas.



**Figura 16. EAEC utiliza a Pic para atravesar la barrera de mucinas.** La secreción y la actividad proteolítica de Pic en las diferentes variantes de EAEC (A). Los sobrenadantes provenientes de las bacterias EAEC $\Delta$ pic, EAEC $\Delta$ pic/pPic, EAEC $\Delta$ pic/pTrcHis2B, EAECPicS258A fueron precipitados por TCA y analizados mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-Pic (Panel superior) o un anticuerpo anti-Pet (Panel de en medio). Los sobrenadantes de las diferentes variantes de EAEC fueron individualmente incubadas con las mucinas secretadas (0.5  $\mu$ g) de las células LS174T a 37°C (pH 7.2) durante 2 h o en ausencia de las mucinas y analizadas mediante *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-MUC5AC (45M1). Las mucinas secretadas de las células LS174T (5  $\mu$ g/200  $\mu$ l) fueron colocadas en la cámara superior de un *Transwell* (diámetro 1.8 mm y un poro de 3  $\mu$ m). Las diferentes variantes de EAEC ( $20 \times 10^6$  UFC) fueron inoculadas en la cámara superior que contenía a las mucinas, mientras que, en la cámara inferior se colocó medio LB. Todo el *Transwell* fue incubado a 37°C durante 2 h. Los insertos fueron retirados y el medio en la cámara inferior fue plaqueado en placas de agar LB. Se cuantificaron las UFCs que atravesaron la capa de mucinas (B). Todos los datos muestran la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Cada grupo se comparó usando una prueba de *t* de Student, \*\* $p < 0.001\%$ .

## DISCUSIÓN

Una de las características patológicas de la infección de EAEC es la formación del *biofilm*, el cual está constituido de una capa de moco adherida al epitelio intestinal y la bacteria EAEC inmersa en el moco. El mecanismo molecular que permite la hipersecreción de moco inducido durante la infección de EAEC no está bien entendido. Previamente en nuestro laboratorio se reportó que la proteína autotransportadora Pic es un potente secretagogo, lo cual fue determinado realizando experimentos en asas ligadas en íleon de la rata utilizando patotipos de *E. coli* y EAEC las cuales secretan a Pic, o empleando Pic purificada (Navarro-García et al., 2010). En este trabajo investigamos el mecanismo por el cual Pic induce la hipersecreción de las mucinas. Pic es capaz de inducir la hipersecreción de mucinas directamente sobre las células caliciformes e interesantemente Pic al mismo tiempo es capaz de degradar las mucinas que se secretan. Análisis por ELISA y microscopía confocal nos permitieron mostrar que estas actividades son independientes, porque una mutante en el motivo de serín-proteasa (PicS258I) abate la degradación de las mucinas pero no se ve alterada la actividad de secretagogo. De hecho si estimulamos la secreción de las mucinas con un secretagogo DCA y utilizamos de manera simultánea la mutante PicS258I, resulta en un sinergismo en la secreción de las mucinas; pero estas mucinas son completamente degradadas cuando estimulamos con DCA simultáneamente con Pic nativa. Adicionalmente, la preincubación de Pic con un inhibidor de serín-proteasa mostró un efecto sinérgico en la secreción de las mucinas similar a la

mutante en el sitio catalítico. Las mucinas MUC2 y MUC5AC son degradadas por Pic, pero Pic degrada de forma más eficiente a la mucina MUC5AC que a la mucina MUC2. Cuando utilizamos 2 µg/ml de Pic, Pic es capaz de degradar a la mucina MUC5AC desde los primeros 5 min de incubación, mientras que, Pic pretratada con PMSF o Pic mutante en el sitio catalítico son incapaces de degradar a la mucina MUC5AC o MUC2. También pudimos identificar que Pic es capaz de cortar a la mucina MUC5AC en el extremo C-terminal generando subproductos de degradación de 180-250 kDa que corresponden al extremo N-terminal de la mucina MUC5AC. Pic estimula la secreción rápida de las mucinas directamente en las células caliciformes a través del aumento del calcio intracelular como resultando la activación de la vía de señalización de PLC permitiendo la producción de DAG e IP<sub>3</sub>. Finalmente la actividad dual de Pic como un secretagogo y una mucinasa son relevantes para que la bacteria EAEC pueda utilizar el moco como fuente de carbono y para tener la capacidad de penetrar la capa de mucinas y alcanzar las células epiteliales.

