



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

UNIDAD DE ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE PIC  
*ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA EN  
CÉLULAS CALICIFORMES MEDIANTE ENSAYOS  
*IN SILICO* E *IN VITRO*”**

**TESIS**

que presenta

LBT. MONTSERRAT GUTIÉRREZ SOTO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD  
DE BIOLOGÍA CELULAR

Ciudad de México

Julio, 2023

**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 FEDERICO BERNARDO CASTRO MUÑOZ LEDO**

Investigador titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Emiliano Fernando Navarro García. Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de maestría, No. 1074762.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por el cariño, consejos y amor incondicional que siempre está presente en mi vida a pesar de la distancia. Este logro no se hubiera cumplido sin su apoyo en cada etapa de mi desarrollo personal y profesional. Este logro se los debo enteramente a ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por brindarme el apoyo y el amor incondicional para poder cumplir mis metas personales y académicas. Gracias por siempre impulsarme a perseguir mis sueños, nada es inalcanzable teniéndolos a ustedes a mi lado.

A mi abuela Gloria, gracias por apoyarme y estar conmigo tantos años, te extraño demasiado, pero me enseñaste tanto que ahora sé que vives a través de mí.

A mi tutor, Dr. Fernando Navarro García, gracias por paciencia, sus enseñanzas y todos sus consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional.

A mis asesores, la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y el Dr. Federico Castro Ledo, por su invaluable apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por su tiempo y sus correcciones para mejorar este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Landy, Jaime, Arturo y Yaniel, por su enseñanza y experiencia para mejorar mis experimentos, los momentos y las risas que compartimos, gracias por hacer mi estancia en el laboratorio muy amena.

A mis amigos, Aylin Pérez, David Sánchez, Alexis Sotelo, Ricardo Buendía, Ana Martínez, Ruth Vela y Theresa Azcarraga, muchas gracias por todos los momentos que hemos compartido, la vida es más linda a su lado. Gracias por todos sus consejos y su amistad.

A la M. en C. Lucía Chávez Dueñas y la M. en C. Jazmín Huerta Cantillo, por su apoyo, su asesoría durante el desarrollo de este proyecto y su apreciable amistad. Al Sr. Israel Flores Trejo, por su apoyo técnico en el laboratorio.

# INDICE

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS.....   | viii |
| LISTA DE TABLAS .....   | ix   |
| ABREVIATURAS.....   | xi   |
| RESUMEN .....   | xiii |
| INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....   | 1    |
| Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal) .....  | 2    |
| Mucinas .....   | 3    |
| Células caliciformes .....  | 4    |
| Ensamblaje de MUC2 en las células caliciformes .....  | 5    |
| Secreción de mucinas .....  | 6    |
| Receptor de adenosina A1 .....  | 7    |
| Receptor 2 del péptido formilo/ Receptor de la lipoxina A4 .....  | 8    |
| Receptor purinérgico P2Y2.....  | 8    |
| Receptor activado por proteasa 2.....   | 9    |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 10   |
| OBJETIVOS.....  | 11   |
| Objetivo general: .....   | 11   |
| Objetivos específicos:.....   | 11   |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 11   |
| Modelo de estructura .....  | 11   |
| Identificación de los subdominios de DP Pic.....  | 11   |
| Análisis de validación de moléculas para el acoplamiento molecular .....                                  | 11   |
| Acoplamiento molecular .....  | 12   |
| Cepas bacterianas .....   | 12   |
| Construcción de pTrcHis2B:: <i>pic</i> $\Delta$ d1 y pTrcHis2B:: <i>pic</i> $\Delta$ d2 .....             | 12   |
| Obtención de células competentes por el método de CaCl <sub>2</sub> .....                                 | 12   |
| Transformación de bacterias HB101 competentes con el plásmido<br>pTrcHis2B:: <i>pic</i> $\Delta$ d1 ..... | 13   |

|  |           |
|--|-----------|
| Purificación de PicΔd1 .....   | 13        |
| Secuenciación de <i>picΔd1</i> .....   | 14        |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>14</b> |
| Modelado tridimensional del DP Pic en Phyre <sup>2</sup> .....   | 14        |
| Análisis de la estructura tridimensional de DP Pic .....   | 14        |
| Acoplamiento molecular .....   | 16        |
| Acoplamiento molecular del receptor A1R y DP Pic.....  | 16        |
| Acoplamiento molecular del receptor ALX/FPR2 y DP Pic.....   | 23        |
| Acoplamiento molecular del receptor PAR2 y DP Pic .....  | 29        |
| Acoplamiento molecular del receptor P2Y2R y DP Pic .....   | 34        |
| Acoplamiento molecular del EGFR Y DP Pic.....  | 40        |
| Identificación del <i>pocket</i> del receptor que se une a Pic .....   | 45        |
| Construcción de pTrcHis2B:: <i>picΔd1</i> .....  | 47        |
| Secreción de Pic y PicΔd1 .....  | 49        |
| Secuenciación de <i>picΔd1</i> .....   | 51        |
| Secreción de Pic y PicΔd1 .....  | 54        |
| Secuenciación de <i>picΔd1</i> .....   | 54        |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>57</b> |
| Modelaje de DP Pic muestra 4 subdominios anclados a una β-hélice estructural.<br>.....                             | 57        |
| Acoplamiento molecular de los subdominios de DP Pic. ....  | 58        |
| Los <i>pockets</i> de unión de PAR2 con ambos ligandos (8UN y el subdominio d1)<br>son muy similares entre sí..... | 62        |
| Delección del subdominio d1 de DP Pic.....   | 63        |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>66</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>68</b> |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ensamblaje de la mucina MUC2 en la célula caliciforme .**¡Error! Marcador no definido.**

**Figura 2.** Estructura tridimensional del dominio pasajero de Pic y su representación esquemática ..... 15

**Figura 3.** Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor A1R y su ligando DU1 o d1 ..... 22

**Figura 4.** Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor ALX/FPR2 y su ligando WKYMV o d2..... 28

**Figura 5.** Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor PAR2 y su ligando 8UN o d1 ..... 33

**Figura 6.** Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor P2Y2R y su ligando UTP o d2..... 39

**Figura 7.** Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor EGFR y su ligando EGF o d2 ..... 44

**Figura 8.** Comparación del bolsillo (pocket) de unión de PAR2 en su acoplamiento con 8UN o d1 ..... 46

**Figura 9.** Amplificación por PCR del gen *pic* excluyendo el subdominio *d1* del plásmido pTrcHis2B::*pic*-AvrII usando un gradiente de temperatura..... 47

**Figura 10.** Amplificación del gen *pic* y *pic* $\Delta$ d1 a partir de la cepa *E. coli* HB101 ..... 48

**Figura 11.** Restricción enzimática del gen *pic* y *pic* $\Delta$ d1 a partir de la cepa *E. coli* HB101 ..... 49

**Figura 12.** Expresión y secreción de Pic, y Pic $\Delta$ d1 a partir de las cepas *E. coli* HB101 y BL21 .....**¡Error! Marcador no definido.**

**Figura 13.** Alineamiento de secuencias de nucleótidos de Pic $\Delta$ d1 teórica y Pic $\Delta$ d1 secuenciada ..... 52

**Figura 14.** Amplificación del gen *pic* y *pic* $\Delta$ d1 a partir de la cepa *E. coli* BL21..... 53

**Figura 15.** Expresión y secreción de Pic, y Pic $\Delta$ d1 a partir de las cepas *E. coli* HB101 y BL21 ..... 55

**Figura 16.** Alineamiento de secuencias de nucleótidos de Pic $\Delta$ d1 teórica y Pic $\Delta$ d1



secuenciada .....¡Error! Marcador no definido.

## LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos utilizados en este estudio. ....  | 12 |
| <b>Tabla 2.</b> Receptores candidatos ocupados para los acoplamientos moleculares con DP Pic. ....                       | 16 |
| <b>Tabla 3.</b> Acoplamientos moleculares de A1R y DU1/DP Pic. ....  | 18 |
| <b>Tabla 4.</b> Acoplamientos moleculares de A1R y los subdominios del DP Pic. ....                                      | 19 |
| <b>Tabla 5.</b> Acoplamientos moleculares de A1R y $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice.....                               | 20 |
| <b>Tabla 6.</b> Acoplamientos moleculares de A1R y $d1/\beta$ -hélice1.....  | 21 |
| <b>Tabla 7.</b> Acoplamiento molecular del receptor ALX/FPR2 y WKYMV/DP Pic.....   | 24 |
| <b>Tabla 8.</b> Acoplamientos moleculares del receptor ALX/FPR2 y subdominios del DP Pic. ....                           | 25 |
| <b>Tabla 9.</b> Acoplamientos moleculares del receptor ALX/FPR2 y las $\beta$ -hélice/ $\alpha$ -hélice del DP Pic. .... | 26 |
| <b>Tabla 10.</b> Acoplamientos moleculares de ALX/FPR2 y el conjunto de $d2$ - $\beta$ -hélice2 del DP Pic. ....         | 27 |
| <b>Tabla 11.</b> Acoplamientos moleculares de P2Y2R y UTP/DP Pic. ....   | 35 |
| <b>Tabla 12.</b> Acoplamientos moleculares de P2Y2R y los subdominios de DP Pic.....                                     | 36 |
| <b>Tabla 13.</b> Acoplamientos moleculares de P2Y2R y las $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice.....                        | 37 |
| <b>Tabla 14.</b> Acoplamientos moleculares de P2Y2R y los conjuntos de D2- $\beta$ -hélice1/D2- $\beta$ -hélice2.....    | 38 |
| <b>Tabla 15.</b> Acoplamientos moleculares de PAR2 y 8UN/DP Pic. ....  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 16.</b> Acoplamiento molecular de PAR2 y subdominios de DP Pic. ....   | 30 |
| <b>Tabla 17.</b> Acoplamiento molecular de PAR2 y las $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice de DP Pic.....                 | 31 |
| <b>Tabla 18.</b> Acoplamiento molecular de PAR2 y conjunto de d1- $\beta$ -hélice1. ....                                | 32 |
| <b>Tabla 19.</b> Acoplamiento molecular de EGFR y EGF/DP Pic. ....  | 41 |
| <b>Tabla 20.</b> Acoplamiento molecular de EGFR y los subdominios de DP Pic.....  | 43 |
| <b>Tabla 21.</b> Distancias intermoleculares del bolsillo de unión de PAR2 y los ligandos (8UN y el subdominio d1)..... | 45 |

## ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| °C                | Grados centígrados                                 |
| µg                | Microgramo   |
| µl                | Microlitro   |
| ADN               | Ácido desoxirribonucleico                          |
| ARN               | Ácido ribonucleico                                 |
| Amp               | Ampicilina   |
| CaCl <sub>2</sub> | Cloruro de calcio                                  |
| A1R               | Receptor de adenosina A1                           |
| AAF               | Fimbria de Adherencia agregativa                   |
| ALX/FPR2          | Receptor 2 del péptido/ Receptor de la lipoxina A4 |
| ATP               | Trifosfato de adenosina                            |
| BSA               | Albúmina sérica bovina                             |
| g                 | Gravedades   |
| HRP               | Peroxidasa de rábano                               |
| PCR               | Reacción en cadena de la polimerasa                |
| ml                | mililitro  |
| MgCl <sub>2</sub> | cloruro de magnesio                                |
| d1                | subdominio d1                                      |
| d2                | subdominio d2                                      |
| d3                | subdominio d3                                      |
| d4                | subdominio d4                                      |
| DAEC              | <i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa       |
| DAG               | Diacilglicerol                                     |
| DCA               | Ácido desoxicólico                                 |
| DMEM              | Medio Eagle modificado de Dulbecco                 |
| DP                | Dominio pasajero                                   |
| EAEC              | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa           |
| EGF               | Factor de crecimiento epidérmico                   |
| EGFR              | Receptor de factor de crecimiento epidérmico       |
| EHEC              | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica          |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>EIEC</b>           | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva                                       |
| <b>EPEC</b>           | <i>Escherichia coli</i> enteropat6gena                                       |
| <b>FPR</b>            | Receptores de p6ptidos de formilo  |
| <b>GPCR</b>           | Receptores acoplados a prote6nas G   |
| <b>HAT</b>            | Proteasa similar a la tripsina   |
| <b>IP<sub>3</sub></b> | Inositol trifosfato  |
| <b>KDa</b>            | KiloDaltones   |
| <b>LB</b>             | Luria Bertani  |
| <b>MUC</b>            | Mucina   |
| <b>OMS</b>            | Organizaci6n mundial de la salud   |
| <b>P2Y2R</b>          | Receptor purin6rgico P2Y2  |
| <b>PAGE</b>           | Electroforesis en gel de poliacrilamida                                      |
| <b>PAR</b>            | Receptores activados por proteasas   |
| <b>PAR2</b>           | Receptor activado por proteasa 2   |
| <b>Pb</b>             | Pares de bases   |
| <b>PBS</b>            | Soluci6n amortiguadora salina de fosfatos                                    |
| <b>PBS-Tween</b>      | PBS con Tween20 al 0.05%   |
| <b>PDB</b>            | Protein Data Bank  |
| <b>Pic</b>            | Prote6na involucrada en la colonizaci6n intestinal                           |
| <b>PIP2</b>           | Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato   |
| <b>PLC</b>            | Fosfolipasa C  |
| <b>PMSF</b>           | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  |
| <b>PVDF</b>           | Membrana de difluorido polivinilido P-inmobilon                              |
| <b>RvD1</b>           | Resolvina D1   |
| <b>SPATE</b>          | Ser6n proteasas autrotransportadoras de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> |
| <b>UPEC</b>           | <i>Escherichia coli</i> uropat6gena  |

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteroagrativa (EAEC) está asociada con diarrea aguda en niños y adultos, diarrea persistente en niños y personas con inmunodeficiencias, y es la causante de la diarrea del viajero. Entre los principales factores de virulencia de EAEC se encuentra la proteína autotransportadora Pic, la cual juega un papel importante durante la colonización del epitelio intestinal del hospedero. Recientemente, se demostró que Pic tiene una actividad dual como secretagogo de mucinas en células caliciformes, independiente de su motivo serín proteasa y su actividad como mucinasa dependiente de su motivo serín proteasa. En ese trabajo también se describió el mecanismo molecular para la secreción rápida de mucinas relacionada con la vía PLC/DAG-IP3/Calcio. Sin embargo, hasta ahora se desconoce el receptor de la célula caliciforme que se une a Pic para desencadenar la vía de señalización de PLC. Por ello, consideramos importante determinar cuál es el receptor que desencadena dicha vía de señalización, así como cuál es la secuencia motivo en Pic que reconoce dicho receptor. Para hacerlo, primero hicimos un análisis *in silico* en el que realizamos el modelaje tridimensional del dominio pasajero (DP) de Pic, para posteriormente, hacer acoplamiento molecular con los receptores candidatos (A1R, ALX/FPR2, P2Y2R, PAR2 y EGFR) que se unieran al DP Pic y así, también saber en qué motivos de la secuencia de DP Pic es donde se unen dichos receptores. Las interacciones moleculares que encontramos fueron: A1R y PAR2 con el subdominio d1 mientras que ALX/FPR2, P2Y2R y EGFR interactúan con el subdominio d2 de Pic. Entre todos los acoplamientos, identificamos que el que tenía mayor afinidad en la interacción fue el receptor PAR2 con el subdominio d1 presentando una energía de afinidad de  $-8.8$  kcal/mol y su  $K_d$  de  $3.6 \times 10^{-7}$ . Con estos resultados, procedimos a construir una mutante de Pic, deletando el subdominio d1 del DP Pic (Pic $\Delta$ d1) mediante una PCR inversa. Esta mutante tiene 3,310 pares de bases de longitud, y la proteína Pic $\Delta$ d1 secretada tiene un peso molecular de 82.6 kDa. Los análisis bioinformáticos nos indican que el mejor receptor candidato que se une a DP Pic para la secreción rápida de mucinas es PAR2. La construcción pTrcHis2B::pic $\Delta$ d1 y los ensayos *in silico* realizados en este proyecto servirán para identificar el receptor que se une a DP Pic para desencadenar la vía de señalización de secreción rápida de mucinas.

## SUMMARY

Enteroaggregative *Escherichia coli* is associated with acute diarrhea in children, persistent diarrhea in children and immunodeficient persons, and traveler's diarrhea. Among its main virulence factors is an autotransporter protein termed Pic, which plays a key role during the colonization of the host intestinal epithelium. Recently, it was reported that Pic has dual activity as a mucin secretagogue in goblet cells, independent of its serine protease motif, and as a mucinase, which is dependent on this motif. In that work was also described that the molecular mechanism for the rapid secretion of mucins is related to the PLC/DAG-IP3/Calcium pathway. However, the goblet cell receptor that binds to Pic to trigger the PLC signaling pathway is so far unknown. Therefore, we consider to determine which is the receptor that triggers this signaling pathway, as well as the motif sequence in Pic that recognizes this receptor. To determine this, we first carried out an *in silico* analysis in which we performed three-dimensional modeling of the passenger domain (PD) of Pic, to subsequently perform molecular dockings with the candidate receptors (A1R, ALX/FPR2, P2Y2R, PAR2, and EGFR) that bind to the PD Pic. and thus, also know which motifs of the PD Pic sequence are bound to these receptors. We found that the probable molecular interactions interacted were: with A1R and PAR2 at the d1 subdomain, while ALX/FPR2, P2Y2R and EGFR interacted with the d2 subdomain. Within all the molecular dockings, we identified that the one with the highest affinity of interaction was the PAR2 receptor with the d1 subdomain presenting an affinity energy of  $-8.8$  kcal/mol and its  $K_d$  of  $3.6 \times 10^{-7}$ . With these results, we proceeded to construct a Pic mutant, deleting the d1 subdomain of PD Pic (Pic $\Delta$ d1) by inverse PCR. This mutant has 3,310 base pairs in length and the secreted Pic $\Delta$ d1 protein has a molecular weight of 82.6 kDa. The bioinformatic analysis indicates that the best candidate receptor that binds DP Pic for rapid mucin secretion is PAR2. The pTrcHis2B::*pic* $\Delta$ d1 construct and the *in silico* assays performed in this project will serve to identify the receptor that binds to DP Pic to trigger the rapid mucin secretion signaling pathway.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas son de gran importancia, debido a que son la primera causa de muerte producida en niños menores de cinco años, ocasionando 1 millón de muertes cada año según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Perin et al., 2022). La diarrea infecciosa se adquiere predominantemente por vía fecal-oral y por la ingestión de agua y alimentos contaminados con microorganismos patógenos. Entre los agentes infecciosos asociados a la enfermedad diarreica se encuentran los rotavirus, protozoos y las cepas diarrogénicas de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Aranda-Michel and Giannella, 1999).

La bacteria *E. coli* es un anaerobio facultativo predominante en la microbiota colónica humana. Entre estas bacterias, existen diferentes patotipos que causan diarrea, entre las cuales se encuentran: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro and Kaper, 1998).

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

EAEC es una causa común de enfermedad diarreica en todo el mundo y se transmite principalmente por la ingesta de bebidas y/o alimentos contaminados, y se asocia frecuentemente con casos de diarrea persistente en niños de países en desarrollo e industrializados, así como con la diarrea del turista, siendo la segunda causa de muerte en viajeros (Adachi et al., 2002; Liu et al., 2020). Se cree que la patogenia ocurre en el íleon y el colon, donde las bacterias se adhieren y forman una biopelícula de agregación robusta (Liu et al., 2020). 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 (Huang et al., 2006).

El modelo de patogenicidad para EAEC consta de tres etapas. La primera etapa implica la adhesión de microorganismos a la mucosa intestinal mediante fimbrias de adherencia agregativa (AAF); así EAEC forma agregados asemejando “ladrillos

apilados”, constituyendo una biopelícula con el moco secretado por las células caliciformes. Durante la segunda etapa, hay hipersecreción de moco intestinal, manteniendo a los microorganismos inmersos en una matriz de gel que favorece la colonización persistente. Finalmente, la tercera etapa implica la secreción de proteínas y toxinas con actividades enterotóxicas/citotóxicas que provocan alteraciones histopatológicas (Kaper et al., 2004).

Entre los múltiples factores de virulencia producidos por EAEC, la serín proteasa Pic se ha implicado en la colonización bacteriana en virtud de su actividad mucinolítica.

### **Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal)**

La proteína involucrada en la colonización (Pic) está codificada en el cromosoma de EAEC y pertenece a la subfamilia llamada serín proteasas autotransportadoras de la familia *Enterobacteriaceae* (SPATE) (Henderson et al., 1999). Además, el gen *pic* contiene dos genes orientados de manera opuesta en tándem dentro del gen *pic*, denominado gen *she*. Este gen codifica las dos subunidades, set1B y set1A, de la toxina ShET1 (Behrens et al., 2002).

Al ser miembro de las SPATE, Pic tiene 3 dominios ya establecidos: la secuencia señal, el dominio pasajero y la unidad de translocación, y estos, están relacionados en la secreción de la proteína misma. La secuencia señal permite el reconocimiento del sistema sec para la translocación de la proteína al periplasma. Una vez en el periplasma, la unidad de translocación forma un poro barril que se inserta en la membrana externa de la bacteria, a través del cual se secreta el dominio pasajero de Pic (DP Pic). La proteína Pic secretada tiene un peso molecular de 116 KDa (Navarro-Garcia and Elias, 2011).

Navarro-Garcia et al. (2010) analizaron el papel biológico de Pic en un ensayo *in vivo* utilizando el modelo de íleon del intestino de rata que ha sido útil para caracterizar las lesiones histopatológicas causadas por EAEC 042. Se observó que al inocular la bacteria EAEC al modelo había un aumento en la secreción de mucinas, sin embargo, si se inoculaba EAECΔPic la secreción de mucinas se mantenía en niveles basales. Del mismo modo, ocurría con Pic de *Shigella flexneri* y *E. coli* uropatógena



(UPEC). En otro estudio, Liu et al. (2020) analizaron los roles de Pic durante la infección de EAEC utilizando colonoides humanos (modelo intestinal que comprende células caliciformes y una gruesa barrera de mucina). Ellos demostraron la capacidad de Pic en la degradación de MUC2, pero al agregar PicS258A (mutante con una mutación sitio dirigida para eliminar la función mucinolítica) no existió un decremento de la MUC2, es decir la actividad mucinolítica proviene del dominio serín proteasa.

Recientemente se reportó que Pic, tiene una actividad dual, la primera es su capacidad de secretagogo de moco independiente de su motivo serín proteasa y, la segunda, la actividad mucinolítica dependiente de su motivo serín proteasa en células caliciformes humanas que secretan MUC2 y MUC5AC (Flores-Sanchez et al., 2020). Interesantemente, Pic estimula la secreción rápida de mucinas en las células caliciformes al activar la vía de calcio intracelular. La hipersecreción de mucinas en células caliciformes se produce por la activación de la vía de señalización del calcio (Davis and Dickey, 2008). Cuando se activa la vía de calcio intracelular tiene como resultado la activación de la señal de transducción de fosfolipasa C (PLC). La PLC cataliza la conversión de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) produciendo segundos mensajeros como el DAG y el IP3. El IP3 es el mayor mediador en la liberación de calcio intracelular (Tran et al., 2016). 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 es la penetración de la capa de moco lo que permite que EAEC tenga acceso a las células epiteliales (Flores-Sanchez et al., 2020).

## **Mucinas**

Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas que se caracterizan por su gran peso molecular y su capacidad para formar geles viscoelásticos (Corfield et al., 2001). Su composición química tiende a ser mayoritariamente carbohidratos (mayor del 80%) y se concentran en dominios denominados MUC (mucina). Estos dominios se construyen sobre un núcleo proteico de una secuencia de repetición en tándem conformado por los aminoácidos prolina, serina y treonina (llamadas secuencias PTS) (Johansson, 2013). Además, las mucinas contienen múltiples dominios como los dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), regiones ricas en cisteína y los dominios D localizados en

el amino y carboxilo-terminal que ayudan en la formación del polímero, (Kufe, 2009).

Diferentes tipos de células pueden expresar a las mucinas que se encuentran en contacto con ambientes agresivos, 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 clasificación de las mucinas se divide 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 dominios homólogos a EGF. La liberación de la mucina de membrana al medio extracelular provoca que la mucina 12 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). Las mucinas secretadas (MUC2, 5AC, 5B, 6) están agrupadas en el cromosoma 11p15.5. MUC2, MUC5AC y MUC6 muestran una expresión importante en el epitelio de todo el tracto con MUC5AC y MUC6 en el estómago y MUC2 en el intestino delgado y grueso. MUC5B muestra una expresión importante en glándulas salivales y glándulas esofágicas, pero niveles menores en epitelio gástrico y colorrectal (Corfield et al., 2001).

### **Células caliciformes**

Las células caliciformes están especializadas en la síntesis y secreción de mucinas. Adquirieron su nombre por su típica apariencia de copa formada por los gránulos de mucina que llenan el citoplasma. Los ratones que carecen de MUC2 tienen el mismo número de células caliciformes, pero estas no tienen la forma típica de las células caliciformes (Hollingsworth and Swanson, 2004).