Pic induce la hipersecreción de las mucinas directamente sobre las células caliciformes, sugiriendo que otras estirpes celulares no son requeridas, como los enterocitos, células enteroendocrinas, células de *Paneth* etc. Las células residentes en la mucosa intestinal pueden secretar factores que activan indirectamente a las células caliciformes como el EGF que activa el receptor de EGFR y la vía de las MAPK cinasas (Rios et al., 2008; Yasuda-Onozawa et al., 2017), la prostaglandina se ha reportado ser un secretagogo, a través de la activación de CREB/ATF1 (Cassidy & Lightfoot, 1980; Dilly et al., 2017). Mientras que las citocinas como IL-4, IL-13, TNF-α, IL-6 o IL-1β aumentan la secreción de las mucinas a través de la

activación de NF- $\kappa$ B mediante de las MAPK cinasas (Iwashita et al., 2003; Kuhn et al., 2018). Interesantemente, Pic induce hipersecreción de moco pero no a través de un mecanismo autocrino o de la participación de las citocinas. La incubación de Pic con las células caliciformes no indujo la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 IL-1 $\beta$ , las cuales están involucradas en la secreción de las mucinas. Sin embargo, pudiera existir un mecanismo sinérgico ya que durante la infección con EAEC también se puede aumentar la secreción de mucinas a través de los enterocitos; debido a que entre los diferentes patotipos de *E. coli*, EAEC, es el mejor inductor de la secreción de TNF- $\alpha$  en las células epiteliales y también puede inducir la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  en una línea celular de macrófagos (Sanchez-Villamil et al., 2016). Interesantemente, Pic tiene una actividad dual durante la hipersecreción de las mucinas, que no pudo ser detectada inicialmente debido a que las mucinas secretadas también son degradadas por la actividad de proteasa de Pic. En los experimentos de las asas ligadas del íleon de la rata inoculada con EAEC o *S. flexneri*, las cuales secretan Pic, se puede observar un moco abundante en el lumen intestinal, mientras que, la infección en ratones con *C. rodentium*, que secreta PicC, no se observó diferencias en la secreción de mucinas entre la cepa nativa y la mutante isogénica de *picC* (Bhullar et al., 2015).

Las mucinas se clasifican en formas secretadas y asociadas a la membrana: MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 codifican mucinas secretadas formadoras de gel y se mapean en el cromosoma 11p15.5 (Pigny et al., 1996), mientras que MUC1, MUC3, MUC4, MUC7 codifican las mucinas asociadas a la membrana están dispersas en diferentes cromosomas (Fowler et al., 2001). Aquí hemos demostrado que Pic, además de su actividad secretagogo, también puede degradar

eficientemente las mucinas secretadas formadoras de gel, principalmente MUC2 y MUC5AC. Curiosamente, la cinética de la actividad proteolítica muestra que Pic parece ser más eficiente degradando MUC5AC que MUC2, a pesar de que la apomucina MUC5AC forma dímeros en el retículo endoplásmico dependiente de N-glucosilación en una forma similar a la apomucina MUC2 (Asker et al., 1998b).

De acuerdo con nuestros datos Pic corta proteolíticamente a la mucina MUC5AC en el extremo C-terminal y la similitud es más del 90% en el número y en las posiciones de los residuos de cisteína en el C-terminal de MUC2 y MUC5AC (Asker et al., 1998a). Sin embargo, MUC2 y MUC5AC no heterodimerizan cuando son formadas en la misma célula (van Klinken et al., 1998), sugiriendo que las secuencias fuera del motivo del "nudo de cistina" (*cysteine knot*) son diferentes y también están involucradas en la especificidad de la formación del dímero. Las mucinas MUC2 y MUC5AC están formados por un largo extremo N-terminal constituido con tres dominios von Willebrand D (vWD), una gran cantidad de dominios PTS interrumpidos por dominios de cisteína (CysD) y un C-terminal terminando por un "*cysteine knot*" (Gum et al., 1994). El corte de extremo C-terminal de la mucina MUC5AC o MUC2 es crítico para la formación y polimerización de las mucinas en geles, porque las mucinas forman grandes polímeros a través de la unión del motivo "*cysteine-knot*" dos y dos ubicados en el C-terminal de MUC5AC, mientras, que la polimerización en el caso de MUC2 ocurre entre los dominios "*cysteine knot*" tres y tres ubicados en el N-terminal. La mucina MUC5AC es cortada en el C-terminal generando una gran banda entre 180 a 250 kDa y fuimos incapaces de determinar que parte del dímero de MUC5AC representa, o el sitio de corte exacto. Sin embargo, otras dos enzimas de patógenos, una cisteín-proteasa de *E.*

*histolytica* (EhCP) y una cisteín-proteasa bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* (RgpB), son capaces de cortar el núcleo de la proteína MUC2 en la secuencia de aminoácidos SIIRT↓TGLR, mientras que RgpB corta en la secuencia SIIR↓TTGLR. Es claro que RgpB de *Porphyromonas gingivalis* corta a MUC2 en la región de C-terminal, mientras que el N-terminal se mantiene inalterado (van der Post et al., 2013). De nuevo, los dominios N y C-terminales menos glicosilados se estabilizan mediante numerosos enlaces disulfuro, y hacen que MUC2 sea C-terminalmente dimérico y N-terminalmente trimérico (Godl et al., 2002) y el corte en el extremo C-terminal de las mucinas MUC5AC y MUC2 por las proteasas EhCP5, RgpB o Pic destruyen las largas mallas de mucinas que están formando los geles. La capa de mucinas normalmente actúa como una barrera que no permite que las bacterias residentes en el intestino alcancen las células epiteliales y esto limita el contacto directo entre la microbiota intestinal y el huésped. Sin embargo, el corte de MUC2 y MUC5AC en el C-terminal puede causar que el polímero de moco se disuelva. En el caso de *E. histolytica*, el corte por EhCP5 hace que el polímero de MUC2 se rompa y permite que la amiba penetre la capa interna de moco. En este trabajo, encontramos que EAEC que secreta Pic, pero no las mutantes en el motivo de serina proteasa de Pic, pueden penetrar eficientemente la capa de moco. Curiosamente, el corte proteolítico de las mucinas por Pic no favoreció el crecimiento de EAEC en comparación con el medio condicionado de las células LS174T tratadas con PicS258I (mucina no degradada), ya que ambos medios condicionados ricos en mucinas aumentaron el crecimiento de EAEC a niveles similares y claramente más altos que el medio condicionado de las células LS174T no tratadas (secreción basal). Estos datos pueden no ser una discrepancia, debido

a que las bacterias que residen en el intestino son muy eficientes en degradar los oligosacáridos provenientes de las mucinas y hasta un 40% de los genomas de las bacterias codifican para cientos de enzimas que degradan glicanos (Koropatkin et al., 2012). Por lo tanto, al igual que las bacterias colónicas comensales, EAEC puede utilizar eficientemente los monosacáridos liberados por las hidrolasas bacterianas y ser transportadas a la bacteria por transportadores específicos (Koropatkin et al., 2012; Arike & Hansson, 2016), independientemente si la apomucina es cortada o no, ya que el núcleo central de la proteína altamente glicosilado no se puede escindir.

Los ligandos extracelulares y las vías de señalización involucradas en la secreción de mucinas en las células caliciformes han sido ampliamente estudiadas en las vías respiratorias superiores (Davis & Dickey, 2008). La molécula de ATP, es el ligando mejor estudiado, el cual se une a los receptores P2Y2 que activa a la GTPAsas Gq y posteriormente a PLC-1, permitiendo la producción de los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG. Sin embargo, algunos patógenos también pueden facilitar la colonización intestinal a través de la regulación de la secreción y la expresión de las mucinas en las células caliciformes. Por ejemplo *E. histolytica* estimula la secreción de las mucinas a través del contacto de la amiba con el huésped permitiendo la activación de la PKC (Cornick et al., 2016) mientras que, *Vibrio cholerae* aumenta la secreción de mucinas a través del aumento del AMPc la cual permite la activación del elemento modulador de respuesta a AMPc (CREB) (Epple et al., 1997). Otros parásitos como *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis* y *Trichuris muris* a través de las células inmunológicas inducen la producción de citocinas y estas a su vez provocan un incremento en la producción de las mucinas (Hasnain et al., 2011;