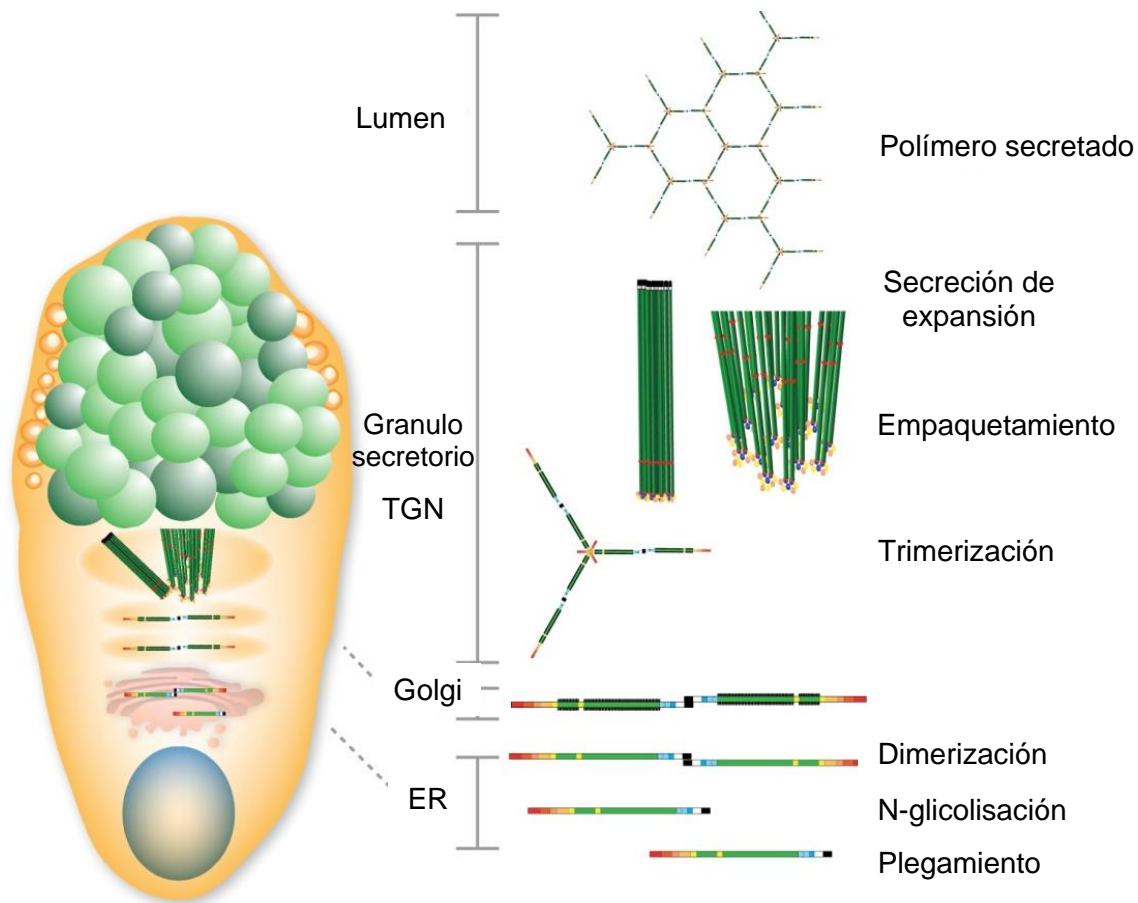
Las células troncales dan origen a todas las células epiteliales intestinales, incluidos los enterocitos, células caliciformes, células de Paneth y células enteroendocrinas. El linaje de enterocitos es el linaje celular primario y su vía de diferenciación está controlada por la señalización de Notch (Birchenough et al., 2015). Al igual que el epitelio de la superficie intestinal, las células caliciformes se renuevan continuamente a partir de las células troncales que se encuentran en la base de la cripta

intestinal, su recambio celular ocurre normalmente entre 3 y 7 días (Barker, 2014).

Las células caliciformes de la superficie del colon secretan moco continuamente y, por lo tanto, construyen una capa de moco extensa que recubre las células epiteliales intestinales, cuya función principal es formar una barrera física que las protege de patógenos y materiales insolubles. Esta capa de moco se divide en dos subcapas: la capa interna de moco que está anclada a las células caliciformes y es altamente organizada y estatificada, lo que impide que sea impenetrable para las bacterias. La segunda subcapa de moco es la capa externa, la cual está más expandida debido a que los poros que forman los polímeros de las mucinas son más grandes permitiendo que penetren bacterias comensales y ocupen a las mucinas como fuente de carbono. Al presentarse una patología como la colitis, la capa externa de moco se encuentra en menor volumen permitiendo que las bacterias patógenas penetren la capa interna y así, infectar a las células epiteliales intestinales. Por lo que esta capa de moco funciona como primera línea de defensa del hospedero en el tracto intestinal (Birchenough et al., 2015).

### **Ensamblaje de MUC2 en las células caliciformes**

Las células caliciformes del intestino delgado y grueso secretan principalmente a MUC2. El ensamblaje de la mucina MUC2 comienza en el retículo endoplasmático de la célula caliciforme, donde las mucinas forman homooligómeros mediante la formación de puentes disulfuro entre los dominios D del extremo amino-terminal. Las mucinas MUC2 forman dímeros mediante puentes disulfuro, a través de sus los dominios D4 ubicados en el carboxilo-terminal, además de sufrir N-glicosilaciones. Los dímeros son translocados al aparato de Golgi, donde forman trímeros mediante los dominios D (D1-D3) del amino-terminal que también unidos por puentes disulfuro, además de estar O-glicosilados. Estos trímeros son empacados en los gránulos secretorios y preparados para su secreción (Figura 1) (Birchenough et al., 2015).



**Figura 1. Ensamblaje de la mucina MUC2 en la célula caliciforme.** Las mucinas MUC2 son dimerizadas y N-glicosiladas en el retículo endoplasmático. Los dímeros se translocan al aparato de Golgi para formar trímeros mediante sus dominios D del carboxilo-terminal y O-glicosilados. Los trímeros son empaquetados en los gránulos secretorios. ER, retículo endoplasmático; TGN, red trans-Golgi (Birchenough et al., 2015).

### Secreción de mucinas

La secreción de mucinas es regulada a través de dos procesos celulares: secreción constitutiva y la secreción regulada o rápida. En la secreción constitutiva la célula secreta mucinas al medio a una concentración muy baja y de manera continua y lenta. Para este proceso no se necesita de un estímulo, mientras que, en la secreción regulada o también denominada rápida, se necesita un estímulo como los compuestos denominados secretagogos que transducen una señal para liberar las vesículas que contienen mucinas a través de la activación un receptor de membrana (Davis and Dickey, 2008; Deplancke

and Gaskins, 2001).

La secreción rápida de las mucinas puede ser activada a través del aumento del calcio intracelular, esto bajo la activación de la señal de transducción de PLC, lo cual produce segundos mensajeros como el DAG e IP3. El IP3 libera el calcio intracelular de los reservorios del retículo endoplasmático, mientras que el DAG activa a proteínas del granulo secretorio (Rab3/27, VAMP8 y Syt2) para unirse con proteínas de la membrana plasmática (syntaxina, SNAP23, Munc13-2/4 y Munc18b) y así, permitir que el granulo secretorio se fusione a la membrana plasmática de la célula y permita la liberación de las mucinas (Adler et al., 2013; Flores-Sanchez et al., 2020).

Sin embargo, en el caso de la inducción de la secreción por la Pic, aún no se conoce el receptor de membrana que desencadena la vía de señalización antes mencionada para permitir la secreción rápida de mucinas. Hasta el momento se han reportado dos grandes familias de receptores asociados a dicha secreción: los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y los receptores acoplados a tirosina cinasa, sin embargo, cualquier otro receptor que sea capaz de activar a PLC y a su vez, aumentar el calcio intracelular, son capaces de aumentar la secreción de mucinas.

### **Receptor de adenosina A1**

Los receptores adenosina (AR) son receptores acoplados a proteínas G (GPCR), de ellos se han descrito 4 subtipos: A1R, A2AR, A2BR Y A3R (Fredholm et al., 2011).

En un estudio reciente se reportó que el receptor de adenosina A1 (A1R) a través de la vía de PLC desencadena la liberación de vesículas secretoras de mucinas de células caliciformes. Cuando a estas células se les agregaba su agonista, la adenosina, la secreción de mucinas se ve en aumento; al contrario de cuando se aplicaba un pretratamiento con su antagonista DPCPX a diferentes concentraciones (1  $\mu$ M a 20  $\mu$ M). Por lo tanto, el receptor A1R permite la secreción regulada de mucinas (McNamara et al., 2004).

## **Receptor 2 del péptido formilo/ Receptor de la lipoxina A4**

Los receptores de péptidos de formilo (FPR) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y son bien conocidos como receptores quimiotácticos y receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen péptidos formilados derivados de bacterias y mitocondrias. Existen tres tipos de FPR humanos (FPR1, FPR2 y FPR3) y ocho tipos de FPR murinos (Fpr1, Fpr2, Fpr3, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs5, Fpr-rs6 y Fpr-rs7).

El receptor 2 del péptido formilo/ Receptor de la lipoxina A4 (ALX/FPR2) está involucrado en la secreción rápida de mucinas que sigue la vía de señalización de PLC y la liberación de calcio intracelular de los reservorios del retículo endoplasmático. Lippestad et al. (2017) lo demostraron al agregar el agonista resolvina D1 (RvD1) a las células caliciformes conjuntivales de rata, sin embargo, cuando se hace un pretratamiento con el antagonista BOC2, la secreción de mucinas se ve interrumpida, todo esto analizado mediante microscopía confocal. Por lo tanto, ALX/FPR2 es un receptor que libera las vesículas secretoras mediante un estímulo.

## **Receptor purinérgico P2Y2**

Los receptores purinérgicos P2 (P2Rs) están compuestos por siete miembros del receptor P2X (P2XR, P2X1R-P2X7R) y ocho miembros del receptor P2Y (P2YR; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R, P2Y11R-P2Y14R). Los receptores P2X son canales iónicos activados por ligandos y los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G. Interesantemente, se ha demostrado que el receptor purinérgico P2Y2 (P2Y2R) está involucrado en la liberación de mucina de las glándulas secretoras (Shishikura et al., 2016).

El P2Y2R induce la secreción rápida de mucinas en células caliciformes al utilizar el trifosfato de adenosina (ATP) como secretagogo. Las señales secretoras de mucina fueron estimadas utilizando un ensayo de lectina ligada a enzimas y se observaron señales típicas del 300 al 400% de la línea de base en respuesta a una exposición de 30 min a ATP (100 M). Sin embargo, al utilizar antagonistas competitivos del receptor

P2Y2R como la suramina y AR-C118925XX inhibieron la secreción de mucina inducida por adenosina 5'-o-(3-tiotrifosfato) (ATP-S). Por lo tanto, el receptor P2Y2R está involucrado en la secreción regulada de mucinas.

## **Receptor activado por proteasa 2**

Los receptores activados por proteinasa (PAR) son una familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G, que actualmente consta de cuatro miembros. PAR1, PAR3 y PAR4 son receptores de trombina mientras que PAR2 es un receptor de tripsina, triptasa de mastocitos, factores de coagulación VIIa y Xa, y posiblemente proteasas desconocidas. La activación de PAR se logra mediante el desenmascaramiento proteolítico de la secuencia activadora del receptor crítico N-terminal, que posteriormente, se une al cuerpo del receptor como un ligando anclado (Kawabata, 2002).

El receptor activado por proteasa 2 (PAR2), también pueden activarse específicamente mediante péptidos sintéticos aplicados de forma exógena de cinco a seis aminoácidos (SLIGRL y SLIGKV para PAR2 murino y humano, respectivamente). La vía de señalización común que sigue a la activación de distintos PAR se desencadena por la activación de PLC a través de la proteína Gq/11, aunque cada PAR también puede activar otras vías de transducción de señales distintas (Kawabata, 2003).

PAR2 desempeña un papel en la hipersecreción de mucinas. Esto se demuestra cuando a las células caliciformes se les aplica un tratamiento con la proteasa similar a la tripsina (HAT), agonista de las respuestas celulares inducidas por PAR2, aumentando la secreción de mucinas MUC5AC. Sin embargo, cuando se aplica un pretratamiento con el inhibidor del receptor, el inhibidor de PLC (U73122) o el quelante de calcio intracelular (BAPTA-AM) atenúa la secreción de mucinas. En conjunto, estos resultados indican que HAT puede estimular la hipersecreción de MUC5AC a través de una vía de señalización mediada por PAR2 (Liu et al., 2013).

## **Receptor factor de crecimiento epidérmico**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) induce la hipersecreción de mucinas en células caliciformes al estimularlo con RvD1, mostrando un aumento en el calcio intracelular. Sin embargo, cuando se utiliza un pretratamiento con un inhibidor de EGFR (AG1478) se bloquea el aumento del calcio intracelular. La vía de señalización que se desencadena para la hipersecreción de mucinas es cruzada mediante el receptor ALX/FPR2 al unirse con su ligando (RvD1), activa la metaloproteasa ADAM17 para liberar al factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF liberado se une al EGFR para activar AKT y ERK 1/2 (Kaye et al., 2019).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*Escherichia coli* enteroagrativa (EAEC) está asociada con diarrea aguda en niños y adultos, diarrea persistente en niños y personas con inmunodeficiencias, y causante de la diarrea del viajero. Entre los principales factores de virulencia de EAEC se encuentra la proteína autotransportadora Pic, la cual juega un papel importante durante la colonización del epitelio intestinal del hospedero. Previamente, nuestro grupo encontró que Pic puede ser el factor que provoca una de las características de la infección por EAEC detectada en biopsias intestinales, la formación de una biopelícula de bacterias inmersas en una capa de moco intestinal.

Recientemente, nuestro grupo de investigación también demostró que Pic tiene una actividad dual como secretagogo de moco en células caliciformes y mucinasa dependiente de su motivo serín proteasa. Además, en este mismo estudio, se dilucidó parte del mecanismo molecular para la secreción rápida de mucinas que incluye una señalización por la vía PLC/IP3-DGA/Calcio (Flores-Sanchez et al., 2020). Sin embargo, hasta ahora se desconoce cuál es el receptor de la célula caliciforme que se une a Pic para desencadenar la vía de señalización de PLC. Por ello, consideramos importante determinar cuál es el receptor que desencadena la vía de señalización para la secreción de mucinas en las células caliciformes al estimularlos con la proteasa Pic, así como cuál es la secuencia motivo en Pic que es reconocida por dicho receptor.



## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Identificar el receptor y la secuencia que reconoce cuando Pic de EAEC se une a las células caliciformes.

### Objetivos específicos:

1. Evaluar los receptores candidatos (P2Y2R, PAR2, A1R, ALX/FPR2 y EGFR) mediante acoplamiento molecular con Pic.
2. Identificar el *pocket* del receptor que se une a Pic.
3. Diseñar mutantes en los motivos detectados en los acoplamiento molecular para evaluar la interacción Pic-célula caliciforme.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Modelo de estructura

Las estructuras tridimensionales de la proteína DP Pic y P2Y2R fueron modeladas utilizando sus secuencias de aminoácidos descritas por Henderson et al. (1999) (No. de acceso: Q7BS42) y Parr et al. (1994) (No. de acceso: P4123) mediante el servidor de predicción de estructuras Phyre 2.0 (Kelley et al., 2015).

### Identificación de los subdominios de DP Pic

Los subdominios del dominio pasajero (DP) de Pic fueron identificados por homología tridimensional mediante la plataforma Dali server (Holm, 2020).

### Análisis de validación de moléculas para el acoplamiento molecular

Los receptores candidatos PAR2 (PDB:5NDZ), ALX/FPR2 (PDB:6LW5), A1R (PDB:5UEN) y EGFR (PDB:1IVO) fueron descargados de la plataforma RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Tanto las moléculas de los receptores como los dominios de DP Pic fueron validados con el servidor MolProbity (Davis et al., 2007).

## Acoplamiento molecular

Los acoplamientos moleculares de cada uno de los receptores con los subdominios de DP Pic fueron realizados con el servidor HDock (Yan et al., 2020) y Prodigy server (Xue et al., 2016).

## Cepas bacterianas

Durante este estudio fueron utilizadas las cepas HB101 pTrcHis2B:*pic* (Flores-Sanchez et al., 2020) y HB101/*ppicS258I* (Navarro-Garcia et al., 2010). Estas cepas fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) toda la noche a 37°C, cuando fue necesario se agregó ampicilina (100 µg/ml) o tetraciclina (15 µg/ml).

## Construcción de pTrcHis2B::*pic*Δ1 y pTrcHis2B::*pic*Δ2

pTrcHis2B::*pic*Δ1 (*Pic*Δ1) fue derivado a partir de pTrcHis2B::*pic* (*Pic*) obteniéndolo mediante una PCR usando los oligonucleótidos *Pic*Δ1F y *Pic*Δ1R descritos en la Tabla 1, ambos *primers* contienen sitios *AvrII* para permitir la circularización del plásmido. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron purificados utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania). Estos productos de PCR purificados se cortaron con la enzima de restricción *AvrII* para finalmente ser ligados con la ligasa T4.

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

| Oligos                  | Secuencia  |
|-------------------------|--|
| <b>PicΔ1F</b>           | 5'- CGT GCC TAG GAC TAG TCT GAA CTG GAC ATA CGA CAA-3'         |
| <b>PicΔ1R</b>           | 5'- GCA CCC TAG GAG ATC TAA TAC CCG CCT GGG ATA TCT-3'         |
| <b>PicΔ2F</b>           | 5'- GTG CCC TAG GAC TAG TAT CTT TCA TGG TCA GCT GAC-3'         |
| <b>PicΔ2R</b>           | 5'- CCG ACC TAG GAG ATC TAT CCA GTA AAA GCT GGG ATT-3'         |
| <b><i>picpTrcF</i></b>  | 5'- CCG CTC GAG CAT GAA TAA AGT TTA TTC TCT TAA ATA TTG CC -3' |
| <b><i>picpTrc-R</i></b> | 5'- CCG GAA TTC TCA GAA CAT ATA CCG GAA ATT CGC GTT -3'        |
| <b><i>pTrcHis2B</i></b> | 5'- GAG GTA TAT ATT AAT GTA TCG -3'                            |

## Obtención de células competentes por el método de CaCl<sub>2</sub>

La cepa HB101 fue inoculada en 3 ml de medio LB durante 16 h a 37°C/160 rpm. A partir de este cultivo, se utilizaron 4 ml para inocular un matraz con 100 ml de medio LB y se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.<sub>600 nm</sub>) entre 0.6 y 0.8. Al alcanzar la D.O. deseada, el cultivo fue centrifugado a 2,350 × *g* durante 15

minutos a 4°C. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 4 ml de MgCl<sub>2</sub> 0.1 M y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado como se describió anteriormente, el paquete celular fue resuspendido en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y fue incubado en hielo durante 1 hora. las bacterias fueron centrifugadas nuevamente y resuspendidas en 4 ml de CaCl<sub>2</sub>. Las células competentes, se distribuyeron en alícuotas de 100 µl, en tubos Eppendorf de 0.6 ml. Para conservar las bacterias competentes, agregar 20% de glicerol estéril y almacenar a -70°C.

### **Transformación de bacterias HB101 competentes con el plásmido**

#### **pTrcHis2B::*pic*Δd1**

Las bacterias *E. coli* HB101 competentes se les añadió 5 µl del plásmido pTrcHis2B::*pic*Δd1 y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Pasado los 30 minutos, se colocaron a 42°C durante 1 minuto y rápidamente se regresó a hielo por 10 minutos. Posteriormente, se les agregó 800 µl de medio LB y se dejó incubando a 37°C durante 1 hora. De manera subsecuente, las bacterias se centrifugaron a 1,380 × *g* durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó, la pastilla se resuspendió con 100 µl de medio LB, se plaqueó en medio LB sólido adicionado con ampicilina (100 µg/ml), y se incubó a 37°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, las colonias que crecieron fueron sembradas en parches en una placa de medio LB sólido adicionado con ampicilina (100 µg/ml), para seleccionar las clonas que tienen el plásmido pTrcHis2B::*pic*Δd1. Para verificar que estas clonas contengan los plásmidos antes mencionados, se realizó una PCR a cada una de las clonas con los oligos *pic*-pTrcF y *pic*-pTrc-R descritos en la Tabla 1 y el amplificado fue corrido en un gel de agarosa al 1%.

#### **Purificación de PicΔd1**

Las proteínas Pic y PicΔd1 fueron purificadas como se reportó anteriormente (Navarro-Garcia et al., 2010). Brevemente, las clonas mínimas HB101/pTrcHis2B::*pic*Δd1 y HB101/ pTrcHis2B::*pic*Δd2 fueron cultivadas en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, 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 50,000 MWCO (Millipore, Billerica, MA).

### **Secuenciación de *picΔd1***

A partir del ADN plasmídico de *E. coli* HB101/pTrcHis2B::*picΔd1* clona 12 se realizó una PCR utilizando el oligo *pTrcHis2B* y el kit de secuenciación de ciclos BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Posteriormente, el producto de PCR fue purificado con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN plasmídico purificado se pasó a una columna y ésta fue centrifugada a  $1,380 \times g$  durante 3 minutos. La columna se secó durante 15 minutos en el spit back. Finalmente, se secuenció con ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

## **RESULTADOS**

### **Modelado tridimensional del DP Pic en Phyre<sup>2</sup>**

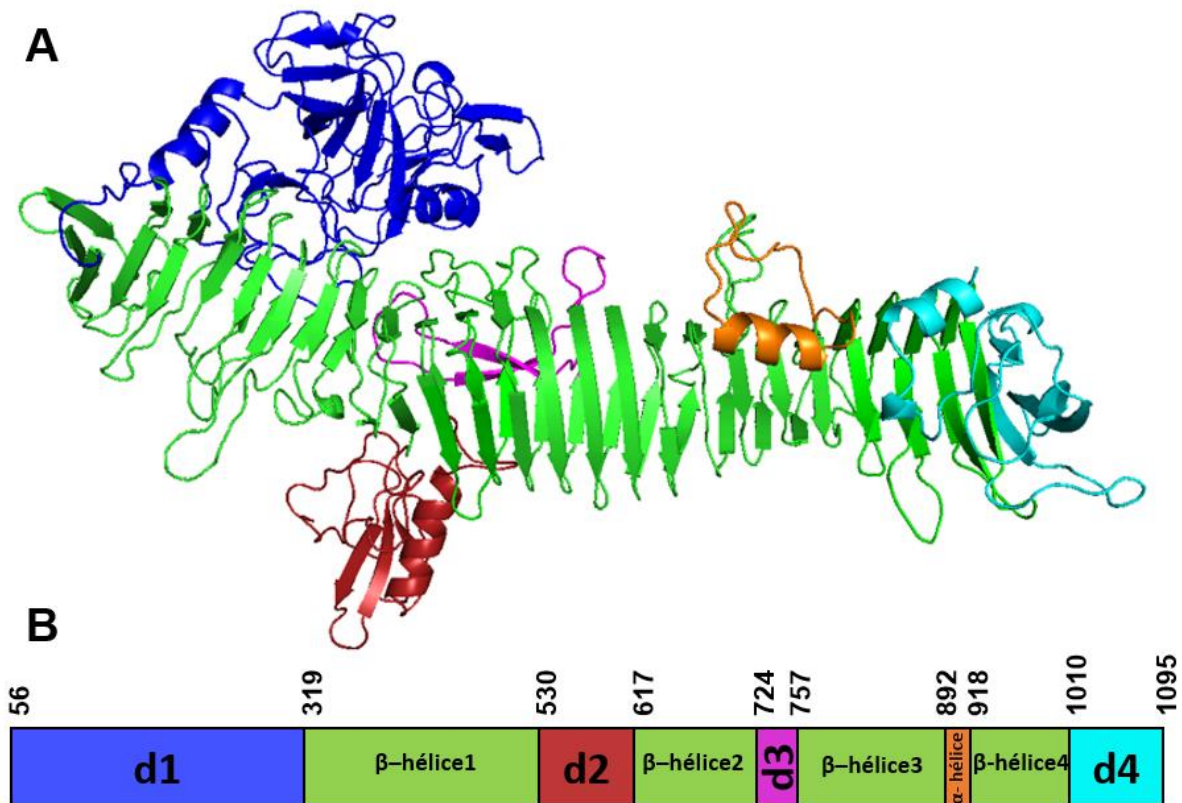
La proteasa Pic de EAEC aún no ha sido cristalizada, por lo cual realizar el modelo tridimensional fue esencial para evaluar la interacción molecular de Pic con los receptores candidatos, *in silico*. El modelo fue generado a partir de la secuencia de Pic reportada por Henderson et al. (1999), seleccionamos únicamente la secuencia del dominio pasajero (DP) de Pic (residuos 56 al 1095) y posteriormente, modelamos mediante la herramienta de biología computacional, Phyre<sup>2</sup>, disponible en el dominio público para predecir estructuras tridimensionales y análisis funcionales adicionales. El templado seleccionado fue la estructura cristalizada de la proteína A extracelular (SepA) de *Shigella flexneri* (PDB:5J44) con una índice identidad del 86%.