Ishikawa et al., 1997; Urban et al., 1998). En este trabajo hemos mostrado que Pic no aumenta la secreción de las mucinas mediante la vía parácrina o autócrina a través de la secreción de las citocinas. En cambio, Pic aumenta la secreción de las mucinas a través del aumento del calcio intracelular. El calcio intracelular puede provenir de depósitos intracelulares o a través de la activación de canales de calcio. Pic aumenta el calcio intracelular y esto sugiere que la fosfolipasa C está participando en la vía de señalización. La fosfolipasa C cataliza la conversión de PIP<sub>2</sub> a IP<sub>3</sub> y DAG. El segundo mensajero IP<sub>3</sub> es el mayor contribuyente en la liberación de calcio intracelular (Tran et al., 2016), de hecho, nosotros encontramos que Pic es capaz de activar a PKC la cual esta río abajo de DAG y la activación directa de PKC es capaz de promover la secreción de las mucinas.

En este trabajo encontramos que la secreción de las mucinas en las células LS174T inducida por Pic es dependiente de PLC (y río abajo de IP<sub>3</sub> y DAG) como se mostró en los experimentos con el inhibidor de PLC U-73122. Interesantemente la hipersecreción de mucinas inducida por Pic es independiente de su motivo de serín-proteasa indicando que al contrario de la actividad mucinolítica, la actividad proteolítica no es necesaria para este proceso. La hipersecreción de las mucinas es una característica común de las enfermedades crónicas en las vías respiratorias y las serín-proteasas tienen un papel crítico en este proceso (Chokki et al., 2005; Liu et al., 2013). Los receptores activados por proteasas (PAR) son receptores acoplados a proteínas G que son activados por el corte del dominio N-terminal (Schmidlin & Bunnnett, 2001) y este proceso produce la activación de PLC río abajo que permite la liberación del calcio intracelular y la secreción de las mucinas. Es

necesario realizar más estudios para conocer como la señalización extracelular de Pic activa la vía de señalización de PLC/IP<sub>3</sub>-DAG/PKC.

## CONCLUSIONES

- Pic aumenta la secreción de la mucina MUC5AC independientemente de su motivo de serín-proteasa.
- Pic tiene una actividad dual que aumenta la secreción de las mucinas y degrada a las mucinas MUC2 y MUC5AC.
- Pic degrada a la mucina MUC5AC en su extremo C-terminal y de forma más eficiente que la mucina MUC2.
- Pic aumenta el calcio intracelular y activa a la proteína cinasa C en las células LS174T.
- La secreción de la mucina MUC5AC estimulada por Pic es inhibida por un quelante de calcio y con el inhibidor de PLC (U-73122).
- El crecimiento de EAEC se favorece en un medio rico en mucinas independientemente si las mucinas están o no degradadas
- EAEC utiliza a la proteasa Pic para degradar a las mucinas y atravesar la capa de mucinas.

## PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de inmunoprecipitación utilizando a PicS258I como carnada para poder identificar los posibles receptores de Pic que activa la vía de señalización PLC/ IP<sub>3</sub>-DAG y activación de PKC.
- Determinar la secuencia en Pic que interacciona con el receptor para permitir la señalización que lleva a la activación de la vía de señalización PLC/ IP<sub>3</sub>-DAG.
- La proteasa Pic es capaz de degradar a las principales mucinas intestinales además, la proteasa Pic degrada otras O-glicoproteínas de membrana de leucocitos humanos, sin embargo, sería importante conocer si Pic degrada a las mucinas de membrana que forman parte de la glicocálix en el epitelio intestinal.