El modelo tridimensional de DP Pic (Figura 2) comprende 1039 aminoácidos, en su amino terminal se encuentra el subdominio 1 (d1) (residuos 56-318), seguido de una  $\beta$ -hélice estructural (residuos 319-1009) interrumpida por estructuras globulares que corresponden al subdominio 2 (d2) (residuos 530-616), subdominio 3 (d3) (residuos 724-756),  $\alpha$ -hélice (residuos 892-917) y, por último, en su carboxilo terminal, el subdominio 4 (d4) (residuos 1010-1095).

### **Análisis de la estructura tridimensional de DP Pic**

Con la finalidad de identificar las actividades efectoras de los subdominios del DP Pic,

procedimos a hacer un análisis comparativo con los dominios de otras proteínas reportadas en RCSB PDB mediante la plataforma DALI server. Como resultado obtuvimos que el subdominio d1 de DP Pic tiene similitud estructural con la tripsina (PDB:1CE5) mientras que el dominio 2 fue estructuralmente similar a la quitinasa (PDB:7C92) y finalmente, el dominio 4 fue similar al dominio autochaperona. Sin embargo, al dominio 3 no se le encontró similitud estructural con dominios de otras proteínas reportadas.



**Figura 2. Estructura tridimensional del dominio pasajero de Pic y su representación esquemática. (A).** Modelo tridimensional del DP Pic nativo. Este modelo fue generado utilizando la predicción de la estructura en Phyre<sup>2</sup> y fue basado en la secuencia identificada por Henderson et. al., 1999. **(B).** Dentro del DP Pic (residuos 56 a 1095) y proyectándose de la  $\beta$ -hélice (verde) se pueden identificar cuatro subdominios. Subdominio 1 (d1, azul), subdominio 2 (d2, rojo), subdominio 3 (d3, magenta),  $\alpha$ -hélice (naranja) y subdominio 4 (d4, cyan) como se indican en la representación esquemática.

## Acoplamiento molecular

Con la finalidad de realizar los acoplamiento molecular, primero realizamos una revisión bibliográfica para seleccionar los receptores candidatos que activan la vía de señalización de PLC (Tabla 2), que podrían estar involucrada en la secreción de mucinas inducidas por Pic. A partir de estas estructuras, obtuvimos también los ligandos que sirvieron como control en los acoplamiento molecular con DP Pic.

**Tabla 2. Receptores candidatos ocupados para los acoplamiento molecular con DP Pic.**

| Receptor  | PDB                            | Referencias                         |
|---|--------------------------------|-------------------------------------|
| Receptor de adenosina A1 (A1R)  | 5UEN                           | (Glukhova et al., 2017)             |
| Receptor activado por proteasa 2 (PAR2)                               | 5NDZ                           | (Cheng et al., 2017)                |
| Receptor 2 del péptido formilo/ Receptor de la lipoxina A4 (ALX/FPR2) | 6LW5                           | (Chen et al., 2020)                 |
| Receptor purinérgico P2Y2 (P2Y2R)                                     | Modelado en Phyre <sup>2</sup> | En este trabajo (Parr et al., 1994) |
| Receptor factor de crecimiento epidérmico (EGFR)                      | 1IVO                           | (Ogiso et al., 2002)                |

Los acoplamiento molecular se hicieron con 2 plataformas: HDock server, plataforma en línea que nos predice los aminoácidos que se unen tanto del receptor como del ligando y Prodigy server, plataforma en línea que nos indica la energía de afinidad del acoplamiento y la constante de disociación; ambos valores nos reportan si el acoplamiento molecular puede ser espontáneo.

### Acoplamiento molecular del receptor A1R y DP Pic

El primer acoplamiento que hicimos fue la interacción molecular del receptor A1R y su ligando (DU1), debido a que Glukhova et al. (2017) reportaron cuáles son los aminoácidos de este receptor que se unen con DU1. Así, utilizamos este acoplamiento como control para las siguientes interacciones de A1R con el DP Pic y con cada uno de sus subdominios y  $\beta$ -hélices.

En el acoplamiento control (A1R y DU1) observamos la interacción del receptor

A1R (gris) y su ligando DU1 (naranja) junto con los aminoácidos de A1R que interaccionan con dicho ligando y que son reportados en la literatura marcados en verde (Figura 3A). Cabe destacar que la interacción fue únicamente en la cadena A del receptor A1R. Al hacer un acercamiento al sitio de interacción (Figura 3B) observamos a todos los aminoácidos presentes en la interacción con DU1, marcados en verde a los que corresponden al mismo aminoácido y en la misma posición con lo ya reportado en la literatura. Por lo tanto, podemos usar este acoplamiento como control para las siguientes interacciones de A1R con DP Pic.

En las siguientes Tablas, optamos por tener el mismo sistema de colores para los aminoácidos identificados, en verde son los aminoácidos del receptor que están en la misma posición reportada en la literatura, mientras que en amarillo están los aminoácidos que están en una posición cercana a lo ya reportado.

En la Tabla 3, reportamos los aminoácidos identificados por HDock server, que podrían participar en las interacciones moleculares del receptor A1R y DU1/DP Pic completo. Identificamos todos los aminoácidos del receptor A1R que se unen al ligando y que han sido reportados literatura (marcados en verde), siendo este nuestro control para los siguientes acoplamientos. Cuando hicimos el acoplamiento molecular de A1R con DP Pic, identificamos 4 aminoácidos iguales a los reportados en la literatura, pero en una posición cercana (marcados en amarillo). Además, mediante Prodigy server, calculamos la energía de afinidad,  $\Delta G_{score}$  y las constantes de disociación cada uno de los acoplamientos. La energía de afinidad nos dio como resultado  $-10.8$  Kcal/mol y  $\Delta G_{score}$  55.4 para la interacción A1R Y DU1, mientras que para la interacción A1R y DP Pic fueron de  $-13.2$  Kcal/mol y la constante de disociación,  $2.2 \times 10^{-10}$  M. Por lo tanto, ambos acoplamientos pueden ocurrir en la naturaleza.

Sin embargo, cuando hicimos los acoplamientos con cada uno de los subdominios de DP Pic (Tabla 4) observamos que el mejor acoplamiento posible entre A1R fue con el subdominio d1, ya que identificamos cuatro aminoácidos del receptor (marcados en amarillo) que se unen en una posición cercana a lo reportado en la literatura, por lo tanto, A1R posiblemente interacciona con d1 de DP Pic. Además, el valor de la energía de afinidad de este acoplamiento fue de  $-11.4$  Kcal/mol y su constante de disociación fue de  $4.7 \times 10^{-9}$  M, sugiriendo que esta unión puede ocurrir espontáneamente. Mientras que

en los subdominios d2, d3 y d4, identificamos solamente 3, 1 y 2 aminoácidos (en amarillo), respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 3. Acoplamiento molecular de A1R y DU1/DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                      | Ligando (DU1) <sup>b</sup> | DP Pic <sup>b</sup>                              |
|--|----------------------------|--|
| Y12  | Y12                        |  |
| L88  | L88                        |  |
| F171   | F171                       | F183-748   |
| M177   | M177                       |  |
| M180   | M180                       |  |
| W247   | W247                       |  |
| L250   | L250                       | L245-F854  |
| N254   | N254                       |  |
| L253   | L253                       | L248-F854  |
| T257   | T257                       |  |
| T270   | T270                       |  |
| Y271   | Y271                       |  |
| I274   | I274                       | I256-L858  |
| <b>Energía de afinidad<br/>ΔG (Kcal/mol)</b> | -10.8                      | -13.2  |
| <b>ΔGscore</b>                               | 55.4                       | <b>Kd (M) a<br/>25°C</b> 2.2 × 10 <sup>-10</sup> |

<sup>a</sup>Aminoácidos de A1R que interactúan molecularmente con DU1 (Glukhova et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Adicionalmente, reportamos en la Tabla 5, los acoplamiento molecular realizados con cada uno de los segmentos de las β-hélices y la α-hélice del DP Pic, siendo el mejor acoplamiento con la β-hélice1, ya que identificó 4 aminoácidos en una posición cercana (en amarillo) del receptor. Además, de tener valores de -7.4 Kcal/mol y 4.10 × 10<sup>-6</sup> M, para la energía de afinidad y la constante de disociación respectivamente, indicando que este acoplamiento puede ser espontáneo. Mientras que los acoplamiento con α-hélice, β-hélice2, β-hélice3 y β-hélice4, identificaron solamente



1, 2, 2 y 2 aminoácidos del receptor, respectivamente.

**Tabla 4. Acoplamiento molecular de A1R y los subdominios del DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(DU1) | d1 <sup>b</sup>      | d2 <sup>b</sup>      | d3 <sup>b</sup>      | d4 <sup>b</sup>      |                       |
|---|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Y12   | Y12                           |                      |                      |                      |                      |                       |
| L88   | L88                           |                      |                      | L61-Y685             | L99-L968             |                       |
| F171  | F171                          |                      |                      |                      | F185-M955            |                       |
| M177  | M177                          |                      |                      |                      |                      |                       |
| M180  | M180                          |                      |                      |                      |                      |                       |
| W247  | W247                          |                      |                      |                      |                      |                       |
| L250  | L250                          | L245-Y187            | L276-N508            |                      |                      |                       |
| N254  | N254                          | N280-Q185            |                      |                      |                      |                       |
| L253  | L253                          | L248-K150            | L300-F493            |                      |                      |                       |
| T257  | T257                          |                      |                      |                      |                      |                       |
| T270  | T270                          |                      |                      |                      |                      |                       |
| Y271  | Y271                          |                      |                      |                      |                      |                       |
| I274  | I274                          | I272-N230            | I286-I490            |                      |                      |                       |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -10.8                         | -11.4                | -10.4                | -7.9                 | -8.6                 |                       |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 55.4                          | <b>Kd (M) a 25°C</b> | $4.7 \times 10^{-9}$ | $2.4 \times 10^{-8}$ | $1.7 \times 10^{-6}$ | $5.10 \times 10^{-7}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de A1R que interactúan molecularmente con DU1 (Glukhova et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Debido a que los mejores acoplamiento molecular con el receptor A1R fueron con el subdominio d1 y la  $\beta$ -hélice1, hicimos un acoplamiento con A1R y el conjunto del subdominio d1 y la  $\beta$ -hélice1 reportado en la Tabla 6. Sin embargo, solo identificamos 2 aminoácidos (en amarillo) en una posición cercana a lo reportado en la literatura, sugiriendo que estos dos segmentos en su conjunto disminuyen la interacción con el receptor.

Tabla 5. Acoplamientos moleculares de A1R y  $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice.

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(DU1) | $\alpha$ -hélice <sup>b</sup>                 | $\beta$ -hélice1 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice2 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice3 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice4 <sup>b</sup> |                       |
|---|-------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Y12   | Y12                           |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| L88   | L88                           |   |                               | L99-V563                      | L96-F748                      | L99-A864                      |                       |
| F171  | F171                          |   | F183-L295                     | F186-G583                     | F183-T709                     |                               |                       |
| M177  | M177                          |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| M180  | M180                          |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| W247  | W247                          |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| L250  | L250                          |   | L245-Y435                     |                               |                               |                               |                       |
| N254  | N254                          |   |                               |                               |                               | N304-R908                     |                       |
| L253  | L253                          |   | L248-Y435                     |                               |                               |                               |                       |
| T257  | T257                          |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| T270  | T270                          |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| Y271  | Y271                          |   |                               |                               |                               |                               |                       |
| I274  | I274                          | I256-R415                                     | I256-R415                     |                               |                               |                               |                       |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -10.8                         | -7.4  | -11.3                         | -9.2                          | -12.1                         | -12.4                         |                       |
| <b><math>\Delta G</math>score</b>                           | 55.4                          | <b>Constante de disociación Kd (M) a 25°C</b> | $4.10 \times 10^{-6}$         | $5.6 \times 10^{-9}$          | $1.8 \times 10^{-7}$          | $1.2 \times 10^{-9}$          | $7.4 \times 10^{-10}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de A1R que interactúan molecularmente con DU1 (Glukhova et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

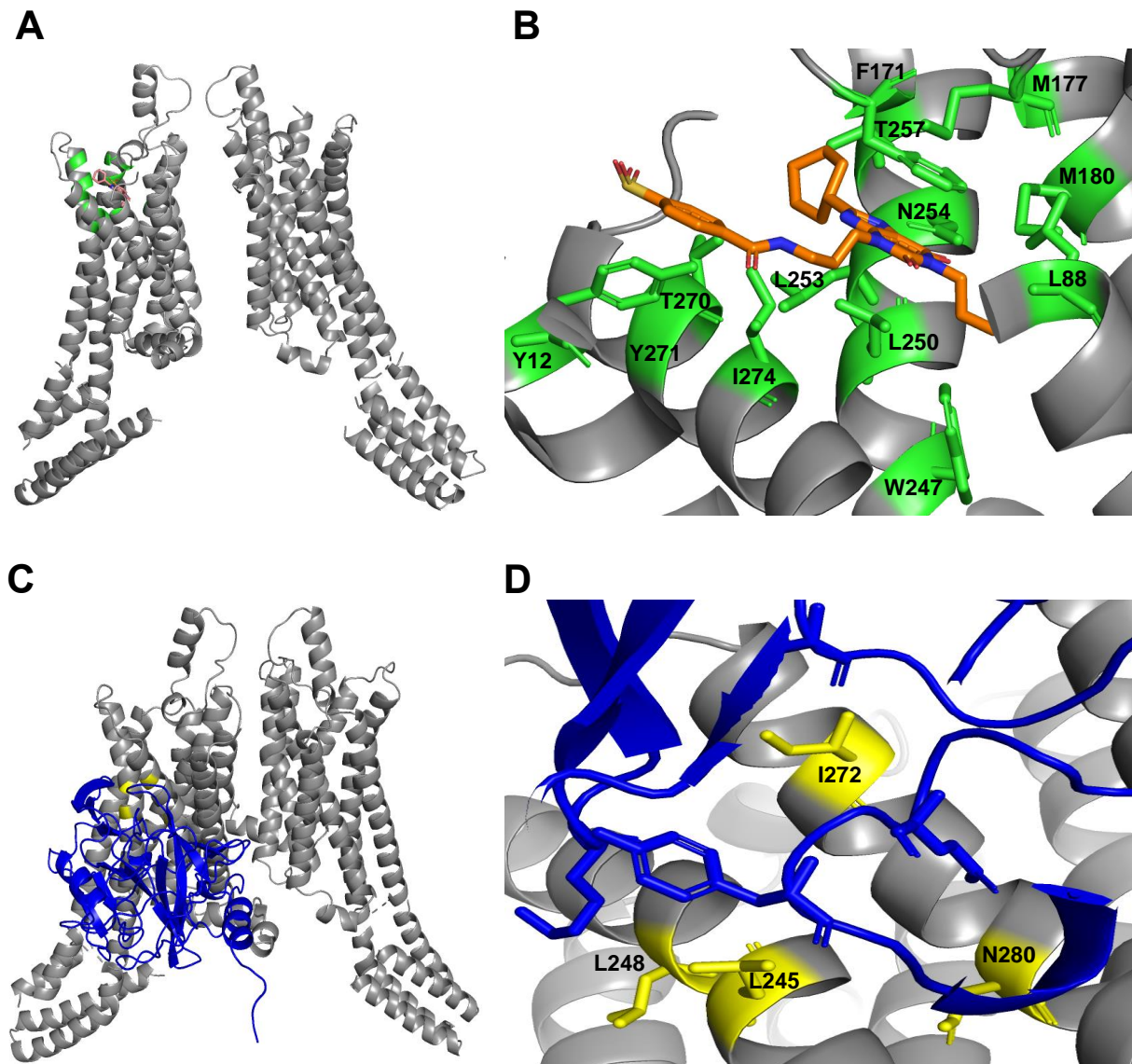
**Tabla 6. Acoplamiento molecular de A1R y d1β-hélice1.**

| Literatura                                   | Ligando (DU1) | d1-β-hélice1  |
|--|---------------|---|
| Y12  | Y12           |   |
| L88  | L88           | L113-A573   |
| F171   | F171          | F144-T489   |
| M177   | M177          |   |
| M180   | M180          |   |
| W247   | W247          |   |
| L250   | L250          |   |
| N254   | N254          |   |
| L253   | L253          |   |
| T257   | T257          |   |
| T270   | T270          |   |
| Y271   | Y271          |   |
| I274   | I274          |   |
| <b>Energía de afinidad<br/>ΔG (Kcal/mol)</b> | -10.8         | -16.6   |
| <b>ΔGscore</b>                               | 55.4          | <b>Constante de<br/>disociación Kd<br/>(M) a 25°C</b> |
|  |               | $6.7 \times 10^{-13}$                                 |

<sup>a</sup>Aminoácidos de A1R que interactúan molecularmente con DU1 (Glukhova et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Así, el mejor acoplamiento molecular de A1R (gris) fue con el subdominio d1 (azul) (Figura 3C) y, al igual que su acoplamiento con el ligando DU1 (naranja) (Figura 3A, 3B), se une a la cadena A del receptor. Al hacer un acercamiento al sitio de interacción (Figura 3D), observamos 4 aminoácidos presentes en la interacción con el subdominio d1 en una posición cercana (en amarillo) a lo ya reportado en la literatura para el ligando endógeno.



**Figura 3. Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor A1R y su ligando DU1 o d1. (A).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de A1R y DU1. Las moléculas A1R y DU1 están coloreadas en gris/verde y naranja, respectivamente. **(B).** Interacciones de aminoácidos del receptor A1R (verde) con su ligando DU1 (naranja). **(C).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de A1R (gris/amarillo) y d1 (azul). **(D).** Interacciones de aminoácidos del receptor A1R (amarillo) con d1 (azul). Los aminoácidos marcados en verde corresponden a los reportados en la literatura, el mismo aminoácido y en la misma posición, mientras que, en amarillo, mismo aminoácido, pero en una posición muy cercana. Las interacciones de todos los acoplamientos fueron realizadas por la plataforma HDock.

## **Acoplamiento molecular del receptor ALX/FPR2 y DP Pic**

El segundo receptor candidato fue ALX/FPR2, el acoplamiento molecular que ocupamos como control para este receptor (gris) fue con su ligando, WKYMV (naranja) (Figura 4A). Al hacer un acercamiento al sitio de interacción mediante el análisis con HDock (Figura 4B), identificamos todos los aminoácidos del receptor ALX/FPR2 que interaccionan con su ligando (en verde), a excepción de un aminoácido que fue identificado en una posición cercana (en amarillo) comparado a lo reportado por Chen et al. (2020).

El análisis de las interacciones de ALX/FPR2 con su ligando (WKYMV) y el DP Pic son detallados en la Tabla 7. El acoplamiento molecular ALX/FPR2 con su ligando WKYMV fue utilizado como control, puesto que identificamos con HDock a la mayoría de los aminoácidos reportados en la literatura (en verde) y a un aminoácido que está en una posición cercana (en amarillo). De éstos, únicamente 2 aminoácidos (F110 y W254) no fueron identificados por nuestro acoplamiento. Con respecto, a la energía de afinidad y  $\Delta G_{score}$ , los valores obtenidos en este acoplamiento fueron de  $-6$  Kcal/mol y  $4.1 \times 10^{-5}$ , respectivamente. Al identificarse la mayoría de los aminoácidos del receptor que interaccionan con WKYMV por nuestro acoplamiento, procedimos a utilizar este como control para los próximos acoplamientos de ALX/FPR2 y el DP Pic.

Al realizar el acoplamiento molecular de ALX/FPR2 con DP Pic, identificamos 6 aminoácidos que se encuentran en una posición cercana a lo reportado (en amarillo). Además, en este acoplamiento reportamos los valores de la energía de afinidad y constante de disociación siendo favorables:  $-14.6$  Kcal/mol y  $2 \times 10^{-11}$  M, respectivamente.

En el análisis de los acoplamientos moleculares de ALX/FPR2 con cada uno de los subdominios de DP Pic (Tabla 8), observamos que el subdominio d2 es el mejor candidato posible para el acoplamiento con ALX/FPR2, ya que identificamos 2 aminoácidos del receptor reportados en la literatura por su interacción con el ligando (en verde) y 5 aminoácidos que están en una posición cercana (en amarillo); siete aminoácidos en total. Además, la interacción de ALX/FPR2 con d2 puede ocurrir en la naturaleza debido a que la energía de afinidad nos da un valor de  $-12.2$  Kcal/mol y una constante de disociación de  $2 \times 10^{-11}$  M.

**Tabla 7. Acoplamiento molecular del receptor ALX/FPR2 y WKYMV/DP Pic**

| Literatura <sup>a</sup>                      | Ligando (WKYMV) <sup>b</sup> | DP Pic <sup>b</sup>  |
|--|------------------------------|----------------------|
| F5   | F5                           |                      |
| V105   | V105                         | V104-A162            |
| D106   | D106                         |                      |
| L109   | L109                         | L100-Y161            |
| F110   |                              | F96-N56              |
| V113   | V160                         |                      |
| L164   | L164                         | L154-T144            |
| F178   | F178                         | F161-Y161            |
| F180   | F180                         |                      |
| L198   | L198                         | L162-G75             |
| R201   | R201                         |                      |
| R205   | R205                         |                      |
| W254   |                              |                      |
| F257   | F257                         |                      |
| L268   | L268                         |                      |
| M271   | M271                         |                      |
| D281   | D281                         |                      |
| N285   | N285                         |                      |
| F292   | F292                         |                      |
| <b>Energía de afinidad<br/>ΔG (Kcal/mol)</b> | -6.0                         | -14.6                |
| <b>ΔGscore</b>                               | $4.1 \times 10^{-5}$         | <b>Kd (M) a 25°C</b> |
|  |                              | $2 \times 10^{-11}$  |

<sup>a</sup>Aminoácidos de ALX/FPR2 que interactúan molecularmente con WKYMV (Chen et al., 2020).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

De la misma manera que los acoplamientos con los subdominios de DP Pic, evaluamos los acoplamientos de ALX/FPR2 y las β-hélices/α-hélice del DP de Pic (Tabla 9), así observamos que las interacciones de ALX/FPR2 con la β-hélice2 y la β-hélice4, se identificaron 7 aminoácidos que están en una posición cercana (en amarillo) al reportado en la literatura. Además, estas interacciones pueden ser espontáneas debido a que los valores de la energía de afinidad y constante de disociación corresponden a -11.7 Kcal/mol y  $2.7 \times 10^{-9}$  M, respectivamente del acoplamiento de ALX/FPR2 y β-

hélice2 mientras que en el acoplamiento de ALX/FPR2 y  $\beta$ -hélice4 obtuvimos un valor de energía de afinidad de  $-10.3$  Kcal/mol y la constante de disociación fue  $3 \times 10^{-8}$  M.

**Tabla 8. Acoplamientos moleculares del receptor ALX/FPR2 y subdominios del DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(WKYMV) | d1 <sup>b</sup> | d2 <sup>b</sup> | d3 <sup>b</sup> | d4 <sup>b</sup> |
|---|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| F5  | F5                              | F53-Y76         |                 | F53-F675        | F37-P967        |
| V105  | V105                            | V104-K156       |                 |                 | V83-F980        |
| D106  | D106                            |                 |                 |                 |                 |
| L109  | L109                            | L100-L154       |                 | L69-V686        | L78-L968        |
| F110  |                                 | F96-N153        |                 |                 | F93-N1004       |
| V113  | V160                            |                 |                 |                 |                 |
| L164  | L164                            | L141-K19        | L164-T511       | L154-Y685       |                 |
| F178  | F178                            | F161-D149       | F163-I506       |                 |                 |
| F180  | F180                            |                 | F180-I506       |                 |                 |
| L198  | L198                            | L154-V157       | L162-S509       |                 |                 |
| R201  | R201                            |                 | R190-L525       |                 |                 |
| R205  | R205                            |                 |                 |                 |                 |
| W254  |                                 |                 |                 |                 |                 |
| F257  | F257                            |                 |                 |                 |                 |
| L268  | L268                            |                 |                 |                 |                 |
| M271  | M271                            |                 |                 |                 |                 |
| D281  | D281                            |                 |                 |                 |                 |
| N285  | N285                            |                 |                 |                 |                 |
| F292  | F292                            |                 |                 |                 | F293-S1026      |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -6.0                            | -12.2           | -10.2           | -5.9            | -6.9            |

**$\Delta G_{score}$**   $4.1 \times 10^{-5}$       **Kd (M) a 25°C**  $1.1 \times 10^{-9}$      $3.2 \times 10^{-8}$      $4.4 \times 10^{-5}$      $9.3 \times 10^{-6}$

<sup>a</sup>Aminoácidos de ALX/FPR2 que interactúan molecularmente con WKYMV (Chen et al., 2020).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

**Tabla 9. Acoplamiento molecular del receptor ALX/FPR2 y las  $\beta$ -hélice/ $\alpha$ -hélice del DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(WKYMV) | $\alpha$ -hélice <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice1 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice2 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice3 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice4 <sup>b</sup> |                      |
|---|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| F5  | F5                              |                               | F37-A342                      | F53-I618                      |                               | F53-S878                      |                      |
| V105  | V105                            | V127-N857                     | V104-N300                     | V104-N627                     |                               | V104-A869                     |                      |
| D106  | D106                            |                               |                               |                               |                               | L100-T871                     |                      |
| L109  | L109                            |                               | L100-A342                     | L100-N627                     |                               |                               |                      |
| F110  |                                 |                               | F96-H365                      |                               |                               | F96-D889                      |                      |
| V113  | V160                            | V131-S846                     |                               | V147-P623                     |                               | V147-A865                     |                      |
| L164  | L164                            |                               | L154-N296                     | L158-Q609                     |                               | L154-E905                     |                      |
| F178  | F178                            |                               |                               | F163-T668                     |                               | F161-D907                     |                      |
| F180  | F180                            |                               |                               |                               |                               |                               |                      |
| L198  | L198                            |                               |                               | L162-S651                     |                               |                               |                      |
| R201  | R201                            |                               |                               |                               |                               |                               |                      |
| R205  | R205                            | R238-L858                     |                               |                               | R241-S823                     |                               |                      |
| W254  |                                 |                               |                               |                               |                               |                               |                      |
| F257  | F257                            |                               |                               |                               |                               |                               |                      |
| L268  | L268                            |                               |                               |                               | L290-P797                     |                               |                      |
| M271  | M271                            |                               |                               |                               | M300-S769                     |                               |                      |
| D281  | D281                            | D308-E860                     |                               |                               |                               |                               |                      |
| N285  | N285                            |                               |                               |                               |                               |                               |                      |
| F292  | F292                            | F309-Y862                     |                               |                               | F293-L767                     |                               |                      |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -6.0                            | -7.8                          | -12.9                         | -11.7                         | -10.3                         | -10.5                         |                      |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | $4.1 \times 10^{-5}$            | <b>Kd (M) a 25°C</b>          | $1.9 \times 10^{-6}$          | $3.2 \times 10^{-10}$         | $2.7 \times 10^{-9}$          | $3 \times 10^{-8}$            | $1.9 \times 10^{-8}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de ALX/FPR2 que interactúan molecularmente con WKYMV (Chen et al., 2020).

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

El análisis usando HDock mostró que los mejores acoplamiento molecular de ALX/FPR2 fueron con el subdominio d2, la  $\beta$ -hélice2 y  $\beta$ -hélice4, por lo cual hicimos un acoplamiento entre este receptor y el conjunto del subdominio d2 y la  $\beta$ -hélice2 (Tabla 10), sin embargo, solo identificamos 7 aminoácidos (en amarillo) en una posición cercana a lo reportado en la literatura.



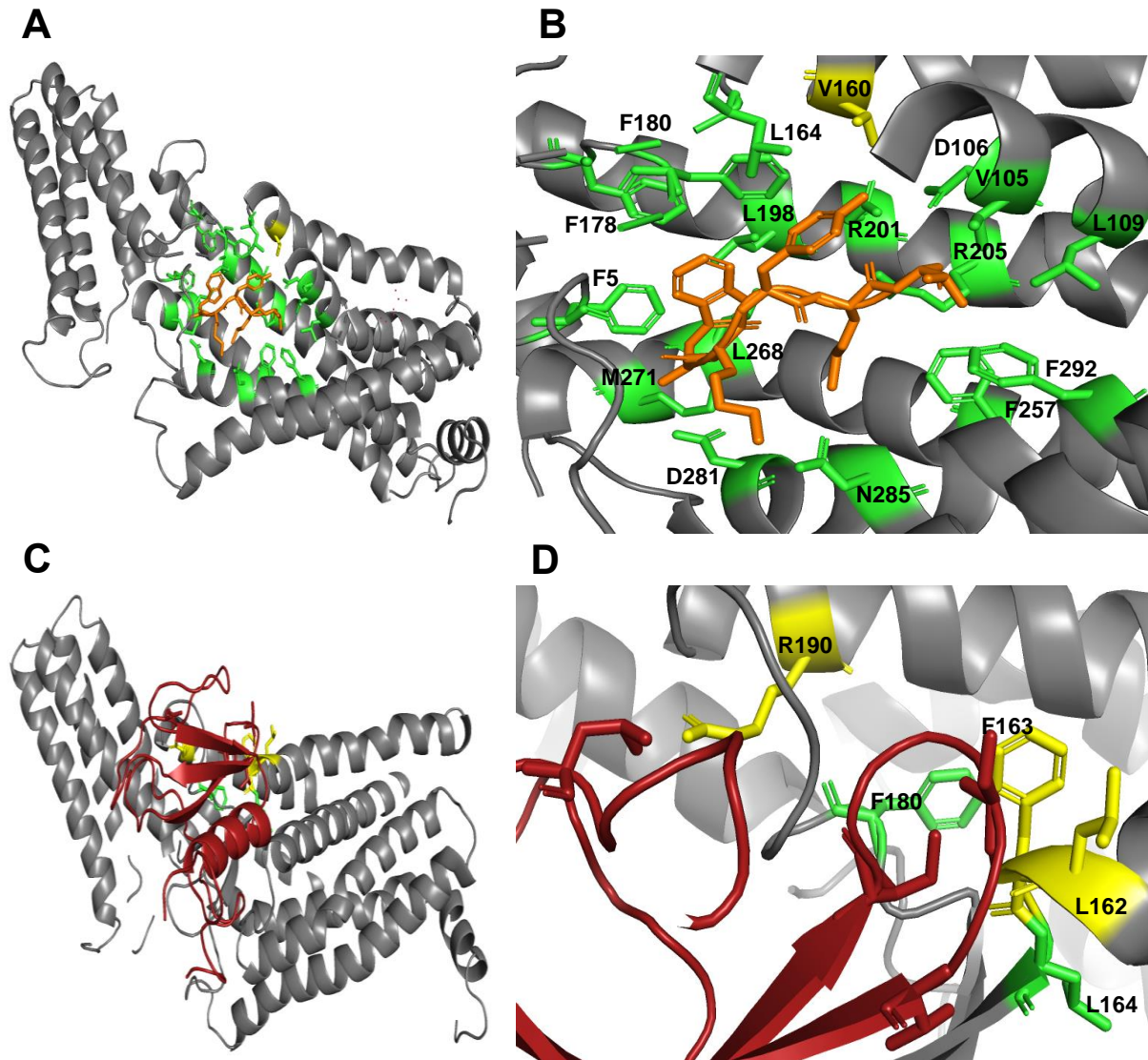
**Tabla 10. Acoplamiento molecular de ALX/FPR2 y el conjunto de d2-β-hélice2 del DP Pic.**

| Literatura                               | Ligando (WKYMV)      | d2-β-hélice2         |
|--|----------------------|----------------------|
| F5                                       | F5                   | F53-F565             |
| V105                                     | V105                 |                      |
| D106                                     | D106                 | L100-E632            |
| L109                                     | L109                 |                      |
| F110                                     |                      | F96-Q568             |
| V113                                     | V160                 | V139-K476            |
| L164                                     | L164                 | L154-S617            |
| F178                                     | F178                 | F161-H615            |
| F180                                     | F180                 |                      |
| L198                                     | L198                 | L158-A616            |
| R201                                     | R201                 |                      |
| R205                                     | R205                 |                      |
| W254                                     |                      |                      |
| F257                                     | F257                 |                      |
| L268                                     | L268                 |                      |
| M271                                     | M271                 |                      |
| D281                                     | D281                 |                      |
| N285                                     | N285                 |                      |
| F292                                     | F292                 |                      |
| <b>Energía de afinidad ΔG (Kcal/mol)</b> |                      |                      |
|  | -6.0                 | -9.1                 |
| <b>ΔGscore</b>                           | $4.1 \times 10^{-5}$ | <b>Kd (M) a 25°C</b> |
|  |                      | $2.1 \times 10^{-7}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de ALX/FPR2 que interaccionan molecularmente con WKYMV (Chen et al., 2020)

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Al comparar todos los acoplamientos de ALX/FPR2 observamos que el mejor acoplamiento molecular de este receptor (gris/verde/amarillo) fue con el subdominio d2 (rojo) (Figura 4C). Al hacer un acercamiento al sitio de interacción (Figura 4D), observamos 2 aminoácidos presentes en la interacción con el subdominio d2, estos identificados la misma posición (en verde) a lo ya reportado en la literatura y 3 aminoácidos que se encuentran en una posición muy cercana (en amarillo).



**Figura 4. Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor ALX/FPR2 y su ligando WKYMV o d2. (A).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de ALX/FPR2 y su ligando WKYMV. Las moléculas ALX/FPR2 y WKYMV están coloreados en gris/verde y naranja respectivamente. **(B).** Interacciones de aminoácidos del receptor ALX/FPR2 (verde) con WKYMV (naranja). **(C).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de ALX/FPR2 (gris/verde/amarillo) y d2 (rojo). **(D).** Interacciones de aminoácidos del receptor ALX/FPR2 (verde/amarillo) junto con d2 (rojo). Los aminoácidos marcados en verde corresponden a lo reportado en la literatura, el mismo aminoácido y en la misma posición, mientras que, en amarillo, mismo aminoácido, pero en una posición muy cercana. Las interacciones de todos los acoplamientos fueron realizadas por la plataforma HDock.

## Acoplamiento molecular del receptor PAR2 y DP Pic

El cuarto candidato a receptor de Pic en células caliciformes, es PAR2. El acoplamiento molecular control que utilizamos para PAR2 (gris/verde) fue con su ligando 8UN (naranja) (Figura 6A). Al hacer un acercamiento a dicha interacción (Figura 6B), identificamos todos los aminoácidos del receptor que interaccionan con 8UN (en verde) reportados por Cheng et al. (2017), a excepción de uno (C161).

El análisis de los aminoácidos de PAR2 que interaccionan con 8UN y el DP Pic completo son mostrados en la Tabla 15. En el acoplamiento control (PAR2-8UN) identificamos 6 aminoácidos reportados en la literatura (en verde). En contraste, cuando realizamos el acoplamiento molecular entre PAR2 y el DP Pic, identificamos 4 aminoácidos del receptor que están reportados en la interacción con 8UN (en verde) y 1 aminoácido en una posición muy cercana (en amarillo) a lo reportado en la literatura.

**Tabla 11. Acoplamientos moleculares de PAR2 y 8UN/DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(8UN) | DP Pic <sup>b</sup>          |
|---|-------------------------------|------------------------------|
| L123  | L123                          | L123-N793                    |
| F154  | F154                          |                              |
| A157  | A157                          | A197-L741                    |
| C161  |                               |                              |
| W199  | W199                          | W199-Q794                    |
| L203  | L203                          | L203-K789                    |
| Y210  | Y210                          | Y210-K789                    |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -12.8                         | -12.6                        |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 63.5                          | <b>Kd (M)<br/>a<br/>25°C</b> |
|   |                               | $5.6 \times 10^{-10}$        |

<sup>a</sup>Aminoácidos de PAR2 que interaccionan molecularmente con 8UN (Cheng et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Los siguientes acoplamientos que realizamos fueron de PAR2 con las subunidades de DP Pic (Tabla 16). En estas interacciones, el mejor acoplamiento fue

con el subdominio d1, HDock nos identificó 5 aminoácidos del receptor (en verde) que interaccionan con los reportados en la literatura y 1 en una posición cercana (en amarillo). Además, cuando analizamos la energía de afinidad y la constante de disociación nos da un valor de  $-12.6$  Kcal/mol y  $5.6 \times 10^{-6}$  M, respectivamente, sugiriendo que este acoplamiento puede ocurrir en la naturaleza.

**Tabla 12. Acoplamientos moleculares de PAR2 y subdominios de DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup> (8UN) | d1 <sup>b</sup>      | d2 <sup>b</sup>      | d3 <sup>b</sup>       | d4 <sup>b</sup>      |                      |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| L123  | L123                       | L123-T144            | L164-N508            |                       | L164-F1027           |                      |
| F154  | F154                       | F154-P200            |                      |                       |                      |                      |
| A157  | A157                       | A146-A227            | A197-S509            |                       | A174-M955            |                      |
| C161  |                            |                      | C168-N508            |                       |                      |                      |
| W199  | W199                       | W199-K156            | W175-L525            |                       | W175-M955            |                      |
| L203  | L203                       | L203-K156            | L201-S509            |                       | L201-F1027           |                      |
| Y210  | Y210                       | Y210-I229            |                      | Y242-L669             |                      |                      |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -12.8                      | -8.8                 | -12.3                | -9.4                  | -11.3                |                      |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 63.5                       | <b>Kd (M) a 25°C</b> | $3.6 \times 10^{-7}$ | $9.2 \times 10^{-10}$ | $1.2 \times 10^{-7}$ | $5.5 \times 10^{-9}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de PAR2 que interaccionan molecularmente con 8UN (Cheng et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

También realizamos acoplamientos de PAR2 y las  $\beta$ -hélice/ $\alpha$ -hélices (Tabla 17). De estos acoplamientos, la mejor interacción con PAR2 fue con la  $\beta$ -hélice4, identificamos 6 aminoácidos del receptor (en verde) que interaccionan de acuerdo con lo reportados en la literatura. Además, este acoplamiento es espontáneo debido a sus valores de energía de afinidad y constante de disociación,  $-10.7$  Kcal/mol y  $1.4 \times 10^{-8}$  M, respectivamente.

Tabla 13. Acoplamientos moleculares de PAR2 y las  $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice de DP Pic.

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(8UN) | $\alpha$ -hélice <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice1 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice2 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice3 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice4 <sup>b</sup> |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| L123  | L123                          |                               | L73-E324                      | L123-M573                     | L123-F748                     | L123-S953                     |
| F154  | F154                          |                               |                               | F154-M573                     | F154-S769                     | F154-S953                     |
| A157  | A157                          |                               |                               |                               | A146-V799                     | A157-F954                     |
| C161  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| W199  | W199                          |                               |                               |                               | W199-D727                     | W199-V952                     |
| L203  | L203                          |                               | L252-N296                     |                               | L203-A744                     | L203-L931                     |
| Y210  | Y210                          |                               |                               |                               | Y210-L767                     | Y210-D930                     |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -12.8                         | -8.7                          | -11.8                         | -9.3                          | -10.5                         | -10.7                         |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 63.5                          |                               |                               |                               |                               |                               |
|   | <b>Kd (M) a 25°C</b>          |                               |                               |                               |                               |                               |
|   |                               | $4.2 \times 10^{-7}$          | $2.1 \times 10^{-9}$          | $1.4 \times 10^{-7}$          | $2.1 \times 10^{-8}$          | $1.4 \times 10^{-8}$          |

<sup>a</sup>Aminoácidos de PAR2 que interactúan molecularmente con 8UN (Cheng et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Debido a que el mejor acoplamiento de PAR2 fue con el subdominio d1, pero también los acoplamientos con las  $\beta$ -hélices nos dieron resultados muy interesantes, procedimos a hacer un último acoplamiento de este receptor con el conjunto de D1 y  $\beta$ -hélice1. En esta interacción obtuvimos 5 aminoácidos del receptor (en verde) que interactúan y que están reportados en la literatura, y 2 aminoácidos que están en una posición muy cercana. Además, el acoplamiento nos da valores de energía de afinidad de  $-15.9$  Kcal/mol y la constante de disociación  $2.1 \times 10^{-12}$  M.

**Tabla 14. Acoplamiento molecular de PAR2 y conjunto de d1-  $\beta$ -hélice1.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(U8N) | d1 $\beta$ -<br>hélice1 <sup>b</sup> |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|
| L123  | L123                          | L123-A309                            |
| F154  | F154                          | F154-N307                            |
| A157  | A157                          | A146-N351                            |
| C161  |                               | C148-N351                            |
| W199  | W199                          | W199-S260                            |
| L203  | L203                          | L203-Q306                            |
| Y210  | Y210                          | Y210-N307                            |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> |                               |                                      |
|   | -12.8                         | -15.9                                |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 63.5                          | <b>Kd (M)<br/>a<br/>25°C</b>         |
|   |                               | $2.1 \times 10^{-12}$                |

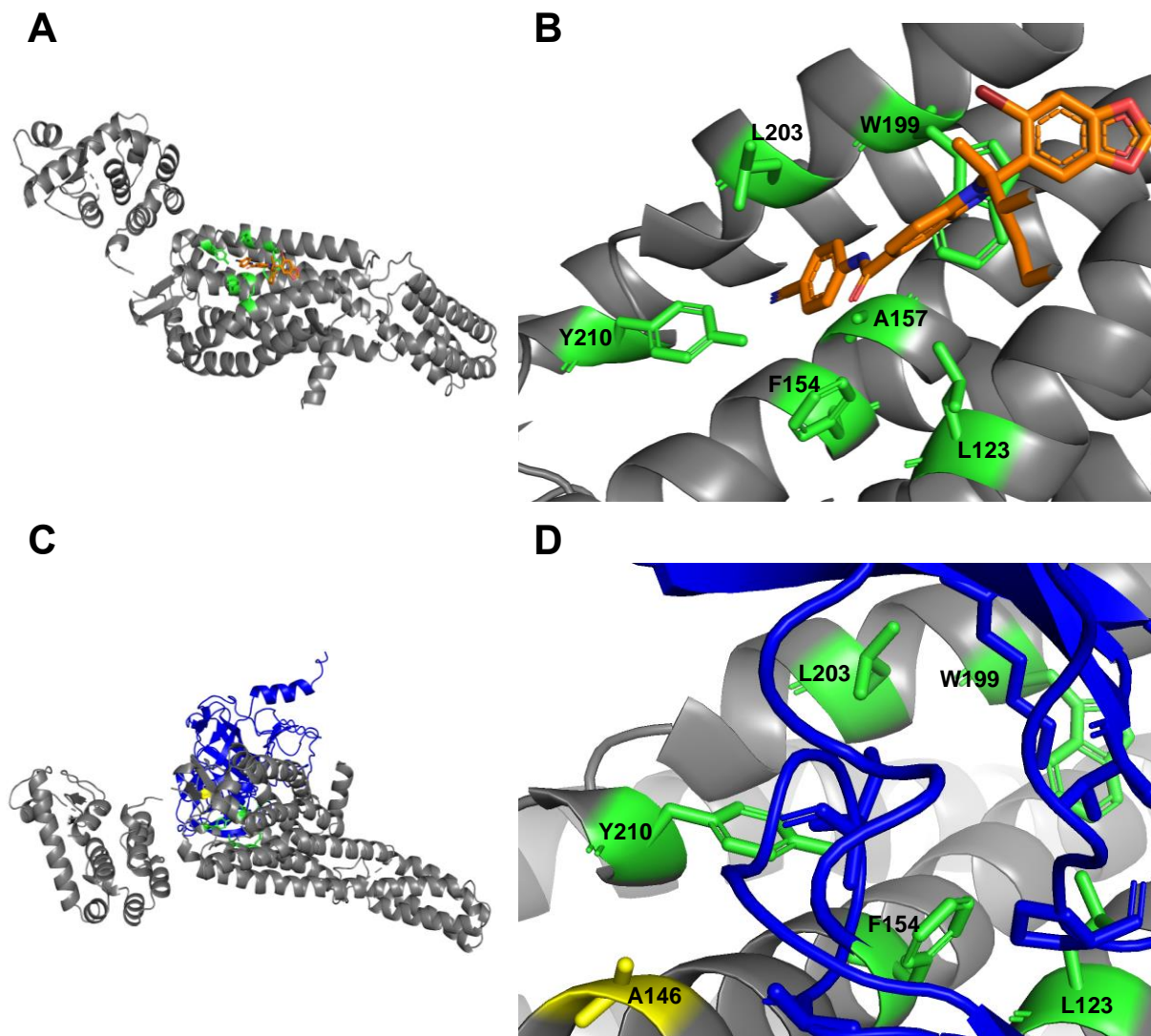
<sup>a</sup>Aminoácidos de PAR2 que interaccionan molecularmente con 8UN (Cheng et al., 2017).

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Al comparar todos los acoplamiento de PAR2 (gris/verde/amarillo), podemos afirmar que el mejor acoplamiento de estos fue con el subdominio d1 (azul) de DP Pic, por lo tanto, posiblemente PAR2 interacciona con D1 de DP Pic (Figura 6C).

Al hacer un acercamiento de la interacción de PAR2 y d1 (Figura 6D) observamos 5 aminoácidos del receptor (en verde) que interaccionan y que están reportados en la literatura, y 2 aminoácidos que están en una posición muy cercana (en amarillo).





**Figura 5. Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor PAR2 y su ligando 8UN o d1.** (A). Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de PAR2 y 8UN. Las moléculas PAR2 y 8UN están coloreados en gris y naranja respectivamente. (B). Interacciones de aminoácidos del receptor PAR2 (verde) con 8UN (naranja). (C). Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de PAR2 (gris/verde) y d1 (azul). (D). Interacciones de aminoácidos del receptor PAR2 (verde) con d1 (azul). Los aminoácidos marcados en verde corresponden a lo reportado en la literatura, el mismo aminoácido y en la misma posición, mientras que, en amarillo, mismo aminoácido, pero en una posición muy cercana. Las interacciones de todos los acoplamientos fueron realizadas por la plataforma HDock.

## Acoplamiento molecular del receptor P2Y2R y DP Pic

El tercer receptor candidato que evaluamos como receptor de Pic en células caliciformes, fue P2Y2R. Este receptor lo modelamos al igual que DP Pic con el programa Phyre<sup>2</sup>, ya que aún no ha sido cristalizada la proteína. Una vez modelado P2Y2R realizamos los acoplamientos moleculares. El acoplamiento que utilizamos como control fue con su ligando (UTP), debido a que Attah et al. (2020) reportaron cuáles son los aminoácidos de P2Y2R que se unen a UTP.

En el acoplamiento control (P2Y2R y UTP) (Figura 5A) observamos la interacción del receptor P2Y2R (gris/verde/amarillo) y su ligando UTP (naranja) junto con los aminoácidos de P2Y2R que interaccionan con dicho ligando. Al hacer un acercamiento al sitio de interacción (Figura 5B) observamos a todos los aminoácidos presentes en la interacción con UTP, marcados en verde, que corresponden al mismo aminoácido y a la misma posición con lo ya reportado en la literatura. Además de un aminoácido que está en una posición cercana a lo reportado, marcado en amarillo. Por lo tanto, pudimos usar este acoplamiento como control para las siguientes interacciones de P2Y2R con DP Pic.

El análisis estructural de los aminoácidos identificados por HDock server, que parecen participar en las interacciones moleculares del receptor P2Y2R y UTP o DP Pic completo se muestran en la Tabla 11. En nuestro acoplamiento control identificamos la mayoría de los aminoácidos de dicho receptor que interaccionan con UTP (en verde) y solo un aminoácido que se encuentra en una posición cercana (en amarillo). Al contrario, cuando realizamos el acoplamiento de P2Y2R y DP Pic identificamos 6 aminoácidos iguales a los reportados en la literatura, pero en una posición cercana (en amarillo). Además, mediante Prodigy server, calculamos la energía de afinidad y  $\Delta G_{score}$  cada uno de los acoplamientos dándonos como resultado en la interacción P2Y2R Y UTP,  $-8.5$  Kcal/mol y  $170.9$  M, respectivamente, y en la interacción P2Y2R y DP Pic, la energía de afinidad fue de  $-22.7$  Kcal/mol y la constante de disociación fue de  $2.3 \times 10^{-17}$  M. Por lo tanto, ambos acoplamientos pueden ser espontáneos.



**Tabla 15. Acoplamiento molecular de P2Y2R y UTP/DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(UTP) | DP Pic <sup>b</sup>                          |
|---|-------------------------------|--|
| R110  | R110A                         | R95A-Q466                                    |
| F113  |                               | F111A-T723                                   |
| Y114  | Y93A                          | Y91A-T570                                    |
| L117  |                               | L112A-E705                                   |
| Y118  |                               |  |
| R177  | R177A                         | R152A-K789                                   |
| H184  | H184A                         |  |
| D185  | D185A                         |  |
| T186  | T186A                         |  |
| F195  |                               |  |
| F261  |                               |  |
| H262  |                               |  |
| R265  |                               |  |
| R272  | R272A                         |  |
| Y268  | Y268A                         |  |
| Y269  |                               |  |
| Y288  |                               |  |
| K289  | K289A                         |  |
| R292  | R292A                         | R315A-Y32                                    |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -8.5                          | -22.7  |
| $\Delta G_{score}$  | 170.9                         | <b>Kd (M) a25°C</b><br>$2.3 \times 10^{-17}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de P2Y2R que interactúan molecularmente con UTP (Attah et al., 2020)

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Los siguientes acoplamiento que realizamos mediante HDock fueron con cada uno de los subdominios de DP Pic (Tabla 12). El mejor acoplamiento molecular de P2Y2R fue con el subdominio d2 en el cual identificamos 7 aminoácidos que están en una posición cercana (en amarillo) a lo reportado en la literatura. Además, este acoplamiento podría ser espontáneo ya que su energía de afinidad fue de  $-8.3$  Kcal/mol y su constante de disociación  $7.7 \times 10^{-7}$  M.

Tabla 16. Acoplamiento molecular de P2Y2R y los subdominios de DP Pic.