## REFERENCIAS

- Abdullah, L.H., J.D. Conway, J.A. Cohn, and C.W. Davis. 1997. Protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> activation of mucin secretion in airway goblet cells. *Am J Physiol.* 273:L201-210.
- Abdullah, L.H., and C.W. Davis. 2007. Regulation of airway goblet cell mucin secretion by tyrosine phosphorylation signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L591-599.
- Adachi, J.A., C.D. Ericsson, Z.D. Jiang, M.W. DuPont, S.R. Pallegar, and H.L. DuPont. 2002. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *J Infect Dis.* 185:1681-1683.
- Asker, N., M.A. Axelsson, S.O. Olofsson, and G.C. Hansson. 1998a. Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 273:18857-18863.
- Asker, N., M.A. Axelsson, S.O. Olofsson, and G.C. Hansson. 1998b. Human MUC5AC mucin dimerizes in the rough endoplasmic reticulum, similarly to the MUC2 mucin. *Biochem J.* 335 ( Pt 2):381-387.
- Bhullar, K., M. Zarepour, H. Yu, H. Yang, M. Croxen, M. Stahl, B.B. Finlay, S.E. Turvey, and B.A. Vallance. 2015. The Serine Protease Autotransporter Pic Modulates *Citrobacter rodentium* Pathogenesis and Its Innate Recognition by the Host. *Infect Immun.* 83:2636-2650.
- Black, R.E., S. Cousens, H.L. Johnson, J.E. Lawn, I. Rudan, D.G. Bassani, P. Jha, H. Campbell, C.F. Walker, R. Cibulskis, T. Eisele, L. Liu, and C. Mathers. 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* 375:1969-1987.
- Boll, E.J., J. Ayala-Lujan, R.L. Szabady, C. Louissaint, R.Z. Smith, K.A. Krogfelt, J.P. Nataro, F. Ruiz-Perez, and B.A. McCormick. 2017. Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence Fimbriae Drive Inflammatory Cell Recruitment via Interactions with Epithelial MUC1. *MBio.* 8.
- Canizalez-Roman, A., and F. Navarro-Garcia. 2003. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Mol Microbiol.* 48:947-958.
- Cassidy, M.M., and F.G. Lightfoot. 1980. Effects of prostaglandin E<sub>1</sub>, administered by gastric intubation, on mucus secretory patterns in rat small intestine. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 8:1589-1593.
- Chen, Y., Y.H. Zhao, and R. Wu. 2001. Differential regulation of airway mucin gene expression and mucin secretion by extracellular nucleotide triphosphates. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25:409-417.
- Choi, J., J.H. Klinkspoor, T. Yoshida, and S.P. Lee. 1999. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* stimulates mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells. *Hepatology.* 29:1352-1357.

- Choi, J.Y., J.H. Shin, J.L. Kim, S.H. Jung, E.J. Son, M.H. Song, S.H. Kim, and J.H. Yoon. 2005. P2Y2 agonist induces mucin secretion via Ca<sup>2+</sup>- and inositol 1,4,5-triphosphate-dependent pathway in human middle ear epithelial cells. *Hear Res.* 209:24-31.
- Chokki, M., H. Eguchi, I. Hamamura, H. Mitsuhashi, and T. Kamimura. 2005. Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF alpha-converting enzyme activity in airway epithelial cells. *FEBS J.* 272:6387-6399.
- Cornick, S., F. Moreau, and K. Chadee. 2016. *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 5 Evokes Mucin Exocytosis from Colonic Goblet Cells via alpha5beta3 Integrin. *PLoS Pathog.* 12:e1005579.
- Davis, C.W., and B.F. Dickey. 2008. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu Rev Physiol.* 70:487-512.
- Deplancke, B., and H.R. Gaskins. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.* 73:1131S-1141S.
- Dilly, A.K., B.D. Honick, Y.J. Lee, Z.S. Guo, H.J. Zeh, D.L. Bartlett, and H.A. Choudry. 2017. Targeting G-protein coupled receptor-related signaling pathway in a murine xenograft model of appendiceal pseudomyxoma peritonei. *Oncotarget.* 8:106888-106900.
- Elias, W.P., A.P. Uber, S.K. Tomita, L.R. Trabulsi, and T.A. Gomes. 2002. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. *Epidemiol Infect.* 129:49-55.
- Enss, M.L., M. Cornberg, S. Wagner, A. Gebert, M. Henrichs, R. Eisenblatter, W. Beil, R. Kownatzki, and H.J. Hedrich. 2000. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res.* 49:162-169.
- Epple, H.J., K.M. Kreusel, C. Hanski, J.D. Schulzke, E.O. Riecken, and M. Fromm. 1997. Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol. *Pflugers Arch.* 433:638-647.
- Fields, R.D., and G. Burnstock. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 7:423-436.
- Fowler, J., L. Vinall, and D. Swallow. 2001. Polymorphism of the human muc genes. *Front Biosci.* 6:D1207-1215.
- Godl, K., M.E. Johansson, M.E. Lidell, M. Morgelin, H. Karlsson, F.J. Olson, J.R. Gum, Jr., Y.S. Kim, and G.C. Hansson. 2002. The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *J Biol Chem.* 277:47248-47256.
- Gum, J.R., Jr., J.W. Hicks, N.W. Toribara, B. Siddiki, and Y.S. Kim. 1994. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 269:2440-2446.
- Gutierrez-Jimenez, J., I. Arciniega, and F. Navarro-Garcia. 2008. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after

- binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microb Pathog.* 45:115-123.
- Harden, T.K., J.L. Boyer, and R.A. Nicholas. 1995. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35:541-579.
- Harrington, S.M., E.G. Dudley, and J.P. Nataro. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 254:12-18.
- Harrington, S.M., J. Sheikh, I.R. Henderson, F. Ruiz-Perez, P.S. Cohen, and J.P. Nataro. 2009. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun.* 77:2465-2473.
- Harrington, S.M., M.C. Strauman, C.M. Abe, and J.P. Nataro. 2005. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 7:1565-1578.
- Hasnain, S.Z., D.J. Thornton, and R.K. Grencis. 2011. Changes in the mucosal barrier during acute and chronic *Trichuris muris* infection. *Parasite immunology.* 33:45-55.
- Hayashi, N., M. Matsukawa, Y. Horinishi, K. Nakai, A. Shoji, Y. Yoneko, N. Yoshida, S. Minagawa, and N. Gotoh. 2013. Interplay of flagellar motility and mucin degradation stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* with human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *J Infect Chemother.* 19:305-315.
- Henderson, I.R., J. Czczulin, C. Eslava, F. Noriega, and J.P. Nataro. 1999. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 67:5587-5596.
- Hicks, S., D.C. Candy, and A.D. Phillips. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun.* 64:4751-4760.
- Hodges, R.R., J.A. Bair, R.B. Carozza, D. Li, M.A. Shatos, and D.A. Dartt. 2012. Signaling pathways used by EGF to stimulate conjunctival goblet cell secretion. *Exp Eye Res.* 103:99-113.
- Hollingsworth, M.A., and B.J. Swanson. 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.* 4:45-60.
- Huang, D.B., A. Mohanty, H.L. DuPont, P.C. Okhuysen, and T. Chiang. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 55:1303-1311.
- Ishikawa, N., D. Wakelin, and Y.R. Mahida. 1997. Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology.* 113:542-549.
- Iwashita, J., Y. Sato, H. Sugaya, N. Takahashi, H. Sasaki, and T. Abe. 2003. mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-alpha through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. *Immunol Cell Biol.* 81:275-282.
- Iwashita, M., J. Nishi, N. Wakimoto, R. Fujiyama, K. Yamamoto, K. Tokuda, K. Manago, and Y. Kawano. 2006. Role of the carboxy-terminal region of the