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup> (UTP) | d1 <sup>b</sup>    | d2 <sup>b</sup>      | d3 <sup>b</sup>      | d4 <sup>b</sup>      |                      |
|---|----------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R110  | R110                       | R146-P46           | R137-M505            | R137-F675            | R61-N1040            |                      |
| F113  |                            | F73-P64            |                      |                      |                      |                      |
| Y114  | Y93                        |                    | Y71-F493             |                      | Y91-V989             |                      |
| L117  |                            | L81-T111           | L133-S491            | L122-N684            | L81-F1027            |                      |
| Y118  |                            |                    | Y149-F493            |                      |                      |                      |
| R177  | R177                       | R152-P24           | R140-G488            | R152-G681            |                      |                      |
| H184  | H184                       |                    |                      |                      |                      |                      |
| D185  | D185                       |                    |                      |                      |                      |                      |
| T186  | T186                       |                    |                      |                      |                      |                      |
| F195  |                            |                    |                      |                      |                      |                      |
| F261  |                            |                    |                      |                      | F307-M979            |                      |
| H262  |                            |                    |                      |                      |                      |                      |
| R265  |                            |                    | R223-L507            | R223-R673            | R245-P972            |                      |
| R272  | R272                       |                    | R224-N508            | R224-S671            |                      |                      |
| Y268  | Y268                       |                    |                      |                      |                      |                      |
| Y269  |                            |                    |                      |                      |                      |                      |
| Y288  |                            |                    |                      |                      |                      |                      |
| K289  | K289                       |                    |                      |                      |                      |                      |
| R292  | R292                       |                    |                      |                      |                      |                      |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -8.5                       | -8.4               | -8.3                 | -8.3                 | -6.9                 |                      |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 170.9                      | <b>Kd (M) 25°C</b> | $6.6 \times 10^{-7}$ | $7.7 \times 10^{-7}$ | $7.7 \times 10^{-7}$ | $8.4 \times 10^{-6}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de P2Y2R que interactúan molecularmente con UTP (Attah et al., 2020)

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Al igual que los acoplamiento con los subdominios de DP Pic, realizamos los acoplamiento molecular de P2Y2R con las  $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice (Tabla 13). De estas interacciones, el mejor acoplamiento fue con la  $\beta$ -hélice1 en el cual identificamos 6 aminoácidos que se encuentran en una posición cercana (en amarillo) a lo reportado. Además, el valor de la energía de afinidad corresponde a  $-10.1$  Kcal/mol y la constante de disociación fue de  $3.8 \times 10^{-8}$ , lo que indica que el acoplamiento puede ser espontáneo.

Tabla 17. Acoplamiento molecular de P2Y2R y las  $\beta$ -hélices/ $\alpha$ -hélice.

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(UTP) | $\alpha$ -hélice <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice1 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice2 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice3 <sup>b</sup> | $\beta$ -hélice4 <sup>b</sup> |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| R110  | R110                          | R137-E848                     | R137-R415                     | R148-T570                     | R95-Q794                      | R151-A864                     |
| F113  |                               |                               |                               | F111-R584                     | F111-T709                     | F73-S878                      |
| Y114  | Y93                           |                               | Y71-Y435                      |                               | Y91-Q794                      |                               |
| L117  |                               | L133-S852                     | L133-R436                     | L112-V563                     | L112-D727                     | L112-T871                     |
| Y118  |                               | Y149-A855                     | Y149-R436                     |                               |                               |                               |
| R177  | R177                          | R152-Y862                     | R152-Y457                     | R152-M573                     | R152-T729                     | R152-A865                     |
| H184  | H184                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| D185  | D185                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| T186  | T186                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| F195  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| F261  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| H262  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| R265  |                               |                               | R223-I345                     |                               |                               |                               |
| R272  | R272                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| Y268  | Y268                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| Y269  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Y288  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| K289  | K289                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| R292  | R292                          |                               |                               |                               |                               |                               |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
|   | -8.5                          | -6.0                          | -10.1                         | -7.8                          | -11.6                         | -10.8                         |
| <b><math>\Delta G_{score}</math></b>                        | 170.9                         |                               |                               |                               |                               |                               |
| <b><math>K_d</math> (M) a 25°C</b>                          |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
|   |                               | $3.7 \times 10^{-5}$          | $3.8 \times 10^{-8}$          | $1.9 \times 10^{-6}$          | $3.3 \times 10^{-9}$          | $1.3 \times 10^{-8}$          |

<sup>a</sup>Aminoácidos de P2Y2R que interactúan molecularmente con UTP (Attah et al., 2020)

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

El análisis con HDock mostró que las mejores interacciones de P2Y2R fueron con el subdominio d2 y la  $\beta$ -hélice1, por lo cual realizamos acoplamiento de este receptor con los conjuntos de d2/ $\beta$ -hélice1 y d2/ $\beta$ -hélice2 (Tabla 14). En ambas interacciones identificamos 5 aminoácidos que están en una posición cercana (en amarillo) a lo reportado. Además, los valores de energía de afinidad y de constante de disociación de ambos acoplamiento, nos indican que pueden ser espontáneos.

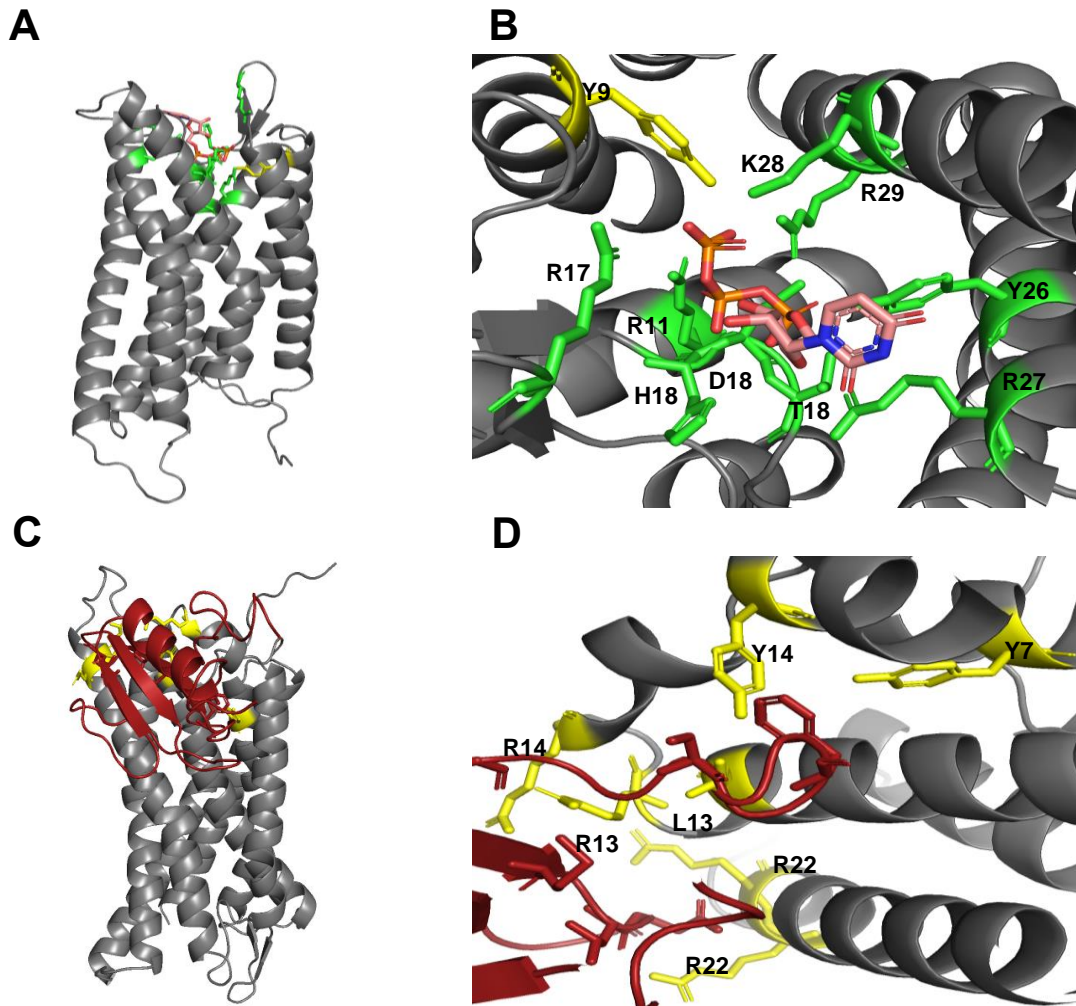
**Tabla 18. Acoplamientos moleculares de P2Y2R y los conjuntos de D2-β-hélice1/D2-β-hélice2.**

| Literatura <sup>a</sup>                  | Ligando <sup>b</sup> (UTP) | D2β-hélice1 <sup>b</sup> | D2β-hélice2 <sup>b</sup> |
|--|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| R110                                     | R110                       | R137-R415                | R95-A576                 |
| F113                                     |                            |                          | F101-L475                |
| Y114                                     | Y93                        | Y71-Y435                 | Y91-K476                 |
| L117                                     |                            | L133-R436                | L105-V563                |
| Y118                                     |                            |                          |                          |
| R177                                     | R177                       | R194-T496                | R180-M573                |
| H184                                     | H184                       |                          |                          |
| D185                                     | D185                       |                          |                          |
| T186                                     | T186                       |                          |                          |
| F195                                     |                            |                          |                          |
| F261                                     |                            |                          |                          |
| H262                                     |                            |                          |                          |
| R265                                     |                            | R223-I345                |                          |
| R272                                     | R272                       |                          |                          |
| Y268                                     | Y268                       |                          |                          |
| Y269                                     |                            |                          |                          |
| Y288                                     |                            |                          |                          |
| K289                                     | K289                       |                          |                          |
| R292                                     | R292                       |                          |                          |
| <b>Energía de afinidad ΔG (Kcal/mol)</b> | -8.5                       | -12                      | -8.5                     |
| <b>ΔG<sub>score</sub></b>                | 170.9                      | <b>Kd (M) a 25°C</b>     | $1.6 \times 10^{-9}$     |
|  |                            |                          | $2.5 \times 10^{-6}$     |

<sup>a</sup>Aminoácidos de P2Y2R que interactúan molecularmente con UTP (Attah et al., 2020).

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Al comparar todos los acoplamientos realizados de P2Y2R (gris/verde/amarillo), observamos que el mejor acoplamiento de estos fue con el subdominio d2 (rojo), por lo tanto, posiblemente P2Y2R interactúe con d2 de DP Pic (Figura 5C). Al hacer un análisis usando un acercamiento de la interacción de P2Y2R y d2 (Figura 5D) observamos 7 aminoácidos del receptor en una posición cercana (en amarillo) a lo reportado que interactúan con el d2.



**Figura 6. Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor P2Y2R y su ligando UTP o d2. (A).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de P2Y2R y UTP. P2Y2R y UTP están coloreados en gris/verde y naranja respectivamente. **(B).** Interacciones de aminoácidos del receptor P2Y2R (verde) con UTP (naranja). **(C).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de P2Y2R (gris/amarillo) y d2 (rojo). **(D).** Interacciones de aminoácidos del receptor P2Y2R (amarillo) con d2 (rojo). Los aminoácidos marcados en verde corresponden a lo reportado en la literatura, el mismo aminoácido y en la misma posición, mientras que, en amarillo, mismo aminoácido, pero en una posición muy cercana. Las interacciones de todos los acoplamientos fueron realizados por la plataforma HDock.

## Acoplamiento molecular del EGFR Y DP Pic

Otra posibilidad es que Pic desencadene la vía de señalización para la secreción de mucinas en las células caliciformes mediante una comunicación cruzada. Se ha reportado que el receptor ALX/FPR2 al unirse con su ligando, activa a ADAM17 para liberar EGF. El EGF liberado se une al EGFR para activar AKT y ERK 1/2. Además, de activar mecanismos indirectos que incluyen la activación de PLC, PLD o PLA2 (Kaye et al., 2019). Con este antecedente, hicimos los acoplamientos moleculares de EGFR con su ligando (EGF), con el DP Pic y con cada uno de los subdominios de DP Pic.

El acoplamiento control que utilizamos fue EGFR (gris/verde/amarillo) con su ligando EGF (naranja) (Figura 7A), Al hacer un acercamiento a la interacción, identificamos por HDock a la mayoría de aminoácidos que ya habían sido reportados por Ogiso et al. (2002) (en verde) por su interacción con el ligando y 4 aminoácidos que están en una posición cercana (en amarillo) a la interacción (Figura 7B).

El análisis de la interacción de los aminoácidos de EGFR con el ligando EGF y el DP Pic se presenta en la Tabla 19. Como vemos en el acoplamiento de control, de los aminoácidos de EGFR que tienen interacción con EGF, identificamos a 12 aminoácidos que ya han sido reportados por su interacción con el ligando (en verde) y 4 aminoácidos que se presentaban en una posición cercana (en amarillo). Sus valores de energía de afinidad y constante de disociación indican que este acoplamiento puede ser espontáneo (Tabla 19).

Una vez teniendo el control, procedimos hacer la posible interacción de EGFR con el DP Pic completo, en el cual identificamos 5 aminoácidos que corresponden con la literatura (en verde). Además, esta interacción puede ser espontánea debido a que su energía de afinidad es de  $-14$  Kcal/mol y su constante de disociación fue de  $5.10 \times 10^{-11}$  M.

**Tabla 19. Acoplamientos moleculares de EGFR y EGF/DP Pic.**

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(EGF) | DP Pic <sup>b</sup>    |
|---|-------------------------------|------------------------|
| H10   |                               |                        |
| Y13   |                               | L14-S751               |
| L14   | L14-A30                       |                        |
| L15   |                               |                        |
| Q16   | Q16-C31                       | Q16-N713               |
| G18   | G18-N32                       |                        |
| M21   | M30-W49                       |                        |
| I23   |                               |                        |
| L26   | L17-Y37                       |                        |
| K28   |                               |                        |
| Y29   |                               |                        |
| C31   |                               |                        |
| N32   | N12-G39                       |                        |
| C33   |                               |                        |
| R41   | R29-W49                       |                        |
| Y45   | Y45-M21                       |                        |
| L69   | L69-I23                       | L69-H772               |
| E90   | E90-K28                       | E90-D806               |
| L98   | L98-L26                       | L98-D803               |
| Q43   |                               |                        |
| R45   |                               |                        |
| L47   |                               |                        |
| V350  | V350-L15                      |                        |
| D355  | D355-R41                      |                        |
| F357  | F357-H10                      |                        |
| L382  | L382-Y44                      |                        |
| Q384  | Q384-R45                      |                        |
| F412  |                               |                        |
| I438  |                               |                        |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -15.9                         | -14                    |
| <b>Kd (M) a 25°C</b>  | $2.2 \times 10^{-12}$         | $5.10 \times 10^{-11}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de EGFR que interactúan molecularmente con EGF (Ogiso et al., 2002)

<sup>b</sup>Todos los acoplamientos moleculares fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.

Al igual que en los receptores anteriores, también evaluamos los acoplamientos de EGFR con cada uno de los subdominios de DP Pic (Tabla 20). De estas interacciones, el mejor acoplamiento molecular posible fue con el subdominio d2, en que identificamos 9 aminoácidos que corresponden a los reportados en la literatura (en verde) y 3 aminoácidos localizados en una posición cercana (en amarillo) a lo ya reportado. Además, esta interacción puede ser espontánea debido a que su energía de afinidad es de  $-13.2$  Kcal/mol y su constante de disociación fue de  $2.1 \times 10^{-10}$ .

Por lo tanto, la interacción de EGFR (gris/verde/amarillo) y el d2 (rojo) (Figura 7C) es la más probable en comparación con los anteriores acoplamientos de EGFR. Al hacer un acercamiento de la interacción de EGFR y D2 (Figura 7D) observamos 9 aminoácidos del receptor (en verde) que interaccionan, y que ya están reportados en la literatura, y 3 aminoácidos que están en una posición muy cercana (en amarillo).

Estos resultados nos indican que en los acoplamientos moleculares de A1R y PAR2 con los subdominios de DP Pic, el subdominio d1 es la región que mejor se une a estos receptores en comparación con los otros subdominios. Mientras que el subdominio d2 es la región que mejor se une con los receptores ALX/FPR2, P2Y2R y EGFR. Todo parece indicar que el subdominio d1 y d2 son candidatos importantes para la interacción de DP Pic y su receptor.

Al comparar los 5 receptores candidatos de los acoplamientos antes mencionados, podemos observar que el mejor candidato para ser receptor de Pic en células caliciformes, a nivel bioinformático, es PAR2 el que interacciona con el subdominio d1, ya que este es el más cercano en los aminoácidos de los receptores que interaccionan con su ligando.

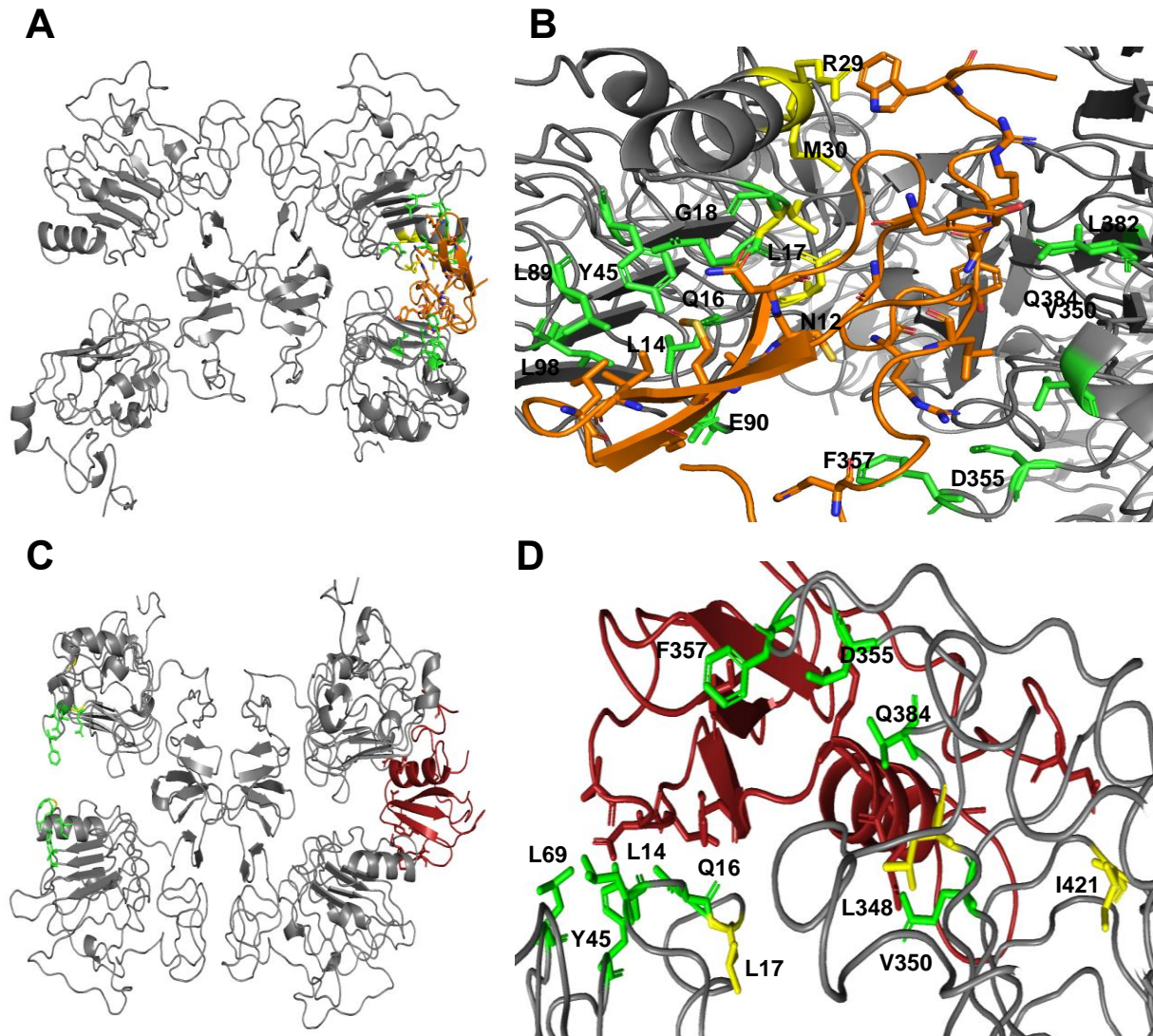


Tabla 20. Acoplamiento molecular de EGFR y los subdominios de DP Pic.

| Literatura <sup>a</sup>                                     | Ligando <sup>b</sup><br>(EGF) | d1 <sup>b</sup>       | d2 <sup>b</sup>       | d3 <sup>b</sup>       | d4 <sup>b</sup>      |
|---|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| H10   |                               |                       |                       |                       |                      |
| Y13   | K13-E40                       | L14-A225              | L14-L530              | L14-S693              | L14-T995             |
| L14   | L14-A30                       |                       |                       |                       |                      |
| L15   | T15-C31                       |                       |                       |                       |                      |
| Q16   | Q16-C31                       | Q16-G228              | Q16-F538              | Q16-S693              |                      |
| G18   | G18-N32                       | G18-I229              | G18-D532              | G9-K678               |                      |
| M21   | M30-W49                       |                       |                       |                       |                      |
| I23   |                               |                       |                       |                       |                      |
| L26   | L17-Y37                       |                       | L17-F538              | L38-G681              |                      |
| K28   |                               |                       |                       | K13-V676              |                      |
| Y29   |                               |                       |                       |                       |                      |
| C31   |                               |                       |                       |                       |                      |
| N32   | N12-G39                       |                       |                       | N40-D680              |                      |
| C33   |                               |                       |                       |                       |                      |
| R41   | R29-W49                       |                       |                       |                       |                      |
| Y45   | Y45-M21                       | Y45-Y226              | Y45-S529              | Y45-V694              | Y45-H997             |
| L69   | L69-I23                       | L69-Y226              | L69-S529              | L69-D700              | L69-D1010            |
| E90   | E90-K28                       | E90-K71               |                       | L98-N699              | L98-K1013            |
| L98   | L98-L26                       |                       |                       |                       |                      |
| Q43   |                               |                       |                       |                       |                      |
| R45   |                               |                       |                       |                       |                      |
| L47   |                               |                       |                       |                       |                      |
| V350  | V350-L15                      |                       | V350-N544             | V350-E690             |                      |
| D355  | D355-R41                      | D355-Y161             | D355-K543             | D344-V686             | D323-N1040           |
| F357  | F357-H10                      | F357-V58              | F357-T511             | F321-V686             | F357-V1039           |
| L382  | L382-Y44                      |                       | L348-N544             | L348-P688             |                      |
| Q384  | Q384-R45                      |                       | Q384-Q548             |                       |                      |
| F412  |                               |                       |                       |                       |                      |
| I438  |                               |                       | I421-Q478             |                       |                      |
| <b>Energía de afinidad <math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b> | -15.9                         | -12.4                 | -13.2                 | -16.6                 | -11.8                |
| <b>Kd (M) a 25°C</b>  | $2.2 \times 10^{-12}$         | $7.6 \times 10^{-10}$ | $2.1 \times 10^{-10}$ | $7.1 \times 10^{-13}$ | $2.4 \times 10^{-9}$ |

<sup>a</sup>Aminoácidos de EGFR que interactúan molecularmente con EGF {Ogiso et al., 2002}

<sup>b</sup>Todos los acoplamiento molecular fueron realizados mediante HDock y Prodigy server.



**Figura 7. Complejo de acoplamiento molecular e interacciones del receptor EGFR y su ligando EGF o d2. (A).** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de EGFR y EGF. EGFR y EGF están coloreados en gris/verde/amarillo y naranja respectivamente. **(B).** Interacciones de aminoácidos del receptor EGFR (verde/amarillo) con EGF (naranja). **(C)** Modelo tridimensional del acoplamiento molecular de EGFR (verde) y d2 (rojo). **(D).** Interacciones de aminoácidos del receptor EGFR (verde) con d2 (rojo). Los aminoácidos marcados en verde corresponden a lo reportado en la literatura, el mismo aminoácido y en la misma posición, mientras que, en amarillo, mismo aminoácido, pero en una posición muy cercana. Las interacciones de todos los acoplamientos fueron realizadas por la plataforma HDock.

## Identificación del *pocket* del receptor que se une a Pic

Con la finalidad de encontrar el *pocket* molecular del receptor PAR2, que parece ser el mejor candidato a unirse a Pic, medimos con la herramienta de Pymol, las distancias moleculares que existen entre cada uno de los aminoácidos que interaccionan con su ligando (Figura 8A) y con d1 (Figura 8B). El análisis de la posible interacción del ligando conocido en comparación con el subdominio d1, en el *pocket* de interacción del receptor PAR2, mostró una gran similitud entre ambos ligandos (d1 y 8UN). Además, las distancias moleculares que hay entre las interacciones del receptor con ambos ligandos por separado son muy similares entre sus valores (Tabla 21), lo que nos indica que muy posiblemente el receptor PAR2 se une con el subdominio d1.