- outer membrane protein AatA in the export of dispersin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 256:266-272.
- Jarry, A., L. Dorso, V. Gratio, M.E. Forgue-Lafitte, M. Laburthe, C.L. Laboisie, and D. Darmoul. 2007. PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 364:689-694.
- Jonsson, R., C. Struve, E.J. Boll, N. Boisen, K.G. Joensen, C.A. Sorensen, B.H. Jensen, F. Scheutz, H. Jenssen, and K.A. Krogfelt. 2017. A Novel pAA Virulence Plasmid Encoding Toxins and Two Distinct Variants of the Fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 8:263.
- Kim, K.C., and B.C. Lee. 1991. P2 purinoceptor regulation of mucin release by airway goblet cells in primary culture. *Br J Pharmacol.* 103:1053-1056.
- Klinkspoor, J.H., K.S. Mok, B.J. Van Klinken, G.N. Tytgat, S.P. Lee, and A.K. Groen. 1999. Mucin secretion by the human colon cell line LS174T is regulated by bile salts. *Glycobiology.* 9:13-19.
- Koropatkin, N.M., E.A. Cameron, and E.C. Martens. 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 10:323-335.
- Kufe, D.W. 2009. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 9:874-885.
- Kuhn, K.A., H.M. Schulz, E.H. Regner, E.L. Severs, J.D. Hendrickson, G. Mehta, A.K. Whitney, D. Ir, N. Ohri, C.E. Robertson, D.N. Frank, E.L. Campbell, and S.P. Colgan. 2018. Bacteroidales recruit IL-6-producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity. *Mucosal Immunol.* 11:357-368.
- Levine, S.J., P. Larivee, C. Logun, C.W. Angus, F.P. Ognibene, and J.H. Shelhamer. 1995. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12:196-204.
- Lidell, M.E., M.E. Johansson, M. Morgelin, N. Asker, J.R. Gum, Jr., Y.S. Kim, and G.C. Hansson. 2003. The recombinant C-terminus of the human MUC2 mucin forms dimers in Chinese-hamster ovary cells and heterodimers with full-length MUC2 in LS 174T cells. *Biochem J.* 372:335-345.
- Liu, C., Q. Li, X. Zhou, V.P. Kolosov, and J.M. Perelman. 2013. Human airway trypsin-like protease induces mucin5AC hypersecretion via a protease-activated receptor 2-mediated pathway in human airway epithelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 535:234-240.
- Martin, T.F. 2002. Prime movers of synaptic vesicle exocytosis. *Neuron.* 34:9-12.
- McGuckin, M.A., S.K. Linden, P. Sutton, and T.H. Florin. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 9:265-278.
- Nataro, J.P., Y. Deng, S. Cookson, A. Cravioto, S.J. Savarino, L.D. Guers, M.M. Levine, and C.O. Tacket. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 171:465-468.
- Nataro, J.P., Y. Deng, D.R. Maneval, A.L. German, W.C. Martin, and M.M. Levine. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli*

- mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun.* 60:2297-2304.
- Nataro, J.P., and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11:142-201.
- Nataro, J.P., J.B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. Vial, and M.M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.* 6:829-831.
- Navarro-Garcia, F., C. Eslava, J.M. Villaseca, R. Lopez-Revilla, J.R. Czczulin, S. Srinivas, J.P. Nataro, and A. Cravioto. 1998. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 66:3149-3154.
- Navarro-García, F., J. Gutierrez-Jimenez, C. Garcia-Tovar, L.A. Castro, H. Salazar-Gonzalez, and V. Cordova. 2010. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun.* 78:4101-4109.
- Okeke, I.N., O. Ojo, A. Lamikanra, and J.B. Kaper. 2003. Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol.* 41:4525-4530.
- Oliveira-Giacomelli, A., Y. Naaldijk, L. Sarda-Arroyo, M.C.B. Goncalves, J. Correa-Velloso, M.M. Pillat, H.D.N. de Souza, and H. Ulrich. 2018. Purinergic Receptors in Neurological Diseases With Motor Symptoms: Targets for Therapy. *Front Pharmacol.* 9:325.
- Park, J.A., F. He, L.D. Martin, Y. Li, B.N. Chorley, and K.B. Adler. 2005. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C $\{\delta\}$ -mediated mechanism. *Am J Pathol.* 167:651-661.
- Pigny, P., V. Guyonnet-Duperat, A.S. Hill, W.S. Pratt, S. Galiegue-Zouitina, M.C. d'Hooge, A. Laine, I. Van-Seuningen, P. Degand, J.R. Gum, Y.S. Kim, D.M. Swallow, J.P. Aubert, and N. Porchet. 1996. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics.* 38:340-352.
- Rios, J.D., M.A. Shatos, H. Urashima, and D.A. Dartt. 2008. Effect of OPC-12759 on EGF receptor activation, p44/p42 MAPK activity, and secretion in conjunctival goblet cells. *Exp Eye Res.* 86:629-636.
- Rothmeier, A.S., and W. Ruf. 2012. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol.* 34:133-149.
- Ruiz-Pérez, F., R. Wahid, C.S. Faherty, K. Kolappaswamy, L. Rodriguez, A. Santiago, E. Murphy, A. Cross, M.B. Sztein, and J.P. Nataro. 2011. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:12881-12886.
- Sanchez-Villamil, J., G. Tapia-Pastrana, and F. Navarro-Garcia. 2016. Pathogenic Lifestyles of *E. coli* Pathotypes in a Standardized Epithelial Cell Model Influence Inflammatory Signaling Pathways and Cytokines Secretion. *Front Cell Infect Microbiol.* 6:120.