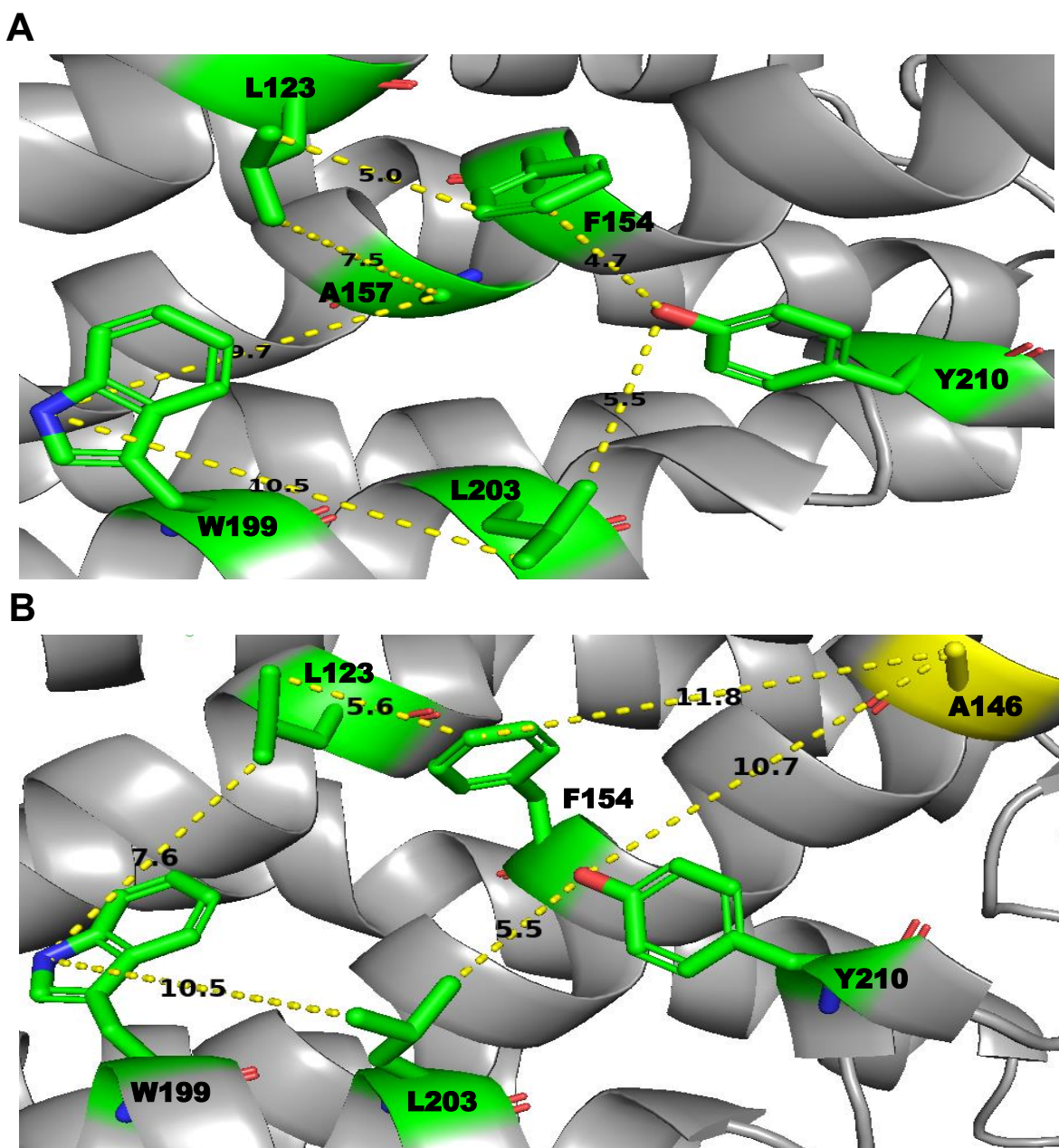
**Tabla 21. Distancias intermoleculares del bolsillo de unión de PAR2 y los ligandos (8UN y el subdominio d1)**

| Acoplamiento molecular | Relación entre los aminoácidos | Distancia molecular <sup>a</sup> (Å) |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| PAR2-8UN               | L123-F154                      | 5.0                                  |
|                        | L123-A157                      | 7.5                                  |
|                        | W199-L203                      | 10.5                                 |
|                        | W199-A157                      | 9.7                                  |
|                        | L203-Y210                      | 5.5                                  |
|                        | Y210-F154                      | 4.7                                  |
| PAR2-Subdominio d1     | L123-F154                      | 5.6                                  |
|                        | L123-A146                      | 11.8                                 |
|                        | W199-L203                      | 10.5                                 |
|                        | W199-L123                      | 7.6                                  |
|                        | L203-Y210                      | 5.5                                  |
|                        | Y210-A146                      | 10.7                                 |

<sup>a</sup>Las mediciones de las distancias intermoleculares fueron realizadas por Pymol.

La única diferencia radica en que, en la interacción con el d1, identificamos un aminoácido (A146) que está en una posición cercana (en amarillo) a lo reportado por la literatura, que es la A157, el cual se identificó en nuestra interacción de PAR2 y 8UN.

Por lo tanto, los resultados sugieren que existe un *pocket* molecular de PAR2 que podría unir a Pic.

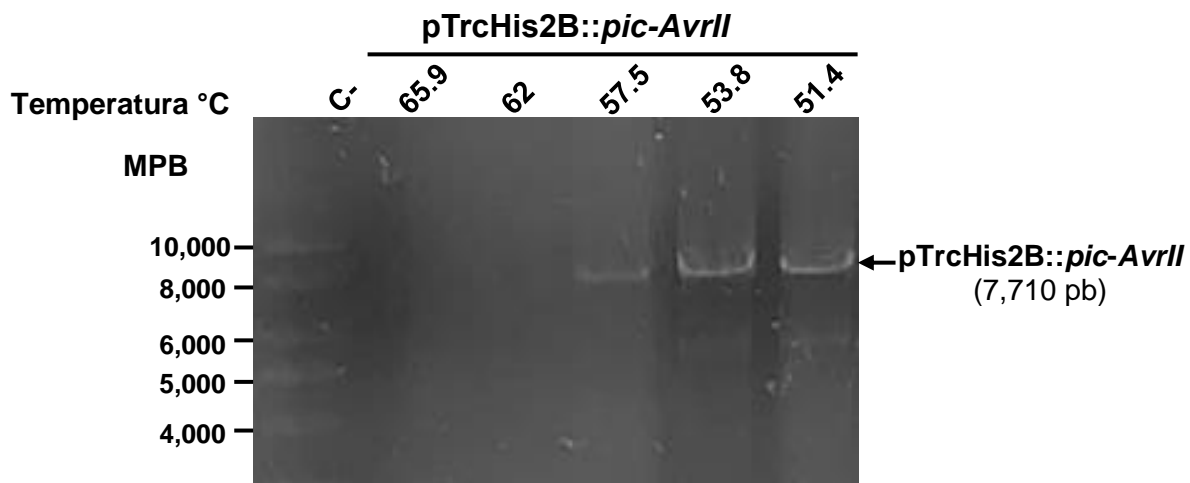


**Figura 8. Comparación del bolsillo (pocket) de unión de PAR2 en su acoplamiento con 8UN o d1. (A).** El bolsillo de unión de PAR2 con su ligando (8UN). **(B).** El bolsillo de unión de PAR2 con su d1. Los aminoácidos marcados en verde corresponden a lo reportado en la literatura, el mismo aminoácido y en la misma posición, mientras que, en amarillo, mismo aminoácido, pero en una posición muy cercana. Las interacciones de todos los acoplamientos fueron realizadas por la plataforma HDock. Las distancias moleculares fueron marcadas por líneas interrumpidas amarillas y fueron realizadas con la herramienta Pymol.

### Construcción de pTrcHis2B::*pic*Δd1

Debido a que el análisis bioinformático, nos indicó que los subdominios d1 y d2 son las posibles regiones de Pic que se unen al receptor, procedimos primero a realizar una mutante del subdominio d1 (HB101 pTrcHis2B::*pic*Δd1) para confirmar *in vitro* los resultados *in silico*.

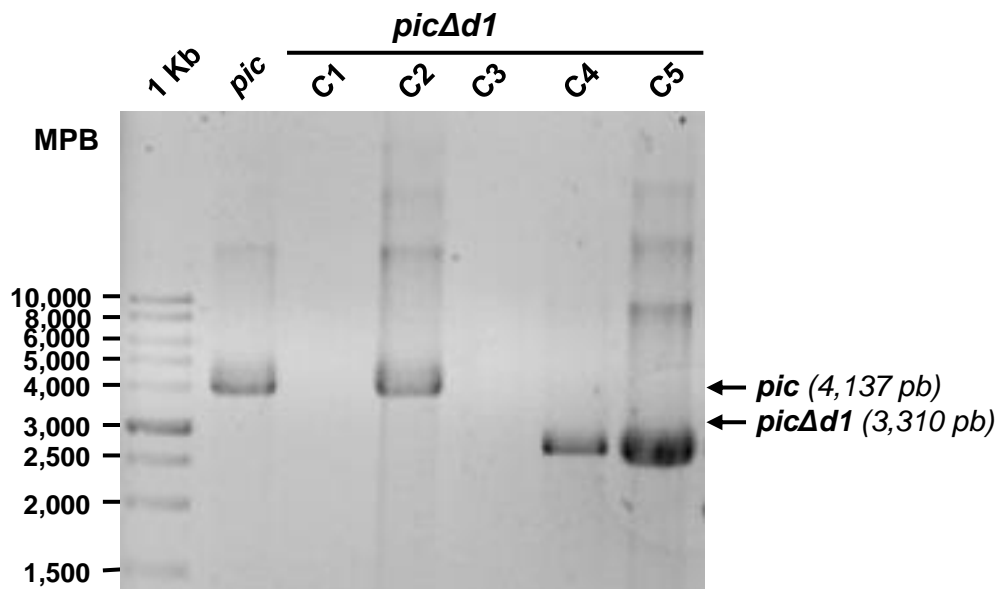
El gen *pic* esta clonado en pTrcHis2B (pTrcHis2B[*pic*]), por lo cual se diseñaron *primers* en dirección opuesta al inicio y final del subdominio d1 para poder amplificar todo el plásmido excluyendo el subdominio d1. Estos *primers* contenían los sitios *AvrII* para permitir la circularización del plásmido (pTrcHis2B::*pic*Δd1). Para lograr esto, primero realizamos un PCR utilizando un gradiente de temperatura de 51.4-65.9°C, el producto amplificado fue corrido en un gel de agarosa al 1% y observamos amplicones de 7,710 pb pertenecientes a pTrcHis2B::*pic*-*AvrII* en la temperatura de fusión de 57.5, 53.8 y 51.4°C (Figura 9).



**Figura 9. Amplificación por PCR del gen *pic* excluyendo el subdominio d1 del plásmido pTrcHis2B::*pic*-*AvrII* usando un gradiente de temperatura.** El ADN plasmídico (pTrcHis2B::*pic*) total fue extraído a partir de la cepa *E. coli* HB101, el ADN fue digerido con *AvrII* y separado por un gel de agarosa. Carril 1: marcador de pares de bases (MPB), carril 2: Control negativo: H<sub>2</sub>O (C-), carril 3-7: amplificación con el gradiente de temperatura; 65.9, 62, 57.5 53.8 y 51.4°C.

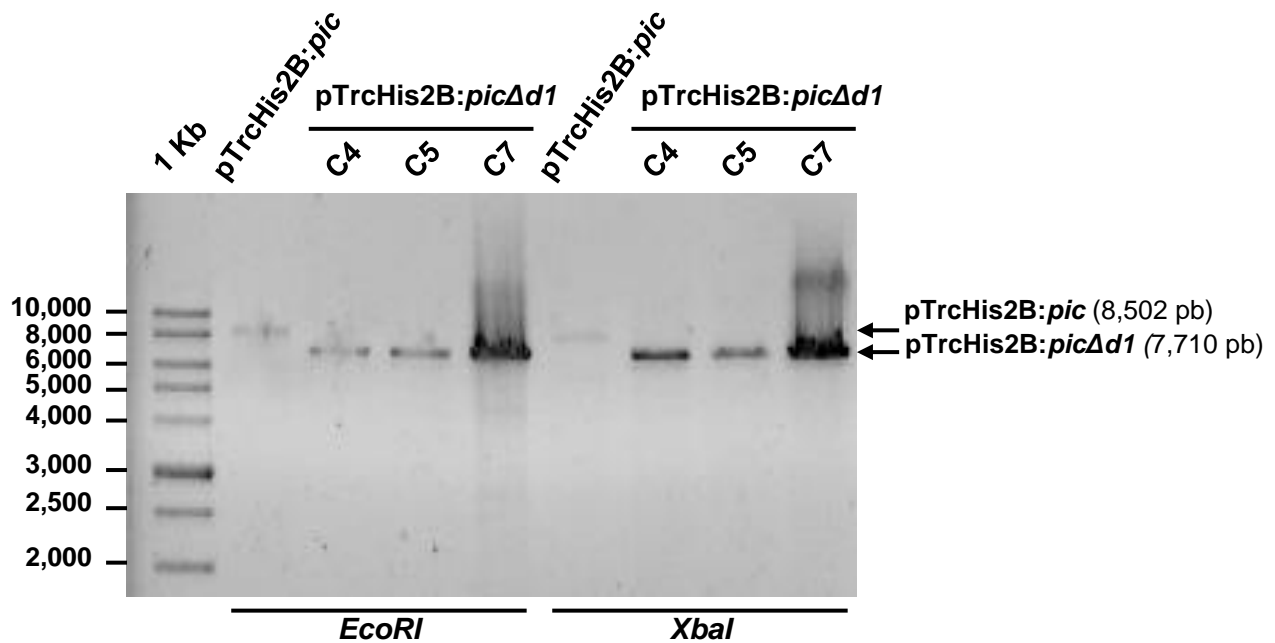
A partir del gel mencionado, cortamos las bandas que corresponden a 7,710 pb y purificamos el ADN plasmídico. Utilizamos bacterias *E. coli* HB101 competentes para llevar a cabo la transformación por el método de  $\text{CaCl}_2$  con el plásmido pTrcHis2B::*pic* $\Delta$ d1, seguido por la selección en medio LB suplementado con Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), como marcador de selección.

Para corroborar que HB101 se transformó con el plásmido, seleccionamos colonias que crecieron en el medio antes mencionado y extrajimos el ADN para determinar la presencia del gen *pic* en el plásmido pTrcHis2B::*pic* $\Delta$ d1 en dichas clonas por PCR utilizando los *primers* *pic*-pTrcF y *pic*-pTrc-R descritos en la Tabla 1. El fragmento amplificado fue corrido en un gel de agarosa al 1% y obtuvimos que las clonas 4 y 5 tienen el gen *pic* $\Delta$ d1 con la longitud esperada de 3,310 pb, calculado teóricamente y siendo más pequeño que el gen *pic* completo que tiene una longitud de 4,137 pb (Figura 10).



**Figura 10. Amplificación del gen *pic* y *pic* $\Delta$ d1 a partir de la cepa *E. coli* HB101.** HB101 fue transformado con pTrcHis2B::*pic* $\Delta$ d1 y se comprobó mediante PCR si las clonas tienen el gen *pic* $\Delta$ d1 y se comparó con la PCR del gen completo (*pic*). Carril 1: marcador de pares de bases (MPB), carril 2: *pic*, carril 3-7: clona 1 (C1), clona 2 (C2), clona 3 (C3), clona 4 (C4) y clona 5 (C5).

Realizamos una segunda verificación de que nuestras clonas tuvieran el plásmido *pTrcHis2B::picΔd1*. Para ello, se realizó una digestión enzimática con *EcoRI* y *XbaI* del plásmido purificado para linealizar los plásmidos de las clonas seleccionadas y determinar su tamaño; el tamaño esperado para el gen truncado clonado en el plásmido sería de 7,710 pb. En el gel de agarosa, se detectaron 3 clonas con bandas de aproximadamente 7,710 pb, lo cual corresponde con el tamaño del plásmido *pTrcHis2B::picΔd1* (Figura 11). Esto indica que las cepas HB101 podrán expresar la proteasa PicΔd1.



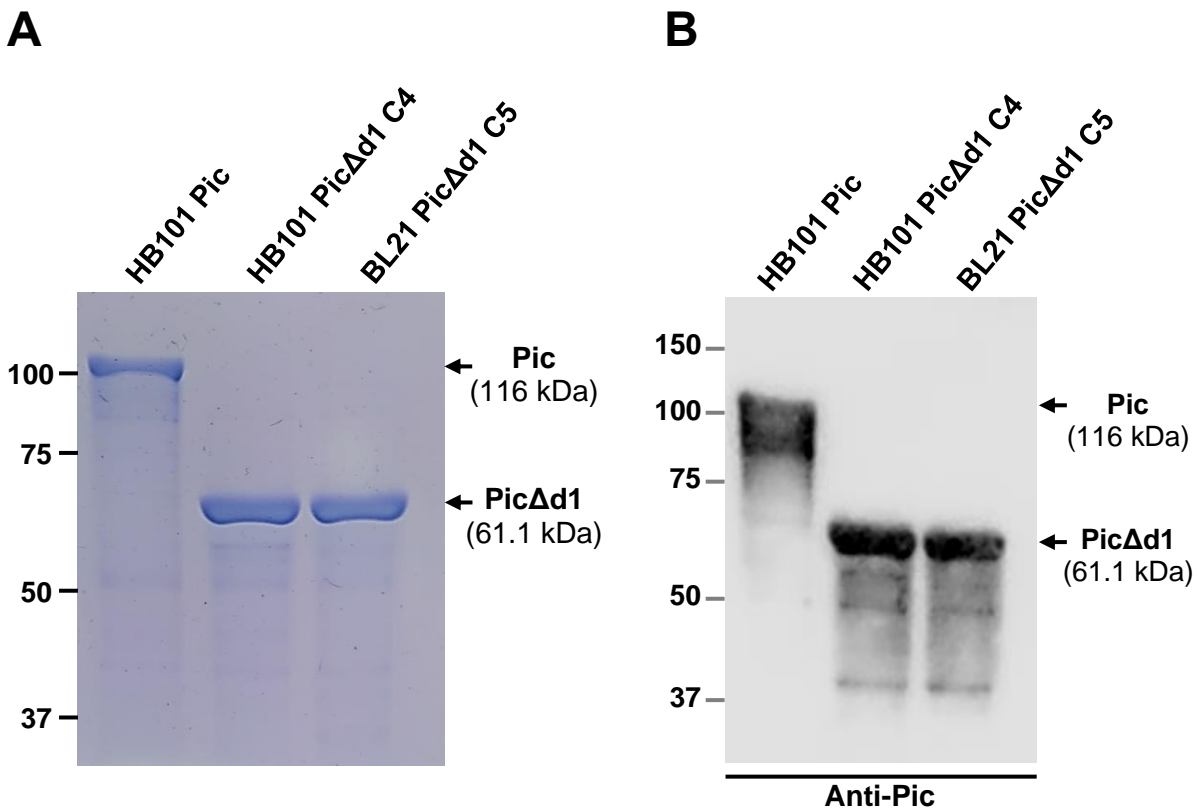
**Figura 11. Restricción enzimática del gen *pic* y *picΔd1* a partir de la cepa *E. coli* HB101.** HB101 fue transformado con *pTrcHis2B::picΔd1* y se comprobó mediante PCR si las clonas tienen el gen *picΔd1* mediante una doble restricción enzimática con *EcoRI* y *XbaI*. Carril 1: marcador de pares de bases (MPB), carril 2: *pic*, carril 3-7: clona 1 (C1), clona 2 (C2), clona 3 (C3), clona 4 (C4) y clona 5 (C5).

### Secreción de Pic y PicΔd1

Al confirmar que el plásmido contenía a *picΔd1*, procedimos a purificarlo y transformar en *E. coli* BL21 y HB101 para posteriormente, inducir la proteína con IPTG y



concentrarla en filtros de retención de 50 kDa ya que se esperaría una proteína Pic truncada de 82.6 kDa. Estos concentrados filtrados fueron corridos en un gel SDS-PAGE y analizados por Western Blot con un anticuerpo anti-Pic. El análisis mostró que la proteína Pic completa tiene un peso molecular de 116 KDa mientras que la mutante Pic $\Delta$ d1 mostró un peso molecular de 61.1 KDa en ambas cepas de *E. coli*, HB101 y BL21 (Figura 12). Interesantemente, no pudimos detectar la proteína de 82.6 kDa, lo que sugiere que la proteína se procesó de manera incompleta, por lo que fue necesario secuenciar la clona de *pic* truncada (*pic* $\Delta$ d1) en el plásmido donde se llevó a cabo la mutación.



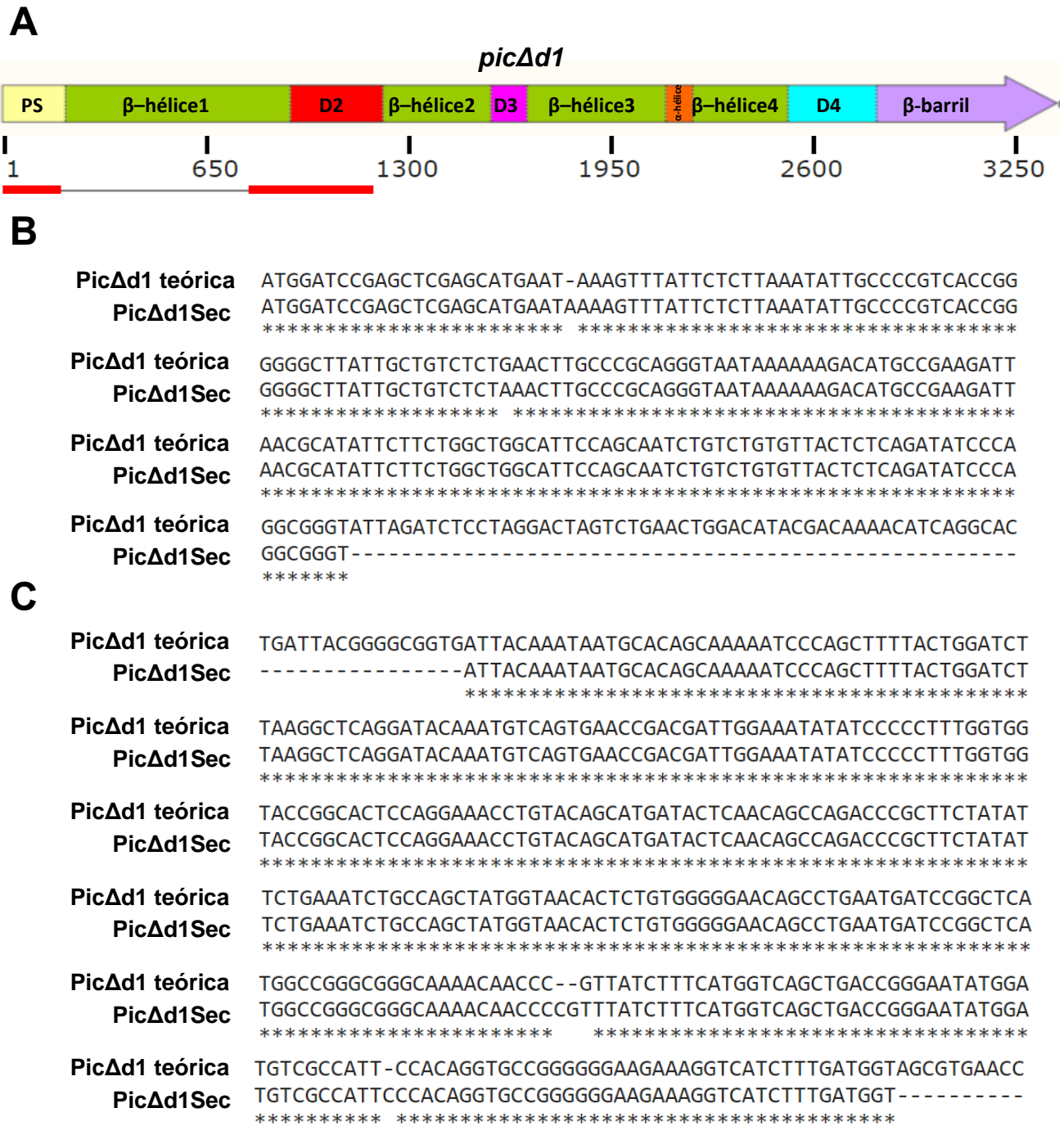
**Figura 12. Expresión y secreción de Pic, y Pic $\Delta$ d1 a partir de las cepas *E. coli* HB101 y BL21. (A).** SDS- PAGE de los sobrenadantes concentrados de proteína Pic, y Pic $\Delta$ d1 a partir de cultivos de HB101 y BL21 crecidos toda la noche. **(B).** Western Blot de Pic (S258I) y Pic $\Delta$ d1 a partir de clones de HB101 y BL21, estas proteínas se concentraron con un filtro de retención de 50 kDa. Las dos proteínas se detectaron mediante transferencia Western Blot con anticuerpos contra Pic. Carril 1: HB101 Pic (S258I), carril 2: HB101 Pic $\Delta$ d1 clona 4 (C4) y carril 3: BL21 Pic $\Delta$ d1 clona 5 (C5).



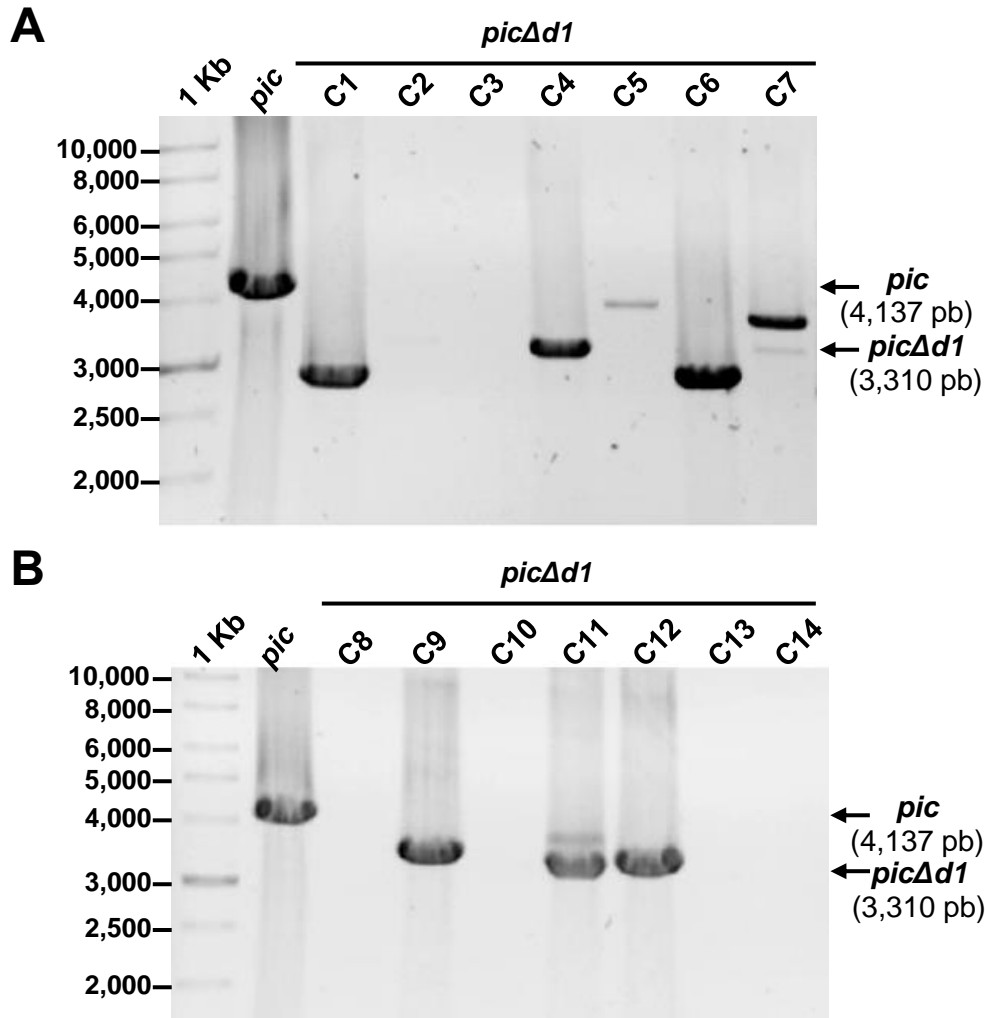
### **Secuenciación de *picΔd1***

La secuenciación del gen *picΔd1* se hizo a partir del ADN plasmídico de *E. coli* HB101/pTrcHis2B::*picΔd1* utilizando el secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Al obtener la secuencia, procedimos a realizar un alineamiento de *picΔd1* secuenciada (*picΔd1Sec*) y *picΔd1* teórica mediante la herramienta bioinformática MUSCLE. A partir de este alineamiento, notamos que se deletó tanto el subdominio d1 como 609 pb de la β-hélice 1 (Figura 13A).

Al analizar el alineamiento observamos que los primeros nucleótidos (incluyendo al péptido señal) son idénticos en ambas secuencias, sin embargo, en la posición nucleotídica 140 de *picΔd1Sec* existe un corte, posiblemente asociado a un corte erróneo dentro de la construcción pTrcHis2B::*picΔd1* (Figura 13A). Esto es debido a que en el DP Pic existe una deleción de alanina en la posición 25 de *picΔd1Sec* ocasionando un cambio en el marco de lectura, que deleta parte de la β-hélice 1 (Figura 13B). También hay una sustitución de nucleótidos de alanina a guanina en la posición 79, pero ésta no cambia el marco de lectura. Siguiendo con el análisis del alineamiento observamos que la última parte de la β-hélice 1 y el subdominio d2 siguen presentes en el gen, dando como resultado la proteína truncada de 61.1 kDa (Figura 13C).



**Figura 13. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de PicΔd1 teórica y PicΔd1 secuenciada. (A).** Mapa gráfico muestra que la región secuenciada (rojo) revela la delección de la β-hélice 1. **(B).** Alineamiento de la región del péptido señal muestra que los nucleótidos de la β-hélice 1 fueron deletados. **(C).** Segunda parte del alineamiento muestra que la última parte de la β-hélice 1 está presente, junto con el subdominio d2, indicando una pérdida de 609 pb. El alineamiento fue realizado con la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004).



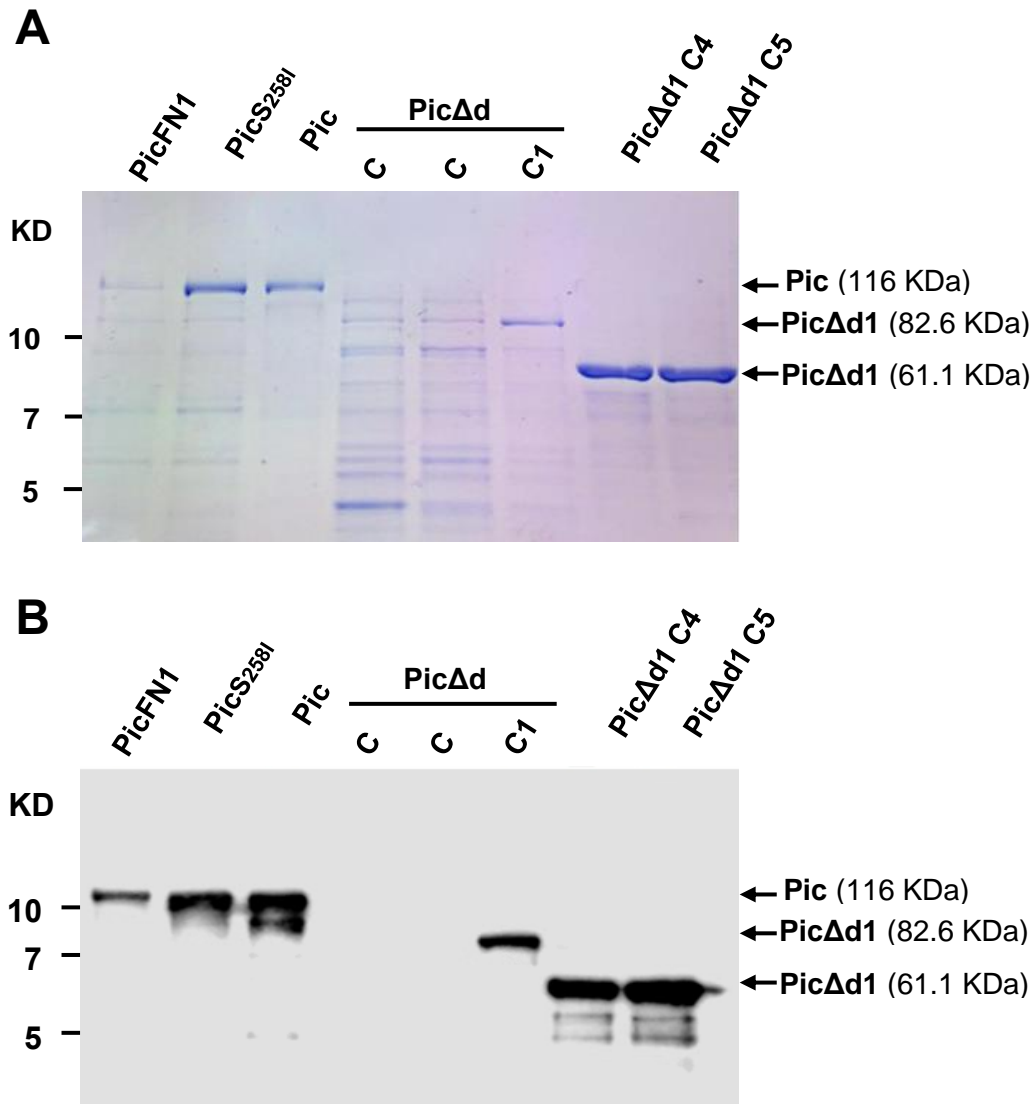
**Figura 14. Amplificación del gen *pic* y *picΔd1* a partir de la cepa *E. coli* BL21.** BL21 fue transformado con pTrcHis2B::*picΔd1*, se realizó una restricción enzimática con *XhoI* y *EcoRI* se comprobó mediante PCR si las clonas tienen el gen *picΔd1* y se comparó con la PCR del gen completo (*pic*). (A). Carril 1: marcador de pares de bases (MPB), carril 2: *pic*, carril 3-9: clona 1 (C1), clona 2 (C2), clona 3 (C3), clona 4 (C4), clona 5 (C5), clona 6 (6) y clona 7 (7). (B). Carril 1: marcador de pares de bases (MPB), carril 2: *pic*, carril 3-9: clona 8 (C8), clona 9 (C9), clona 10 (C10), clona 11 (C11), clona 12 (C12), clona 13 (13) y clona 14 (14).

### **Secreción de Pic y PicΔd1**

Al confirmar que los plásmidos contenían a *picΔd1* en las clonas C4, C7 y C12 de BL21, procedimos, a inducir la proteína con IPTG y concentrarla en filtros de retención de 50 kDa. Estos concentrados filtrados fueron corridos en un gel SDS-PAGE y analizados por Western Blot con un anticuerpo anti-Pic (Figura 15). El análisis mostró nuevamente que la proteína Pic completa tiene un peso molecular de 116 KDa mientras que la mutante PicΔd1 mostró un peso molecular de 82.6 KDa en la cepa de *E. coli* BL21 de la clona 12. Ahora que comprobamos que PicΔd1 tiene el peso molecular correcto, procedimos a realizar la secuenciación de la clona 12 para confirmar que el subdominio d1 fue deletado.

### **Secuenciación de *picΔd1***

El resultado de secuenciación del gen *picΔd1* lo comparamos junto con la secuencia de *picΔd1* teórico, mediante un alineamiento de las secuencias nucleotídicas hecho por BLAST (Zhang et al., 2000). En el alineamiento nos indica que tiene un porcentaje de identidad del 99.32%. Observamos que existen 3 mutaciones de sustitución que no cambian el marco de lectura y una inserción. Los sitios de restricción por *BglIII* (azul), *AvrII* (rojo) y *SpeI* (morado) están marcados en el alineamiento (Figura 16).



**Figura 15. Expresión y secreción de Pic, y PicΔd1 a partir de las cepas *E. coli* HB101 y BL21. (A).** SDS- PAGE de los sobrenadantes concentrados de proteína Pic, y PicΔd1 a partir de cultivos de HB101 y BL21 crecidos toda la noche. **(B).** Western Blot de Pic nativa, Pic (S258I) y PicΔd1 a partir de clones de HB101 y BL21, estas proteínas se concentraron con un filtro de retención de 50 kDa. Las tres proteínas se detectaron mediante transferencia Western Blot con anticuerpos contra Pic. Carril 1: HB101 Pic nativa, carril 2: Pic (S258I), carril 3: HB101 Pic nativa, carril 4: BL21 PicΔd1 clona 4 (C4), carril 5: BL21 PicΔd1 clona 7 (C7), carril 6: BL21 PicΔd1 clona 12 (C12), carril 7: HB101 PicΔd1 C4 clonación pasada (CP) y BL21 PicΔd1 C5 (CP).



## DISCUSIÓN

La patogenicidad de EAEC se debe principalmente a la secreción de proteínas y toxinas con actividades citotóxicas que provocan alteraciones citopatológicas. Entre estas proteínas se encuentra Pic, una serín proteasa que se ha demostrado que es un secretagogo de moco. Hasta el momento, no se conoce el receptor al cual se une Pic que activa la vía de transducción de señales de PLC, a su vez, activando la vía de calcio intracelular, lo que conduce a la producción de DAG y la liberación de IP3, un segundo mensajero de la señalización de calcio. En este trabajo estudiamos mediante acoplamiento molecular, los posibles receptores que se unen con DP Pic y la secuencia de aminoácidos de DP Pic que se une al receptor de células caliciformes, desencadenando la secreción rápida de moco.

### **Modelaje de DP Pic muestra 4 subdominios anclados a una $\beta$ -hélice estructural.**

El modelado de la estructura tridimensional del DP Pic (Figura 2) es muy similar a proteínas pertenecientes a la familia SPATEs. Los miembros pertenecientes a este grupo de proteínas están estrechamente relacionadas, que han desarrollado funciones específicas y distintas que se adaptan al nicho particular ocupado por el patógeno, aunque poseen una homología significativa del 40 al 100% a lo largo de la proteína completa (Henderson and Nataro, 2001). El modelaje de DP Pic realizado con Phyre2 presenta una  $\beta$ -hélice estructural en la que destacan pequeños bucles funcionales llamados subdominios d1, d2, d3 y d4. La  $\beta$ -hélice es el sello estructural de las proteínas autotransportadoras, y parece ser que estos subdominios les confieren funcionalidad (Yen et al., 2008).

La estructura tridimensional de DP Pic y el análisis con la plataforma DALI nos ayudó a identificar la posible función de los subdominios que conforman a esta proteasa (subdominios d1, d2, d3 y d4). El subdominio d1 es compartido con otras proteínas SPATEs debido a que este contiene el motivo serín proteasa (GDSGSP) que es altamente conservado y se encuentra en posiciones similares en las proteínas Pet (Djafari et al., 1997), Tsh (Czeczulin et al., 1999), EspP (Benz and Schmidt, 1992), EspC

(D'Souza et al., 1988) pertenecientes a *E. coli* y las proteínas pertenecientes a *Shigella*, ShMu (Elsinghorst and Weitz, 1994) y SepA (Crocquet-Valdes et al., 1994). Las funciones específicas de los subdominios d2 y d3 aún no se han dilucidado, sin embargo, el análisis bioinformático en DALI muestran que el subdominio d2 es similar estructuralmente a la quitinasa y el subdominio d3 no tiene similitud estructural con ningún subdominio de proteínas ya reportadas. En de la literatura se han reportado miembros de las SPATEs que contienen el subdominio d2 adoptando un pliegue similar al de la quitinasa como lo es la serín proteasa EspP, pero aún no se ha identificado su papel funcional (Khan et al., 2011) y la proteasa de hemoglobulina (Hbp) que tiene homología con la región de unión a quitina, pero la propiedad de adherencia aún no se ha confirmado (Otto et al., 2005).

Por último, el subdominio d4 es estructuralmente similar al dominio autochaperona, este dominio también es conocido como la región de unión e influye en el plegamiento y la secreción eficiente del dominio pasajero de un autotransportador a través de la membrana externa (Yen et al., 2008).

Una vez obtenida la estructura tridimensional del DP Pic y los receptores candidatos procedimos a realizar los acoplamientos moleculares, los cuales nos indicaron que el subdominio d1 de Pic era el mejor candidato para unirse al receptor de las células caliciformes y así, activar la vía de secreción rápida de mucinas.

### **Acoplamientos moleculares de los subdominios de DP Pic.**

Los receptores asociados a la secreción rápida de moco presentes en células caliciformes fueron considerados candidatos para ser el receptor de DP Pic, por lo que nos interesó predecir interacciones entre los diferentes subdominios de DP Pic y cada receptor utilizando técnicas de acoplamiento molecular. Para estandarizar los parámetros de acoplamiento molecular y validar el software empleado utilizamos los ligandos originales de cada receptor candidato. En el receptor A1R obtuvimos una concordancia perfecta entre los aminoácidos predichos y los reportados por la literatura (Glukhova et al., 2017) (Tabla 3) y el acoplamiento molecular muestra el *pocket* del receptor A1R y su interacción con el ligando DU1 (Figura 3A-B). De la misma forma,



obtuvimos una buena concordancia entre los aminoácidos identificados del receptor ALX/FPR2 con su ligando WKYMV (16 de 19 aminoácidos, Tabla 7). Debido a que la estructura de P2Y2R no se encuentra cristalizada y tuvo que ser modelada, los aminoácidos predichos fueron menos que los reportados por la literatura, obteniendo 10 de los 19 reportados (Shishikura et al., 2016) (Tabla 11). El acoplamiento entre PAR2 y su ligando 8UN fue igualmente bueno (6 de 7 aminoácidos) (Tabla 15). Finalmente, aunque el receptor EFGR ya está cristalizado, no obtuvimos una buena concordancia entre los aminoácidos que interactúan con el EGF y su receptor (16 de 29 aminoácidos, Tabla 19). Aunque los acoplamientos de los receptores con sus ligandos nativos no fueran perfectos, siempre obtuvimos buenos valores de energía de afinidad, entre  $-6.0$  y  $-15.9$  kcal/mol, que están dentro de los parámetros encontrados para otras moléculas, ya sea por acoplamientos moleculares o directamente por experimentación (Du et al., 2016).

Al haber estandarizado los acoplamientos moleculares, procedimos a realizar los acoplamientos con el DP Pic completa, con cada uno de sus subdominios, las  $\beta$ -hélices, la  $\alpha$ -hélice y regiones combinadas de  $\beta$ -hélices y sus subdominios contiguos correspondientes. El primer receptor que analizamos fue el A1R y al evaluar su acoplamiento con DP Pic completa encontramos que su energía de afinidad es menor a la de otros receptores con los que se evaluó ( $-13.2$  kcal/mol), además de que su constante de disociación ( $K_d$ ) fue de  $2.2 \times 10^{-10}$  M. Beaglehole et al. (2000) reportó la  $K_d$  de la interacción entre A1R y su ligando (DU1) que dio un valor de  $3.7 \times 10^{-10}$  M, cabe resaltar que en todos los acoplamientos que hicimos con el A1R y DP Pic (completo, subdominios,  $\beta$ -hélice,  $\alpha$ -hélice o conjunto entre subdominios y  $\beta$ -hélice) nos muestra una  $K_d$  similar a lo ya reportado, es decir nuestros acoplamientos podrían ser espontáneos.

Sólo 4 aminoácidos de A1R interaccionaban con el DP Pic, y estos no se ubicaron en una posición exacta. Al analizar el mismo receptor con cada subdominio de DP Pic, observamos que el d1 tenía la mayor afinidad ( $-11.4$ , Tabla 4), refiriéndonos que es más probable encontrar esta interacción en la naturaleza, aunque la energía de afinidad fue menor que con DP Pic completa. Del mismo modo, la  $K_d$  de esta interacción fue de  $4.7 \times 10^{-11}$  M, siendo este acoplamiento el más cercano al valor de  $K_d$  ya reportado para la

interacción de A1R y DU1,  $3.7 \times 10^{-10}$  M (Beauglehole et al., 2000) (Tabla 4). Por otro lado, al usar el d1 unido a la  $\beta$ -hélice 1 encontramos que la afinidad aumenta ( $-16.6$  kcal/mol, Tabla 6), lo que podría indicar que la  $\beta$ -hélice1 estabiliza la unión del subdominio d1 a este receptor, aunque se necesitarían experimentos deletando la  $\beta$ -hélice1 para comprobar estos datos bioinformáticos. Cabe resaltar que cuando se analizan sólo el subdominio d1 (Tabla 4) o la  $\beta$ -hélice1 (Tabla 5) se obtienen 4 aminoácidos que interaccionan con el receptor, sin embargo, si se unen ambas regiones solo interaccionan 2 aminoácidos (Tabla 6), probablemente debido al plegamiento predicho de la región d1- $\beta$ -hélice1. Al mapear las interacciones entre los aminoácidos de A1R y el subdominio d1 de DP Pic se observa que los 4 aminoácidos candidatos están relativamente cerca, posiblemente formando un pocket donde se lleve a cabo la interacción (Figura 3C-D).

La interacción del DP Pic con el receptor ALX/FRP2 presentó una mayor afinidad que con el receptor A1R ( $-14.6$  contra  $-13.2$  kcal/mol). Sin embargo, la  $K_d$  que obtuvimos de este acoplamiento fue de  $2 \times 10^{-11}$  M, parecida a la de  $7.5 \times 10^{-11}$  M que se reportó de la interacción de ALX/FPR2 con su ligando nativo WKYMV (Chen et al., 2020) (Tabla 7). Además, el WKYMV se une a una gran variedad de aminoácidos (Figura 4A-B), mientras que DP Pic sólo se une a 6 aminoácidos y éstos están en posiciones cercanas a los aminoácidos que interaccionan con el ligando nativo. De todas las pruebas de acoplamiento, ninguna tuvo la misma energía de afinidad y sólo el subdominio d2 se unió a dos aminoácidos que concordaban con el ligando natural (Tabla 8), aunque el modelaje de esta interacción mostró que 5 aminoácidos podrían formar un pocket de interacción con este subdominio (Figura 4C-D). Sin embargo, al comparar los valores de  $K_d$ , observamos una diferencia significativa en nuestro acoplamiento al tener un valor de  $3.2 \times 10^{-8}$  M para la interacción de ALX/FPR2 y el subdominio d2 comparado con el valor de  $7.5 \times 10^{-11}$  M de la interacción de ALX/FPR2 y su ligando ya reportada (Chen et al., 2020) (Tabla 8). Al hacer la interacción de ALX/FPR2 y el conjunto del subdominio d2-  $\beta$ -hélice2 se obtienen 7 aminoácidos interaccionando con el receptor (Tabla 10), sin embargo, todos estos aminoácidos no interaccionan en la misma posición que la del ligando natural, es decir la interacción mas fuerte con este receptor sigue siendo con el subdominio d2.

En el caso de los acoplamiento molecular de P2Y2R, en la interacción de este receptor con DP Pic obtuvimos la mejor energía de afinidad ( $-22.7$  kcal/mol, Tabla 11) de todas las interacciones que hicimos con los receptores candidatos y DP Pic. Sin embargo, en el caso de la  $K_d$ , el valor que obtuvimos fue de  $2.3 \times 10^{-17}$  M, con una gran diferencia a la  $K_d$  de  $8.2 \times 10^{-10}$  M reportado por Attah et al. (2020) de la interacción de P2Y2R con su ligando, UTP. Cabe resaltar que este receptor no tiene una estructura cristalizada reportada, por lo que tuvimos que modelarlo, por lo cual la diferencia en su  $K_d$  es predecible. A pesar de eso, se obtuvieron 6 aminoácidos de DP Pic en posiciones cercanas que interaccionaban con el receptor (Figura 5C-D) comparandolo con el acoplamiento de P2Y2R con UTP en donde hay 10 aminoácidos que interaccionan con dicho receptor (9 aminoácidos en la misma posición y 1 aminoácido en una posición cercana) mostrando un pocket de unión (Figura 5A-B). Además, la energía de afinidad de la interacción de P2Y2R y el subdominio d2 fue de  $-8.3$  kcal/mol y su  $K_d$  de  $7.7 \times 10^{-7}$  M (Tabla 12), un valor más cercano al reportado de  $8.2 \times 10^{-10}$  M (Attah et al., 2020), es decir este acoplamiento fue el que nos dio un mejor resultado respecto a los otros con el P2Y2R. Al hacer el acoplamiento con este receptor y el conjunto del subdominio d2 y la  $\beta$ -hélice1, observamos que la interacción es con 5 aminoácidos, mucho menor a lo que se había encontrado con el subdominio d2 (Tabla 14), esto podría deberse a que al ser más grande la región de la proteína hay un mayor impedimento estérico que afecta a la unión al receptor P2Y2R (Jin et al., 1994).