- Schmidlin, F., and N.W. Bunnett. 2001. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Curr Opin Pharmacol.* 1:575-582.
- Shao, M.X., and J.A. Nadel. 2005. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol.* 175:4009-4016.
- Smirnova, M.G., J.P. Birchall, and J.P. Pearson. 2000. TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model. *Cytokine.* 12:1732-1736.
- Steiner, T.S., J.P. Nataro, C.E. Poteet-Smith, J.A. Smith, and R.L. Guerrant. 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest.* 105:1769-1777.
- Takeyama, K., K. Dabbagh, J. Jeong Shim, T. Dao-Pick, I.F. Ueki, and J.A. Nadel. 2000. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol.* 164:1546-1552.
- Takeyama, K., K. Dabbagh, H.M. Lee, C. Agusti, J.A. Lausier, I.F. Ueki, K.M. Grattan, and J.A. Nadel. 1999. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3081-3086.
- Tran, T.D., J.M. Gimble, and H. Cheng. 2016. Vasopressin-induced Ca<sup>(2+)</sup> signals in human adipose-derived stem cells. *Cell Calcium.* 59:135-139.
- Urban, J.F., Jr., N. Noben-Trauth, D.D. Donaldson, K.B. Madden, S.C. Morris, M. Collins, and F.D. Finkelman. 1998. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity.* 8:255-264.
- van der Post, S., D.B. Subramani, M. Backstrom, M.E. Johansson, M.B. Vester-Christensen, U. Mandel, E.P. Bennett, H. Clausen, G. Dahlen, A. Sroka, J. Potempa, and G.C. Hansson. 2013. Site-specific O-glycosylation on the MUC2 mucin protein inhibits cleavage by the *Porphyromonas gingivalis* secreted cysteine protease (RgpB). *J Biol Chem.* 288:14636-14646.
- van Klinken, B.J., A.W. Einerhand, H.A. Buller, and J. Dekker. 1998. The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins. *Glycobiology.* 8:67-75.
- Vial, P.A., R. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J.B. Kaper, J.P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M.M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis.* 158:70-79.
- Warren, C. M., et al. (2003). "Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins." *Electrophoresis* 24(11): 1695-1702
- Yamamoto, T., and P. Echeverria. 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun.* 64:1441-1445.
- Yang, L.J., C.J. Jeng, H.N. Kung, C.C. Chang, A.G. Wang, G.Y. Chau, M.J. Don, and Y.P. Chau. 2005. Tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* elicits the cell death of human endothelial cells. *J Biomed Sci.* 12:347-361.

- Yasuda-Onozawa, Y., O. Handa, Y. Naito, C. Ushiroda, Y. Suyama, Y. Toyokawa, T. Murakami, T. Yasuda, T. Ueda, A. Majima, Y. Hotta, T. Doi, M. Tanaka, Y. Horii, Y. Higashimura, K. Mizushima, M. Morita, Y. Uehara, H. Horie, A. Fukui, O. Dohi, T. Okayama, N. Yoshida, K. Kamada, K. Katada, K. Uchiyama, T. Ishikawa, T. Takagi, H. Konishi, and Y. Itoh. 2017. Rebamipide upregulates mucin secretion of intestinal goblet cells via Akt phosphorylation. *Mol Med Rep.* 16:8216-8222.
- Yu, H., X. Zhou, S. Wen, and Q. Xiao. 2012. Flagellin/TLR5 responses induce mucus hypersecretion by activating EGFR via an epithelial cell signaling cascades. *Exp Cell Res.* 318:723-731.