El acoplamiento molecular de DP Pic con PAR2, nos mostró que 5 de 7 aminoácidos interaccionaban con dicho receptor, sin embargo, la interacción es menor comparandolo con el acoplamiento de PAR2 y su ligando (8UN) en el cual hubo 6 de 7 aminoácidos formando un *pocket* de unión a dicho receptor (Figura 6A-B). Del mismo modo, el acoplamiento de DP Pic con PAR2 nos mostró una energía de afinidad de  $-12.6$  kcal/mol y una  $K_d$  de  $5.6 \times 10^{-10}$  M, comparandolo con la  $K_d$  de la interacción reportada de PAR2 con 8UN, de  $6.6 \times 10^{-6}$  M (Cheng et al., 2017), existe una diferencia significativa (Tabla 15). A pesar de esto, el acoplamiento de PAR2 con el subdominio d1 presentó mejores resultados, con 6 aminoácidos que interaccionan con el receptor (Figura 6C-D), una energía de afinidad un poco más baja que con DP Pic,  $-8.8$  kcal/mol, pero su  $K_d$  de  $3.6 \times 10^{-7}$  M se asemeja más a lo reportado ( $6.6 \times 10^{-6}$  M) (Tabla 16). Al igual, la

interacción de este receptor con la  $\beta$ -hélice4 mostró 6 aminoácidos que interaccionan con PAR2 (Tabla 17), sin embargo se ha reportado que la  $\beta$ -hélice es un andamio estructural de la preteína y solo los subdominios son los que confieren funcionalidad (Yen et al., 2008), por lo que hasta el momento, el subdominio d1 es el mejor candidato para unirse a PAR2. Al realizar la interacción de PAR2 con el conjunto del subdominio d1 y la  $\beta$ -hélice1 obtuvimos los 7 aminoácidos (5 aminoácidos en las mismas posiciones y 2 con posiciones cercanas) que interaccionan con el receptor, a pesar de que el pocket de unión es mejor que en la interacción con solo el subdominio d1, la  $K_d$  ( $2.1 \times 10^{-12}$  M) varía más a la  $K_d$  reportada ( $6.6 \times 10^{-6}$  M), por lo tanto el acoplamiento de PAR2 con el subdominio d1 sigue siendo el mejor de todas las interacciones antes predichas (Tabla 18).

La interacción de EGFR con DP Pic, encontramos que 5 aminoácidos interaccionan con el receptor, a diferencia con la interacción con su ligando (EGF) que se encontró 16 aminoácidos dentro de su *pocket* de unión (Figura 7A-B). A pesar de esto, la energía de afinidad de EGFR y DPPic fue de  $-14$  kcal/mol y su  $K_d$  fue de  $5.1 \times 10^{-11}$  M, comparado con la  $K_d$  reportada de la interacción de EGFR y su ligando EGF ( $6 \times 10^{-10}$  M) tiene un valor similar (Sanders et al., 2013). Al interaccionar el subdominio d2 con EGFR observamos una mayor interacción (12 aminoácidos) a comparación con DP Pic (Figura 7C-D), al igual que su  $K_d$   $2.1 \times 10^{-10}$  M que es más similar a lo ya reportado,  $6 \times 10^{-10}$  M (Tabla 20).

### **Los *pockets* de unión de PAR2 con ambos ligandos (8UN y el subdominio d1) son muy similares entre sí.**

De todos los acoplamientos moleculares que hicimos con los receptores candidatos y DP Pic, la mejor interacción fue entre el receptor PAR2 y el subdominio d1. Al realizar una comparación del bolsillo del unión de las interacciones de PAR2 con su ligando o con el subdominio d1 (Figura 8A-B) nos muestra que las distancias intermoleculares entre los aminoácidos que interaccionan, son muy similares entre ambos acoplamientos (Tabla 21). En de la literatura, se reportó que el anillo de 1,3-benzodioxol del ligando 8UN encaja en un bolsillo hidrofóbico creado por la L123 (2.52 Å), F154 (3.31 Å), A157 (3.34 Å), C161

(3.38 Å), W199 (4.50 Å) y L203 (4.54 Å), todos estos aminoácidos pertenecientes a PAR2. Mientras que la Y210 (4.61 Å) forma un enlace de enlace de hidrógeno débil (3,4 Å) con el nitrógeno de 8UN (Cheng et al., 2017). De tal forma, el subdominio d1 parece ser la región de DP Pic con mayor afinidad por el receptor PAR2.

### **Delección del subdominio d1 de DP Pic.**

Los acoplamientos moleculares nos indicaron que el subdominio d1 de Pic es el mejor candidato para unirse al receptor de las células caliciformes y así, activar la vía de secreción rápida de mucinas. Por lo tanto, para comprobar los resultados bioinformáticos obtenidos, construimos una mutante de Pic deletando el subdominio d1 (pTrcHis2B::*picΔd1*) para evaluar la función de la proteína como secretagogo. De las temperaturas de alineamiento probadas para amplificar el gen truncado, obtuvimos una mayor amplificación a 51.4 °C, lo que concuerda con un estudio que describió que con *primers* con un alto contenido de adenina y timina, las temperaturas óptimas de alineación están por debajo de 60°C utilizando la polimerasa HIFi Kappa (Nagai et al., 2022). Se esperaba que las clonas transformantes con *picΔd1* amplificaran un fragmento de 3,310 pb, sin embargo, las clonas 4 y 5 amplificaron un fragmento ligeramente menor de unos 2,600 pb aproximadamente (Figura 10). La clona 5 presenta mayor cantidad de amplicón que la clona 4, lo cual podría ser efecto de errores técnicos al no colocar la misma cantidad de muestra de ADN plasmídico en el *mastermix*. En cuanto a las clonas 1 y 3, no tuvieron ninguna amplificación, que igualmente el error puede ser técnico, o el plásmido se cortó en un lugar diferente y se eliminó el gen *pic*. Debido a esto, hicimos una segunda verificación de la mutante mediante una digestión enzimática con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* por separado para linealizar los plásmidos de las clonas 4, 5 y 7 (Figura 11) y concluyeron que el plásmido pTrcHis2B::*picΔd1* linealizado tiene una longitud de 7,710 pb. Henderson et al. (1999) reportaron por primera vez que el gen *pic* tiene un tamaño de 4,137 pb, de los cuales el dominio serín proteasa (d1) tiene una longitud de 792 pb. Al clonar *pic* en pTrc, la construcción tuvo una longitud de 8,502 pb y al eliminar el d1 la construcción pTrcHis2B::*picΔd1* debería ser de 7,710 pb. Sin embargo, al hacer el corte notamos que el plásmido linealizado tiene una longitud de unos 6,500

pb aproximadamente, por lo que faltan unos 1,200 bp, lo que ayuda a justificar los pb faltantes durante la PCR (Figura 10).

Al obtener la construcción pTrcHis2B::*picΔd1*, procedimos a realizar la secreción, purificación y concentración de PicΔd1 y Pic a partir de *E. coli* BL21 y HB101. La secreción de la proteasa Pic tuvo un peso molecular de 116 KDa que corresponde a lo ya reportado en la literatura (Flores-Sanchez et al., 2020; Henderson et al., 1999; Navarro-Garcia et al., 2010), sin embargo, en la secreción de PicΔd1 presentó un peso molecular de 61.1 KDa que no corresponde al peso molecular calculado en el programa bioinformático *ExPASy compute PI/Mw tool* (Gasteiger et al., 2005) dándonos una estimación de 82.6 KDa de la proteína mutante (Figura 12). El peso menor de PicΔd1, la longitud menor del amplicón de *pic* y el menor tamaño del plásmido pTrcHis2B::*picΔd1* linealizado con XbaI/EcoRI indican un posible corte erróneo y la pérdida de una región fuera del subdominio d1. Pese a que la proteína está truncada, sigue teniendo una buena secreción y ésta fue incluso mayor que la de Pic, lo que refiere que sigue teniendo un buen procesamiento para su secreción.

Para confirmar la región faltante del plásmido pTrcHis2B::*picΔd1*, secuenciamos el gen *picΔd1* (*picΔd1Sec*) y posteriormente, hacer un alineamiento de *picΔd1Sec* y *picΔd1* teórica en MUSCLE (Edgar, 2004) el cual nos indicó que los primeros 140 nucleótidos de ambos genes son idénticos, a excepción de la deleción en la posición 25, lo que cambiaría el marco de lectura y produciría una proteína truncada. También hay una mutación A/G en la posición 79, pero no se cambia el marco de lectura (Figura 13). La región correspondiente a la β-hélice1 está deletada en esta construcción, faltando 609 pb, correspondiendo a unos 20.9 kDa, lo que explica que la proteína secretada tenga un peso de aproximadamente 60 kDa en vez de los 82 kDa que debería tener según la secuencia teórica.

Como las clonas analizadas producían proteínas que tenían una deleción del subdominio d1 así como de la β-hélice 1, decidimos repetir el procedimiento de deleción del subdominio d1 por PCR inversa. De las clonas transformantes analizamos 14 por PCR y encontramos que la C4, la C7 y la C12 producían amplicones de una longitud de unos 3,310 pb (Figura 14), por lo que probamos la secreción de PicΔd1 y encontramos que la C12 secretaba una proteína de unos 82 kDa, lo cual coincide con el peso teórico

del DP de Pic $\Delta$ d1 (Figura 15). Esta proteína también fue reconocida utilizando anti Pic, lo que apoya la noción de que la proteína secretada era en realidad Pic $\Delta$ d1, sin embargo, para asegurarnos de que el corte había sido en el sitio correcto decidimos secuenciar nuevamente la región 3' de pic $\Delta$ d1. Los resultados mostraron que el gen pic tenía los sitios de corte AvrII, BglII y SpeI y que se había deletado correctamente el subdominio d1 (Figura 16). Aunque los sitios de corte estén presentes, existen 3 sustituciones y una deleción, aunque ésta última se encuentra en la región más al extremo del amplicón secuenciado, lo que podría indicar que se trata de un error de secuenciación ya que los extremos de fragmentos largos tienen menores intensidades de fluorescencia (Platt et al., 2007). Las 3 sustituciones restantes (A312/G; T316/C y A405/C) no cambian el marco de lectura de la proteína. Las primeras dos sustituciones (A312/G; T316/C) son mutaciones silenciosas ya que no cambian el aminoácido codificado, sin embargo la tercera sustitución A405/C cambia la treonina 72 por una prolina. De acuerdo con Li et al. (1996) las prolinas son fuertes disruptores tanto de las  $\beta$ -hélices como de las  $\alpha$ -hélices, por lo que este cambio podría traer consecuencias en el plegamiento de Pic $\Delta$ d1, aunque en los experimentos de secreción no vimos una alteración en la secreción de la proteína (Figura 15).

Los acoplamientos moleculares nos permitieron encontrar que el mejor candidato a ser el receptor fue PAR2 y la región a la cual se podría unir del DP Pic es el subdominio d1. Además, en 3 acoplamientos moleculares con los receptores ALX/FPR2, P2Y2R y EGFR encontramos que el subdominio d2 es el que se uniría a dichos receptores, por lo cual realizar una construcción deletando dicho subdominio sería importante para validar los resultados bioinformáticos.

La construcción pTrcHis2B::*pic* $\Delta$ d1 se realizó con el fin de saber si el subdominio d1 es la que se une al receptor PAR2. Para comprobar esto, utilizaremos un cultivo de células LS174T que se expondrán a la proteína Pic nativa que sabemos desencadena la secreción rápida de moco, sin embargo, al agregar Pic $\Delta$ d1 no debe haber secreción de mucinas en dado caso que sea el subdominio d1 quien active la secreción de moco. En caso de que Pic $\Delta$ d1 siga aumentando la secreción de mucinas, se evaluará la función del subdominio d2 como posible ligando de receptores promotores a la secreción de mucinas.

Por último, con la finalidad de saber si PAR2 es el receptor que desencadena la secreción de moco en las células caliciformes, procederemos a relizar un experimento en el cual a células LS174T tendrán una preincubación con un antagonista de PAR2, para posteriormente agregarles a Pic nativa, si no existe secreción de moco, refiere a que este receptor es el que se une a DP Pic para desencadenar la secreción de mucinas.

## CONCLUSIONES

1. En este trabajo obtuvimos el modelo tridimensional del DP Pic.
2. Los acoplamientos moleculares identificaron la interacción de:
  - A1R con el subdominio d1
  - ALX/FPR2 con el subdominio d2
  - P2Y2R con el subdominio d2
  - PAR2 con el subdominio d1
  - EGFR con el subdominio d2
3. El mejor acoplamiento molecular fue con PAR2 y el subdominio d1 de DP Pic, en el cual identificamos 5 aminoácidos del receptor que están reportados en la literatura y un aminoácido que están en una posición muy cercana.
4. Existe un *pocket* en PAR2 en donde se une d1 de DP Pic, similar a su ligando natural.
5. Tanto el subdominio d1 como el subdominio d2 podría ser la posible secuencia en Pic que interacciona con el receptor para permitir la señalización que lleva a la activación de la vía de señalización PLC/ IP3-DAG.
6. Se logró la delección del subdominio d1. Posteriormente, *E. coli* HB101 Y BL21 fueron transformados con el plásmido con pTrcHis2B::*picΔd1*.
7. La mutante PicΔd1 mostró un peso molecular de 82.6 KDa en la cepa de *E. coli* BL21.



## PERSPECTIVAS

En este trabajo realizamos la construcción de pTrcHis2B::*picΔd1* en *E. coli* HB101 y BL21 para obtener la proteína mutante PicΔd1, ya que en el mejor acoplamiento molecular observamos que el subdominio d1 es la región a la cual se une el receptor PAR2, a nivel bioinformático. Por lo tanto, para comprobar esto *in vitro*, necesitaremos utilizar esta mutante en un cultivo de células de LS174T y comprobar que la secreción de moco es nula, a diferencia de Pic nativa que se ha comprobado que propicia la secreción rápida de mucinas (Flores-Sanchez et al., 2020).

En el caso de identificar el receptor que desencadena la vía de PLC/DAG-IP3/Calcio a través de Pic, se utilizará antagonistas del receptor PAR2 preincubados en las células LS174T, después incubarlas con Pic nativa y cuantificar la secreción de mucinas, si nuestras predicciones con los acoplamientos son ciertas, este receptor será el que se una a Pic y propiciará la secreción rápida de moco.

En caso de que el subdominio d1 no sea la región a la cual se une el receptor, observamos que el subdominio d2 también interaccionaba con buena afinidad a los receptores ALX/FPR2, P2Y2R y EGFR. Por lo tanto, construir la mutante PicΔd2 nos ayudaría a comprobar si el subdominio d2 interacciona con el receptor que desencadena la secreción rápida de mucinas.

## BIBLIOGRAFÍA

Adachi, J.A., Ericsson, C.D., Jiang, Z.-D., DuPont, M.W., Pallegar, S.R., and DuPont, H.L. (2002). Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *Journal of Infectious Diseases* 185, 1681-1683.

Adler, K.B., Tuvim, M.J., and Dickey, B.F. (2013). Regulated mucin secretion from airway epithelial cells. *Frontiers in endocrinology* 4, 129.

Aranda-Michel, J., and Giannella, R.A. (1999). Acute diarrhea: a practical review. *The American journal of medicine* 106, 670-676.

Attah, I.Y., Neumann, A., Al-Hroub, H., Rafehi, M., Baqi, Y., Namasivayam, V., and Müller, C.E. (2020). Ligand binding and activation of UTP-activated G protein-coupled P2Y2 and P2Y4 receptors elucidated by mutagenesis, pharmacological and computational studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1864, 129501.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 19-33.

Beaglehole, A.R., Baker, S.P., and Scammells, P.J. (2000). Fluorosulfonyl-substituted xanthines as selective irreversible antagonists for the A1-adenosine receptor. *Journal of medicinal chemistry* 43, 4973-4980.

Behrens, M., Sheikh, J., and Nataro, J.P. (2002). Regulation of the overlapping pic/set locus in *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 70, 2915-2925.

Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1995). SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Molecular microbiology* 17, 123-135.

Benz, I., and Schmidt, M.A. (1992). AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of

the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126: H27), is synthesized via a precursor molecule. *Molecular microbiology* 6, 1539-1546.

Benz, I., and Schmidt, M.A. (2011). Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 461-468.

Birchenough, G.M., Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., and Hansson, G. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal immunology* 8, 712-719.

Chen, T., Xiong, M., Zong, X., Ge, Y., Zhang, H., Wang, M., Won Han, G., Yi, C., Ma, L., and Ye, R.D. (2020). Structural basis of ligand binding modes at the human formyl peptide receptor 2. *Nature communications* 11, 1-9.

Cheng, R.K., Fiez-Vandal, C., Schlenker, O., Edman, K., Aggeler, B., Brown, D.G., Brown, G.A., Cooke, R.M., Dumelin, C.E., and Doré, A.S. (2017). Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2. *Nature* 545, 112-115.

Corfield, A.P., Carroll, D., Myerscough, N., and Probert, C.S. (2001). Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 6, 1321-1357.

Crocquet-Valdes, P.A., Weiss, K., and Walker, D. (1994). Sequence analysis of the 190-kDa antigen-encoding gene of *Rickettsia conorii* (Malish 7 strain). *Gene* 140, 115-119.

Czeczulin, J.R., Whittam, T.S., Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J.P. (1999). Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 67, 2692-2699.

D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H., Burke, T.A., Lam, S.C.-T., and Plow, E.F. (1988). Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* 242, 91-93.

Davis, C.W., and Dickey, B.F. (2008). Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annual review of physiology* 70, 487-512.

Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall III, W.B., Snoeyink, J., and Richardson, J.S. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research* 35, W375-W383.

Deplancke, B., and Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American journal of clinical nutrition* 73, 1131S-1141S.

Deshmukh, H.S., Case, L.M., Wesselkamper, S.C., Borchers, M.T., Martin, L.D., Shertzer, H.G., Nadel, J.A., and Leikauf, G.D. (2005). Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171, 305-314.

Djafari, S., Ebel, F., Deibel, C., Krämer, S., Hudel, M., and Chakraborty, T. (1997). Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 25, 771-784.

Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., and Liu, S.-Q. (2016). Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International journal of molecular sciences* 17, 144.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-1797.

Elsinghorst, E.A., and Weitz, J.A. (1994). Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infection and immunity* 62, 3463-3471.

Flores-Sanchez, F., Chavez-Dueñas, L., Sanchez-Villamil, J., and Navarro-Garcia, F. (2020). Pic Protein From Enteroaggregative *E. coli* Induces Different Mechanisms for Its Dual Activity as a Mucus Secretagogue and a Mucinase. *Frontiers in immunology*, 2963.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011).

International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacological reviews* 63, 1-34.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (Springer).

Glukhova, A., Thal, D.M., Nguyen, A.T., Vecchio, E.A., Jörg, M., Scammells, P.J., May, L.T., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2017). Structure of the adenosine A1 receptor reveals the basis for subtype selectivity. *Cell* 168, 867-877. e813.

Henderson, I.R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., and Nataro, J.P. (1999). Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 67, 5587-5596.

Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and immunity* 69, 1231-1243.

Hodges, R.R., Li, D., Shatos, M.A., Bair, J.A., Lippestad, M., Serhan, C.N., and Dartt, D.A. (2017). Lipoxin A4 activates ALX/FPR2 receptor to regulate conjunctival goblet cell secretion. *Mucosal immunology* 10, 46-57.

Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer* 4, 45-60.

Holm, L. (2020). Using Dali for protein structure comparison. In *Structural Bioinformatics* (Springer), pp. 29-42.

Huang, D.B., Mohanty, A., DuPont, H.L., Okhuysen, P.C., and Chiang, T. (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology* 55, 1303-1311.

Jeong, Y.S., and Bae, Y.-S. (2020). Formyl peptide receptors in the mucosal immune system. *Experimental & Molecular Medicine* 52, 1694-1704.

Jin, X., Talbot, J., and Wang, N.H.L. (1994). Analysis of steric hindrance effects on adsorption kinetics and equilibria. *AIChE journal* 40, 1685-1696.

Johansson, M. (2013). Sjövall H., Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 352-361.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology* 2, 123-140.

Kawabata, A. (2002). PAR-2: structure, function and relevance to human diseases of the gastric mucosa. *Expert reviews in molecular medicine* 4, 1-17.

Kawabata, A. (2003). Gastrointestinal functions of proteinase-activated receptors. *Life sciences* 74, 247-254.

Kawabata, A., Kinoshita, M., Nishikawa, H., Kuroda, R., Nishida, M., Araki, H., Arizono, N., Oda, Y., and Kakehi, K. (2001). The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *The Journal of clinical investigation* 107, 1443-1450.

Khan, S., Mian, H.S., Sandercock, L.E., Chirgadze, N.Y., and Pai, E.F. (2011). Crystal structure of the passenger domain of the *Escherichia coli* autotransporter EspP. *Journal of molecular biology* 413, 985-1000.

Kaye, R., Botten, N., Lippestad, M., Li, D., Hodges, R.R., Utheim, T.P., Serhan, C.N., and Dartt, D.A. (2019). Resolvin D1, but not resolvin E1, transactivates the epidermal growth factor receptor to increase intracellular calcium and glycoconjugate secretion in rat and human conjunctival goblet cells. *Experimental eye research* 180, 53-62.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols* 10, 845-858.

Kufe, D.W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer* 9, 874-885.

Li, S.-C., Goto, N.K., Williams, K.A., and Deber, C.M. (1996). Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 6676-6681.

Lippestad, M., Hodges, R.R., Utheim, T.P., Serhan, C.N., and Dartt, D.A. (2017). Resolvin D1 increases mucin secretion in cultured rat conjunctival goblet cells via multiple signaling pathways. *Investigative ophthalmology & visual science* 58, 4530-4544.

Liu, C., Li, Q., Zhou, X., Kolosov, V.P., and Perelman, J.M. (2013). Human airway trypsin-like protease induces mucin5AC hypersecretion via a protease-activated receptor 2-mediated pathway in human airway epithelial cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 535, 234-240.

Liu, L., Saitz-Rojas, W., Smith, R., Gonyar, L., In, J.G., Kovbasnjuk, O., Zachos, N.C., Donowitz, M., Nataro, J.P., and Ruiz-Perez, F. (2020). Mucus layer modeling of human colonoids during infection with enteroaggregative *E. coli*. *Scientific Reports* 10, 10533.

Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., and Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews* 53, 245-282.

McNamara, N., Gallup, M., Khong, A., Sucher, A., Maltseva, I., Fahy, J.V., and Basbaum, C. (2004). Adenosine up-regulation of the mucin gene, MU2, in asthma. *The FASEB journal* 18, 1770-1772.

Morris, G.M., and Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (Springer), pp. 365-382.

Nadel, J.A. (2001). Role of epidermal growth factor receptor activation in regulating mucin synthesis. *Respiratory research* 2, 1-5.

Nagai, S., Sildever, S., Nishi, N., Tazawa, S., Basti, L., Kobayashi, T., and Ishino, Y. (2022). Comparing PCR-generated artifacts of different polymerases for improved accuracy of DNA metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 6, e77704.

Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology*

reviews 11, 142-201.

Navarro-Garcia, F., and Elias, W.P. (2011). Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut microbes* 2, 13-24.

Navarro-Garcia, F., Gutierrez-Jimenez, J., Garcia-Tovar, C., Castro, L.A., Salazar-Gonzalez, H., and Cordova, V. (2010). Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infection and immunity* 78, 4101-4109.

Nelson, J.W., Leigh, N.J., Mellas, R.E., McCall, A.D., Aguirre, A., and Baker, O.J. (2014). ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306, C178-C185.

Nishikawa, H., and Kawabata, A. (2003). Modulation of gastric function by proteinase-activated receptors. *Drug development research* 60, 9-13.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., and Shirouzu, M. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.

Otto, B.R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J.G., Mizutani, K., Park, S.-Y., and Tame, J.R. (2005). Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 17339-17345.

Parr, C.E., Sullivan, D.M., Paradiso, A.M., Lazarowski, E.R., Burch, L.H., Olsen, J.C., Erb, L., Weisman, G.A., Boucher, R.C., and Turner, J.T. (1994). Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 3275-3279.

Perin, J., Mulick, A., Yeung, D., Villavicencio, F., Lopez, G., Strong, K.L., Prieto-Merino, D., Cousens, S., Black, R.E., and Liu, L. (2022). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the



Sustainable Development Goals. *The Lancet Child & Adolescent Health* 6, 106-115.

Platt, A.R., Woodhall, R.W., and George Jr, A.L. (2007). Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques* 43, 58-62.

Ríos, J.D., Shatos, M.A., Urashima, H., and Dartt, D.A. (2008). Effect of OPC-12759 on EGF receptor activation, p44/p42 MAPK activity, and secretion in conjunctival goblet cells. *Experimental eye research* 86, 629-636.

Sanders, J.M., Wampole, M.E., Thakur, M.L., and Wickstrom, E. (2013). Molecular determinants of epidermal growth factor binding: a molecular dynamics study. *PloS one* 8, e54136.

Shishikura, Y., Koarai, A., Aizawa, H., Yamaya, M., Sugiura, H., Watanabe, M., Hashimoto, Y., Numakura, T., Makiguti, T., and Abe, K. (2016). Extracellular ATP is involved in dsRNA-induced MUC5AC production via P2Y2R in human airway epithelium. *Respiratory Research* 17, 1-14.

Xue, L.C., Rodrigues, J.P., Kastritis, P.L., Bonvin, A.M., and Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics* 32, 3676-3678.

Yan, Y., Tao, H., He, J., and Huang, S.-Y. (2020). The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nature protocols* 15, 1829-1852.

Yasuda-Onozawa, Y., Handa, O., Naito, Y., Ushiroda, C., Suyama, Y., Toyokawa, Y., Murakami, T., Yasuda, T., Ueda, T., and Majima, A. (2017). Rebamipide upregulates mucin secretion of intestinal goblet cells via Akt phosphorylation. *Molecular Medicine Reports* 16, 8216-8222.

Yen, Y.T., Kostakioti, M., Henderson, I.R., and Stathopoulos, C. (2008). Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends in microbiology* 16, 370-379.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning

DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 7, 203-214.